



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Ocular inflammation in age-related eye diseases

Vu, T.H.K.

### Citation

Vu, T. H. K. (2019, June 27). *Ocular inflammation in age-related eye diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/74440>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/74440>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/74440> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Vu, T.H.K.

**Title:** Ocular inflammation in age-related eye diseases

**Issue Date:** 2019-06-27



**DUTCH SUMMARY**  
**ACKNOWLEDGEMENTS**  
**CURRICULUM VITAE**  
**LIST OF PUBLICATIONS**



**DUTCH SUMMARY**

**NEDERLANDSE SAMENVATTING**

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het onderwerp van dit proefschrift is de rol van ontstekingen in de pathogenese van leeftijdsgebonden oogziekten, zoals maculadegeneratie, uvea melanoom en glaucoom. Veroudering is onvermijdelijk en is een multidimensionaal proces van fysieke, psychologische en sociale veranderingen. Met een toename van de oudere populatie (60 jaar en ouder) wereldwijd zullen we te maken krijgen met een toenemende hoeveelheid mensen met leeftijdsgebonden oogziekten. Naarmate we ouder worden, worden onze lichaamscellen steeds meer blootgesteld aan oxidatieve en metabole stress, hetgeen uiteindelijk leidt tot weefselschade. Laaggradige ontstekingsreacties, ook wel *para-inflammatie* genoemd, proberen de weefselfunctionaliteit en homeostase te herstellen. Dit heeft geen invloed op het goed functioneren van ons beschermende immuunsysteem. Secundaire veranderingen die optreden bij veroudering, zoals metabole en genetische afwijkingen, veranderde vaatdoorbloeding of degeneratieve aandoeningen, kunnen echter leiden tot een minder goed functioneren van het immuunsysteem, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot een chronische en niet meer onderdrukte ontstekingsreactie. Ondanks dat bij verschillende ziekten specifieke genetische en omgevingsfactoren betrokken zijn, laat ik in dit proefschrift zien dat weefselontsteking een belangrijke en gemeenschappelijke component is die bijdraagt aan de pathogenese van meerdere leeftijdsgebonden oogziekten, zoals het uvea melanoom en glaucoom.

### ***Uvea melanoom***

Het is bekend dat ontstekingscellen zoals macrofagen en lymfocyten aanwezig zijn in uvea melanomen en dat hun aanwezigheid gepaard gaat met een slechte prognose. Niet alle uvea melanomen tonen een ontstekingsreactie, maar specifiek diegene met een genetisch verhoogd risico op metastasering. Deze hoog-risico tumoren bevatten prognostisch ongunstige tumorkarakteristieken zoals de aanwezigheid van een ontstekingsinfiltraat, epitheloïde cellen en een verhoogde vaatdichtheid, geassocieerd met verlies van een chromosoom 3 en verlies van een specifiek eiwit, BAP1. In een muizenmodel van intraoculaire melanomen bleek dat de aanwezigheid van pro-angiogene M2 type macrofagen de tumorgroei bevordert in oudere muizen: macrofagen in oudere muizen hebben een sterk tumor-bevorderende rol. Tumor-geassocieerde macrofagen zijn direct betrokken bij de vorming van nieuwe bloedvaten die de tumor voorzien van voedingsstoffen: ze creëren een route voor verspreiding van tumorcellen via de bloedbaan.

Bij mensen (Hoofdstuk 2) worden pro-angiogene en anti-inflammatoire M2-type macrofagen gekarakteriseerd door een verhoogde expressie van CD163, en wij laten zien dat het merendeel van de macrofagen in uvea melanoom bij mensen dit fenotype bevatten. Opvallend genoeg bevatten tumoren met monosomie 3 meer M2-type macrofagen en meer bloedvaten dan tumoren met disomie van chromosoom 3. In Hoofdstuk 2 hebben we ook bepaald welke subtypen T cellen aanwezig zijn in deze tumoren. De aanwezigheid van regulatorische T cellen (Tregs) kan tumoren helpen om een effectieve anti-tumor immuun respons te ontwijken. Onder fysiologische omstandigheden worden Tregs gebruikt om lokale ontstekingsreacties te remmen middels onderdrukking van andere T cellen, macrofagen en antigeen-presenterende cellen. Onze data laat zien dat het aantal CD163<sup>+</sup> M2-type macrofagen gecorreleerd is aan het aantal CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T cellen, terwijl het merendeel van de T lymfocyten bestaat uit CD8<sup>+</sup> T cellen. Behalve het aantal macrofagen was ook het aantal lymfocyten in de tumor gerelateerd aan monosomie 3. Daarom denken wij dat de intrinsieke maligne eigenschappen van de tumor leiden tot een gemixte ontstekingsreactie die vervolgens tumorgroei stimuleert. De aanwezigheid van immunosuppressieve immuuncellen in de tumor, zoals M2-type macrofagen en FoxP3<sup>+</sup> T regs, kan verklaren waarom de aanwezigheid van grote hoeveelheden cytotoxische CD8<sup>+</sup> T cellen niet leidt tot een effectieve anti-tumor activiteit.

