

Experimental studies on innate immune regulatory proteins during non-infectious tissue damage : a focus on Mammose-binding lectin as an innate regulator of immunity

Citation for published version (APA):

Matthijssen, R. A. (2010). Experimental studies on innate immune regulatory proteins during non-infectious tissue damage : a focus on Mammose-binding lectin as an innate regulator of immunity. Maastricht: Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2010

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 04 Dec. 2019

Nederlandse Samenvatting

In dit proefschrift werd de rol van enkele onderdelen van het aangeboren afweersysteem, in het ontstaan van zowel acute als chronische weefselschade bestudeerd.

Het menselijk afweersysteem heeft zich over een periode van miljoenen jaren ontwikkeld tot een complex en verfijnd systeem. Het wordt onderverdeeld in twee systemen; het aangeboren afweersysteem en het aangeleerde immuunsysteem. Het aangeboren afweersysteem is zoals de naam suggereert vanaf de geboorte aanwezig en bestaat onder andere uit diverse mechanische barrières zoals de huid en slijmvliezen. Bovendien bestaat het uit een groot aantal cellen en eiwitten met een zeer divers scala aan specifieke immunologische eigenschappen. Deze, in het gehele lichaam aanwezige cellen en eiwitten, worden vrijwel direct geactiveerd indien contact optreedt met lichaamsvreemde materialen. Hierdoor kunnen binnendringende ziekteverwekkers snel en efficiënt worden herkend en opgeruimd nadat ze een organisme zijn binnengedrongen.

Het aangeleerde afweersysteem vormt een meer specifieke afweerreactie. Deze afweerreactie wordt gekenmerkt door de betrokkenheid van zeer gespecialiseerde aanvallende cellen (T-cellen) en de productie van ziekteverwekker specifieke antilichamen (door B-cellen) tegen een breed scala aan bedreigingen. De productie van deze specifieke antilichamen vergt enige tijd, waardoor een effectieve reactie van het aangeleerde immuunsysteem pas na enkele dagen opgang komt. Het aangeleerde afweersysteem heeft echter door de veelal blijvende aanwezigheid van geheugen T- en B-cellen een ‘geheugen’ voor latere infecties door een zelfde ziekteverwekker. Door een dergelijk ‘geheugen’ kan nog jaren later, bij een tweede contact met een zelfde ziekteverwekker, een doeltreffende afweerreactie middels de productie van specifieke antilichamen snel worden gestart; het organisme wordt niet ziek en is daarmee ‘immuun’ voor deze ziekteverwekker.

Voor dit proefschrift werden verschillende onderdelen van ons aangeboren immuunsysteem bestudeerd. De onderdelen van ons aangeboren immuunsysteem vormen een effectieve bescherming tegen een breed scala aan bedreigingen. De bekendste bedreigingen worden gevormd door diverse ziekteverwekkers. Experimentele studies laten zien dat ons aangeboren immuunsysteem echter niet alleen reageert op en bescherming biedt tegen diverse ziekteverwekkers van buitenaf, maar ook geactiveerd wordt als gevolg van schade aan het eigen organisme. De reactie van het aangeboren immuunsysteem is voornamelijk gericht op het opruimen van potentiële bedreigingen en het herstel van de geleden schade om zo de functionele balans in het organisme te herstellen. Dit verloopt na het optreden van ernstige schade en daardoor een sterke activatie van het aangeboren immuunsysteem onvoldoende gecontroleerd. Uit onderzoek blijkt dat zo een sterke reactie van het aangeboren immuunsysteem op uitgebreide acute orgaan- en weefselschade leidt tot additionele, ofwel secundaire schade aan het getroffen orgaan of weefsel. Dit ontstaat bijvoorbeeld na een periode van gebrekkige of afwezige doorbloeding van een orgaan (ischemie) welke wordt gevolgd door een terugkeer van de normale doorbloeding (reperfusie). Een voorbeeld van ischemie en reperfusie (IR) schade is de schade die optreedt aan het hart tijdens een hartinfarct. Een vaak levensreddende dotter procedure herstelt de gebrekkige doorbloeding van de hartspier, waarmee een periode van ischemie wordt gevolgd door reperfusie. Het blijkt juist deze combinatie van ischemie en reperfusie te zijn, welke door een overmatige activatie van het aangeboren immuunsysteem aanleiding geeft tot extra schade in bijvoorbeeld de getroffen hartspier. Hoewel het herstel van de bloedtoevoer van levensgroot belang is voor de patiënt, is de totale schade aan het hart, juist door de reperfusie groter dan alleen door de korte periode van ischemie mag worden verwacht. Niet alleen bij een hart infarct speelt dit een belangrijke rol. Ook bij de transplantatie van organen treedt aanzienlijke IR-schade op. Het stoppen van de circulatie bij het overlijden van de donor of het uitnemen van een

