



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Tuberculosis & type 2 diabetes

Vrieling, F.

### Citation

Vrieling, F. (2020, September 3). *Tuberculosis & type 2 diabetes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136088>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136088>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136088> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Vrieling, F.

**Title:** Tuberculosis & type 2 diabetes

**Issue date:** 2020-09-03

Nederlandse Samenvatting

Dankwoord

Curriculum Vitae

List of Publications



## Nederlandse Samenvatting

### Introductie

Tuberculose (TBC) is een longziekte die wordt veroorzaakt door een infectie met *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). De eerste aanwijzingen voor TBC in mensen kunnen worden herleid tot het neolithische tijdperk (~9.000 jaar geleden) en vormt tot op heden een belangrijke bedreiging voor de menselijke gezondheid. In 2017 kregen naar schatting 10 miljoen mensen TBC en stierven 1,6 miljoen mensen als gevolg van de ziekte, wat TBC de belangrijkste doodsoorzaak maakt door een enkel infectieus agens en één van top 10 doodsoorzaken wereldwijd. Het overgrote deel van TBC infecties (87%) vindt plaats in slechts 30 landen, waarvan India (27%), China (9%) en Indonesië (8%) de grootste TBC last dragen. De behandeling voor TBC bestaat uit een intensieve antibioticakuur van 6 maanden. Echter, de opkomst van antibioticumresistente stammen vormt een groot gevaar voor de behandeling van de ziekte in de toekomst. Hoewel vaccinatie met Bacille Calmette-Guérin (BCG), een levend verzwakt *Mycobacterium bovis*-vaccin dat sinds 1921 aan mensen wordt toegediend, gedeeltelijke werkzaamheid vertoont bij kinderen, ontbreekt een vaccin dat voldoende bescherming geeft in jongeren en volwassenen momenteel.

TBC wordt verspreid door inademing van *Mtb*-bevattende luchtdeeltjes, geproduceerd tijdens niezen of hoesten. De ingeademde bacteriën infecteren vervolgens macrofagen in de longen. Dit belangrijke cellen die deel uitmaken van het aangeboren immuunsysteem, met als primaire taak het direct doden van pathogenen door ingestie (fagocytose) om vervolgens het adaptieve immuunsysteem te activeren door het presenteren van antigenen aan T cellen. De immuunrespons tegen *Mtb* wordt gekenmerkt door de vorming van granulomen. Dit zijn complexe opeenhopingen van immuuncellen die enerzijds de gastheer beschermen door fysieke insluiting van geïnfecteerde cellen, maar tegelijkertijd een gunstig milieu vormen voor overleving van de bacterie (6). Na infectie volgt een klinisch asymptomatische periode van latente TBC (LTBI). Een recente schatting stelt dat ongeveer een kwart van de wereldbevolking latent besmet is met *Mtb* (7), waarvan 5 tot 10% tijdens het leven zal reactiveren en dus actieve TBC zal ontwikkelen. De precieze factoren die dit proces van TB reactivering bepalen zijn nog niet compleet duidelijk.

### De associatie tussen tuberculose en diabetes

De incidentie van TBC wordt sterk beïnvloed door verschillende comorbiditeiten die het risico op het ontwikkelen van actieve ziekte vergroten. Hiervan was co-infectie met het humaan immunodeficiëntievirus (HIV) de afgelopen decennia het meest invloedrijk. Infectie met HIV leidt tot een 20-voudig verhoogd risico op TBC (77). In 2017 ontwikkelden 920.000 HIV-patiënten TBC en 300.000 mensen stierven als gevolg van de ziekte (2). Andere bekende risicofactoren voor TBC zijn roken, alcoholgebruik en ondervoeding

(78). Een TBC-geassocieerde comorbiditeit die pas sinds kort in de belangstelling staat is diabetes mellitus (DM), ondanks dat deze associatie al eeuwen geleden voor het eerst werd beschreven (79). Epidemiologisch onderzoek laat zien dat DM het risico op het ontwikkelen van TBC verdrievoudigt (81). Naar schatting kan 15% van de wereldwijde TBC gevallen worden toegeschreven aan gelijktijdige DM. Waar het aantal sterfgevallen door TBC onder HIV-patiënten met 44% is gedaald sinds het jaar 2000, wordt juist voorspeld dat het aantal patiënten met gelijktijdige TBC-DM de komende jaren sterk zal gaan toenemen. De reden hiervoor is de het aantal mensen met DM wereldwijd naar schatting met bijna 50% zal toenemen de komende 25 jaar; van 425 miljoen mensen in 2017 tot 629 miljoen mensen in 2045 (82). Deze stijging zal naar verwachting voor het overgrote deel plaatsvinden in ontwikkelingslanden als gevolg van toenemende welvaart en verstedelijking; dezelfde gebieden waar TBC nog veelvoorkomend is. Verder is DM geassocieerd met een verhoogde kans op falen van TBC-behandeling, terwijl actief TBC het effectief controleren van de glucosespiegel tijdens DM bemoeilijkt (83).

