

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43352> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Velden, D. van der

**Title:** Mast cell-mediated immune modulation in experimental Rheumatoid Arthritis and Atherosclerosis

**Issue Date:** 2016-09-29

# Chapter 9

Nederlandse samenvatting

## Introductie

Het immuunsysteem is een essentieel onderdeel van het menselijk lichaam in de verdediging tegen pathogene micro-organismen. Het immuunsysteem kan grofweg worden opgedeeld in twee onderdelen: het aangeboren (“innate”) en het specifieke, verworven (“adaptive”) immuunsysteem. Kenmerkend voor een aangeboren afweerreactie is een snelle reactie van zowel cellulaire als niet-cellulaire componenten gericht tegen een pathoog. Verworven immuniteit is vaak een tragere, maar hoog specifieke reactie op een infectie, die resulteert in een levenslange bescherming.

Mestcellen zijn onderdeel van het innate immuunsysteem en zijn strategisch gelegen in verschillende weefsels, die in contact staan met de buitenwereld. Evolutionair gezien zijn mestcellen essentieel in de afweerreactie tegen parasieten zoals wormen en protozoa. De interactie van mestcellen met deze pathogenen zorgt ervoor dat binnen enkele seconden gevormde mediators zoals signaalstoffen en enzymen worden uitgescheiden in het omliggende weefsel. Dit proces staat bekend als degranulatie, en is een fenomeen dat bij mestcellen, basofielen en neutrofielen voorkomt. Door deze activatie worden andere typen ontstekingscellen aangetrokken naar de plaats van infectie, wat bijdraagt aan een snelle eliminatie van de pathoog.

Echter, in de huidige westerse samenleving zijn parasitaire infecties zeldzaam en worden mestcellen vaker in verband gebracht met overgevoeligheidsreacties zoals allergie en astma. Onderzoek van de laatste jaren heeft duidelijk gemaakt dat mestcellen ook een rol kunnen spelen in de pathogenese van ontstekingsziektes zoals reumatoïde artritis en aderverkalking. In deze ziektes reageren mestcellen zeer snel op (endogene) stoffen met het uitscheiden van signaalstoffen en enzymen. Hierdoor hebben mestcellen nu een negatieve reputatie zowel in allergieën en auto-immuniteiten. Het onderzoek naar de effecten van remming van de activiteit van de mestcel in deze ziektes kan mogelijk tot een nieuwe therapeutische benadering kunnen komen. Om het effect van één celtype te bestuderen in complexe ziektes zoals reumatoïde artritis of atherosclerose zijn dierexperimentele modellen van belang. Deze modellen maken het mogelijk om specifiek één bepaalde cel te verwijderen, en zo het effect hiervan op het ziekteverloop te bestuderen.

In dit proefschrift hebben wij de invloed van mestcellen in dierexperimentele modellen voor reumatoïde artritis en aderverkalking bestudeerd met een focus op de rol van mestcellen in de (sub)-klinische fases van het ziekteproces, waarin er een actieve immuunrespons ontwikkeld was. Ook hebben wij de aanwezigheid van verschillende soorten antistoffen in het serum van cardiovasculaire patiënten onderzocht. Wij hebben de niveaus van antilichamen gecorreleerd aan klinische observaties zoals body mass index (BMI), lipidenprofiel, klinische diagnose van vaatlijden, samenstelling van de atherosclerotische plaque en de uitkomst van de ziekte.

### **Mestcellen en (experimentele) reumatoïde artritis**

Reumatoïde artritis (RA) is de meest voorkomende vorm van gewrichtsontsteking (artritis) en heeft een prevalentie van 0,5 – 1% van de wereldbevolking en naarmate de leeftijd hoger wordt hebben meer mensen RA. Het ziekteproces wordt gekenmerkt door de chronische ontsteking van met name de kleine hand- en voetgewrichten. De ontsporing van het immuunsysteem speelt een belangrijke rol in het proces van gewrichtsdestructie, en de huidige behandelmethoden zijn sterk gericht op het remmen van de chronische ontsteking en het remmen van specifieke inflammatoire eiwitten. Dankzij het op de markt verschijnen van verschillende zogenaamde biologicals zoals tumor necrosis factor (TNF)-blokkers is het mogelijk geworden in veel patiënten een verlaging van ziekteactiviteit of zelfs remissie te bereiken.

