

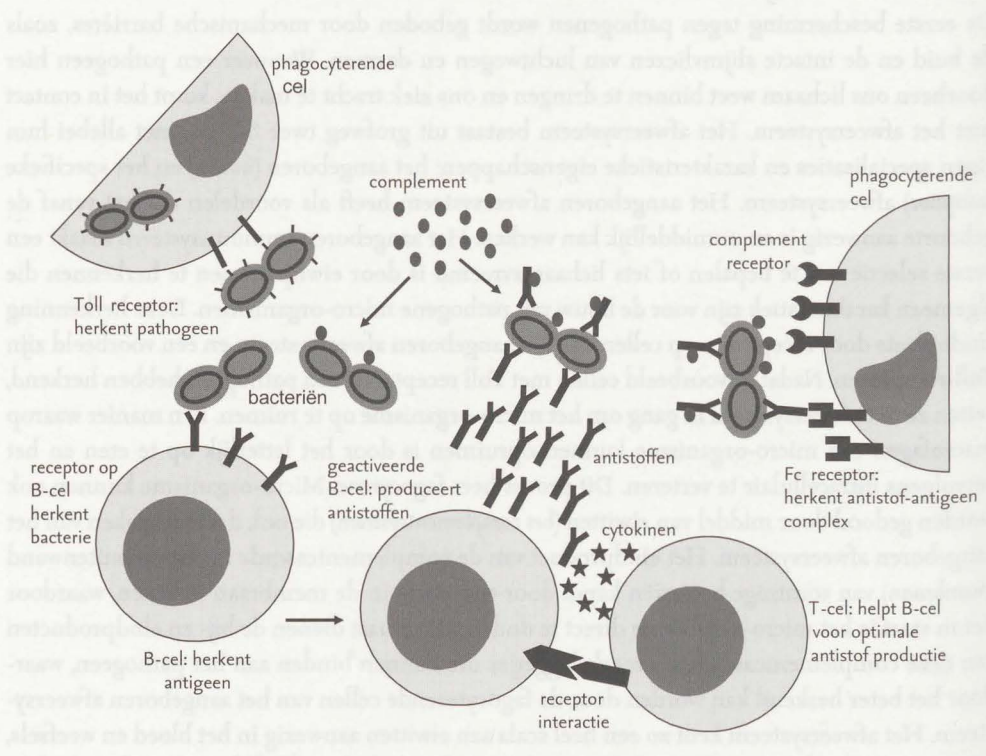
Nederlandse samenvatting

Het afweersysteem of immuunsysteem beschermt ons tegen micro-organismen die ons ziek kunnen maken zoals bacteriën, virussen, schimmels en wormen. Met een verzamelnaam heeten deze ziekmakende micro-organismen ook wel pathogenen. Aangezien er vele verschillende soorten ziekteverwekkers bestaan, is er ook een heel scala aan afweermechanismen noodzakelijk. Het belang van een goed afweersysteem blijkt uit zeldzame syndromen waarbij kinderen geboren worden zonder goed functionerend afweersysteem of bij patiënten met het Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Deze patiënten overlijden meestal aan het optreden van verschillende infecties – infecties die bij een persoon met een goed functionerend immuunsysteem niet of nauwelijks hinder zouden hebben veroorzaakt.

