

SAMENVATTING

Dit proefschrift handelt over de immunologische afweer in de bovenste luchtwegen, met name in de neus. Deze vormt de 'porte d'entrée' van het ademhalingsstelsel. Tegelijk met de geïnhalerde lucht worden allerlei lichaamsvreemde stoffen (antigenen) ingeademd die mogelijk schadelijk en in ieder geval ongewenst zijn voor de longen. In de neusholte wordt een begin gemaakt met de verwijdering of het onschadelijk maken van deze stoffen. Naast bestudering van het neusslijmvlies (neusmucosa) bij de mens, werd in het onderzoek speciale aandacht gegeven aan het neus-geassocieerde lymfoïde weefsel (NALT) in de rat. De ratte NALT is een ophoping van lymfoïd weefsel in de bodem van de neusholte.

In hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van de literatuur betreffende de morfologie en functie van slijmvliezen (mucosae) in het algemeen en van het neusslijmvlies in het bijzonder. Slijmvliezen hebben een gespecialiseerde functie, bijvoorbeeld de uitwisseling van zuurstof tegen koolzuurgas via de mucosa van de longen en de opname van voedsel via de darmmucosa. Tegelijkertijd moeten de slijmvliezen zoveel mogelijk voorkomen dat schadelijke stoffen het lichaam binnendringen. Hiertoe beschikken ze over zowel niet-immunologische als immunologische afweersystemen. Tot de eerste behoren bijvoorbeeld de trilharen welke deeltjes verwijderen die 'gevangen' zijn in de slijmlaag die de slijmvliezen bekleedt, en allerlei anti-microbiële eiwitten (bijvoorbeeld enzymen). Het immunologische afweersysteem omvat lymfoïde cellen, zoals T en B cellen, niet-lymfoïde cellen, zoals macrofagen ('vreetcellen') en antigeen-presenterende cellen welke nodig zijn om een immuunrespons op gang te brengen, en verder specifieke afweerstoffen (antilichamen = immunoglobulinen = Ig). Deze worden geproduceerd door uit B cellen ontwikkelde plasma cellen. Er zijn 5 isotypen (soorten) immunoglobulinen, namelijk IgM, belangrijk in de vroege reacties; IgE, dat een rol speelt in allergische reacties en in parasitaire infecties; IgD, het minst voorkomende immunoglobuline (minder dan 1%) in plasma; en tenslotte IgA en IgG, de meest voorkomende immunoglobulinen. In de sekretoire produkten van slijmvliezen is IgA verreweg het belangrijkste. Het komt daar in een bijzondere vorm, het sekretoir IgA (sIgA) voor, opgebouwd uit 2 molekulen (dimeer) IgA plus een J-keten (joining-chain), plus een sekretoire component. De plasma cellen die het dimeer IgA met J-keten produceren liggen met name onder het slijmvlies-epitheel en rondom klierstructuren. Dit vergemakkelijkt de uitscheiding van het sIgA via de sekretoire component (SC) op deze (klier)epitheel cellen (zie hoofdstuk 1: Fig. 1).

Op diverse plaatsen direkt onder het epitheel, in het bindweefsel van de slijmvliezen worden georganiseerde aggregaten van lymfoïd weefsel aangetroffen. De algemene benaming hiervoor is mucosa-geassocieerd lymfoïd weefsel (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT). In de darm bevindt zich het darm-geassocieerde

lymfoïde weefsel (gut-associated lymphoid tissue: GALT) en in de longen het bronchus-geassocieerde lymfoïde weefsel (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT). Bij verschillende diersoorten is ook in de neusholte MALT aangetoond. Al in 1947 werd MALT in de ratteneus beschreven, maar het duurde tot ver in de tachtiger jaren alvorens er structureel onderzoek aan werd gedaan. Dit neus-geassocieerde lymfoïde weefsel (NALT) wordt wel beschouwd als het equivalent van de neusamandel (adenoid) bij de mens.