DM is een stofwisselingsstoornis die kan worden veroorzaakt door een gebrek aan productie van het glucose-regulerende hormoon insuline (type 1 / T1DM) of door de ontwikkeling van insulineresistentie (type 2 / T2DM), waarvan de laatste ongeveer 90% van diabetes patiënten betreft (82). Beide ziekte types worden gekenmerkt door een hoge bloedsuikerspiegel (hyperglykemie) die wordt veroorzaakt door het onvermogen van cellen om voldoende glucose op te nemen. Klinische symptomen van DM zijn o.a. terugkerende infecties, gewichtstoename, polyurie gepaard met overmatige dorst en een verslechterde wondgenezing. T1DM wordt veroorzaakt door destructie van insuline producerende  $\beta$ -cellen in de alvleesklier, meestal als gevolg van een auto-immuun reactie. De precieze oorzaken die ten grondslag liggen aan T2DM vallen echter minder duidelijk te definiëren. Obesitas en overgewicht zijn belangrijke risicofactoren voor de ontwikkeling van T2DM, wat de ziekte linkt aan voeding van lage kwaliteit en een gebrek aan fysieke inspanning. Verder heeft T2DM ook een hoge erfelijke belasting (85). Door de associatie met obesitas hebben veel T2DM-patiënten ook een verhoogd risico op cardiovasculaire complicaties zoals atherosclerose door afwijkingen in bloedlipideniveaus (dyslipidemie). Dit klinische beeld staat in schril contrast met het klinisch beeld van TBC-patiënten dat juist gepaard gaat met ondervoeding en gewichtsverlies (86).

Hoewel er dus veel bewijs is dat DM de ontwikkeling van TBC sterk kan beïnvloeden, is de precieze oorzaak hiervan nog niet duidelijk. Het doel van dit proefschrift was dan ook om de pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan TBC-DM comorbiditeit te ontrafelen.

### Humane macrofagen als model voor TBC (en DM)

Macrofagen spelen een belangrijke rol in de infectiecyclus van *Mtb* omdat ze de voorkeursomgeving van de bacterie vormen voor overleving. Om deze reden worden primaire humane macrofagen vaak gebruikt als *in vitro* model om *Mtb* infectie te bestuderen. Een belangrijk kenmerk van macrofagen is dat zij erg gevoelig zijn voor lokale veranderingen in het micromilieu en op basis hiervan kunnen wisselen van functie (plasticiteit). Dit kan dus ook gevolgen hebben voor hun vermogen om intracellulaire pathogenen zoals *Mtb* te bestrijden. Waar macrofagen in het verleden werden geclassificeerd als pro-inflammatoir (M $\phi$ 1) of anti-inflammatoir (M $\phi$ 2) is het inmiddels duidelijk dat zij nog veel meer vormen aan kunnen nemen als reactie op verschillende stimulaties (1, 2). Veranderingen in de balans tussen deze verschillende macrofaagtypen kan leiden tot verergering van meerdere ziektes, waaronder TBC (3). Om deze reden zou het gericht sturen van macrofaag-differentiatie een interessante optie zijn bij TBC therapie.