transplantatieorgaan leidt tot ischemie. Deze wordt na het herstel van de bloed doorstroming in het transplantaat direct gevolgd door reperfusie. De ontwikkeling van IR-schade beïnvloedt het functioneren van een getransplanteerd orgaan en is in sterke mate bepalend voor het succes van de transplantatie. De uitgebreidheid van IR-schade bij en daarmee het post-operatief functioneren van een orgaan of weefsel na bijvoorbeeld een transplantatie vallen nog niet te voorspellen.

Ischemie en reperfusie schade komt met regelmaat voor in de dagelijkse chirurgische praktijk. Grote operatieve ingrepen in de transplantatie-, vaat-, tumor- of traumachirurgie gaan veelal samen met een tijdelijke vermindering van de orgaan doorbloeding met als gevolg lokale ischemie. Dit kan optreden door bijvoorbeeld bloedverlies, een verlaging van de bloeddruk door de gegeven anesthesie of door het afsluiten of tijdelijk klemmen van bloedvaten tijdens een operatieve procedure. Hierdoor zijn grote operatieve ingrepen vaak geassocieerd met het optreden van IR schade. Ook bij dergelijke schade zal het aangeboren immuunsysteem worden geactiveerd en wordt het postoperatieve beloop door de ontwikkeling van additionele orgaan- of weefselschade beïnvloedt.

Het is inmiddels duidelijk dat verschillende onderdelen van ons aangeboren immuunsysteem een belangrijk rol spelen in de ontwikkeling van deze additionele IR-schade. Hoe de verschillende componenten van het aangeboren immuunsysteem precies worden geactiveerd door weefselschade blijft veelal onduidelijk. Ook is de rol van vele regulatoire componenten van het aangeboren immuunsysteem in de ontwikkeling van additionele weefselschade nog onvoldoende begrepen.

Dit proefschrift gaat vooral over de rol van verschillende cellen en eiwitten van het aangeboren immuunsysteem in de ontwikkeling van acute, vaak additionele, en chronische orgaan- of weefselschade. Om hierover duidelijkheid te verkrijgen werden drie verschillende doelen geformuleerd.

Het eerste doel van dit proefschrift was het om meer inzicht te verkrijgen in de rol van enkele aangeboren immuuncomponenten in het ontstaan van additionele schade na nier ischemie en reperfusie. Een beter begrip van de ontwikkeling van dit fenomeen maakt het mogelijk om strategieën te ontwikkelen die nieren kunnen beschermen rondom transplantatie. Tevens zal dat naar verwachting leiden tot strategieën die de complicaties verminderen die het gevolg zijn van de slechte orgaandoorbloeding die geassocieerd is met grote operaties en ziektebeelden als systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, shock en trauma. In hoofdstuk 2.2 wordt de rol van myeloperoxidase (MPO) belicht in het ontstaan van additionele orgaanschade en orgaanfunctie verlies in een model van experimentele nier ischemie en reperfusie. De afwezigheid van MPO, dat normaal door o.a. neutrofiële witte bloedcellen wordt gebruikt om binnendringende bacteriën te doden, voorkomt nierfunctie verlies na ischemie en reperfusie. Dit effect wordt veroorzaakt door de rol van MPO bij het binnendringen van neutrofiële witte bloedcellen in het beschadigde weefsel. Een verminderde aanwezigheid van deze witte bloedcellen en hun immunologische functies is geassocieerd met een verbeterde orgaanfunctie.