Na de algemene inleiding geeft **hoofdstuk 2** een toelichting op het motief en het doel van de opeenvolgende experimenten. Een steeds terugkerende techniek in de experimenten is de immunohistochemie. Deze techniek berust op het feit dat cellen kenmerkende antigenen dragen op hun oppervlak of in hun cytoplasma. Tegen diverse van deze antigenen zijn antilichamen opgewekt. Na incubatie van weefselcoupes (een plakje weefsel van meestal 8/1000 mm dik) met deze antilichamen, is te zien of de betreffende antigenen en dus de betreffende celtypen, in de coupe aanwezig zijn. Draagt een cel namelijk een bepaald antigeen, dan bindt het op dat antigeen passende antilichaam en dit is vervolgens zichtbaar te maken via een kleurreactie. De aangekleurde cel noemt men positief voor dat antigeen.

In **hoofdstuk 3** wordt de normale structuur en ontwikkeling van de neusmucosa inclusief de NALT beschreven, omdat de morfologie en ontogenie van een weefsel belangrijke informatie kunnen verschaffen over de functie van dat weefsel. **Hoofdstuk 3.1** schetst de ontwikkeling van de NALT vanaf de geboorte van een rat tot drie weken daarna. Aanvankelijk bestaat de NALT voornamelijk uit T cellen en niet-lymfoïde cellen. Gedurende de ontwikkeling nemen T en B cellen in aantal toe en gaan zich groeperen waardoor na 10 dagen afzonderlijke T- en B-cel gebieden zijn te onderscheiden. Dan worden ook hoog endotheel venulen (HEV) waargenomen. Dit zijn kleine veneuze bloedvaten met een gespecialiseerd hoog, kubisch, endotheel. HEV zijn de vaatjes van waaruit T en B cellen de bloedbaan verlaten om het lymfoïde weefsel in te gaan.

De niet-lymfoïde cellen werden bestudeerd met behulp van 3 verschillende determinanten, herkend door de (monoklonale) antilichamen ED1, ED2 en ED3. ED1-positieve (ED1+) cellen omvatten monocyten, macrofagen en dendritische cellen. Deze komen op alle leeftijden ongelijkmatig verspreid in de NALT voor en vanaf de tweede dag na de geboorte wordt een enkele ED1+ cel ook in het epitheel aangetroffen. ED3+ cellen vormen een bepaalde subpopulatie macrofagen in lymfoïde organen en komen in de NALT van jonge dieren voor als onregelmatige cellen met dendritische uitlopers. Na een week raken ze steeds meer geconcentreerd in het grensgebied tussen de NALT en het omringende bindweefsel. In dat gebied worden op iedere leeftijd ook sterk aangekleurde ED2+ cellen gezien, welke stompe uitloperijtjes hebben. De subpopulatie van ED2+ cellen omvat vaste, niet-mobiele weefselmacrofagen. Het Ia antigeen, een determinant die normaal voorkomt op B cellen, geactiveerde T cellen, en antigeen-presenterende cellen, wordt door de hele NALT gezien, zowel op ronde cellen als op cellen met uitlopers. Het aantal cellen positief voor Ia neemt toe met de leeftijd van het dier. Ook in het epitheel komen Ia+ cellen voor, zelfs enkele

epitheel cellen brengen zelf het Ia antigeen tot expressie. Intra-epitheliale B cellen worden zelden gezien, maar T cellen komen regelmatig voor in het epitheel. Een krappe meerderheid van de intra-epitheliale T cellen is van het T helper subtype. Dit type T cel heeft in het algemeen een aktiverende invloed op het verloop van immunologische reacties.