De eerste bescherming tegen pathogenen wordt geboden door mechanische barrières, zoals de huid en de intacte slijmvliezen van luchtwegen en darmen. Wanneer een pathogeen hier doorheen ons lichaam weet binnen te dringen en ons ziek tracht te maken, komt het in contact met het afweersysteem. Het afweersysteem bestaat uit grofweg twee takken, met allebei hun eigen specialisaties en karakteristieke eigenschappen: het aangeboren (innate) en het specifieke (adaptive) afweersysteem. Het aangeboren afweersysteem heeft als voordelen dat het vanaf de geboorte aanwezig is en onmiddellijk kan werken. Het aangeboren immuunsysteem maakt een eerste selectie om te bepalen of iets lichaamsvreemd is door eiwitpatronen te herkennen die algemeen karakteristiek zijn voor de bouw van pathogene micro-organismen. Deze herkenning vindt plaats door receptoren op cellen van het aangeboren afweersysteem en een voorbeeld zijn Toll-receptoren. Nadat bijvoorbeeld cellen met Toll receptoren een pathogeen hebben herkend, zetten ze het afweersysteem in gang om het micro-organisme op te ruimen. Een manier waarop macrofagen een micro-organisme kunnen opruimen is door het letterlijk op te eten en het vervolgens intracellulair te verteren. Dit proces heet fagocytose. Micro-organismen kunnen ook worden gedood door middel van eiwitten (het complementsysteem) die ook deel uit maken van het aangeboren afweersysteem. Het eindproduct van de complementcascade maakt de buitenwand (membraan) van sommige bacteriën kapot door een porie in de membraan te boren, waardoor het in staat is het micro-organisme direct te doden. Daarnaast dienen de bij- en eindproducten van deze complementcascade als merkvlaggetjes die kunnen binden aan het pathogeen, waardoor het beter herkend kan worden door de fagocyterende cellen van het aangeboren afweersysteem. Het afweersysteem kent zo een heel scala aan eiwitten aanwezig in het bloed en weefsels, waarvan sommige dienen als merkvlaggetjes om pathogenen beter zichtbaar te maken, andere leiden tot een verhoogde bloedtoevoer (locale roodheid, warmte en zwelling) en weer andere dienstdoen als boodschappermoleculen voor cellen van het immuunsysteem. Deze processen dragen allemaal bij aan het opruimen van het pathogeen.

Een tekortkoming van het aangeboren afweersysteem is dat het slechts in staat is een infectie onder controle te houden, maar dat het de infectie niet volledig kan opruimen. De tweede tak, het specifieke afweersysteem, is wel in staat een pathogeen, en dus een infectie, volledig te

eliminieren. Dit specifieke afweersysteem wordt van oudsher verdeeld in twee delen: het humorele afweersysteem en het cellulaire afweersysteem. Door het humorele afweersysteem worden na herkenning van een specifieke structuur op een micro-organisme (het antigeen) antistoffen geproduceerd. Deze antistoffen zijn wel specifiek gericht tegen dat éne micro-organisme dat is binnengedrongen. Antistoffen worden gemaakt door cellen die oorspronkelijk uit het beenmerg komen, en daarom B-cellen worden genoemd. De antistoffen worden in grote hoeveelheden geproduceerd en binden aan het specifieke antigeen op het binnendringende micro-organisme. Vervolgens kan het antigeen-antistof complex worden herkend door receptoren voor het antistof (Fc-receptoren) die vóórkomen op allerlei cellen van het immuunsysteem. Na binding van het complex aan de Fc-receptor wordt het complex uit de weg geruimd door bijvoorbeeld te worden gefagocyteerd. De andere, cellulaire tak van het specifieke afweersysteem bestaat uit cellen die oorspronkelijk uit de thymus komen en daarom T-cellen worden genoemd. Cellulaire afweer is onder anderen belangrijk voor virus infecties. Zogenaamde cytotoxische T-cel-



Figuur 1 Samenwerking tussen het aangeboren en het specifieke afweersysteem.

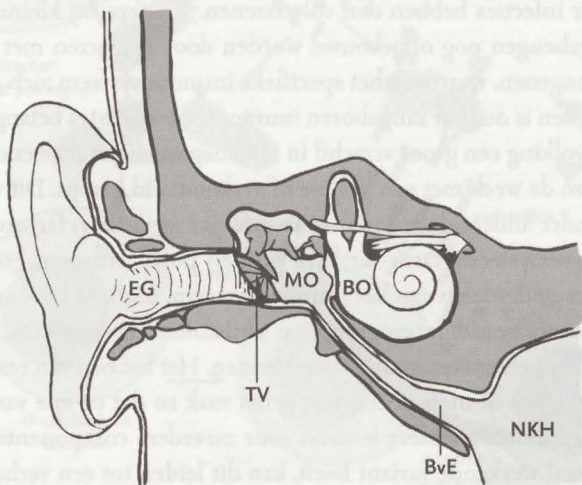
Toll-receptoren herkennen patronen op bacteriën waardoor ze deze kunnen opeten en verteren. Bacteriën worden ook herkend door receptoren op de B-cel, die vervolgens geactiveerd wordt en antistoffen gaat produceren. Geholpen door cytokinen en receptor-interacties met T-cellen, ontstaat optimale antistofproductie en immunologisch geheugen. Verder herkennen Fc- en complement-receptoren op phagocyterende cellen het antigeen-antistof complex en ruimen dit uit de weg.

