

## Nederlandse samenvatting

---

Het spectrum van de zon kan opgesplitst worden in drie delen: het zichtbare licht, de infrarode straling en aan de andere kant van het spectrum, bij golflengten van minder dan 400 nm, de ultraviolette straling. Het grootste gedeelte van de UV straling die het aardoppervlakte bereikt is UV-A straling (315-400 nm). Maar een klein gedeelte van de UV-B straling (280-315 nm) bereikt het aardoppervlakte, de rest wordt geabsorbeerd in de ozonlaag. Deze kleine hoeveelheid UV-B straling in het zonlicht heeft echter de meeste invloed op de huid.

UV straling, met name UV-B straling, is zeer fotoreactief. Het kan fotochemische smog veroorzaken, maar kan ook plastic afbreken. Voorts kan UV straling geabsorbeerd worden door organische moleculen in de huid, zoals het genetisch materiaal (DNA) en eiwitten, en deze moleculen fotochemisch veranderen. Vanuit dit oogpunt bezien, kan men zich voorstellen dat UV straling een groot aantal verschillende effecten kan hebben op de huid.

UV straling heeft een aantal positieve effecten op de huid: het is bijvoorbeeld betrokken bij de vorming van vitamine D (o.a. belangrijk voor de botopbouw) en bij de bruining van de huid (pigmentvorming). Aan de andere kant heeft UV straling een aantal schadelijke effecten: het is betrokken bij verbranding van de huid door de zon, het ontstaan en onverstoord doorgroeien van (huid)tumoren, huidveroudering en het verergeren van infecties. Een deel van deze schadelijke effecten, zoals de groei van tumoren en het verergeren van infecties, is toe te schrijven aan het feit dat UV straling het afweersysteem (immuunsysteem) onderdrukt. Een gedegen reactie van het immuunsysteem, dat betrokken is bij de afweer tegen geïnfecteerde of kwaadaardige cellen, is hierbij niet meer mogelijk.

Vanuit dit laatste perspectief gezien, zou men kunnen concluderen dat deze onderdrukking van het immuunsysteem (immuunsuppressie) een slechte zaak is en voorkomen zou moeten worden. Elke gezonde persoon vertoont echter deze door UV straling veroorzaakte immuunsuppressie. Wanneer we er dan ook wat dieper over zouden nadenken, kunnen we beargumenteren dat we deze onderdrukking juist nodig hebben. Als deze onderdrukking namelijk niet plaatsvindt, zou dat betekenen dat iedere keer wanneer onze huid aan zonlicht blootgesteld wordt, een activatie van het immuunsysteem en dus een ontstekingsreactie zal plaatsvinden.

Een verstoring van de UV-geïnduceerde onderdrukking van het immuunsysteem zou dus kunnen lijden tot een ontstekingsreactie zoals waarneembaar is bij mensen met zonneallergie oftewel chronische polymorfe lichtdermatose (CPLD). CPLD behoort tot de groep huidaandoeningen die we fotodermatosen noemen, omdat ze ontstaan en verergeren onder invloed van zonlicht. Ongeveer 10-20% van de van de bevolking in de gematigde klimaatzones heeft in meer of mindere mate last van zonneallergie. Deze CPLD patiënten krijgen jeukende bultjes en blaasjes en soms eczeemachtige reacties op de zonbeschenen

delen van hun huid. De huidreactie is meestal seizoensafhankelijk: de eerste reactie ontstaat vaak in de lente, neemt af gedurende de zomer en is meestal in de herfst en winter geheel afwezig. In zeer ernstige gevallen echter heeft de patiënt vaak het hele jaar door last van zijn aandoening en moet zijn/haar dag en nacht ritme omdraaien om een blootstelling aan zonlicht te vermijden.

De huidreactie treedt op binnen enkele uren tot dagen na de eigenlijke blootstelling aan zonlicht en verdwijnt vaak na een dag tot enkele weken zonder littekenvorming. Omdat de tijd tussen de eigenlijke blootstelling en het opkomen van de huidreactie vrij lang is (meerdere uren), wordt de reactie ook wel een vertraagd-type overgevoeligheidsreactie genoemd. In de meeste, minder ernstige gevallen is een eenmalige, kortdurende blootstelling aan zonlicht niet voldoende om de huidreactie op te wekken maar zijn daarvoor een aantal belichtingen nodig. CPLD is niet gerelateerd aan een bepaalde huidskleur of ras en kan in iedere levensfase ontstaan. De huidreactie komt meer voor bij (jonge) vrouwen dan bij mannen en meestal zijn UV-B straling en UV-A straling de veroorzakers van de reactie.