In de volwassen NALT, welke beschreven wordt in **hoofdstuk 3.2**, blijkt het merendeel van de lymfocyten in het epitheel boven de NALT uit B cellen te bestaan. Anders dan in het epitheel, komen dieper in de NALT de T en B cellen in ongeveer gelijke hoeveelheden (B/T = 0.9) voor. Helper T cellen zijn groter in aantal dan suppressor/cytotoxische T cellen. Suppressor T cellen hebben een onderdrukkend effect op het verloop van immunologische reacties, en cytotoxische T cellen kunnen bepaalde doelwit cellen onschadelijk maken. B cellen kunnen, zoals eerder vermeld, uitrijpen tot immunoglobuline producerende plasma cellen. Al vóór het stadium van plasma cel zijn immunoglobulinen aanwezig op het oppervlak van B cellen. Van de B cellen in de NALT draagt minder dan 1% IgA of IgE op het oppervlak; verreweg de meeste dragen IgM. De verdeling van de niet-lymfoïde cellen is in de volwassen NALT niet gewijzigd in vergelijking met de situatie op dag 21 na de geboorte. ED1+ cellen komen door de hele NALT voor, met name in het T-cel gebied, terwijl ook enkele ED1+ cellen in het epitheel voorkomen. ED1+, ED2+, en ED3+ macrofagen komen voor in het grensgebied tussen het lymfoïde deel van de NALT en het omringende bindweefsel. Hiervan zijn de ED3+ cellen het geringst in aantal. Enkele van de niet-lymfoïde cellen vertonen zure fosfatase of niet-specifieke esterase activiteit. Zure fosfatase is een verteringsenzym dat met name in de klassieke (vreet)macrofagen actief is. Niet-specifieke esterase komt minder verbreid voor; dit enzym wordt onder andere waargenomen in zogeheten 'tingibele Körper macrofagen', die brokstukken van 'opgeruimde' cellen bevatten. Er is nog een andere monoklonaal antilichaam gebruikt, namelijk ED5, dat een determinant herkent op 'folliculair dendritische cellen'. Deze cellen met dendritische uitlopers komen voor in lymfoïde follikels (bolvormige opeenhopingen van meestal B cellen). De aanwezigheid van ED5+ cellen geeft een zekere mate van aktivatie van het betreffende lymfoïde weefsel aan. Desondanks worden weinig kiemcentra gezien. Ook kiemcentra wijzen op aktivatie van het weefsel. Het Ia antigeen is ruimschoots aanwezig in de NALT, voornamelijk op B cellen. De morfologische kenmerken van de NALT suggereren dat dit lymfoïde weefsel onder normale, gezonde omstandigheden, in een meer geactiveerde toestand is dan de BALT in de lagere luchtwegen.

Hoewel morfologie en functie nauw aan elkaar verbonden zijn, bleef de vraag bestaan: 'wat gebeurt er wanneer antigenen via de neusholte aan het lichaam worden aangeboden?' Daarom zijn immunisatiestudies uitgevoerd. Deze staan beschreven in **hoofdstuk 4**. In de eerste studie, **hoofdstuk 4.1**, kregen ratten het antigeen TNP-LPS toegediend. TNP-LPS bestaat uit een groot drager-molekuul, LPS, en een zogeheten haptene, TNP. LPS, een bacteriële antigeen, is een T cel onafhankelijk (thymus-onafhankelijk) antigeen. Dit betekent dat LPS B cellen kan aanzetten tot de

produktie van antilichamen, zonder tussenkomst van T helper cellen. In een immuunrespons tegen TNP-LPS zullen ook antilichamen tegen TNP gevormd worden. De anti-TNP antilichaam vormende cellen kunnen in weefselcoupes worden aangetoond middels een kleurreactie. Het aantal anti-TNP antilichaam vormende cellen werd als maat voor de optredende reactie gebruikt.

Alle dieren werden in de neus (intranasaal) geïmmuniseerd, nadat ze 15 dagen eerder reeds een dosis TNP-LPS ontvangen hadden, en wel op 4 verschillende manieren, namelijk a. intranasaal, zodat het neusslijmvlies en de NALT twee keer met het antigeen in contact komen, b. in de wang onder de huid (subcutaan), waarbij dezelfde lymfeklieren het antigeen verwerken als na intranasale toediening, c. in de buikholte (intraperitoneaal), aangezien deze manier van immuniseren geschikt is om een reactie in de slijmvliesen op te wekken, en d. in de luchtpijp (intratracheaal) hetgeen aanwijzingen zou kunnen opleveren over een mogelijke communicatie op immunologisch gebied tussen de longen en de neus. De resultaten laten zien dat slechts weinig anti-TNP vormende cellen in de NALT ontstaan. Deze zijn gelokaliseerd in de periferie, hetgeen overeenkomt met de lokalisatie van antilichaam vormende cellen in BALT. Daar worden antilichaam vormende cellen ook met name rondom het lymfoïde weefsel waargenomen. De respons in de diep cervicale lymfeklieren (diep cervical lymph nodes; zie hoofdstuk 1, Fig. 4) is groter dan in de andere onderzochte organen, ongeacht de wijze van immuniseren. De hoogste respons treedt op na subcutaan-intranasaal immuniseren, er is dan een piek te zien op dag 5 na de laatste immunisatie. De meest voorkomende isotypen van de immunoglobulinen (IgM, IgG, IgA, en IgE) worden alle vier geproduceerd. In de lymfeklieren wordt veel IgA gemaakt, terwijl in de milt IgA juist in heel geringe hoeveelheden wordt geproduceerd. Dieren die intraperitoneaal geprimeerd en intranasaal geboosterd zijn, ontwikkelen een aanzienlijke respons op dag 7 in long en milt. Intratracheaal-intranasaal immuniseren induceert vrijwel uitsluitend in de diep cervicale lymfeklieren een respons. Opvallend bij deze laatste immunisatie route was de toename aan long-macrofagen. De mogelijkheid bestaat dat deze macrofagen het antigeen hebben opgeruimd voordat er antilichaam vormende cellen geïnduceerd zijn, en dat daardoor een geringe reactie optreedt. Bovendien is bekend dat long-macrofagen een immuunrespons ter plekke kunnen onderdrukken. Het twee keer aanbieden van antigeen in de neus veroorzaakt slechts geringe aantallen anti-TNP antilichaam vormende cellen. Alle vier de immunisatie routes leiden tot anti-TNP antilichamen in het bloed. In het algemeen wordt geen verband gevonden tussen het aantal anti-TNP antilichaam vormende cellen in de weefsels en de reactie in het bloed.