In het reumatische gewricht, in het synovium en in het synoviale vocht zijn een aantal typen ontstekingscellen aanwezig. Grote aantallen geactiveerde neutrofielen, macrofagen, T cellen en antistoffen producerende plasmacellen dragen bij aan de activatie van osteoclasten, die actief kraakbeen en botweefsel afbreken. Naast deze ontstekingscellen accumuleren ook mestcellen in het synoviale weefsel, en ze kunnen ongeveer 5% van alle cellen in het reumatische gewricht vormen. In het synoviale vocht van RA-patiënten zijn ook hoge concentraties van door mestcellen geproduceerde enzymen gevonden zoals chymase en tryptase. Deze enzymen kunnen direct zorgen voor gewrichtsafbraak, maar ook via de activatie van osteoclasten kunnen mestcellen bijdragen aan de pathogenese. Bovendien kunnen mestcellen grote hoeveelheden interleukines en chemokines uitscheiden, die niet alleen de infiltratie van nieuwe afweercellen in het gewricht kunnen bewerkstelligen, maar ook systemisch de cellulaire adaptieve afweerreactie kunnen moduleren. Dit maakt duidelijk dat de mestcel een belangrijke speler zou kunnen zijn in de pathogenese van RA.

De chronische ontsteking in RA is een belangrijke schakel in het proces van kraakbeen en bot afbraak. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige literatuur over de rol van mestcellen in het proces van gewrichtsafbraak in RA en de huidige kennis opgedaan in dierexperimentele modellen van RA. In dit hoofdstuk is samengevat dat in RA endogene liganden aanwezig zijn die o.a. mestcellen kunnen activeren via Toll-Like Receptoren en receptoren voor IgG antistoffen (FcγR). Ondanks het feit dat er meer mestcellen aanwezig zijn in het ontstoken synoviale weefsel, is de bijdrage van mestcellen aan de pathogenese van RA nog onduidelijk. De afgelopen decennia zijn er door verschillende onderzoeksgroepen studies gedaan om de rol van mestcellen in RA te onderzoeken. Echter, door het gebruik van zowel verschillende artritismodellen als verschillende muismodellen voor mestcel deficiënte is er nog geen eenduidig beeld of mestcellen bijdragen aan reumatoïde artritis. In experimentele artritis modellen die gebaseerd zijn

op het toedienen van pathogene antistoffen lijkt het effect van mestcellen marginaal. Deze modellen worden gekarakteriseerd door de afwezigheid van een adaptieve immuun response en zijn volledig gebaseerd op lokale complement activatie in het gewricht. Een arthritis model waarin wel een sterke adaptieve reactie wordt ontwikkeld is het zogenaamde “collagen-induced-arthritis (CIA)” model, dat qua ziekteverloop vergelijkbaar is met humane RA. Wanneer in mestcel deficiënte muizen CIA wordt geïnduceerd, is de klinische score en ontstekingsreactie lager dan in wildtype dieren. Dit duidt erop dat mestcellen een bijdrage leveren aan de pathogenese van arthritis via modulatie van de adaptieve immuun response.