Het meeste onderzoek op het gebied van CPLD is verricht naar de kenmerken van de huidaandoening op het moment dat de huidreactie aanwezig is. Er is echter nog maar weinig bekend over de fase die vooraf gaat aan het ontwikkelen van de huidreactie en die de eigenlijke aanleiding is tot het ontstaan van de symptomen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich nu juist op deze aanloopfase.

In ons onderzoek hebben we gekeken naar de effecten van een eenmalige hoge dosis UV-B straling op de huid van CPLD patiënten en dat vergeleken met de reacties die optreden bij gezonde personen.

De onderzoeksgroep van de Amerikaan Kevin Cooper heeft zich bezig gehouden met het effect van UV-B straling op de huid van gezonde personen. Daarbij hebben zij in het bijzonder gekeken naar bepaalde witte bloedcellen (CD11b+ cellen). Deze cellen komen in grote getale de huid in na een eenmalige hoge blootstelling aan UV-B straling. Ze spelen een belangrijke rol bij de onderdrukking van het immuunsysteem doordat ze interleukine 10 kunnen produceren, een stofje met een immuunsuppressieve werking. Gebruikmakend van deze kennis stelden wij de volgende hypothese op: immuunsuppressieve CD11b+ cellen zijn niet aanwezig in de huid van CPLD patiënten na blootstelling aan UV straling. CPLD patiënten werden daarom op een klein huidveldje blootgesteld aan een hoge dosis UV-B straling. Na 1 dag en 2 dagen werd van de belichte huid en, ter controle, van de onbelichte huid onder lokale verdoving een klein stukje huid (biopsie) van 3 mm doorsnee afgenomen. Door middel van een biochemische kleurreactie hebben we kunnen aantonen dat deze CD11b+ cellen wel aanwezig zijn in de huid van CPLD patiënten, waarmee onze hypothese verworpen zou worden (**hoofdstuk 2**). Er waren echter duidelijke verschillen te zien in de huid van CPLD patiënten ten opzichte van gezonde controles: de CD11b+ cellen in de huid van CPLD patiënten drongen niet door tot in de bovenste huidlaag (de opperhuid of epidermis) en het bleek ook om een ander type cellen te gaan (deze CD11b+ cellen waren

voornamelijk macrofagen terwijl deze celpopulatie in gezonde personen voornamelijk uit neutrofielen bestond).

Een ander, veel verrassender verschil konden we waarnemen bij de Langerhans cellen. Deze cellen zijn in staat om lichaamsvreemde stofjes (antigenen) op te nemen, te verteren en te presenteren op hun celoppervlakte. Deze cellen spelen een belangrijke rol in de activatie en suppressie van het immuunsysteem. De Langerhans cellen bevinden zich in de epidermis en verdwijnen bij gezonde personen na belichting van de huid met UV-B straling. In de huid van CPLD patiënten zagen we daarentegen, zelfs bij een belichting met een hoge UV dosis, dat het merendeel van deze Langerhans cellen bleven zitten in de epidermis. Deze Langerhans cellen leken resistent te zijn voor UV-straling!

In een volgende reeks van experimenten wilden we daarom uitzoeken waarom deze UV-resistente Langerhans cellen niet verdwenen uit de huid van CPLD patiënten en of dat mede een oorzaak kon zijn voor het ontstaan van CPLD. Daartoe moesten we eerst achterhalen welk mechanisme een rol speelt bij het verdwijnen van de Langerhans cellen uit de huid van gezonde personen. Wanneer dat bekend is, kunnen we pas nagaan of dat mechanisme defect is bij CPLD patiënten. Daarom hebben we eerst in de UV-B-belichte huid van gezonde vrijwilligers gekeken. Twee mechanismen die ten grondslag zouden kunnen liggen aan de verdwijning van de Langerhans cellen zijn apoptose of migratie de huid uit (**hoofdstuk 3**). Wanneer een cel zoveel schade heeft dat hij die niet meer kan herstellen, zal hij een zelfmoordprogramma (apoptose) in werking zetten waardoor hij langzaam dood gaat en desintegreert zonder een ontstekingsreactie te veroorzaken. Apoptose is een beschermingsmechanisme waarbij het ontstaan van gemuteerde cellen, die later tot kankercellen kunnen uitgroeien, wordt voorkomen. Door middel van een biochemische kleurreactie in de afgenomen huidmonsters hebben we aangetoond dat de Langerhans cellen niet in apoptose gaan, maar veel van de omliggende opperhuidcellen (keratinocyten) wel.