Nu gebleken was dat specifieke antilichaam vormende cellen in de bovenste luchtwegen opgewekt kunnen worden, zij het met name in de lymfeklieren van dat gebied, werd vervolgens het effect van drie verschillende soorten antigenen bestudeerd. Weer werden ratten intranasaal geïmmuniseerd. De drie gebruikte soorten antigenen waren weer koppelingen van TNP en een drager molecuul. Het drager-molecuul bepaalt de aard van de reactie. Er werd geïmmuniseerd met: TNP-LPS, TNP-KLH en TNP-SRBC. TNP-KLH is een T-afhankelijk antigeen. Het

kan geen antilichaam vormende cellen opwekken zonder de hulp van T helper cellen, dit in tegenstelling tot TNP-LPS. Deze twee antigenen zijn oplosbare antigenen. TNP-SRBC (SRBC = schape rode bloedcellen), is een deeltjes-antigeen. Rode bloedcellen zijn relatief groot (7/1000 nm), en zouden in de neusholte verwerkt moeten worden. Een aantal dieren kreeg het antigeen nu slechts eenmalig toegediend, de andere kregen het wederom twee keer, met een tussenpoos van 15 dagen. De resultaten in **hoofdstuk 4.2** laten zien dat het eenmalig toedienen van deze antigenen niet leidt tot specifieke antilichamen in het bloed en nauwelijks tot antilichaam vormende cellen in de weefsels. Van de drie gebruikte antigenen geeft TNP-KLH na twee keer toedienen de hoogste respons in de diep cervicale lymfeklier. TNP-LPS en TNP-SRBC geven een hele lage respons. TNP-SRBC leidt, met of zonder boosten, niet tot anti-TNP antilichamen in het bloed. De resultaten van de uitgevoerde immunisatie-experimenten suggereren dat de respons op intranasaal toegediende antigenen bij voorkeur beperkt blijft tot de lymfeklieren die de bovenste luchtwegen draineren. Bovendien blijken deeltjes antigenen, zoals SRBC, geen immuunrespons te veroorzaken, waarschijnlijk omdat ze in de slijmlaag gevangen en vervolgens door de werking van trilharen van de neusmucosa verwijderd worden. Hoewel bacteriën ook deeltjes zijn, kunnen deze tot andere resultaten leiden omdat ze levend zijn, zich vermenigvuldigen en actief kunnen hechten aan het slijmvlies.

Op basis van de gevonden resultaten, gecombineerd met literatuurgegevens wordt de volgende suggestie gedaan: de NALT en de neusmucosa zijn gericht op een specifieke verdediging tegen microorganismen in het lumen van de neus, en tegelijkertijd op het onderdrukken van de immuunrespons tegen oplosbare antigenen welke in de neusmucosa zijn doorgedrongen. Het is bekend dat het herhaald aanbieden van antigenen via de slijmvliesen de respons in het bloed kan verminderen.

