

SAMENVATTING IN HET NEDERLANDS

Ultraviolette straling, die voorkomt in zonlicht, is een van de meest belangrijke omgevingsfactoren die een effect hebben op de gezondheid van de mens. Blootstelling van de mens aan UV licht neemt steeds meer toe. Dit wordt naast een afname van de ozonlaag, ook veroorzaakt door een veranderde leefstijl, zoals meer vrije tijd en het dragen van weinig kleren buiten.

Het is al enige tijd bekend dat blootstelling aan ultraviolette straling, en dan met name UVB, het immuunsysteem van dier en mens kan moduleren. Uit infectiemodellen in proefdieren is gebleken dat blootstelling aan UVB de weerstand tegen verschillende infectieuze agentia, zoals bacteriën, parasieten, virussen en schimmels kan onderdrukken. Tevens vertonen deze blootgestelde dieren meer symptomen en afhankelijk van het infectiemodel een verhoogde mortaliteit. UV straling kan de weerstand tegen zowel huid-geassocieerde als niet-huid-geassocieerde, oftewel systemische, infecties onderdrukken.

Door middel van het extrapoleren van data verkregen uit infectiemodellen in proefdieren naar de humane situatie is er een risicoschatting gemaakt voor de effecten van UV op het humane immuunsysteem. Daaruit bleek dat blootstelling aan UVB, aan een dosis die relevant is voor de actuele zonblootstelling, de weerstand tegen infectieziekten in de mens zou kunnen beïnvloeden. Echter, omdat extrapolatie gebaseerd is op vele aannames, zijn experimentele studies met humane vrijwilligers nodig, om een betere risicoschatting te kunnen maken. Het is duidelijk dat experimentele infectiestudies niet uitgevoerd kunnen worden in de mens. Epidemiologische studies hebben informatie gegeven over effecten van zonlicht op infecties, maar deze zijn beslist niet zo duidelijk.

Vaccinatie is gebaseerd op het principe van ontwikkelen van een immuunrespons tegen een antigeen van infectieuze organismen. Vaccinaties kunnen wel uitgevoerd worden in de mens en daarmee kunnen de effecten van UV straling op de ontwikkeling van vaccinatie responsen bepaald worden. Belangrijke componenten van het immuunsysteem zijn nodig voor de ontwikkeling van vaccinatie responsen. Vandaar dat een veranderde vaccinatie respons door omgevingsfactoren, zoals UV straling, een verminderd functioneren van het immuunsysteem kan betekenen.

Het doel van dit proefschrift was het onderzoeken van de effecten van blootstelling aan UVB op de ontwikkeling van immuunresponsen na hepatitis B vaccinatie. Dit om een betere risicoschatting te kunnen maken voor de

Samenvatting in het Nederlands

immuunsuppressieve effecten van UVB blootstelling en dientengevolge een veranderde weerstand tegen infecties in de mens.

Hepatitis B vaccinatie modellen

Allereerst zijn de effecten van blootstelling aan UVB op hepatitis B vaccinatie responsen in een muis model bepaald (hoofdstuk 2). Twee verschillende muizen stammen, BALB/c and C57Bl/c, werden bestraald met verschillende doseringen UVB en vervolgens gevaccineerd tegen hepatitis B met een commercieel verkrijgbaar hepatitis B vaccin, Engerix-B®. Dit vaccin bevat een oppervlakte eiwit van het hepatitis B virus. De cellulaire respons werd o.a. gemeten door middel van het bepalen van de vertraagd type overgevoeligheidsreactie (DTH). Dit werd gedaan door vaccin onder de huid in het oor te spuiten en dan de mate van oorzwelling te meten. Tevens werd de cellulaire respons gemeten door middel van proliferatie van miltcellen in aanwezigheid van het hepatitis B antigeen. De humorale respons werd gemeten aan de hand van antigeen-specifieke antilichamen. De C57Bl/6 muis gaf een betere cellulaire respons op het vaccin dan de BALB/c muis. Het tegenovergestelde was waar voor de humorale respons; de BALB/c muis was beter in staat om antilichamen te ontwikkelen dan de C57Bl/6 muis. In beide muizenstammen bleek UVB straling de cellulaire respons dosis-afhankelijk te onderdrukken. De C57Bl/6 muis leek gevoeliger te zijn voor UVB-geïnduceerde immuunsuppressie, daar deze bij lagere doseringen UVB al onderdrukt was vergeleken met de BALB/c muis. De totale antilichaam spiegel tegen hepatitis B bleek niet significant onderdrukt te zijn. Echter, wanneer isotypes werden bepaald bleek het Th1-geassocieerde IgG2a significant onderdrukt te zijn.