Het is moeilijk om een dynamisch proces als migratie aan te tonen in een biopsie die een statische momentopname laat zien. Daarom hebben we eerst een nieuwe methode ontwikkeld voor het meten van migratie. Door het trekken van een blaartje met behulp van onderdruk kunnen de epidermis en de onderste huidlaag (lederhuid of dermis) pijnloos van elkaar gescheiden worden. De holte die daardoor ontstaat, wordt gevuld met blaarvocht. De Langerhans cellen die zich in de epidermis bevinden 'vallen' als het ware, wanneer ze de huid uit migreren, in het blaarvocht. Wanneer we nu het blaarvocht met behulp van een klein naaldje uit de blaar halen, zouden we migrerende Langerhans cellen in dit blaarvocht moeten kunnen terugvinden. Dit bleek inderdaad ook het geval: in de UV-belichte huid, maar niet in de onbelichte huid, konden we migrerende Langerhans cellen terugvinden in het blaarvocht. Ter controle werd ook het blaardak (epidermis) van de blaar gehaald om aan te tonen dat de Langerhans cellen inderdaad verdwenen waren. Het onderliggende

mechanisme voor de verdwijning van Langerhans cellen bleek dus geen apoptose maar migratie te zijn.

Met behulp van deze gegevens konden we nu nagaan of CPLD patiënten een defect hebben in de UV-geïnduceerde migratie van hun Langerhans cellen (**hoofdstuk 4**). Daartoe hebben we bij CPLD patiënten blaren getrokken op de belichte en onbelichte huid. Het bleek dat CPLD patiënten een sterk verminderde migratie hebben van hun Langerhans cellen. Een groot gedeelte van de cellen blijft gewoon zitten in de epidermis na UV-B belichting terwijl maar een heel klein gedeelte van de cellen terug te vinden is in het blaarvocht.

Waardoor is deze Langerhans cel migratie nu verstoord in CPLD patiënten? Om dat te onderzoeken hebben we gekeken naar de aanwezigheid van allerlei wateroplosbare stofjes, cytokines, die migratie van deze Langerhans cellen kunnen induceren (**hoofdstuk 5**). De twee belangrijkste migratie-inducerende cytokines, die in gezonde personen geproduceerd worden na belichting van de huid met UV-B zijn interleukine (IL)-1- $\beta$  en tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Deze twee cytokines bleken door significant mindere cellen geproduceerd te worden in de belichte huid van CPLD patiënten. Deze verminderde productie vormt een plausibele verklaring voor de verminderde Langerhans cel migratie in CPLD patiënten.

UV-B straling dringt niet dieper dan epidermis de huid in, waar het schade kan veroorzaken aan het DNA (thymidine dimeren). Migrerende Langerhans cellen uit de UV-B-belichte epidermis zijn dan ook herkenbaar aan hun UV-specifieke DNA schade. Het bleek echter dat maar 10-15% van alle migrerende Langerhans cellen UV-specifieke DNA schade had. Vermoedelijk wordt de schade eerst hersteld voordat de Langerhans cellen kunnen gaan migreren. Om dit te onderzoeken hebben we experimenten gedaan in (transgene) muizen die een defect hebben in het DNA herstelmechanisme waardoor ze niet of in beperkte mate de UV-geïnduceerde DNA schade kunnen herstellen (**hoofdstuk 6**). Deze muizen zijn zeer gevoelig voor UV-B straling en verbranden snel. Door deze muizen bloot te stellen aan lage doses UV-B straling konden we nagaan of een gebrek aan DNA herstel de migratie van de Langerhans cellen beïnvloedt. Het bleek echter dat deze muizen bij deze lage UV-B doses en geringe DNA schade al Langerhans cel migratie vertoonden. Herstel van het DNA is dus geen absolute voorwaarde voor Langerhans cel migratie in deze dieren. Met behulp van deze muizen konden we ook nagaan of er een verband bestond tussen de Langerhans cel migratie en de onderdrukking van het immuunsysteem. Met andere woorden, leidt een verminderde migratie tot een verminderde immuussuppressie? De muizen die bij een lage dosis UV-B straling al Langerhans cel migratie vertoonden, lieten ook bij deze lage dosis al een onderdrukking van het immuunsysteem zien. Samenvattend kunnen we dus zeggen dat DNA herstel niet nodig is voor Langerhans cel migratie, in tegenstelling tot wat we vermoedden bij de mens, en dat Langerhans cel migratie gerelateerd is aan immuussuppressie in de huid. Dit laatste lijkt ook het geval te zijn bij de mens want Chantalle van de Pas en anderen hebben recent in Londen experimenteel aangetoond dat CPLD patiënten inderdaad, zoals wij vermoedden, na UV-B straling een verminderde

onderdrukking hebben van het immuunsysteem en dat ze daarom waarschijnlijk ook, naar onze waarnemingen, minder migratie van Langerhans cellen uit de opperhuid vertonen.