Het complement systeem bestaat uit ongeveer 30 verschillende eiwitten die kunnen worden geactiveerd door de binding aan ziekteverwekkers of beschadigde eigen cellen. Het systeem wordt geactiveerd door drie onderling verschillende activatie routes; te weten de klassieke, alternatieve en lectine route. Iedere route beschikt over eigen factoren die het complement systeem kunnen activeren. Voor de klassieke route is dit de complement factor C1q met zijn cofactoren C1r en C1s. Complement factor C3 activeert de alternatieve complement activatie route. De lectine route echter wordt geactiveerd door mannose-binding lectin (MBL) of ficolins (H-, L- en M-ficolin) met cofactoren MASP-1, -2, -3, Map19 en Map44. De factoren C1q, C3, MBL en ficolins binden allen aan verschillende, specifieke eiwitten op ziekteverwekkers of beschadigde eigen cellen. Activatie van complement leidt tot de vorming

van enkele immunologisch actieve bijproducten en een groot ringvormig eind complex, het membrane attack complex. Dit membrane attack complex of MAC perforereert de membraan van binnendringende bacteriën. Het MAC, bestaande uit aan elkaar geschakelde complement eiwitten, veroorzaakt daarmee lysis van de binnendringende bacterie. Complement factor 5 fungeert als de eerste bouwsteen van deze ring structuur.

Activatie van C5 als gevolg van nier ischemie en reperfusie bleek essentieel in de ontwikkeling van secundaire IR schade en het optreden van nierfunctie verlies na nier IR (hoofdstuk 2.3). Het voorkomen van de activatie van C5, voorkwam de activatie van andere complement factoren en de vorming van het MAC. Deze vermindering in complement activatie was essentieel in het voorkomen van additionele weefselschade in de nier na IR. Deze bescherming ging samen met een verbeterde nierfunctie.

Een beter begrip van de betrokkenheid van regulatoire immuun componenten van het aangeboren immuunsysteem in de ontwikkeling van additionele weefselschade zal leiden tot de ontwikkeling therapeutische mogelijkheden waarmee weefselschade na ischemie en reperfusie kan worden voorkomen.

Lysophosphatidic acid (LPA) is een lichaamseigen groeifactor met bekende beschermende eigenschappen waardoor wellicht het optreden van celsterfte rondom de ischemie en reperfusie kan worden voorkomen. De effecten van toegediend LPA op de ontwikkeling van nier IR waren opmerkelijk (hoofdstuk 2.4). Hoewel initiële orgaanschade ten gevolge van de ischemie niet kon worden voorkomen, bleek LPA zeer wel in staat het ontstaan van additionele orgaanschade ten gevolge van uitgebreide immuun activiteit te voorkomen met een verbeterde nierfunctie na IR als resultaat.

Om dergelijke hoopvolle resultaten uit kleine proefdier modellen verder te ontwikkelen en om te komen tot de ontwikkeling van nieuwe therapeutische mogelijkheden uit basaal wetenschappelijk onderzoek is het noodzakelijk nieuwe inzichten te testen in een relevant

groot proefdiermodel. Om in deze vraag te voorzien werd een autoloog niertransplantatie model in varkens ontwikkeld (hoofdstuk 2.5). Eerste data, waaruit wellicht een humane toepassingsvorm kan worden ontwikkeld, zullen hopelijk snel uit dit model volgen.

Recente studies tonen aan dat lokaal in het getroffen orgaan geproduceerde regulatoren van het aangeboren immuunsysteem belangrijk zijn in het ontstaan van de additionele schade na ischemie en reperfusie.

Hoewel het merendeel van het lichaamseigen MBL geproduceerd wordt in de lever is ook een extra-hepatische of lokale productie van MBL sinds enige tijd gekend. Er bestaan voor MBL verschillende en goed gedocumenteerd MBL genotypen die de productie van het eiwit alsook de immunologische werkzaamheid van MBL in de mens bepalen. Draggers van deze verschillende genotypen, beschikken over verschillende genetische informatie, waardoor het plasma eiwit MBL zowel in immunologische functie als in aanwezige hoeveelheid tussen individuen sterk kan verschillen. Een rol voor MBL in het ontstaan van nier IR schade kon eerder in proefdieren worden aangetoond. Of de met het transplantaat mee getransplanteerde genotypen geassocieerd zijn met uitkomsten van de transplantatie is nog onduidelijk. Om een mogelijke invloed van het donor MBL genotype te onderzoeken op de uitkomst van niertransplantaties werden 237 opeenvolgende niertransplantaties uit het Maastricht Universitair Medisch Centrum onderzocht. Na een niertransplantatie van donoren overleden na een hartstilstand blijken verschillende MBL genotypen van de donor geassocieerd te zijn met de ontwikkeling van primair transplantaat falen (hoofdstuk 2.6). Een gemengd, heterogeen, MBL genotype van de donor gaat samen met een verhoogd risico op het ontwikkelen van primair transplantaat falen in de ontvanger. Deze bevindingen kunnen additioneel bewijs vormen dat kenmerken van de donor niet alleen voor, maar ook na de transplantatie van invloed zijn op het slagen van de transplantatie. Of daarbij organen van donoren met een heterogeen MBL genotype te lijden hebben onder een afgenomen