Uit het muizenmodel bleek dat UVB straling de respons na hepatitis B vaccinatie significant kon onderdrukken. Een effect van UV op vaccinatie responsen in de mens zou dus verwacht kunnen worden. De effecten van UVB straling op vaccinatie responsen tegen hepatitis B zijn ook bepaald in humane vrijwilligers (hoofdstuk 3). In twee opeenvolgende winters, dit om de invloed van natuurlijk zonlicht zoveel mogelijk te beperken, zijn 192 humane vrijwilligers geïnccludeerd. Door middel van randomisatie werden ze ingedeeld in een controle groep en een UVB-groep. De UVB-groep werd op 5 achtereenvolgende dagen blootgesteld aan 1 MED UVB per dag. De minimale erytheem dosis (MED), de minimale dosis die een net waarneembare roodheid induceert, werd van tevoren voor iedere persoon individueel bepaald. Vervolgens werden beide groepen gevaccineerd tegen hepatitis B met het Engerix-B® vaccin. De tweede vaccinatie volgde een maand na de eerste en

een derde vaccinatie 5 maanden na de tweede. Na de derde vaccinatie werd ook een eindtiter bepaald, om te kijken of de vrijwilligers genoeg beschermd waren na de vaccinatie. Op meerdere tijdstippen, zowel voor als na de UVB blootstelling als gedurende het vaccinatie protocol, werd bloed afgenomen. In het serum werden hepatitis B specifieke antilichamen bepaald en cellen werden gebruikt om de antigeen-specifieke celproliferatie te meten. Hieruit bleek, dat blootstelling aan UVB voor de eerste hepatitis B vaccinatie, geen significant effect had op zowel de humorale, antilichaamtiter, als de cellulaire respons.

Om te bevestigen dat ons UVB blootstellingsprotocol voldoende was om immuunsuppressie te induceren, hebben we twee UV-gevoelige immuunparameters als controles meegenomen. Uit de literatuur was al bekend dat UVB straling de activiteit van Natural Killer (NK) cellen kan onderdrukken. Tevens kan UVB de sensibilisatie van een contactallergeen onderdrukken, waardoor na challenge, geen reactie optreedt. Deze beide controles hebben we ook uitgevoerd. Daaruit bleek dat ons UVB blootstellingsregime zowel de contactallergie respons als de activiteit van de Natural Killer cellen kon onderdrukken, oftewel, immuunsuppressie induceren.

Cytokine polymorphismen en hun rol in immuunresponsen en UVB-geïnduceerde immuunmodulatie in het hepatitis B vaccinatie model in de mens
Uit het muizenmodel is gebleken dat de twee verschillende muizenstammen verschillen in hun immuunrespons en verschillen in hun gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunsuppressie (hoofdstuk 2). Het is bekend dat mensen ook verschillen in hun immuunrespons en in gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunsuppressie. Cytokinen spelen een belangrijke rol in de ontwikkeling van immuunresponsen. Recentelijk zijn er polymorphismen in de genen die coderen voor cytokinen gevonden, die een associatie bleken te hebben met verschillende ziektebeelden. Deze polymorphismen, ook wel single nucleotide polymorphisms (SNPs) genoemd, kunnen de expressie van het betreffende cytokine verhogen. Mogelijk spelen cytokine polymorphismen een rol in de interindividuele verschillen in immuunresponsen en ook in verschillen betreffende gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunsuppressie. Binnen onze humane studie hebben we naar aan aantal polymorphismen van cytokinen gekeken: IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β en TNF- α , die een rol spelen in het mechanisme van UVB-geïnduceerde immuunmodulatie. Deze cytokinen worden opgereguleerd na bestraling met UVB en kunnen direct of indirect de functie van de antigeen-presenterende cellen en de relevante T cellen op het moment van antigeen-presentatie beïnvloeden. Het

Samenvatting in het Nederlands

bleek dat IL-1 β een belangrijke rol speelde in de mate van humorale immuunrespons, ontwikkeld na hepatitis B vaccinatie (hoofdstuk 4). Tevens leken mensen met het IL-1 β polymorfisme lagere antilichaamtiter te hebben na blootstelling aan UVB (hoofdstuk 5). Echter, de uiteindelijke antilichaamtiter was voldoende om bescherming te bieden tegen hepatitis B. Het voorkomen van deze polymorfismen is zeer laag, dus we moeten voorzichtig zijn met deze bevindingen en vervolgonderzoek is zeker noodzakelijk. Samenvattend kan worden gesteld dat verschillen in cytokine expressie door de aanwezigheid van polymorfismen in de genen die coderen voor de betreffende cytokinen een rol kunnen spelen en daarom betrokken moeten worden, wanneer effecten van omgevingsfactoren, zoals UV straling, op het immuunsysteem van de mens worden bestudeerd.