Het belang van macrofaagfuncties voor de reactie op *Mtb* wordt geïllustreerd in **hoofdstuk 2** waarin we verschillende M $\phi$ 2-subtypes hebben gekarakteriseerd. We identificeerden M $\phi$ 2b-macrofagen (geïnduceerd door gecombineerde blootstelling aan lipopolysaccharide (LPS) en immuuncomplexen) als een subtype met een krachtige antimicrobiële activiteit tegen zowel *Mtb* als *Salmonella* Typhimurium, maar met een matige capaciteit om Th1- en Treg-cellen te induceren in vergelijking met M $\phi$ 2a/c/d macrofagen. Deze vermindering in bacteriële belasting was niet het gevolg van verminderde opname van *Mtb*. Analyse van gen- en eiwitexpressie data liet zien dat M $\phi$ 2b-macrofagen werden gekenmerkt door een type I interferon profiel. Verder produceerden ze relatief hoge niveaus van vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF), een belangrijke mediator van granulomateuze ontsteking en angiogenese in zowel muizen (4) als zebrafissen (5). Alle M $\phi$ 2-subtypes konden succesvol worden gepolariseerd naar M $\phi$ 2b na initiële differentiatie, wat aangeeft dat inductie van M $\phi$ 2b-polarisatie een mogelijke optie zou kunnen zijn voor gastheergerichte behandeling van infectieziekten.

Aangezien macrofaag-polarisatie sterk verweven is met veranderingen in cellulaire stofwisseling bieden zijn ook een interessant model voor het bestuderen van mogelijke interacties tussen TBC en DM. Allereerst hebben we onderzocht of hyperglykemie het infectieproces van macrofagen met *Mtb* negatief kon beïnvloeden (**hoofdstuk 3**). We vonden dat *in vitro* differentiatie van humane M $\phi$ 2 macrofagen in aanwezigheid van hoge glucose concentraties (25 mM) leidde tot een verhoogde uitscheiding van verschillende cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1RA) als reactie op stimulatie met LPS of *Mtb* lysaat in vergelijking met laag glucose (5 mM). Deze resultaten zijn vergelijkbaar met andere studies over het effect van hoog glucose op primaire macrofagen (7) en THP-1-cellen (8). Hyperglykemie had echter geen invloed op de productie van cytokines of mycobacteriële uitgroei na infectie met *Mtb*. In tegenstelling tot andere studies (9, 10) vonden wij geen

significante verschillen in fagocytose functie tussen macrofagen gekweekt in hoog of laag glucose. Wij concludeerden dat hyperglykemie op zichzelf niet de associatie tussen TBC en DM kon verklaren (althans vanuit het oogpunt van de macrofaag).

### **Lipiden in TBC-DM: een mogelijke parallel met atherosclerose?**

Naast hyperglykemie waren wij ook geïnteresseerd in een mogelijke verband tussen DM-geassocieerde lipiden en TBC. Om deze reden hebben wij het effect van geoxideerde lage-dichtheid lipoproteïne deeltjes (oxLDL) op *Mtb* infectie bestudeerd in macrofagen. Meerdere studies hebben aangetoond dat oxLDL niveaus verhoogd zijn in het bloed van DM patiënten (35, 36). OxLDL deeltjes worden gevormd als gevolg van oxidatieve stress en spelen een belangrijke rol bij de ontwikkeling van atherosclerose (34): macrofagen in de vaatwand kunnen oxLDL deeltjes opnemen door middel van specifieke receptoren, wat leidt tot de vorming van vetdruppels in deze cellen (schuimcellen) (37). Een interessante observatie is dat oxLDL deeltjes zich ook ophoopten in granulomen van *Mtb* geïnfecteerde cavia's (38). Dit betekent dat oxLDL potentieel een verbindende factor vormt tussen TBC en DM. Behandeling van macrofagen met oxLDL leidde tot een dosisafhankelijke ophoping van vetdruppels in humane macrofagen en verhoogde intracellulaire overleving van *Mtb* (**hoofdstuk 4**). Dit ging gepaard met de ophoping van cholesterol in lysosomen en een verminderde lysosomale lokalisatie van *Mtb* in oxLDL-behandelde macrofagen. Behandeling met geacetyleerd LDL (acLDL), een ander gemodificeerd lipoproteïne dat niet leidt tot cholesterol ophoping in lysosomen (39), resulteerde niet in verhoogde uitgroei van *Mtb*, tenzij het werd gecombineerd met een lysosomale cholesteroltransportremmer. Deze resultaten benadrukken dat de intracellulaire lokalisatie van cholesterol cruciaal is voor het effect van oxLDL op *Mtb* infectie in macrofagen.

