

ABSTRACT

Early-onset periodontitis (EOP) is one such syndrome and comprises a group of pathological conditions leading to loss of periodontal tissues early in life. It occurs in children, teenagers and young adults which causes considerable tissue damage over a relatively short period of time. In the case of rapid progression of the destructive disease, early loss of teeth may result. At present, the pathogenesis of EOP is not clearly understood, however, it shares a common underlying mechanisms by other forms of periodontitis. The primary etiologic agents of periodontitis are Gram negative bacteria in dental plaque, such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, and their products such as lipopolysaccharide (LPS). Host immune response to bacterial plaque pathogens, in fact, plays a crucial role in determining the outcome and severity of the disease.

Periodontitis lesions consist of a large number of infiltrating cells such as T cells, B cells and macrophages which are in activated stage. Major effort during the past decade has been focused on immunoregulatory role of T cells and their cytokines which have been well recognized for their important involvement in the pathogenesis of periodontitis. Although B cells are the majority in advanced periodontal lesions, there is no study so far able to clarify their role in the pathogenesis of the disease. It is known that B cells are recognized as one of the professional antigen presenting cells (APCs). To date, the role of APCs, which critically controls the initiation and maintenance of T cell response, has been poorly investigated in periodontitis. Langerhan's cells, keratinocytes in oral epithelium as well as tissue macrophages have been largely speculated to play role as local APCs. It is known that activation stage of APCs associated with up-regulation of co-stimulatory molecule expression (CD40, CD80, and CD86) is a key factor to trigger and maintain optimal T cell response. In this study we analyzed the expression of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) and CD83, a marker of mature dendritic cells, on gingival cells isolated from severe periodontitis tissues by flow cytometry. Significant up-regulation of CD86 and CD83 expression were detected in periodontitis lesions and the majority of them were observed on B cells. *In vitro* peripheral blood mononuclear cell cultures showed that stimulation with different periodontopathic bacteria including *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Actinomyces viscosus*

up-regulated both CD86 and CD83 expression on B cells. Hence, the presence of plaque bacteria may be responsible for enhanced expression on gingival B cells as seen *in vivo*. APC function by bacterial activated B cells was further investigated using allogeneic mixed leukocyte reactions (MLR). After 24h culture with either *A. actinomycetemcomitans* or *P.gingivalis*, these activated B cells performed as potent APCs in MLR and stimulated T cells to produce high levels of gamma Interferon (IFN- γ) and minimal Interleukin-5. In conclusion, periodontopathic bacterial induced B cell activation with up-regulation of CD86 and CD83 may associate with enhanced APC function. Therefore, the results of this study put forward the role of infiltrated gingival B cells as possible APCs in regulating and sustaining local T cell response in periodontitis.

Early-onset periodontitis was described by the consensus report on periodontal diagnosis presented at the 1989 World Workshop in Clinical Periodontics as the disease with the age of onset usually prior to 35 years, rapid rate of progression of tissue destruction, manifestation of defects in host defense to plaque bacteria. It was subdivided into three age-related diseases termed Prepubertal periodontitis (PP, disease initiation before puberty), Juvenile periodontitis (JP, disease initiation between puberty and late teenage years), and Rapidly progressive periodontitis (RPP, disease initiation in the early to late 20s). There is, however, an area of concern in the traditional classification of EOP since we frequently encounter difficulties to classify the disease entity at the borderline which seems to overlap one another. This is for example, the differentiation between generalized juvenile periodontitis (GJP) and RPP. Therefore, a revised classification criteria which are more precise for defining the forms of EOP into several homogeneous subgroups has been recommended.