opsoniserende capaciteit van lokaal geproduceerd MBL, danwel onder een persisterende mogelijkheid van MBL om het complement systeem te activeren zal door nader aanvullend onderzoek belicht moeten worden.

Het tweede deel van het proefschrift beschrijft de gevolgen van darm ischemie en reperfusie in de mens. Ischemie en reperfusie van de darm is veelal geassocieerd met grote chirurgische ingrepen en de daarbij optredende doorbloedingveranderingen in de darm. Deze doorbloedingbeperkingen treden ook op bij ernstige ziekte of sepsis bij bijvoorbeeld intensive care patiënten. Bovendien is darm ischemie een moeilijk te diagnosticeren ziektebeeld, met een hoog risico op mortaliteit. Darm IR kan verstrekkende gevolgen hebben voor de belangrijke cellulaire barrière tussen het darmlumen vol met schadelijke stoffen en bacteriën en het milieu interieur van het organisme. Door de ontwikkeling van een humaan darm ischemie en reperfusie model kon de tweede doelstelling van dit proefschrift worden onderzocht.

Het model kon worden ontwikkeld in patiënten die werden onderworpen aan een grote chirurgische ingreep, een pancreatico-duodenectomie (hoofdstuk 3.2). Hierbij worden een deel van de alveesklier en de twaalfvingerige darm verwijderd, veelal ten gevolge van een kwaadaardige tumor. Eerste resultaten uit het model laten zien dat het optreden van darmschade goed kan worden bepaald aan de hand van een nieuwe marker, het fatty acid binding protein (I-FABP). In het model kon worden aangetoond dat de darm beschikt over een waarschijnlijk uniek mechanisme dat de darm in staat stelt beperkte perioden van ischemie te tolereren en de geleden schade ten gevolge van IR snel te herstellen (hoofdstuk 3.3). De door de IR beschadigde darmbarrière wordt daarbij snel en zorgvuldig hersteld en gesloten. Dit proces verloopt zo efficiënt dat beschadigde of dode cellen, welke het aangeboren immuunsysteem kunnen activeren, snel worden geëlimineerd door ze af te stoten in het lumen van de darm. Een plaats waar aanpassingen van het immuunsysteem het

mogelijk hebben gemaakt de constante bedreigingen vanuit het lumenale milieu, zoals bacteriën, cel resten en voedsel, te tolereren en laten passeren. Dat deze beschermende reactie na een periode van IR inderdaad zorgt voor het uitblijven van een overmatige activatie van het aangeboren immuunsysteem en dus additionele schade na IR kon voorkomen (hoofdstuk 3.4) vormde een belangrijke stap in het verdere onderzoek.