De resultaten die verkregen zijn in dierexperimenteel onderzoek, zijn niet zonder meer toepasbaar op de humane situatie. De mens heeft immers geen NALT als zodanig, hoewel de NALT beschouwd wordt als het ratte equivalent van het humane adenoid. Daarnaast is de neusmucosa zelf bezaaid met lymfoïde en niet-lymfoïde cellen. In **hoofdstuk 5** is de neusmucosa van KNO-patiënten en van mensen met een gezonde neus onderzocht. **Hoofdstuk 5.1** richt zich met name op het epitheel dat de neusmucosa bedekt. Hierin blijken veel meer T dan B cellen voor te komen, waarbij de suppressor/cytotoxische (CD8+) T cellen veruit in de meerderheid zijn. Dit komt het sterkste naar voren bij patiënten. Van de lymfoïde cellen in het neusepitheel is bij patiënten 12% T helper (CD4+) en 78% T suppressor/cytotoxische cel. Het HLA-DR antigeen (het humane equivalent van het Ia antigeen) komt in ruime mate voor, op epitheelcellen, op lymfoïde en op niet-lymfoïde cellen.

Deze studie werd uitgebreid naar de overige lagen van de mucosa, waarover in **hoofdstuk 5.2** gerapporteerd wordt. Niet alleen in het bedekkende epitheel, maar ook in het klierepitheel komen meer CD8+ cellen dan CD4+ cellen voor. Ook in de klieren is de verhouding CD8+/CD4+ het hoogste in weefsel van patiënten. De indruk bestaat dat de CD8+ cellen behoren tot de groep cytotoxische T cellen. Deze kunnen

bijvoorbeeld virus-geïnfekteerde cellen opruimen. In het bindweefsel onder het epitheel zijn B cellen schaars, maar plasma cellen komen veelvuldig voor. De plasma cellen zijn onder het epitheel gelokaliseerd en in grotere aantallen rondom de klieren (zie hoofdstuk 6: Fig. 2). Het meest geproduceerde isotype is IgA. Zowel in patiënten als in controle weefsel worden regelmatig clusters van lymfoïde cellen gevonden in het subepitheliale bindweefsel. Soms worden naast een dergelijk cluster HLA-DR+ HEV waargenomen. Dit is opmerkelijk omdat HEV onder normale omstandigheden uitsluitend in lymfoïde organen voorkomen. Voorts komt het HLA-DR antigeen voor op ronde cellen en op cellen met uitlopers. Relatief gezien komen meer ronde HLA-DR+ cellen in het weefsel van patiënten voor, en meer HLA-DR+ cellen met uitlopers in het weefsel van controle personen. De ronde HLA-DR+ cellen zijn naar alle waarschijnlijkheid geactiveerde T cellen. In geactiveerde toestand kunnen T cellen namelijk het HLA-DR antigeen tot expressie brengen.

In standaard histologisch gekleurde coupes is patiënten materiaal duidelijk van controle weefsel te onderscheiden. De toegepaste 'methylgroen-pyronine' kleuring laat zien dat de klieren in de neusmucosa van patiënten rijkelijk gevuld zijn met mukeus (slijmerig) sereet. Een opvallend verschijnsel is ook het veelvuldig voorkomen van plaveisel epitheel bij patiënten. Deze vorm van epitheel, die bestaat uit afgeplatte cellen welke laagsgewijs zijn gestapeld, komt normaal niet voor in het onderzochte gedeelte van de neusmucosa. Hier wordt doorgaans ademhalingspitheel aangetroffen, waarin slijm producerende cellen en trilhaardragende cellen aanwezig zijn (zie hoofdstuk 1: Fig. 2). Ademhalingspitheel is van belang bij het vangen en afvoeren van deeltjes. Vervanging van ademhalingspitheel door plaveisel epitheel maakt deze basale functies onmogelijk. Ten gevolge van de verminderde reinigingsfunctie ontstaat een verhoogde kans op (re)infectie, met als gevolg dat ontstekingsreacties optreden, leidend tot weefselbeschadiging. Herstel van deze weefselbeschadigingen resulteert in verdere vervanging van ademhalingspitheel door plaveisel epitheel, waarmee de ongunstige kring gesloten is.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 6** de beschreven resultaten besproken in het licht van relevante literatuur. In deze samenvatting komen enkele discussiepunten bij het betreffende onderdeel ter sprake.