According to the Annals of Periodontology, 1996 World Workshop in Periodontics, the review of a number of studies corroborate the conclusion that EOP is more frequent in developing countries and among subjects of black race. So far there is no study in Thailand regarding the prevalence of EOP. Therefore, we carried out the cross sectional study to investigate the prevalence of the EOP patients who entered the Periodontal Clinic, Faculty of dentistry, Chulalongkorn university by using revised criteria. Among the total of 1,723 screened patients, 446 patients were periodontitis and 97 patients were under or equal the age of 40 who were then subdivided into 4 subgroups of EOP according to their clinical and

full mouth intra-oral radiographic data. The prevalence of subform I (localized JP) was 0.29%, subform II (Post localized JP) was 0.7%, subform III (localized JP-RPP) was 1.10% and subform IV (RPP) was 0.75% of periodontal patients. Taken together, EOP prevalence was 2.84% in this study, thus suggesting high prevalence of EOP. Although this study was done at the teaching dental school which does not probably reflect the true EOP of the Thai population, it is a good start not only to recognize the problem of the EOP amongst the Thais but also to stimulate future research into such specific groups of periodontitis patients. Of importance, our study would initiate the awareness among people who often misunderstand that periodontitis only occurs in adults or old-age. Particularly, awareness for dentists / general practitioners regarding early detection of EOP and early treatment which certainly save money and not so complicated.

Hyper-responsiveness of monocytes to bacterial LPS have been hypothesized to be associated with the severity of periodontal disease (Offenbacher and Salvi, 1999). Particularly, high levels of monocytic secretory mediators such as PGE2 in susceptible periodontitis subjects have been reported. In this study, we used whole blood assays to compare monocyte activation after stimulating with LPS from periodontopathic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* between 17 pairs of EOP patients who were in a maintenance care and healthy periodontal subjects (age and sex matched). Upon stimulation with varying doses of highly purified *P.gingivalis* LPS (1, 3, 10 ng/ml), expression of co-stimulatory molecules on monocytes were analyzed by flow cytometry and production of inflammatory mediators were monitored by ELISA. In addition, expression of CD69, early activation marker, on NK and $\gamma\delta$ T cells were evaluated. LPS stimulation resulted in the dose dependent up-regulation of co-stimulatory molecules, CD40, CD80 and CD86 on monocytes, up-regulation of CD69 on NK and $\gamma\delta$ T cells in both EOP and healthy control groups. Generally, periodontitis patients seem to show lower expression of these molecules than healthy controls at any tested LPS concentrations, but the only significant difference ($P < 0.05$) between groups were found in CD80 expression on monocytes. Production of PGE2 and IL-1 β in *P.gingivalis* LPS-stimulated whole blood cultures was quite similar between the two groups. By using the whole blood assay which probably represent the better physiological condition, our results suggest that hyper-responsiveness of monocytes to bacterial challenge may not represent determinant factor responsible for EOP.

บทคัดย่อ

โรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย (Early Onset Periodontitis) เป็นกลุ่มอาการของโรคที่ประกอบไปด้วยพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่นำไปสู่การสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ตั้งแต่ผู้ป่วยอยู่ในช่วงอายุน้อย และมีอัตราการทำลายโรคที่ค่อนข้างรวดเร็ว อันอาจทำให้สูญเสียฟันไปก่อนเวลาอันควร ถึงแม้ว่าพยาธิสภาพการเกิดโรคจะยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่กลไกการเกิดโรคนั้นคงเหมือนกับโรคปริทันต์อักเสบชนิดอื่นๆ คือมีสาเหตุหลักของโรคมาจากเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ ได้แก่ แอคติโนแบซิลัส แอคติโนไมซิเตมคอมมิแทน (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) และ พอร์ไฟโรโมนาส จินจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) และผลิตภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียบางอย่างเช่น ไลโปโพลีแซคคารายด์ (lipopolysaccharide, LPS) ส่วนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรีย จะเป็นตัวกำหนดลักษณะรูปแบบและความรุนแรงของโรคที่แสดงออกทางคลินิก