len kunnen met virus geïnfecteerde cellen doden en daardoor voorkomen dat het virus zich verder in het lichaam verspreidt. Een andere categorie van T-cellen produceert groeifactoren (cytokinen) die het afweersysteem beïnvloeden, reguleren en coördineren. Op het oppervlak van deze T-cellen zitten specifieke receptoren die weer kunnen binden aan andere cellen van het immuunsysteem, bijvoorbeeld B-cellen. De T-cel kan met deze binding de B-cel tot productie van antistoffen aanzetten. Deze T-cellen worden daarom ook wel T-helper-cellen genoemd. De cellen van het specifieke afweersysteem herkennen dus ieder een zeer specifiek antigeen. Het grote voordeel van het specifieke afweersysteem is dat bij de tweede keer dat dit zelfde antigeen het lichaam binnendringt er nog cellen zijn die zich dit antigeen herinneren. Deze B-cellen kunnen deze tweede keer, geholpen door de T-helper-cellen, sneller en meer antistoffen produceren. Bovendien zijn deze antistoffen van een betere kwaliteit (affiniteit). Het immuunsysteem reageert nu dus zo snel en efficiënt dat het pathogeen geen ziekteverschijnselen meer kan veroorzaken. Dit immunologisch geheugen ontstaat na een natuurlijke infectie maar kan ook door middel van inenting (vaccinatie) worden opgewekt.

Het aangeboren en het specifieke afweersysteem werken nauw samen om een binnendringend pathogeen uit te roeien. Doordat het aangeboren systeem in staat is snel en aspecifiek te reageren, kan het pathogeen zich niet optimaal vermenigvuldigen en blijft de infectie dus onder controle. Het specifieke afweersysteem maakt het opruimwerk vervolgens af en zorgt voor geheugen zodat een tweede infectie nog sneller en beter te bestrijden is. Voor een optimale bescherming tegen pathogenen kan het ene systeem niet zonder het andere. Dit blijkt ook uit het feit dat kleine kinderen vaker infecties hebben dan volwassenen. Immers, bij kleine kinderen moet het immunologische geheugen nog opgebouwd worden door contacten met alle in de omgeving voorkomende pathogenen, waardoor het specifieke immuunsysteem zich geleidelijk aan verbetert. Bij de allerjongsten is dus het aangeboren immuunsysteem extra belangrijk. Toch zie je ook in de volwassen bevolking een groot verschil in infectiegevoeligheid; je ene collega is nooit ziek, terwijl de ander om de week met een griepje of verkoudheid kampt. Dit verschil in infectiegevoeligheid komt onder andere door variaties in erfelijke (genetische) factoren van het aangeboren en specifieke afweersysteem. Deze variaties worden polymorfismen genoemd en kunnen voorkomen in allerlei onderdelen van het immuunsysteem, zoals de bovengenoemde Toll receptoren, de complementcascade, receptoren voor antistoffen (Fc-receptoren), de boodschappermoleculen (cytokinen) en receptoren voor deze cytokinen. Het hebben van een bepaalde erfelijke variatie geeft niet een alles-of-niets effect. Wel is het vaak zo dat de ene variant beter werkt en een andere net iets minder. Wanneer iemand voor meerdere componenten van het afweersysteem een minder goed werkende variant heeft, kan dit leiden tot een verhoogde vatbaarheid voor infecties.

Een van de meest voorkomende infectieziektes bij kinderen is otitis media (OM), ofwel middenoorontsteking. Zoals in figuur 2 te zien is, staat het middenoor via de buis van Eustachius in verbinding met de neus-keelholte. In een mensenmond, en dus de neus-keelholte, zijn continu allerlei soorten bacteriën aanwezig. Het kan vóórkomen, bijvoorbeeld tijdens een verkoudheid, dat bacteriën via de buis van Eustachius het middenoor bereiken, waar ze, als ze niet bijtijds door het afweersysteem uit de weg worden geruimd, een ontsteking kunnen veroorzaken. Er zijn verschillende vormen van middenoorontsteking. Otitis media acuta (OMA) is een vorm