De pathogenese van RA wordt gekenmerkt door een preklinische fase en een klinische fase. In de preklinische fase wordt de patiënt met een genetisch risico blootgesteld aan omgevingsfactoren en dit kan leiden tot een subklinische immuunreactie in de gewrichten. In de klinische fase van RA worden de gewrichtszwellingen zichtbaar en circuleren er ook RA specifieke antistoffen zoals reumafactor (RF) en anti-citrullinated protein antilichamen (ACPA). Het hierboven genoemde CIA model voor experimentele arthritis wordt eveneens gekenmerkt door een preklinische en een klinische fase en mestcellen kunnen in beide fases mogelijk bijdragen aan het ziekteproces. Omdat de eerder genoemde dierexperimenten uitgevoerd zijn in mestcel-deficiënte muizen, is het onmogelijk de bijdrage van mestcellen in de latere fases van arthritis te onderscheiden van een initieel effect. Met behulp van een nieuw muismodel, waarin het mogelijk is mestcellen te depletieren, hebben we in **hoofdstuk 3** gekeken naar het effect van mestcel depletie tijdens beide fases van arthritis. Het verwijderen van mestcellen in de preklinische fase van arthritis heeft een positief effect op de uitkomst van RA, terwijl het verwijderen van mestcellen in de klinische fase van arthritis geen significant effect heeft op de arthritis. Mestcel depletie in de initiële fase van RA leidt tot een lagere klinische score van arthritis, wat overeenkomt met een verminderde schade in de gewrichten van de enkels. Immunologische analyse van de dieren laat zien dat afwezigheid van mestcellen samenvalt met een kleinere populatie pathogene Th17 cellen en een grotere populatie immuun-dempende, regulatoire T cellen. In het plasma is de concentratie van de inflammatoire interleukines (IL)-6 en IL-17 verlaagd in vergelijking tot mestcel competente dieren. In dit hoofdstuk hebben wij laten zien dat de rol van mestcellen in de klinische fase van CIA gelimiteerd is, maar dat mestcellen in de preklinische fase een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van de arthritis via hun effect op de pathogene, adaptieve immuunrespons.

### **Circulerende immunoglobulines in cardiovasculaire patiënten en associaties met klinische parameters**

Naast de chronische ontsteking van gewrichten hebben RA patiënten ook vaak systemische klachten zoals algehele malaise, koorts, Sjögren syndroom en aanwezigheid van zogenaamde reumatische noduli: knobbels ontstekingsweefsel, die vaak in de buurt van de gewrichten te vinden zijn. Het meest karakteristieke extra-artculaire effect in het ziekteverloop van RA is een tot op heden niet begrepen verhoogd risico op cardiovasculair lijden. Onderzoek heeft aangetoond, dat RA patiënten een verhoogd risico hebben voortijdig te sterven aan een hartaanval of beroerte. Atherosclerose is vaak de onderliggende pathologie van deze cardiovasculaire syndromen. Het proces wordt gekenmerkt door een lipiden-gemedieerde inflammatie van de vaatwand op plekken met een hoge 'shear stress'. De ontsteking zorgt voor de ophoping van vetten en ontstekingscellen in de vaatwand, de atherosclerotische plaque of laesie genoemd, wat resulteert in een lokale vernauwing. Veel kenmerkende immunologische aspecten van RA komen overeen met het proces van atherosclerose, zoals de ontwikkeling van auto-antilichamen gericht tegen gemodificeerde endogene eiwitten. De meerderheid van RA patiënten ontwikkelt een sterke antilichaamrespons tegen bijvoorbeeld gecitrullineerde eiwitten. Klinisch onderzoek heeft aangetoond dat er een relatie bestaat tussen de aanwezigheid van reuma specifieke antistoffen zoals reumafactor of "anti-citrullinated protein" antilichamen (ACPA) en de ziekte uitkomst en verloop in RA patiënten. Met name ACPA is in de kliniek een belangrijke klinische biomarker voor de effectiviteit van de behandeling, het bereiken van remissie en verhoogde mortaliteit. Recentelijk is aangetoond dat gecitrullineerde eiwitten ook aanwezig zijn in het myocardium en in de atherosclerotische plaque van zowel RA als niet-RA patiënten, en dat ACPA mogelijk pathogene effecten kan bewerkstelligen buiten het gewricht. In **hoofdstuk 4** beschrijven wij dat ACPA gedetecteerd kan worden in het serum van een deel van een cohort cardiovasculaire patiënten in afwezigheid van reumatische klachten. Met behulp van een test voor de detectie van ACPA door middel van cyclic citrullinated peptides (CCP3) vonden wij reactiviteit tegen dit peptide in 6 – 11% van de patiënten. Klinische analyses lieten echter geen correlatie zien tussen bekende cardiovasculaire risicofactoren zoals het lipidenprofiel, BMI of inflammatoire markers en ACPA-positieve cardiovasculaire patiënten. Wel vonden wij een associatie tussen ACPA positiviteit en lange-termijn mortaliteit over 10 jaar na inclusie. De aanwezigheid van ACPA correleerde significant met sterfte. In deze studie laten wij zien dat cardiovasculaire patiënten zonder reumatische (voor)geschiedenis een antistof reactie kunnen ontwikkelen tegen gecitrullineerde eiwitten, die bijdraagt aan voortijdige sterfte.