รอยโรคปริทันต์อักเสบ มีการสะสมของเซลล์ที่แทรกซึมมาเป็นจำนวนมากเช่น บีเซลล์ (B cells) ทีเซลล์ (T cells) และแมคโครฟาจ (macrophages) เซลล์เหล่านี้อยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้นแล้ว การศึกษาในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมาได้มุ่งสนใจไปยังบทบาทของทีเซลล์และไซโตไคน์ (cytokines) ในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ ถึงแม้บีเซลล์เป็นเซลล์หลักอยู่ในรอยโรคที่รุนแรง เรายังขาดการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเซลล์ชนิดนี้ในขบวนการการเกิดพยาธิสภาพ อันที่จริงแล้วบีเซลล์เป็นที่รู้จักกันดีในบทบาทของเซลล์ที่เชี่ยวชาญในการเสนอแอนติเจน ซึ่งมีความสำคัญในการเริ่มและคงสภาพการตอบสนองของทีเซลล์ หากแต่ในปัจจุบันหน้าที่อันนี้ของบีเซลล์มีการศึกษากันน้อยมาก แลงเกอร์ฮานส์เซลล์ (Langerhan's cells) เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) ที่เยื่อเมือกในช่องปาก รวมทั้งแมคโครฟาจ ถูกคาดว่าเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนในเนื้อเยื่อปริทันต์ เป็นที่ทราบกันแล้วว่าภาวะการกระตุ้นของเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ โค-สติโมลูลาโทรีโมเลกุล (co-stimulatory molecules) (ซีดี40 ซีดี80 และซีดี86) และเป็นปัจจัยหลักต่อการชักนำการตอบสนองของทีเซลล์ รวมทั้งการคงสภาพการตอบสนองของทีเซลล์ในระดับสูง ในการศึกษาครั้งนี้ เราได้วิเคราะห์การแสดงออกของโค-สติโมลูลาโทรีโมเลกุล (ซีดี80 และซีดี86) และซีดี83 เครื่องหมายสำหรับเซลล์เดนดริทริก (dendritic cells) ที่โตเต็มที่ บนเซลล์เหงือกที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการอักเสบอย่างรุนแรง โดยใช้โฟลไซโตเมตรี (flow cytometry) ผลการทดลองพบว่าในรอยโรคปริทันต์อักเสบมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ของการแสดงออกของซีดี86 และซีดี83 ซึ่งพบอยู่บนบีเซลล์เป็นหลัก เมื่อกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (mononuclear cells) จากเลือดในหลอดทดลองด้วยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ เช่น พอร์ไฟโรโมนาส จินจิวาลิส แอคติโนแบซิลัส แอคติโนไมซิเตมคอมมิแทน, เพรบิวเทลลา อินเทอมีเดีย (*Prevotella intermedia*) และ แอคติโนไมซิส วิตโคซัส