Zoals eerder al aangegeven voor de nier speelt de aanwezigheid van MBL in proefdieren een rol in het ontwikkelen van additionele IR schade in de nier, het hart en de darm. Hierbij speelt de aan- of afwezigheid van MBL ten tijde van IR een belangrijke rol. Zoals hierboven vermeld zijn er enkele veel voorkomende variaties in het MBL-gen (mutaties) bekend. Hierdoor varieert tussen individuen de functie van het plasma eiwit MBL alsook de in het plasma aanwezige hoeveelheid van het functionele eiwit. De complement activerende en immuunregulatorische eigenschappen van MBL in individuen die drager zijn van deze genetische variaties zijn vaak verminderd of vrijwel afwezig. Met deze wetenschap hebben we de invloed van de bekende MBL gen variaties in de ontwikkeling van darm schade na IR onderzocht. Hoofdstuk 3.5 laat zien dat dragers van MBL gen variaties minder darmschade ontwikkelden ten gevolge van IR dan de proefpersonen met het normale of wildtype MBL gen. In verhouding tot dier experimentele studies, waar de afwezigheid van MBL na IR de ontwikkeling van additionele orgaanschade kon beperken, ontwikkelden de dragers van verschillende MBL gen variaties in ons humane IR model al nauwelijks primaire schade. Deze data demonstreren een brede en zeer vroege rol van MBL in de ontwikkeling van epitheel schade in de humane darm na IR. Eerste suggesties voor een dergelijke nieuwe kwaliteit van MBL beperken zich op dit moment nog tot *in vitro* werk en dier experimenteel onderzoek. *In vitro* is MBL namelijk in staat om de degeneratie van de voor cellen essentiële cellulaire matrix door meprijs, matrix afbrekende enzymen, te beperken. Dit zou komen de

aanwezigheid N-linked oligosaccharides op meprins welke een interactie met MBL mogelijk maken.

Voor het beantwoorden van de derde en laatste doelstelling van dit proefschrift werd onderzocht of MBL betrokken is bij de ontwikkeling van chronische weefselschade. Hierbij is de rol van MBL onderzocht in de ontwikkeling van atherosclerose of aderverkalking. Het treft daarbij uitsluitend slagaders, of arteriën. Atherosclerose is een vorm van chronische weefselschade waarbij vetten, cholesterol, cellen en dode cel resten zich stapelen in een deel van de vaatwand, de intima. Deze stapeling vernauwt het arteriële lumen waardoor de bloedtoevoer naar een orgaan ernstig kan worden beperkt en er in het achterliggende orgaan door een beperkte bloedtoevoer of ischemie weefselschade kan ontstaan. Atherosclerose is een vorm van chronische schade waarbij het immuunsysteem de voortgang van de ziekte bepaald.

De resultaten hebben duidelijk aangetoond dat MBL aanwezig is in de door atherosclerose getroffen vaatwand. Bovendien werd tijdens de vroege ontwikkelingsfase van atherosclerose, MBL lokaal in de aangedane vaatwand geproduceerd. De data uit de verschillende experimenten hebben aangetoond dat de lokale productie van MBL, door specifieke ontstekingscellen van het aangeboren immuunsysteem, de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloedt (hoofdstuk 4.2). Proefdieren waarbij de lokale MBL productie werd uitgeschakeld ontwikkelden tot 30% meer atherosclerose dan gezonde proefdieren in dezelfde tijdsperiode. Deze resultaten laten zien dat de aanwezigheid van lokaal geproduceerd MBL gedurende de ontwikkeling van atherosclerose een remmend effect heeft op de ontwikkeling van atherosclerose. Dit zou kunnen worden verklaard door de opsoniserende eigenschappen van MBL. De opsoniserende werking van MBL berust op de kwaliteit om zich als 'pathogen recognition molecule' (PRM) te binden aan activatoren van het aangeboren immuunsysteem zoals ziekteverwekkers en beschadigde eigen cellen. Deze binding bespoedigt de essentiële

verwijdering van dergelijke dreigingen door daarvoor geschikte cellen. De aanwezigheid van MBL tijdens vroege atherosclerose zou daardoor een rol kunnen spelen in het verwijderen schadelijke atherosclerotische producten in de arteriële intima. In het geval van gevorderde atherosclerose echter, lijkt de situatie veranderd te zijn. Juist in deze gevorderde vormen van atherosclerose zou MBL door zijn complement activerende werking aanleiding kunnen geven tot overmatige activatie van het complementsysteem en daarmee zorgen voor ontsteking en progressie van de atherosclerotische plaques. De aanwezigheid van MBL in een later stadium van atherosclerose ontwikkeling lijkt daarom ongewenst. Interessant in dit kader is dat onderzoek in zowel muizen als mensen geen lokale MBL productie heeft aangetoond in de oudere, gevorderde atherosclerotische afwijkingen of plaques.

Op welke wijze deze inzichten in de rol van MBL gedurende atherosclerose aanleiding kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies in patiënten met hart- en vaatziekten zal toekomstig onderzoek moeten uitwijzen.