Terugkomend op de verstoorde Langerhans cel migratie in CPLD patiënten en het achterblijven van de Langerhans cellen in de epidermis kunnen we ons afvragen wat die achterblijvende Langerhans cellen in de epidermis doen. Kunnen ze daar het immuunsysteem activeren en zo de huidreactie veroorzaken? Om dit te onderzoeken hebben we gekeken naar de aanwezigheid van activatiemarkers op de Langerhans cellen (**hoofdstuk 4**). Wanneer de Langerhans cellen zowel hun 'verteerde' antigeen als deze activatie moleculen op hun celoppervlakte hebben, zijn ze in staat om cellen van het immuunsysteem, zoals de T-cellen, te activeren en hierdoor (eventueel) een ontstekingsreactie te veroorzaken. De Langerhans cellen die achterbleven in de epidermis van CPLD patiënten bleken, tegen onze verwachting in, niet geactiveerd te zijn (geen activatie moleculen op hun oppervlakte). Wat we wel konden waarnemen was een ophoping van geactiveerde Langerhans cellen in de onderste huidlaag (dermis). De gelijktijdige aanwezigheid in de dermis van geactiveerde Langerhans cellen samen met een bepaald type ontsteking-veroorzakende T-cellen zou mede verantwoordelijk kunnen zijn voor het ontstaan van CPLD.

Diverse cytokines spelen een belangrijke rol bij het aansturen van het immuunsysteem. Zo bestaan er cytokines die een remmende werking op een vertraagde allergische reactie hebben (IL-10, IL-4) en cytokines die een stimulerende werking hebben (IL-12, interferon- $\gamma$ ). Deze cytokines kunnen op verschillende wijze worden beïnvloed door UV-B straling. De productie van remmende cytokines wordt verhoogd na belichting van de huid van gezonde personen terwijl de productie van stimulerende cytokines juist wordt verlaagd. Alles bij elkaar genomen leidt dit tot een onderdrukking van het immuunsysteem bij gezonde personen. In CPLD patiënten, bij wie de UV-geïnduceerde immuunsuppressie vermoedelijk verstoord is, is de balans tussen de productie van remmende en stimulerende cytokines hoogstwaarschijnlijk doorgeslagen richting stimulerende cytokines. Om deze hypothese te onderzoeken hebben we gekeken naar de productie van deze verschillende cytokines in de belichte huid van CPLD patiënten en die vergeleken met gezonde vrijwilligers (**hoofdstuk 5**). We konden bij de UV-dosis die wij gebruikten voor de belichting geen verschil vinden in de productie van stimulerende cytokines in de huid van CPLD patiënten ten opzichte van gezonde vrijwilligers. Wel zagen we dat in de huid van CPLD patiënten, in vergelijking met gezonde personen, significant minder cellen aanwezig waren die IL-4 bevatten, een remmende cytokine. Deze kleinere hoeveelheid IL-4 draagt waarschijnlijk bij tot een verminderde onderdrukking van het immuunsysteem in CPLD patiënten. Deze verminderde productie van IL-4, maar ook van TNF- $\alpha$ , bleek vooral veroorzaakt te worden door een lager aantal cytokine-producerende neutrofielen in de huid van CPLD patiënten ten opzichte van gezonde personen.

Wanneer we alle gegevens op een rijtje zetten kunnen we tot een hypothetisch model komen voor het ontstaan van CPLD (**hoofdstuk 7**). Doordat na UV-B belichting minder IL-1- $\beta$  en TNF- $\alpha$  wordt geproduceerd in de huid van CPLD patiënten migreren minder Langerhans cellen uit de epidermis. Door een verminderde en vertraagde Langerhans cel migratie hopen de Langerhans cellen zich op in de dermis. Deze Langerhans cellen, die geactiveerd zijn, kunnen daar hun antigenen presenteren aan specifieke T-cellen. Deze T-cellen kunnen vervolgens een ontstekingsreactie veroorzaken. Het lage aantal cellen dat het remmende cytokine IL-4 produceert, speelt een belangrijke rol bij de verminderde onderdrukking van het immuunsysteem. Aangezien zowel TNF- $\alpha$  en IL-4 door (CD11b+) neutrofielen wordt geproduceerd, lijken deze cellen een prominente rol te spelen bij het ontstaan van CPLD. In dit proefschrift staan de eerste schreden beschreven op weg naar een opheldering van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van CPLD. Toekomstig onderzoek is nodig om het pathologisch mechanisme verder te ontrafelen en specifiekere en efficiëntere therapieën te ontwikkelen voor deze fotodermatose.