Tot 1970 was enucleatie de traditionele behandeling van uvea melanomen, daarna ontstond een shift naar oogsparende technieken. Een bestraald oog kan in meer dan 80% van de gevallen worden behouden. Secundaire enucleatie is vereist bij tumor recidief of bij bestralingscomplicaties. Aangezien lokale immuunreacties een rol kunnen spelen in het verwijderen van tumor debris of in het stimuleren of onderdrukken van anti-tumor immuun reacties, hebben wij in Hoofdstuk 3 de aanwezigheid van ontstekingscellen vergeleken tussen uvea melanomen na primaire enucleatie en na bestraling (secundaire enucleatie). We hebben laten zien dat bestraling geen effect heeft op de hoeveelheid en het type tumor-infiltrerende macrofagen en dat deze tumoren een vergelijkbare variabiliteit aan infiltraat tonen als tumoren in primair geëucleerde ogen. Verder bleek dat bestraalde uvea melanomen meer lymfocyten bevatten dan niet-bestraalde ogen. Aangezien het aantal infiltrerende cellen hoger is in epitheloïde tumoren dan in spindle cell tumoren, en het epitheloïd type geassocieerd is met monosomie 3, kan het zijn dat primaire tumor karakteristieken, zoals de genetische status, en niet de behandeling zelf de celinfiltratie bepaalt. Omdat er echter weinig niet-necrotisch tumor materiaal te vinden was in secundair

geënuceerde ogen, waren wij helaas niet in staat om de chromosale status van deze bestraalde tumoren te bepalen.

### **Glaucoom**

Glaucoom is wereldwijd een medische uitdaging vanwege de prevalentie in met name de oudere populatie, de ernstige gevolgen en een gebrek aan effectieve behandelingen. Ondanks dat een verhoogde oogdruk een belangrijke risicofactor is voor het ontwikkelen van glaucoom, wordt glaucoom niet langer gezien als een neurodegeneratieve aandoening, enkel en alleen veroorzaakt door een verhoogde oogdruk. Ongeveer 20-30% van de glaucoompatiënten hebben een normale oogdruk, en progressieve gezichtsvelduitval kan ook voorkomen in patiënten met goed gecontroleerde oogdrukken. Tot op heden is het exacte mechanisme van de pathogenese van glaucoom niet volledig bekend. Het immuunsysteem kan bij glaucoom zowel beschermend als destructief werken. De aanwezigheid van macrofagen en T cellen in het netvlies maakt het mogelijk dat het immuunsysteem vroeg in contact komt met cel débris door destructie van beschadigde cellen. Een initiële immunreactie kan weefselherstel bevorderen, zoals boven beschreven voor parainflammatie. De infiltrerende immuuncellen beschermen de neuronen tegen degeneratieve condities in het verouderende oog, hetgeen ook wel 'beschermende immuniteit' wordt genoemd. Wanneer er echter andere factoren zoals verhoogde oogdruk, zuurstoftekort of te veel ontstekingsfactoren bij komen, kan een beschermende immuniteit veranderen in een neuroinflammatoir degeneratief proces dat zenuwverval stimuleert. In Hoofdstuk 4 beschrijven we uitgebreid de rol van het immuun systeem bij de ontwikkeling van glaucoomschade.