(*Actinomyces viscosus*) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงของซีดี86 และซีดี83 บนบีเซลล์ ดังนั้น การปรากฏของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์น่าจะชักนำการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกบนบีเซลล์ในเหงือก หน้าที่ของบีเซลล์ในแง่ของการนำเสนอแอนติเจนสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR) เมื่อกระตุ้นบีเซลล์ด้วยการเพาะเลี้ยงกับพอร์ไฟโรไมแนส จีนจิवालิส หรือ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิเตมคอมมิแทน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าบีเซลล์ที่อยู่ในภาวะกระตุ้นนี้สามารถทำหน้าที่เป็นเซลล์นำเสนอแอนติเจนได้เป็นอย่างดีใน MLR และยังสามารถกระตุ้นบีเซลล์ให้ผลิต อินเทอร์เฟรอน แกมมา (Interferon gamma, IFN- γ) ได้ในระดับสูง และอินเตอร์ลิวคิน-5 (Interleukin-5, IL-5) ในระดับต่ำ โดยสรุป แบคทีเรียที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อปริทันต์สามารถกระตุ้นบีเซลล์ให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของซีดี86 และซีดี83 ซึ่งจะไปเชื่อมโยงกับการส่งเสริมการทำงานของบีเซลล์ในการนำเสนอแอนติเจน ผลการทดลองจากการศึกษานี้สนับสนุนความคิดที่ว่า บีเซลล์ที่แทรกซึมอยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์ อาจมีบทบาทเป็นเซลล์ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนในการควบคุมและคงสภาพการตอบสนองของทีเซลล์ ณ บริเวณนั้นในโรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย ได้ถูกอธิบายลักษณะไว้ในรายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการทางคลินิกปริทันตศาสตร์เพื่อการวินิจฉัยโรคปริทันต์ของโลกในปี 1989 ว่าเป็นโรคที่เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรีย ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 35 ปี และมีอัตราการทำลายของโรครวดเร็ว นอกจากนี้โรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย ยังได้ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มโรคย่อย ๆ 3 กลุ่มตามอายุที่เกิดโรคคือ โรคปริทันต์อักเสบก่อนเริ่มวัยเจริญพันธุ์ (Prepubertal Periodontitis) ซึ่งเกิดในช่วงอายุก่อนวัยรุ่น โรคปริทันต์อักเสบในผู้เยาว์ (Juvenile Periodontitis) เกิดในช่วงวัยรุ่น และโรคปริทันต์อักเสบลุกลามรวดเร็ว (Rapidly Progressive Periodontitis) ที่เกิดในช่วงอายุ 20-30 ปี แต่อย่างไรก็ตามการแบ่งแยกโรคดังกล่าวยังมีความยุ่งยากในกรณีที่โรคอยู่คาบเกี่ยวระหว่างโรคใดโรคหนึ่ง ตัวอย่างเช่น การแยกโรคโรคปริทันต์อักเสบในผู้เยาว์ลักษณะทั่วไป (Generalized EOP) ออกจากโรคปริทันต์อักเสบลุกลามรวดเร็ว ดังนั้นการปรับเปลี่ยนการแบ่งแยกโรคโดยการให้เกณฑ์การแบ่งที่ละเอียดมากยิ่งขึ้นจึงถูกนำมาใช้แทน

ตามที่มีการรวบรวมรายงานการศึกษาและสรุปผล ในการประชุมเชิงปฏิบัติการทางคลินิกปริทันตศาสตร์ของโลกในปี 1996 เป็นที่ทราบกันว่าโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย พบมากในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา และในกลุ่มประชากรผิวดำมากกว่าผิวขาว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความชุกของโรคในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาหาความชุกของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย ในกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ามารักษาในคลินิกของภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เกณฑ์การแบ่งโรคที่ละเอียดยิ่งขึ้น

จากผู้ป่วยของภาควิชาปริทันตวิทยาทั้งหมดที่ได้รับการตรวจ 1,723 คน พบว่าเป็นผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 446 คน และในจำนวนนี้มีผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี

จำนวน 97 คนที่ถูกนำมาศึกษาโดยการใช้ข้อมูลที่ได้การซักประวัติ การตรวจสภาพของอวัยวะปริทันต์ ทางคลินิก และการตรวจภาพเอ็กซเรย์ทั้งปาก และให้การวินิจฉัยแยกโรคผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 : โรคปริทันต์อักเสบในผู้เยาว์ลักษณะเฉพาะที่ (LJP) กลุ่มที่ 2 : โรคปริทันต์อักเสบหลังวัยเยาว์ (Post LJP) กลุ่มที่ 3 : โรคที่คาบเกี่ยวระหว่างโรคปริทันต์อักเสบในผู้เยาว์ ลักษณะเฉพาะที่ และโรคปริทันต์อักเสบลุกลามรวดเร็ว (LJP-RPP) และกลุ่มที่ 4 : โรคปริทันต์อักเสบลุกลามรวดเร็ว (RPP) ผลการศึกษาพบว่าความชุกของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อยแบ่งตามกลุ่มย่อย 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับร้อยละ 0.29, 0.7, 1.10 และ 0.75 ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบทั้งหมดตามลำดับ หรือกล่าวโดยสรุปว่า ความชุกของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย จากผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่เข้ามารักษาในคลินิกของภาควิชาปริทันต์วิทยาทั้งหมดมีจำนวนถึงร้อยละ 2.84 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาในสถานศึกษา ซึ่งไม่สามารถแสดงถึงความชุกของโรคในกลุ่มประชากรส่วนใหญ่ของประเทศได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้จะเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาปัญหาโรคปริทันต์อักเสบในประชากรไทยที่มีอายุน้อย และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป และที่สำคัญจะทำให้ทั้งทันตแพทย์ และผู้ป่วยเองได้ตระหนักถึงปัญหาของโรค และตรวจหาหรือพบโรคตั้งแต่ในระยะเริ่มต้น เพื่อสามารถแก้ไขปัญหาล่วงหน้าได้ทันที่ ประหยัดค่าใช้จ่ายและลดความยุ่งยากในการรักษา