van acute ontsteking van het middenoor waarbij vloeistof (effusie) aanwezig is in het middenoor, samen met symptomen van acute ontsteking zoals koorts, roodheid van het trommelvlies en pijn. Bij otitis media met effusie (OME) is ook effusie aanwezig in het middenoor, maar nu zonder symptomen van een acute ontsteking. OME kan het gevolg zijn van een acute middenoorinfectie waarbij de effusie niet adequaat is opgeruimd en dus voor langere tijd achterblijft in het middenoor. OME lijkt echter soms ook op te treden zonder dat hier een acute infectie met symptomen aan is voorafgegaan. Naar schatting heeft ongeveer 80% van alle kinderen tenminste één keer OMA gehad als ze 3 jaar oud zijn en heeft meer dan 50% van alle kinderen al een periode met OME doorgemaakt voor hun eerste verjaardag. De huidige behandelingsmethoden voor OMA en OME, (antibiotica, het plaatsen van trommelvliesbuisjes of het knippen van de keel- en/of neusamandelen) blijken minder effectief dan gehoopt. Het zou dan ook wenselijk zijn maatregelen ter voorkoming van OM beschikbaar te hebben. Momenteel is daarom intensief onderzoek gaande naar een bruikbaar vaccin dat aan het voorkomen van OM bij zou kunnen dragen. De belangrijkste bacteriële verwekker van otitis media is *Streptococcus pneumoniae*, ofwel de pneumokok. Deze bacterie komt erg vaak voor in de neus-keelholte van jonge kinderen. Naast OM kan deze bacterie ook andere ernstige ziekten veroorzaken zoals hersenvliesontsteking, longontsteking of sepsis (bloedvergiftiging waarbij levende bacteriën aanwezig zijn in de bloedbaan). Daarom is reeds vanaf de jaren '80 veel onderzoek gedaan naar de preventie



Figuur 2 Dwarsdoorsnede van het menselijk oor.

- EG: Externe gehoorkanaal;
- TV: Trommelvlies;
- MO: Middenoor met gehoorbeentjes;
- BO: Binnenoor met slakkenhuis en evenwichtsorgaan;
- BvE: Buis van Eustachius;
- NKH: Neus-Keelholte.

van pneumokokkeninfecties door middel van het opwekken van een specifieke afweerrespons met pneumokokkenvaccins. De eerste vaccins bestonden uit suikers (polysacchariden) die aan de buitenkant van de pneumokok voorkomen en daar het kapsel vormen (gekapselde bacterie). Er kunnen op basis van verschillende polysaccharidekapsels 90 verschillende pneumokokken typen worden onderscheiden. Het op dit moment verkrijgbare pneumokokkenpolysaccharidevaccin bevat kapselsuikers van 23 verschillende typen pneumokokken (serotypen). Deze 23 serotypen dekken ongeveer 90% van de voorkomende pneumokokkeninfecties in de Westerse wereld. Maar pneumokokkenpolysaccharidevaccins blijken echter bij kinderen jonger dan 2 jaar een onvoldoende afweerrespons op te wekken en dus pneumokokkeninfecties niet te kunnen voorkomen. Daarom is een nieuw vaccin ontwikkeld waarin de pneumokokkensuikers gekoppeld (geconjugeerd) zijn aan een dragereiwit. Dit conjugaatvaccin blijkt al een antistofrespons op te kunnen wekken bij kinderen vanaf de leeftijd van 2 maanden. Het pneumokokkenconjugaatvaccin bevat echter slechts de kapselsuikers van 7 verschillende pneumokokkenserotypen. Deze top 7 dekt 75% van de pneumokokkeninfecties bij kinderen.

Kinderen met een otitis media, en vooral die kinderen die vaak een acute infectie of die vaak een langdurige OME doormaken, vormen belangrijke groepen waarvoor gezocht wordt naar betere behandeling en preventie. Daarom heeft ons onderzoek zich gericht op het in kaart brengen van het afweersysteem van kinderen met vaak terugkerende OMA en langdurige en terugkerende OME. De onderzoekspopulatie bestond uit 400 kinderen met acute middenoorontsteking en ongeveer evenzoveel kinderen met otitis media met effusie. Zij zijn onderzocht op factoren van het aangeboren en het specifieke afweersysteem.