UVB-geïnduceerde mediators

Wanneer UV straling op de huid komt, ontstaat er een proces dat uit meerdere stappen bestaat. Allereerst wordt UV straling geabsorbeerd door fotoreceptoren, zoals DNA of urocaanzuur, in de bovenste lagen van de huid. Blootstelling van cellulair DNA aan UVB kan leiden tot verschillende mutaties in het DNA. Urocaanzuur, dat gevormd wordt in de huid, absorbeert UV straling, waardoor de *trans*-isomeer verandert in de *cis*-isomeer. Zowel de UV-geïnduceerde DNA schade als het *cis*-urocaanzuur kunnen verschillende huidcellen aanzetten tot de productie of vrijgave van verschillende cytokinen, chemokinen of neuropeptiden. Deze mediators kunnen direct of indirect de functie van de antigeen-presenterende cellen en de relevante T cellen op het moment van antigeen-presentatie beïnvloeden, zowel lokaal (op de plaats van bestraling) als systemisch (op een andere dan de bestraalde plaats).

Cis-urocaanzuur speelt een belangrijke rol in UV-geïnduceerde immuunsuppressie. Het is gebleken dat het verschillende immuunresponsen kan onderdrukken. Tijdens de eerder beschreven humane studie hebben we huidstickers van de vrijwilligers afgenomen. Daarin hebben we *cis*-urocaanzuur gemeten. Zoals in hoofdstuk 6 is beschreven, bleek dat de UVB-bestraalde vrijwilligers significant meer *cis*-urocaanzuur hadden vergeleken met de controle (niet-bestraalde) vrijwilligers. De toename in *cis*-urocaanzuur bleek afhankelijk te zijn van de dosis UVB die de vrijwilligers kregen. De hoeveelheden *cis*-urocaanzuur hebben we gecorreleerd met de hepatitis B vaccinatie responsen. Daaruit bleek dat personen die hoge niveaus *cis*-urocaanzuur hadden na blootstelling aan UVB, lagere cellulaire immuunresponsen tegen hepatitis B hadden. Dit geeft een indicatie dat *cis*-urocaanzuur ook een belangrijke rol in UVB-geïnduceerde immuunsuppressie

speelt in de mens. Daarbij, wanneer we naar de totaal bestudeerde populatie kijken, zien we geen significant effect van UVB straling op de hepatitis B vaccinatie responsen. Echter, we zien verlaagde vaccinatie responsen wanneer we kijken naar personen met hoge *cis*-urocaanzuur niveaus. Wellicht bestaan er individuele verschillen in gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunmodulatie gebaseerd op verschillende mechanismen. Mogelijk kunnen dergelijke verschillen gevonden worden door bijvoorbeeld het bepalen van cytokine polymorphismen of door het meten van "immuunsuppressieve" mediators na UVB bestraling.

Een mediator die tegenwoordig veel in de belangstelling staat is "calcitonin-gene-related peptide" (CGRP), een neuropeptide. Uit diermodellen is gebleken dat CGRP een rol speelt in UVB-geïnduceerde immuunsuppressie. In hoofdstuk 7 hebben we aangetoond dat CGRP ook te meten is in huidstickers van humane vrijwilligers na bestraling met UVB. Tevens is de hoeveelheid CGRP die aanwezig is na UVB, afhankelijk van de dosis, die de vrijwilligers krijgen. Met behulp van CGRP zouden ook verschillen tussen individuen met betrekking tot gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunmodulatie aangetoond kunnen worden. Hier moet nog verder onderzoek naar gedaan worden.

Andere factoren die betrokken zijn bij de modulatie van vaccinatie responsen en de mogelijke consequenties voor extrapolatie van de muis naar de mens

Het vaccin dat gebruikt is in het muis en het humane hepatitis B vaccinatie model, Engerix-B[®], bevat aluminium hydroxide als adjuvant. Een adjuvant wordt aan een deel of antigeen van een infectieus organisme toegevoegd om te helpen bij het ontwikkelen van een immuunrespons. Aluminium hydroxide stimuleert de Th2 cel in plaats van de Th1 cel. Uit studies naar UV-geïnduceerde immuunmodulatie is gebleken dat UV straling voornamelijk Th1 gemedieerde immuunresponsen, oftewel cellulaire immuunresponsen, onderdrukt. Recente studies laten echter zien, dat niet alleen Th1 immuunresponsen, maar ook Th2 immuunresponsen, oftewel humorale immuunresponsen, door UV kunnen worden onderdrukt. In het muizenmodel vonden we significante onderdrukking van de vaccinatie reponsen na blootstelling aan UVB. Echter, alleen de Th1-geassocieerde immuniteit was aangetast. De humane vrijwilligers studie liet geen significante resultaten zien, alhoewel gevoelige individuen (met het IL-1 β polymorfisme of met hoog UVB-geïnduceerd *cis*-urocaanzuur) lagere vaccinatie responsen lieten zien. In hoofdstuk 8 hebben we onderzocht in een muis model of verschillende adjuvantia, die verschillende typen immuunresponsen geven,