Circulerende antistoffen kunnen een negatieve invloed hebben op de ontsteking in een gewricht of vaatwand door antigenen te binden en zo immuuncomplexen te vormen. Deze immuuncomplexen binden vervolgens aan zogenaamde Fc-receptoren op ontstekingscellen. Na binding van een immuuncomplex aan deze Fc-receptoren volgt de activatie van de cel, en zal de ontsteking verder worden versterkt door de secretie van signaaleiwitten door de ontstekingscel. Ook mestcellen brengen deze receptoren tot expressie, en binding van een ligand aan deze receptoren vormt ook een zeer potente manier van mestcel activatie. Eerder werk heeft aangetoond dat het aantal mestcellen in een atherosclerotische plaque voorspellend is voor toekomstig cardiovasculair lijden. In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of in patiënten met hart en vaatziekten circulerende immunoglobulines correleerden met het fenotype van de plaque, zoals de grootte van de necrotische kern, de mate van calcificatie, het aantal macrofagen en spiercellen, hoeveelheid collageen en het aantal bloedvaatjes. Verder hebben we de antilichaam niveaus gekoppeld aan klinische kenmerken van de patiënt, zoals body mass index (BMI), lipidenprofiel, wel of niet roker, bloeddruk en de mate van cardiovasculair lijden (symptomatisch of asymptomatisch). Wij vonden geen associatie tussen de types immunoglobulines (IgG, IgE en oxLDL-IgG) en genoemde parameters. Mogelijk zijn andere liganden verantwoordelijk voor de activatie van mestcellen in de atherosclerotische plaque, of verschilt de lokale concentratie van immunoglobulines met de circulerende concentratie.

### **Mestcellen in experimentele atherosclerose**

De vorming van atherosclerotische plaques begint al op adolescentie leeftijd en ontwikkelt zich asymptomatisch gedurende een groot deel van het leven. Het immuunsysteem speelt in de fase van de groei van de atherosclerotische plaque een belangrijke rol en draagt bij aan de destabilisatie van de plaque. De destabilisatie van de laesie als gevolg van vermindering van de hoeveelheid extracellulaire matrix en celdood is een belangrijk proces, dat vaak een scheuring van de plaque (ruptuur) tot gevolg heeft. Door een ruptuur komt de inhoud van de plaque in de bloedbaan, wat kan leiden tot de vorming van een stolsel, dat ischemie veroorzaakt in het onderliggende weefsel, en kan leiden tot een beroerte of hartaanval. De huidige therapie voor cardiovasculaire patiënten is gebaseerd op het verlagen van het LDL-cholesterol door het gebruik van cholesterolverlagende geneesmiddelen (statines) en door het operatief verwijderen van plaques. Omdat het immuunsysteem een significante rol speelt in het proces van atherogenese, kan de modulatie van de immunoresponsie nieuwe therapeutische aangrijpingspunten opleveren. Naast leukocyten zoals macrofagen, zijn ook mestcellen waargenomen in de atherosclerotische laesies, en de hoogste aantallen mestcellen zijn gevonden in instabiele en geruptureerde plaques. Ook mestcel specifieke mediators zijn verhoogd aanwezig in het serum van cardiovasculaire patiënten.