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een algemene inleiding over otitis media en het aangeboren en specifieke afweersysteem tegen pathogenen die otitis media kunnen veroorzaken. In de twee volgende hoofdstukken richten we ons op erfelijke (genetische) variaties in factoren van het aangeboren afweersysteem.

In **hoofdstuk 2** staat mannan-bindend lectine (MBL) centraal, een molecuul dat na binding aan suikers aan de buitenkant van een bacterie het complementsysteem activeert. Polymorfismen in het gen coderend voor MBL leiden tot verschillende hoeveelheden functioneel MBL in het bloed. We hebben op 12 posities in het gen erfelijke variaties onderzocht en een nieuwe variant van het MBL-gen geïdentificeerd die leidt tot lagere functionele MBL spiegels. Ook laten we zien dat kinderen die drager zijn van deze en een aantal reeds bekende andere erfelijke MBL-varianten, vaker middenoorontsteking hebben dan kinderen die een "normaal" MBL-gen en dus hogere spiegels van MBL in bloed hebben. Deze associatie werd alleen in kinderen jonger dan 2 jaar gevonden, wat nog eens benadrukt dat het aangeboren immuunsysteem vooral in de jongste kinderen van groot belang is, omdat het specifieke afweersysteem zich op die leeftijd nog verder moet ontwikkelen.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een andere belangrijke component van het aangeboren afweersysteem, namelijk de Toll-like receptoren (TLR) die patronen op de buitenkant van pathogenen herkennen. Een belangrijk molecuul in het Toll-like receptorcomplex is CD14, waarvan ook erfelijke varianten bekend zijn. Wij hebben aangetoond dat kinderen die drager zijn van de erfelijke variant die leidt tot lage spiegels van CD14 in het bloed minder goed antistoffen maken na pneumokokkenvaccinaties en ook vaker oorontsteking krijgen dan kinderen met de variant

waarbij meer CD14 geproduceerd wordt. De associatie tussen het polymorfisme en oorontsteking werd weer alleen gevonden in de jongste kinderen.

In de **hoofdstukken 4 en 5** beschrijven we de specifieke afweerrespons na verschillende vaccinaties in kinderen met middenoorontsteking. Er is gekeken of bij kinderen met terugkerende middenoorontstekingen eventueel sprake is van een meer algemene verzwakte specifieke afweerrespons in vergelijking tot kinderen die nooit middenoorontsteking hebben gehad. Om dit te onderzoeken is de antistofrespons na vaccinaties die alle kinderen in Nederland krijgen in het kader van het Rijksvaccinatieprogramma bepaald. Het bleek dat kinderen met OME, OMA en gezonde kinderen even goed reageerden op mazelen, Haemophilus influenzae-type B, tetanus en difterievaccinaties.

De kinderen die aan onze studie deelnamen reageerden over het algemeen bovendien goed op de toegediende pneumokokkeninenting en maakten voldoende antistoffen. Vervolgens hebben we onderzocht of verschillende vaccinatieschema's, met eerst één of twee keer een pneumokokkenconjugaatvaccinatie gevolgd door een pneumokokkenpolysaccharide inenting, leidden tot verschillen in antistofkwaliteit (affiniteit). Wij hebben laten zien dat de polysaccharidevaccinatie, afhankelijk van het aantal toegediende pneumokokkenconjugaatvaccinaties, inderdaad betere antistoffen oplevert. De antistoffen opgewekt na een extra polysaccharidevaccinatie binden beter aan bacteriën dan antistoffen die ontstaan na alleen conjugaatvaccinatie. Ook werden bacteriën die in een reageerbuisje geïncubeerd werden met antistoffen opgewekt na de extra polysaccharidevaccinatie beter gefagocyteerd dan bacteriën geïncubeerd met antistoffen opgewekt na alleen een conjugaat inenting. Deze kwalitatieve karakteristieken na de polysaccharidevaccinatie zijn over het algemeen beter als daarvoor twee pneumokokkenconjugaatvaccinaties zijn toegediend.