Samenvatting in het Nederlands

verschillend gemoduleerd werden door UVB. Hieruit bleek dat de verschillende adjuvantia inderdaad verschillende typen immuunresponsen lieten zien. Echter, UVB straling onderdrukte de hepatitis B vaccinatie responsen onafhankelijk van het type adjuvant.

Om extrapolatie van de dier-data, verkregen uit infectiemodellen, naar de humane situatie mogelijk te maken, zijn de effecten van UVB op hepatitis B vaccinatie zowel in een muizenmodel als in humane vrijwilligers bepaald. Hieruit bleek dat in de muis UVB straling immuunsuppressie induceert van hepatitis B vaccinatie responsen (hoofdstuk 2). Echter, dit effect werd bij de mens niet gevonden (hoofdstuk 3). De verschillen tussen het muis en het humane hepatitis B vaccinatie model kunnen veroorzaakt worden doordat deze soorten verschillen in hun gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immuunmodulatie. Een andere mogelijke verklaring zou kunnen zijn, dat mensen vanaf hun vroege jeugd al aan zonlicht worden blootgesteld. Laboratoriumknaagdieren, die overigens ook nachtdieren zijn, zien veel minder zonlicht. Adaptatie van het immuunsysteem aan de schadelijke gevolgen van UV straling zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat we bij de mens geen immuunsuppressie zien. Dit is onderzocht door muizen chronisch bloot te stellen aan lage doseringen UVB. Vervolgens kregen ze een immuunsuppressief protocol, dat bestond uit een hogere dosering UVB. Hierna zijn de muizen of gevaccineerd tegen hepatitis B, of gesensibiliseerd met een contact allergeen. Het bleek dat de chronische blootstelling aan UVB, de UVB-geïnduceerde immuunsuppressie van de hepatitis B vaccinatie responsen voorkwam, maar de contact allergie responsen waren nog steeds onderdrukt. Dit zou kunnen verklaren waarom we in het humane model geen significante effecten zagen op de hepatitis B vaccinatie responsen in de totaal bestudeerde populatie, maar wel een onderdrukking van de contact type overgevoeligheid reacties. Echter, voordat we dit "immunologische adaptatie" aan de schadelijke effecten van UVB mogen noemen, zal hier nog verder onderzoek naar gedaan moeten worden.

Conclusies en aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Het doel van dit proefschrift was het verbeteren van de risico schatting van de immuunsuppressieve effecten van blootstelling aan UVB en dientengevolge een veranderde weerstand in de mens. In deze studie is de respons op een hepatitis B vaccin gebruikt als model voor de respons op infectieuze organismen. Hieruit bleek dat het humane immuunsysteem verandert na blootstelling aan UVB en dat de weerstand tegen infecties dus ook veranderd zou kunnen worden door UVB straling.

Vaccinatie responsen kunnen een goed model zijn voor het bepalen van de immunomodulerende effecten van UV straling. Echter, wanneer vaccinatie studies worden gebruikt om de effecten van exogene factoren, zoals UV, op het humane immuunsysteem te bepalen, moet er rekening gehouden worden met een aantal facetten, zoals de dosis van het vaccin, het type adjuvant en het feit dat individuen verschillen in het type immuunrespons dat ze ontwikkelen, alsmede verschillen in de gevoeligheid voor de immunomodulatie door de exogene factor.

Extrapolatie van de data verkregen in het muizen hepatitis B vaccinatie model naar de humane situatie om een betere risico schatting te maken voor de effecten van UVB op de weerstand tegen infecties in de mens is niet eenvoudig. Verschillen tussen de soort (muis en mens) en verschillen tussen individuen (binnen de humane populatie) in typen immuunrespons en in gevoeligheid voor UVB-geïnduceerde immunomodulatie zijn factoren die de risicoschatting bemoeilijken. Tevens moet er rekening worden gehouden met het feit dat muizen geen tot weinig zonlicht zien, en de mens al vanaf zijn vroege jeugd is blootgesteld aan zonlicht. Er moet dus rekening worden gehouden met adaptatie aan zonlicht. Zowel naar chronische blootstelling aan UV en adaptatie aan UV en de effecten van deze blootstelling op het immuunsysteem zal nader onderzoek gedaan moeten worden.