Dierexperimenteel onderzoek heeft aangetoond dat systemische activatie van mestcellen resulteert in plaquegroei en destabilisatie. Muizen, die deficiënt zijn voor mestcellen, ontwikkelen kleinere plaques in vergelijking met mestcel competente muizen. Deze studies hebben aangetoond dat mestcellen in de vroege fase van atherosclerose een belangrijke rol spelen. In **hoofdstuk 6** karakteriseerden wij een nieuw muismodel, waarin het mogelijk is mestcellen te verwijderen of depletieren op elk gewenst moment door het toedienen van het eiwit difterie toxine. Dit muismodel is gekruist met een muis, die atherosclerose ontwikkelt, waardoor het mogelijk is om mestcellen te depletieren in latere fases van atherosclerose. In deze studie hebben wij na depletie van mestcellen atherosclerose geïnduceerd door het voeren van een hoog vet dieet en het operatief plaatsen van een collar om de halsslagaders. Analyse van de plaques liet zien dat depletie van mestcellen leidde tot kleinere en stabielere laesies. In het bloed vonden we een daling van het aantal inflammatoire monocyten, en een reductie van de pro-inflammatoire eiwitten IL-6 en MCP-1 in mestcel gedepleteerde muizen. Deze data sluiten goed aan bij eerdere studies in mestcel deficiënte muizen, waar ook kleinere, stabielere laesies werden gevonden. Het voordeel van het huidige muismodel is dat wij nu in staat zijn om de rol van mestcellen in latere fases van atherosclerose te onderzoeken.

Mestcellen kunnen door de uitscheiding van mediators zoals histamine, chymase, tryptase en cytokines ook bijdragen aan de progressie van atherosclerose. Deze mediators beïnvloeden verschillende processen en induceren bijvoorbeeld de dood van spiercellen en de afbraak van extracellulaire matrix zoals collageen, wat kan resulteren in plaque destabilisatie. De studie beschreven in **hoofdstuk 7** laat het effect zien van mestcel depletie op reeds ontwikkelde atherosclerotische plaques. Analyse van de atherosclerotische plaques toonde aan dat depletie van de mestcellen niet de grootte maar wel de stabiliteit van de laesie gunstig beïnvloedde. De plaquestabiliteit was significant verbeterd: een verhoogd collageengehalte, een kleinere necrotische kern en minder macrofagen in mestcel gedepleteerde muizen ten opzichte van competente muizen. Mestcel depletie leidde tot een toename in het aantal regulatoire T cellen in de milt en drainerende lymfeknopen van het hart. In het plasma van mestcel gedepleteerde muizen vonden we een significante daling in het niveau van het pro-atherogene cytokine IL-6 en een toename van IL-10. Samenvattend laat deze studie zien dat mestcellen in belangrijke mate bijdragen aan de destabilisatie van de plaque, maar ook direct of indirect bijdragen aan de inductie van regulatoire T cellen.

Concluderend, dit proefschrift laat zien dat mestcellen in experimentele modellen voor reumatoïde artritis en atherosclerose significant bijdragen aan de pathogenese van deze ziektes. De depletie van mestcellen heeft zowel op lokaal als systemisch niveau een positief effect op het ziekteproces. Daarnaast hebben wij aangetoond dat bepaalde circulerende antilichamen voorspellend zijn voor het voortijdige sterfte aan hart- en vaatziekten. Deze studies suggereren dat de remming van mestcelactivatie in chronische immunogemedieerde ziektes wellicht een nieuw therapeutische aangrijpingspunt kan zijn.