In Hoofdstuk 5 en 6 laten we zien dat een verhoogde oogdruk secundaire reacties veroorzaakt die leiden tot langdurige en progressieve zenuwschade, zelfs wanneer de oogdruk vervolgens terugkeert naar een normale waarde. Eerder werd beschreven dat auto-immun reacties tegen heat-shock eiwitten (Hsps) mogelijk een rol spelen bij glaucoom, aangezien auto-antilichamen tegen Hsps werden gevonden in het serum van glaucoompatiënten. In Hoofdstuk 5 laten we zien dat een 3-week durende drukstijging leidt tot een verhoogde expressie van Hsp27 in retinale ganglioncellen (RGCs). Daarnaast induceert een verhoogde oogdruk een activatie van CD11b<sup>+</sup> microglia/ macrofagen en infiltratie van T cellen in de retina. Dit leidt tot een CD4<sup>+</sup> T cel reactie die specifiek is gericht tegen Hsp27 met als gevolg langdurige en progressieve glaucomateuze neurodegeneratie,



die nog steeds door bleek te gaan nadat de oogdruk al genormaliseerd was. Wanneer we oculaire hypertensie induceerden in immunodeficiënte muizen zagen we geen progressieve schade van de RGCs en axonen. Wanneer echter reactieve T cellen werden geïsoleerd uit muizen met glaucoom en de cellen werden overgebracht naar immunodeficiënte muizen met verhoogde oogdruk, zagen we alsnog RGC en axon neurodegeneratie ontstaan.

Hetzelfde fenomeen zagen wij wanneer retinale en nervus opticus schade werd veroorzaakt door ischemie (tgv. acuut verhoogde oogdruk) of traumatische schade. Ook hier leidden T cel-gemedieerde auto-immuun reacties tot chronisch RGC en axon verlies, terwijl de initiële periode van schade (ischemie) al voorbij was. Door het in het oog injecteren van neutraliserende en blokkerende antilichamen konden deze CD4<sup>+</sup> T cel-gemedieerde immuunreacties worden onderdrukt. Dit leidde tot een drastische daling in het RGC verlies na ischemische schade. Het blokkeren van lokale CD4<sup>+</sup> T cel activiteit leidt niet alleen tot neuroprotectie, maar zorgt ook voor het behoud van de retinale functie door het beschermen van andere retinale cellen tegen ischemie (Hoofdstuk 6). We hebben ook laten zien dat Hsp27-specifieke T cel reacties een belangrijke rol spelen in de pathogenese van glaucomateuze neurodegeneratie bij mensen, waarbij niet alleen tegen Hsp-gerichte auto-antilichamen maar ook een significant verhoogd aantal Hsp27 en Hsp60-reactieve T cellen werden gezien in het bloed van glaucoompatiënten.

Aangezien Hsps sterk geconserveerd zijn van bacteriën tot mensen, veronderstellen wij dat de schadelijke ontstekingsreacties in het menselijke oog ontstaan nadat zich eerder Hsp-specifieke T cellen hebben gevormd door blootstelling aan bacteriën. Deze T cellen zullen vervolgens beschadigde RGCs en axonen herkennen, omdat zij door de beschadiging Hsp's tot expressie brengen, wat uiteindelijk leidt tot een auto-immuun reactie tegen RGCs en daarmee tot optische neuropathie. In Hoofdstuk 5 laten we zien dat muizen die zijn grootgebracht in een germfree omgeving geen glaucomateuze schade ontwikkelen ondanks een persisterende verhoogde oogdruk. Het blijkt dat muizen die nooit blootgesteld zijn aan bacteriële stimuli een meer tolerant en een 'ongetraind' immuunsysteem hebben vergeleken met conventioneel grootgebrachte muizen.

**Concluderend:** Ondanks dat de pathogenese van uvea melanoom en glaucoom verschilt, delen deze oogziekten twee gemeenschappelijke elementen: 1) beiden zijn typisch een ziekte van de oudere mens 2) overdreven ontstekingsreacties spelen een belangrijke rol in

beiden. Door de extreme plasticiteit van ons immuunsysteem kunnen we snel en adequaat reageren op weefselschade en stress zonder een schadelijke immunologische respons te veroorzaken. Het immuunsysteem dient echter niet alleen om ons te beschermen tegen schade of infecties, maar het kan ook betrokken zijn bij schadelijke en chronische immunoreacties die leiden tot neurodegeneratieve ziekten, zoals glaucoom. Aan de andere kant kunnen door het 'immuun-privilege' van het oog, tumoren zoals uvea melanomen rustig en onbelemmerd groeien door te ontsnappen aan afstoting door het immuunsysteem. Het is daarom van belang om de mechanismen te begrijpen die ten grondslag liggen aan de complexe wisselwerking tussen 'immuun-privilege', beschermende immuniteit, ontstekingsreacties en auto-immuunziekten om de pathogenese van leeftijdsgebonden ziekten beter te begrijpen. Toekomstige studies zullen meer licht werpen op onbegrepen aspecten van de rol van de verschillende typen ontstekingscellen bij leeftijdsgebonden oogziekten.