



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Pro-resolving fatty acids and oxylipids in osteoarthritis and rheumatoid arthritis

Brouwers, H.

### Citation

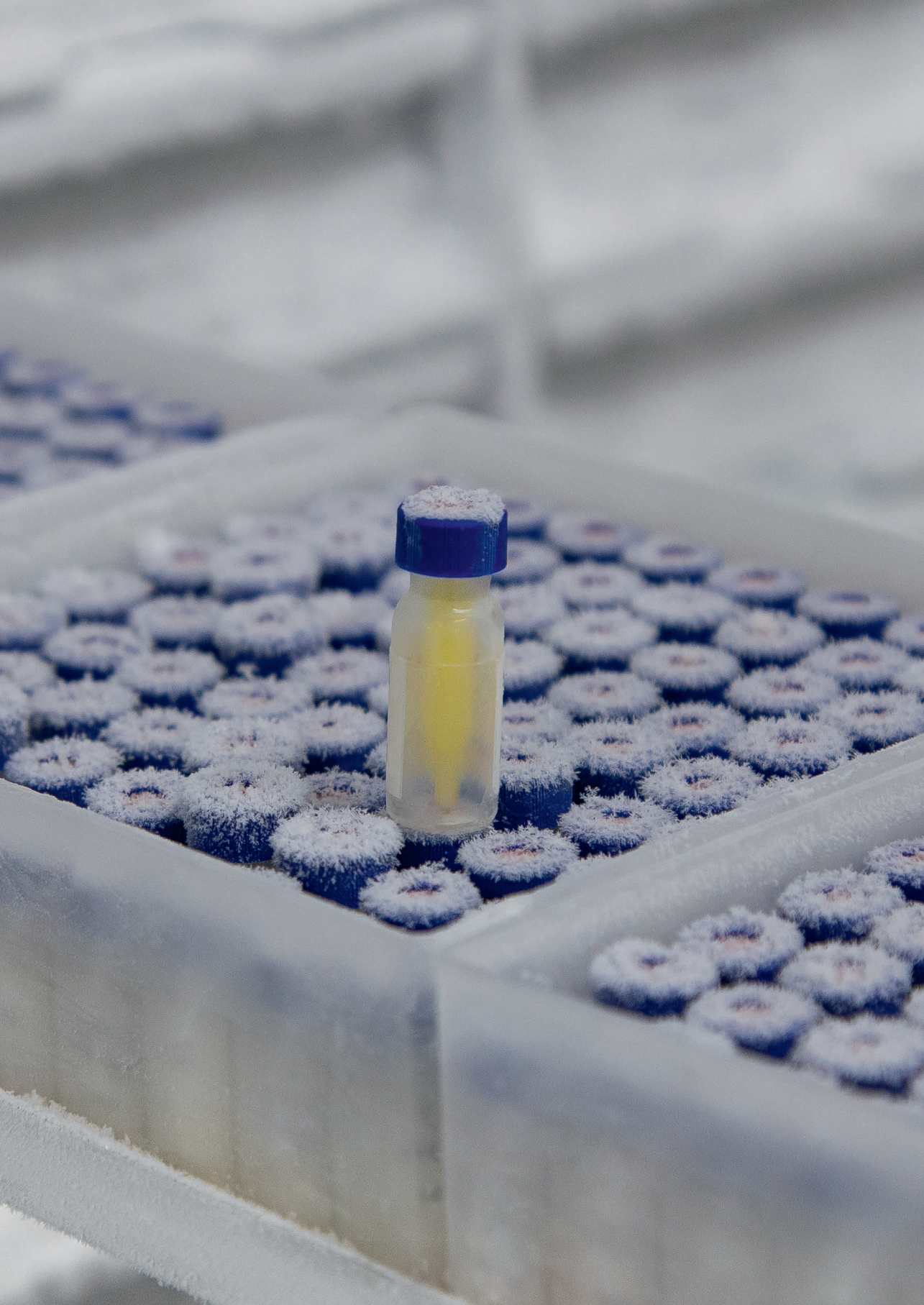
Brouwers, H. (2022, September 20). *Pro-resolving fatty acids and oxylipids in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3459095>

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/1887/3459095>

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





## Appendices

- Nederlandse samenvatting
- Curriculum Vitae
- List of publications
- Dankwoord

Osteoarthritis (OA), ook wel artrose genoemd, en reumatoïde artritis (RA) zijn beide aandoeningen die effect hebben op de gewrichten. Artrose komt voor bij ongeveer 1,5 miljoen Nederlanders en vooral bij ouderen. Reumatoïde artritis komt minder voor, maar toch hebben op dit moment zo'n 270.000 mensen deze diagnose in Nederland. Het ziekteverloop en de symptomen verschillen wel van elkaar. Bij RA patiënten worden hoge ontstekingswaarden gemeten en zij kunnen meestal met succes behandeld worden met medicijnen die actief het immuun systeem onderdrukken. Op radiografische beelden zoals MRI worden bij artrose patiënten ook signalen van ontsteking gemeten, maar wordt het beeld vooral gedomineerd door grote schade aan de gewrichten. Het kraakbeen is versleten en het bot is niet meer mooi glad maar vormt osteofyten, dit zijn uitstulpingen van het bot. Artrose patiënten hebben hierdoor vaak veel pijn in de gewrichten en nemen hiervoor pijnstillers zoals paracetamol. Er is nog veel onduidelijk over het ontstaan van artrose en over hoe we deze ziekte in een vroeg stadium kunnen behandelen zodat grote schade aan de gewrichten wordt voorkomen.