Hoewel bovenstaande resultaten suggereren dat DM-geassocieerde lipiden zoals oxLDL *Mtb* infectie zouden kunnen bevorderen, was het tot dusver onbekend hoe gelijktijdige TBC-DM circulerende lipiden niveaus beïnvloedt. In **hoofdstuk 5** hebben we door middel van kernspinresonantie (NMR) spectroscopie een veelvoud aan stofwisselingsproducten gemeten in bloedplasma van TBC, DM en TBC-DM patiënten uit Zuid-Afrika, waaronder veel aan lipiden gerelateerde parameters. Zoals verwacht vertoonden DM-patiënten dyslipidemie, gekenmerkt door hoge triglyceride niveaus en een verlaagd HDL-cholesterol, terwijl TBC vooral geassocieerd was met lage concentraties van meerdere aminozuren. TBC-DM patiënten vertoonden kenmerken van zowel TBC als DM, wat een vorm van 'getouwtrek' lijkt te weerspiegelen op stofwisselingsniveau. Naast hoge triglyceriden concentraties en lage niveaus van HDL-cholesterol, vertoonden TBC-DM-patiënten specifieke verhogingen van restachtige lipoproteïnedeeftjes en sfigomyeline; beiden zijn geassocieerd met ontwikkeling van atherosclerose (47-49). Ten slotte konden we bevestigen dat de hoeveelheid oxLDL deeltjes verhoogd was in DM-patiënten uit dit cohort (**hoofdstuk 4**). Dit is een belangrijke observatie, aangezien dit de specifieke



populatie betreft met een verhoogd risico op het ontwikkelen van TBC. Ondanks dat er geen duidelijke toename in oxLDL deeltjes waarneembaar was in TBC-DM patiënten, vertoonden oxLDL niveaus wel een sterke positieve correlatie met plasma triglyceriden. Dit impliceert dat oxLDL niveaus voornamelijk verhoogd waren in patiënten met ernstigere manifestaties van dyslipidemie.

### **Metabolomics analyse van TBC-DM:**

De hierboven besproken NMR-metingen uit **hoofdstuk 5** betreffen een vorm van metabolomics analyse. Deze term omvat bepalingen van het metabooloom, de totale hoeveelheid stofwisselingsproducten (metabolieten) in een cel of weefsel. Het eerste bekende gebruik van een primitieve vorm van metabolomics is duizenden jaren terug te voeren op artsen uit China, Babylon en Egypte. Zij bestudeerden de kenmerken van urine om de aanvang van verschillende ziektes te diagnosticeren en te voorspellen. Diabetes kon bijvoorbeeld worden geïdentificeerd door een zoete geur en smaak van urine (75). Inmiddels is het gebruik van metabolomics een manier om de onderliggende pathofysiologische processen van menselijke ziektes te bestuderen. Een goed voorbeeld van de toepassing van metabolomics in TBC-onderzoek is een recente studie door Weiner *et al.* (82): zij beschrijven een prognostisch metabolietenprofiel voor actieve TBC met een gevoeligheid van 69% en specificiteit van 75% binnen 5 maanden voorafgaand aan diagnose. Sommige van de beschreven veranderingen konden al 12 maanden vóór de diagnose van actieve ziekte worden waargenomen, waardoor zij mogelijk zouden kunnen worden gebruikt voor de tijdige voorspelling van TBC ontwikkeling (83).

We gebruikten verschillende vormen van metabolomics om de effecten van TBC-DM op plasma metaboliet profielen te analyseren in twee verschillende patiëntcohorten uit Zuid-Afrika (**hoofdstuk 5**) en Indonesië (**hoofdstuk 6**). In beide studies vertoonden TBC en TBC-DM-patiënten zeer lage concentraties van meerdere aminozuren. In het bijzonder vertoonden lage niveaus van plasma histidine in beide onderzoeken een zeer hoog voorspellend vermogen voor TBC als TBC-DM, wat in overeenstemming is met een eerder uitgevoerde metabolomics analyse van TBC patiënten (84). Bovenal toonde de studie van Weiner *et al.* aan dat histidine concentraties al beginnen af te wijken vanaf 9 maanden voorafgaand aan de manifestatie van klinische TBC (82). In tegenstelling tot histidine was de plasmaconcentratie van fenylalanine juist verhoogd in beide TBC-cohorten. De verhouding van fenylalanine ten opzichte van histidine (Fe / His) had hierdoor een nog sterkere voorspellende waarde voor TBC dan de metabolieten op zichzelf. Beide aminozuren behoorden dan ook tot de 10 metabolieten die deel uit maken van het door Weiner *et al.* beschreven prognostische TBC profiel (82). Andere vroegtijdige veranderingen beschreven in dit artikel waren o.a. lagere concentraties van citrulline en tryptofaan gecombineerd met hogere kynurenine niveaus. Deze observaties zijn in overeenstemming met onze eigen resultaten uit **hoofdstuk 6**. Een verhoogde