In de **hoofdstukken 6 en 7** hebben we bestudeerd of er ook variaties in erfelijke factoren van het afweersysteem voorkomen, die de effectiviteit van vaccinaties of de hoogte van de antistofrespons beïnvloeden. In **hoofdstuk 6** werd gekeken naar erfelijke variaties die bestaan in de Fc-receptoren (zie figuur 1). Het blijkt dat kinderen die drager zijn van een Fc-receptor die minder goed antistoffen van de IgG2 klasse bindt, vaker last hebben van terugkomende middenoorontsteking in vergelijking tot kinderen die de goed IgG2 bindende Fc-receptor hebben. Het slechter binden van IgG2 aan de Fc-receptor leidt waarschijnlijk tot een minder goede opname van pneumokokken door immuuncellen (slechtere fagocytose) lokaal in het middenoor.

De sterkte en de aard van een antistofrespons wordt mede bepaald door de aanwezigheid van de immunologische boodschappermoleculen (cytokinen). Ook in deze cytokinen en receptoren voor cytokinen komen polymorfismen voor. Een cytokine dat productie van antistoffen door B-cellen stimuleert is interleukine-4 (IL-4). Wij hebben in **hoofdstuk 7** gekeken of polymorfismen in IL-4 en de receptor daarvoor leiden tot een verschil in de antistofrespons na pneumokokkenvaccinatie. Als maar één enkele erfelijke variant werd bekeken, waren de verschillen in antistofrespons klein. Toen echter gekeken werd naar de combinatie van de polymorfisme in IL-4 en de IL-4 receptor tegelijkertijd (een haplotype), werd wel een associatie gezien met een minder goede antistofrespons.

De vraag is welke componenten van het immuunsysteem die lijken bij te dragen aan het ontstaan van acute middenoorontsteking, ook bijdragen aan het ontstaan van otitis media met

effusie. In **hoofdstuk 8** werden daarom een aantal van deze immunologische factoren onderzocht in kinderen met otitis media met effusie. We hebben gekeken naar immuunglobulinen- en mannan-bindend lectine (MBL) spiegels in serum en naar de polymorfismen in Fc-receptoren. MBLspiegels en variaties in Fc-receptoren lijken mogelijk wel geassocieerd te zijn met het terugkomen van OME, immuunglobulinenspiegels daarentegen niet.

In **hoofdstuk 9** worden de bevindingen beschreven in dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in de context van reeds bestaande literatuur en worden tevens suggesties gedaan voor mogelijk vervolgonderzoek.

Samenvattend zijn we er door middel van het door ons uitgevoerde onderzoek achter gekomen dat een aantal erfelijke variaties in het aangeboren afweersysteem bijdragen aan het ontstaan van middenoorontsteking, maar alleen in de jongste kinderen van onze studie. De productie van specifieke antistoffen lijkt in kinderen met middenoorontsteking voldoende. Vaccinatie met verschillende pneumokokkenvaccins leidt tot goede antistoffen, waarvan de kwaliteit wel verschilt afhankelijk van het type vaccin (puur bacterieel suiker of suiker gekoppeld aan een eiwit) en het aantal vaccinaties. Wederom zijn het genetische verschillen in de receptoren die deze antistoffen moeten binden voordat ze effect kunnen hebben die wel verder bijdragen tot een verhoogd risico op middenoorontsteking.

Om echter tot de ware invloed van genetische polymorfismen in het aangeboren en specifieke afweersysteem te komen en om het effect van omgevingsfactoren en andere immuun-gerelateerde eigenschappen, zoals bijvoorbeeld het hebben van allergie, verder te onderzoeken, is vervolgonderzoek noodzakelijk. Het beste zou hier een studie voor kunnen worden opgezet waarin baby's vanaf hun geboorte deelnemen en waarbij zowel de afweer, omgevingsfactoren (crèchebezoek, roken in huis, het hebben van broertjes en zusjes), het ontwikkelen van allergieën en het doormaken van infecties gedurende lange tijd zorgvuldig wordt gevolgd. Pas dan kan de bijdrage van deze verschillende factoren op waarde worden beoordeeld. Mogelijk leidt deze kennis dan ook tot een betere preventie en behandeling van middenoorontsteking en andere ontstekingen veroorzaakt door de pneumokok, waarvan veel kinderen over de gehele wereld zouden kunnen profiteren.