การตอบสนองที่มากเกินไปกว่าปกติ (Hyper-responsiveness) ของโมโนไซต์ที่มีต่อแบคทีเรียไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ได้ถูกตั้งเป็นสมมุติฐานถึงความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคปริทันต์ (Offenbacher และ Salvi, 1999) โดยเฉพาะรายงานที่ว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความไวต่อการเป็นโรคปริทันต์อักเสบ เช่น ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีอายุน้อยจะมีสารที่หลังจากโมโนไซต์ในระดับสูง เช่น โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) การศึกษาในครั้งนี้ whole blood assay ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ภาวะการกระตุ้นของโมโนไซต์ หลังจากการกระตุ้นด้วย LPS ที่สกัดจากพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาสิส (*P. gingivalis* LPS) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีอายุน้อย โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีอวัยวะปริทันต์ที่แข็งแรง (อายุ และเพศตรงกันเป็นคู่) จำนวนกลุ่มละ 17 คน กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีอายุน้อยจะถูกเจาะเลือดในช่วงระยะคงสภาพ (maintenance phase) ใน whole blood culture เมื่อใช้ความเข้มข้นต่างๆ กันของ *P. gingivalis* LPS (1, 3 10 ng/ml) กระตุ้น ผลการแสดงผลของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุลบนโมโนไซต์ถูกวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตเมตรี และปริมาณสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่หลั่งออกมาถูกวัดด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA) รวมทั้งการแสดงผลของซีดี69 เครื่องหมายภาวะกระตุ้นในช่วงแรก บนเซลล์เอ็นเค (NK cells) และแกมมาเดลต้าทีเซลล์ ($\gamma\delta$ T cells) ได้ถูกวิเคราะห์เช่นกัน ผลการทดลองพบว่าทั้งสองกลุ่มทดลอง การกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการแสดงผลของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุล ซีดี40 ซีดี80 ซีดี86 บนโมโนไซต์ การเพิ่มขึ้นของซีดี69 บนเซลล์เอ็นเค และแกมมาเดลต้าทีเซลล์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้เป็นไปตามความเข้มข้นของ *P. gingivalis* LPS โดย

ทั่วไปพบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีอายุน้อยมีการแสดงออกของโมเลกุลเหล่านี้น้อยกว่ากลุ่มที่มีอวัยวะปริทันต์ที่แข็งแรง และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญพบที่การแสดงออกของซีดี80 บนโมโนไซต์ ส่วนการหลั่งสารโปรสตาแกลนดิน-อี2 (PGE2) และอินเทอร์ลูคิน-1 เบต้า (IL-1 β) จากกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม พบว่าไม่แตกต่าง โดยสรุปผลการทดลองโดยใช้ whole blood assay ซึ่งน่าจะคล้ายคลึงกับสภาวะในร่างกาย บ่งว่า การตอบสนองที่มากเกินไปของปฏิกิริยาของโมโนไซต์ ที่มีต่อความรุกรานของแบคทีเรีย ไม่น่าที่จะเป็นตัวกำหนดปัจจัยของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยอายุน้อย