Rond het jaar 2000 werd er door een groep wetenschappers in Amerika een interessante ontdekking gedaan. Een bepaald type vetten, afkomstig van onverzadigde vetzuren, zouden eigenschappen hebben die ervoor zorgen dat een ontsteking op tijd wordt beëindigd, zodat grote schade aan het weefsel voorkomen wordt. Dit proces wordt resolutie genoemd en de vetten kregen de naam pro-resolving mediators (SPM), ofwel mediators die pro-resolutie eigenschappen hebben. De vetzuren werden in 4 categorieën verdeeld op basis van hun molecuulformule, namelijk de lipoxins, maresins, protectins en resolvins. In de studies die beschreven staan in dit proefschrift hebben we onderzocht of deze SPM de potentie hebben om te dienen als therapie in artrose. Daarnaast hadden een tweetal studies beschreven in dit proefschrift het doel om te onderzoeken op welke manier het lichaamsmateriaal behandeld en opgeslagen moet worden voordat het gebruikt wordt om metingen in te verrichten.

We zijn dit onderzoek begonnen door in een literatuurstudie te onderzoeken wat er al bekend was over de aanwezigheid van deze SPM en daaraan gerelateerde vetten in RA en OA (**hoofdstuk 2**). We keken voornamelijk naar de SPM zelf en de vetten waaruit zij geproduceerd worden (precursor vetzuren), de omega-3 en omega-6 onverzadigde vetten. De literatuurstudie liet zien dat de precursor vetzuren aanwezig zijn in het bloed van RA en OA patiënten maar ook in het gewrichtsvocht (synoviaal vocht). Één van de vetzuren, het omega-6 vetzuur arachidonzuur kan worden omgezet naar pro-ontstekings vetten zoals prostaglandines en leukotrienes. Vooral deze pro-ontstekings vetten waren meetbaar in het gewrichtsvocht in RA en in mindere mate in dat van artrose patiënten. De daadwerkelijk werden maar door één studie gerapporteerd en alleen in RA gewrichtsvocht.

Omdat het bewijs voor de aanwezigheid van SPM in RA en artrose patiënten zo schaars was, besloten we zelf de aanwezigheid van deze vetten te onderzoeken in gewrichtsvocht (**hoofdstuk 3**). Hiervoor gebruikten we een techniek genaamd tandem massaspectometrie welke ontwikkeld is binnen het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). In de studie beschreven in **hoofdstuk 3** hebben we gewrichtsvocht gemeten van RA en artrose patiënten. Gewrichtsvocht is heel stroperig en het bevat immuun cellen en onoplosbare deeltjes. Om te voorkomen dat de stroperige structuur, de cellen en de onoplosbare deeltjes storen in de meting, behandelden we het gewrichtsvocht eerst met het enzym hyaluronidase. Na deze behandeling wordt het gewrichtsvocht heel hard gecentrifugeerd, waardoor alleen het vloeibare vocht overblijft. Na deze behandeling, konden we 37 verschillende vetten detecteren, variërend van de precursor onverzadigde vetzuren, tussenproducten zoals 17-HDHA en 15-HETE en pro-ontstekings vetten zoals prostaglandines en leukotrienes. Maar ondanks de zeer gevoelige techniek, konden we geen SPM detecteren, behalve als we de meting verrichtte op het onoplosbare gedeelte van het gewrichtsvocht, en ook dan konden we maar één SPM detecteren, Resolvin D2. In **hoofdstuk 3** laten we verder zien dat de geïsoleerde cellen uit het gewrichtsvocht verschillende vetten kan produceren als ze worden geactiveerd. Hiervoor gebruiken ze dezelfde enzymen die nodig zijn als de productie van SPM, maar de daadwerkelijke SPM werden in deze experimenten niet geproduceerd.

Zoals aan het begin van deze samenvatting beschreven staat, zijn signalen van ontsteking zichtbaar op radiografische beelden van gewrichten van artrose patiënten. Onze hypothese is dat deze ontsteking bijdraagt aan de schade die we zien aan de gewrichten zoals het verdwijnen van kraakbeen en het ontstaan van osteofyten. Als de SPM inderdaad in staat zijn om resolutie te bevorderen, zou er met het verdwijnen van de ontsteking ook minder schade moeten ontstaan in de gewrichten. Dit wilden we graag onderzoeken in een diermodel, het hoog vet geïnduceerde artrose muismodel. In de studie beschreven in **hoofdstuk 4** laten we zien dat wanneer je muizen voed met een hoog vet dieet, deze muizen ontsteking en schade in de gewrichten ontwikkelen. We hebben deze muizen behandeld met een mix van verschillende SPM, namelijk Maresin 1, Lipoxin A4 en Lipoxin B4, maar deze behandeling had geen effect op de ontsteking en schade. Ook zagen we geen effect van deze SPM op de productie van ontstekingsfactor interleukin-6, welke gemaakt wordt door verschillende cellen in het gewricht.