verhouding van kynurenine ten opzichte van tryptofaan (Kyn / Trp) is een aanwijzing voor een verhoogde activiteit van het enzym indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), wat geassocieerd is met een verslechterende beheersing van *Mtb* infectie (73). Citrulline is een tussenproduct van de ureumcyclus dat kan worden gebruikt voor de synthese van arginine, een proces dat kan bijdragen aan de antibacteriële respons in macrofagen (88, 89) en T-cellen (90). Behandeling van TBC met antibiotica resulteerde in normalisatie van het overgrote deel van de aangedane plasmametabolieten tot concentraties die vergelijkbaar waren met gezonde controles. Deze resultaten laten zien dat TB en TBC-DM beide geassocieerd zijn met sterk veranderde aminozuurniveaus in de circulatie.

Ten slotte hebben we ook metabolomics uitgevoerd op *Mtb*-geïnfekteerde macrofagen, met als doel om meer inzicht te krijgen over de fundamentele effecten van *Mtb* infectie op de cellulaire stofwisseling (**hoofdstuk 7**). Infectie met *Mtb* leidde tot hogere concentraties van nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), creatine en creatinefosfaat in macrofagen. Daarnaast vonden wij aanwijzingen voor een verhoogde afbraak van glutamine en glucose door glycolyse. Dit correspondeerde met de analyse van genexpressieprofielen van *Mtb*-geïnfekteerde macrofagen (105). Hieruit bleek dat *Mtb* infectie meerdere enzymen uit deze specifieke stofwisselingscascades reguleerde. NAD<sup>+</sup> is een belangrijke cofactor voor veel stofwisselingsreacties; medicijnen die NAD<sup>+</sup> concentraties kunnen verhogen staan dan ook in de belangstelling voor de behandeling van verschillende ziektes (108). Meerdere studies hebben aangetoond dat NAD<sup>+</sup> niveaus een groot effect hebben op macrofaagfunctie (106-108), wat het belang aangeeft om de rol die NAD<sup>+</sup> speelt tijdens *Mtb* infectie in macrofagen verder te onderzoeken. Een ander recent artikel onthulde dat verhoogde creatine opname de anti-inflammatoire capaciteit van macrofagen kon ondersteunen, terwijl pro-inflammatoire functies tegelijkertijd werd onderdrukt (109). De resultaten van **hoofdstuk 2** onderstrepen het belang van macrofaagactivatie voor de bestrijding van *Mtb* infectie. Het zou daarom erg interessant zijn om te onderzoeken of verhoogde intracellulaire creatine niveaus dit proces zouden kunnen beïnvloeden.

## Conclusie

Gezamenlijk wijzen de resultaten van dit proefschrift op een mogelijke rol voor DM-geassocieerde lipiden tijdens de ontwikkeling van TBC. Verhoogde intracellulaire niveaus van lipiden en cholesterol zouden de overleving van *Mtb* in macrofagen kunnen ondersteunen; enerzijds door het remmen van antimicrobiële functies, anderzijds door te fungeren als bacteriële voedingsbron. Hoewel onze observationele resultaten alleen een correlatie en geen causaal verband kunnen aantonen tussen dyslipidemie en TBC, hebben verschillende interventiestudies aangetoond dat lipide-verlagende geneesmiddelen zoals statines, een gunstige werking kunnen hebben als aanvullende behandeling voor TBC (61-64). Naast hun effect op het cholesterolgehalte in het bloed is ook aangetoond

dat statines de intracellulaire bacteriële groei van *Mtb* kunnen remmen, waardoor ze een interessante behandelingsmogelijkheid vormen voor TBC-DM patiënten (63, 110, 111). Prospectieve vervolgstudies zullen moeten uitwijzen of het verlagen van bloedlipide niveaus het risico van DM-patiënten om TBC te ontwikkelen kan verminderen, of kan leiden tot verbeterde TBC behandelingsresultaten in combinatie met de gebruikelijke antibioticakuur. Verder onderzoek naar TBC-DM is van groot belang, aangezien deze snel toenemende co-epidemie grote gevolgen kan hebben voor de wereldgezondheid wanneer deze niet tijdig wordt beheerst.