Vervolgens onderzochten we in **hoofdstuk 5** hoe de resolutie fase precies verloopt in een diermodel waarin een muis buikvliesontsteking krijgt door het inspuiten van gistdeeltjes. Deze muis wordt in de eerste 12 uur erg ziek, waarna de muis zichzelf herstelt, een effectieve resolutie fase dus. Hier ontdekten we dat een omega-6 vetzuur, adreenzuur, zich opstapelt in de buikholtte tijdens de resolutie fase. We tonen daarna in deze studie

aan dat adreenzuur pro-resolutie eigenschappen heeft, zoals het inhiberen van de migratie van immuun cellen en het bevorderen van het opruimen van dode immuun cellen door macrofagen. Daarnaast inhibeert adreenzuur de productie van de pro-ontstekings vet leukotriene B4 door verschillende typen immuun cellen. Als laatste tonen we in deze studie aan dat de aanwezigheid van adreenzuur tijdens de inductie van artritis ervoor zorgt dat er veel minder ontsteking ontstaat in deze muizen dan wanneer ze niet worden blootgesteld aan adreenzuur.

De laatste twee studies in dit proefschrift beschrijven hoe belangrijk het is om het lichaamsmateriaal dat onderzoekers gebruiken in hun studie op een juiste manier te behandelen en te bewaren. In de studie in **hoofdstuk 6** hebben we de effecten onderzocht van verschillende methodes die te maken hebben met de verzameling, verwerking en opslag van bloedplasma, op vetzuurmetingen. De aanleiding voor dit onderzoek was het resultaat van de studie beschreven in **hoofdstuk 3**, waar we geen SPM konden vinden in gewrichtsvocht van RA en artrose patienten terwijl zij in eerder onderzoek wel waren gedetecteerd. In deze studie hebben we bloedplasma verzameld en in een deel daarvan op dezelfde dag, zo snel mogelijk, de verschillende vetten geanalyseerd. De rest van het bloedplasma hebben we op kamertemperatuur, 4°C, -20°C of -80°C bewaard en na verschillende opslagperiodes hebben we de vetten geanalyseerd. De resultaten laten zien dat de tijd en temperatuur tot aan het invriezen, als ook de vriezertemperatuur zeer belangrijk is. Het grootste verschil tussen de nulmeting zagen we bij opslag bij -20°C voor een periode langer dan een half jaar. De SPMs protectin DX and Resolvin D5 werden meetbaar in het materiaal na een opslagperiode van een half jaar ondanks dat deze vetten niet in de nulmeting gedetecteerd konden worden.

De studie beschreven in **hoofdstuk 7** had als doel om te onderzoeken of gewrichtsvocht een voorbehandeling nodig heeft om betrouwbare resultaten te verkrijgen in een aantal veelgebruikte analysetechnieken. Zoals hierboven beschreven hebben we deze behandeling met hyaluronidase ook toegepast op de gewrichtsvochten die we analyseerden voor de studie beschreven in **hoofdstuk 3**. Hyaluronidase is een enzym dat hyaluronzuur afbreekt, de stof die het gewrichtsvocht stroperig maakt. We laten zien dat het vooral van belang is als de immuun cellen in het gewrichtsvocht worden onderzocht. In één van de vochten bleef zelfs 70% van de immuun cellen 'hangen' in het vocht wanneer deze niet werd behandeld met hyaluronidase. Deze achtergebleven cellen werden daardoor gemist in de flowcytometrie analyse, dit is een techniek waarbij cellen worden gelabeld met fluorescerende markers en vervolgens worden aangestraald met gekleurde lasers. Deze techniek wordt veel gebruikt voor het karakteriseren van aanwezige immuun cellen om op die manier iets te kunnen zeggen over het type immuun respons.

Samengenomen tonen de studies beschreven in dit proefschrift aan dat SPM wellicht niet de potentie hebben om als therapie te worden ingezet voor artrose. Het vetzuur adreenzuur daarentegen heeft veelbelovende pro-resolutie effecten op immuun cellen en in een arthritis muismodel. Verder onderzoek is nodig om het mechanisme van adreenzuur te ontrafelen en om te onderzoeken of het pro-resolutie effect ook in patienten standhoudt. De laatste studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat de manier van verwerken en het bewaren van lichaamsmateriaal, effect heeft op de resultaten van bepaalde analyses. Grotere bewustwording hiervan zal leiden tot kwalitatief hoogwaardiger onderzoek.