

University of Groningen

Farming exposure and asthma phenotypes

Gonçalves Dias Pereira, Patricia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Gonçalves Dias Pereira, P. (2015). *Farming exposure and asthma phenotypes: In mice and men*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

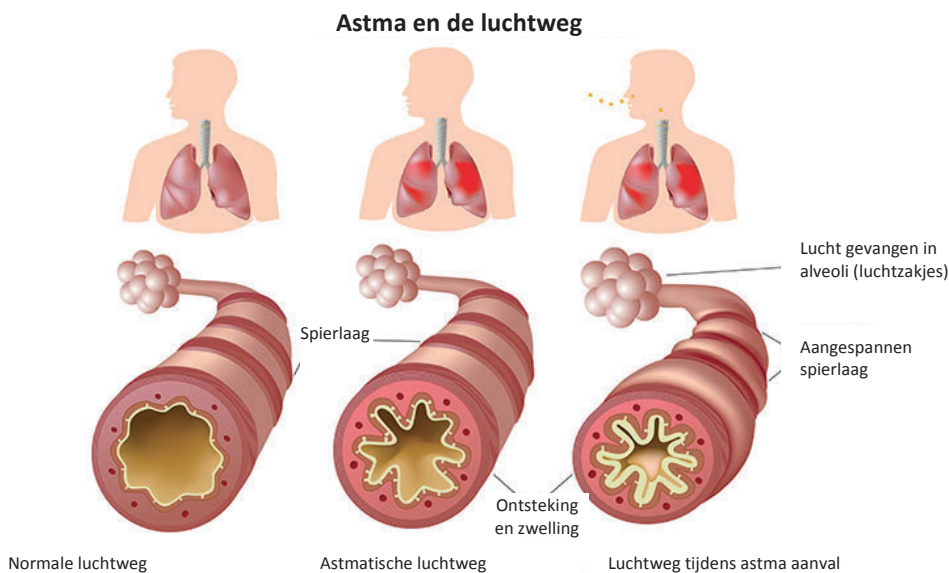
Chapter 9

Samenvatting
Acknowledgements
Curriculum Vitae



ASTMA

Astma is een steeds meer voorkomende ziekte, waarvan de Wereldgezondheidsorganisatie schat dat momenteel wereldwijd 235 miljoen mensen er aan lijden. In Nederland hebben meer dan 500.000 mensen astma, wat aanzienlijke kosten met zich meebrengt, zowel in directe zin in relatie tot medische zorgkosten, en in indirecte zin ten gevolge van het verlies van arbeidsproductiviteit. Astma is een chronische ontsteking van de luchtwegen en wordt gekenmerkt door luchtwegklachten zoals een piepende ademhaling, benauwdheid, kortademigheid en hoesten. Deze klachten kunnen variëren in intensiteit en zelfs soms gedurende weken of maanden afwezig zijn. Stimuli zoals allergenen, sigarettenrook, koude lucht en inspanning zijn vaak aanleiding tot het krijgen van symptomen als gevolg van ontsteking en structurele veranderingen in de luchtwegen (fig 1). Bij een ernstige astma aanval kunnen patiënten een exacerbatie van astma ervaren als levensbedreigend en die tevens kunnen leiden tot ziekenhuisopnames.



Figuur 1: Astma en uw luchtwegen (van NIH Medline plus, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/magazine/issues/fall11/articles/fall11pg4.html>). Longen en luchtwegen van een normaal individu (links), ontstoken luchtwegen van astmatische (midden) en luchtweg tijdens een astma-aanval (rechts). In een normale luchtweg stroomt de lucht vrij, terwijl bij astmapatiënten de luchtwegwand is verdikt door ontsteking en oedeem en verhoogde slijmproductie. In reactie op verschillende stimuli, worden de gladde spieren in een astmatische luchtweg aangespannen en er wordt te veel en dik slijm geproduceerd. Hierdoor wordt de luchtwegdoorgankelijkheid belemmerd, wat leidt tot kortademigheid.

Luchtweg hyperreactiviteit en ontsteking van de luchtwegen zijn kenmerken van astma, maar het type en de ernst van deze parameters zijn afhankelijk van de vorm van de ziekte. Vaak is er een verband tussen astma en allergie en veel astmatische patiënten hebben allergisch astma, maar er zijn echter ook andere vormen van astma, zoals niet-allergisch astma.

De verschillende verschijningsvormen van de ziekte ook wel fenotypes genoemd, zijn genetisch bepaald en worden tevens door omgevingsfactoren bepaald. Het is van belang de heterogeniteit van astma te begrijpen omdat de prognose en respons op de behandeling kan verschillen afhankelijk van het fenotype. In dit proefschrift zal de nadruk liggen op de allergische en niet-allergische / beroepsmatige fenotypen van astma.

In de afgelopen decennia is er veel onderzoek gedaan naar de mechanismen achter de ontwikkeling van astma. Hoewel beter begrip is bereikt, worden de onderliggende mechanismen van de ziekte nog niet volledig begrepen. Bij personen met een allergie, herkent het immuunsysteem onschadelijke stoffen die worden ingeademd (zoals huisstofmijt, huidschilfers van dieren, pollen) als een bedreiging en lokt het een immuunreactie uit ten gevolge van deze stoffen. Stoffen die deze reactie oproepen worden allergenen genoemd.

Wanneer een allergeen wordt ingeademd door individuen met aanleg voor astma, ontwikkelen zich een groot aantal zogenaamde T helper 2 (Th2) cellen in de long.

Th2-cellen scheiden stoffen af, cytokines genaamd, die vervolgens andere ontstekingscellen naar de longen aantrekken en activeren zoals B-cellen en eosinofiele granulocyten. Ook zullen de al in de long aanwezige mestcellen geactiveerd worden. Mestcellen en eosinofielen spelen een belangrijke rol in de overdreven respons van de luchtwegen op ingeademde allergenen (luchtweghyperreactiviteit), terwijl B cellen specifieke afweerstoffen (antilichamen) tegen allergenen maken. De geproduceerde (Immuunglobuline E) antilichamen binden aan mestcellen en zodra een volgende keer hetzelfde allergeen ingeademd wordt kan het allergeen zich binden aan de antilichamen op de mestcel waarna de mestcel o.a. histamine zal uitstoten. Histamine is een stof die ervoor zorgt dat de spieren rondom de luchtwegen samentrekken waardoor de luchtwegen nauwer worden en minder lucht doorlaten. Dit noemen we bronchconstrictie. Daarnaast hebben mensen met astma vaak een dikkere spierlaag om de luchtwegen wat bijdraagt aan een verhoogde kans op bronchoconstrictie. Wanneer astma patiënten vaker een benauwdheidsaanval hebben doorstaan zal ook het aantal slijmbekercellen toenemen waardoor meer en taaier slijm geproduceerd wordt in de luchtwegen wat weer bijdraagt aan vernauwing van de luchtwegen. Veranderingen in de structuur worden ook wel remodellering van de luchtwegwand genoemd.

Hoewel astma typisch een Th2 ziekte is, spelen cellen van het aangeboren immuunsysteem, zoals dendritische cellen, basofielen en macrofagen ook een belangrijke rol bij de ziekte. Macrofagen zijn de meest voorkomende immuuncellen in de luchtwegen en de eerste cellen die de long beschermen tegen de mogelijk schadelijke stoffen die ingeademd worden (microben, pathogenen en stof deeltjes). Afhankelijk van signalen aanwezig in het omliggende weefsel, kunnen macrofagen zich tot verschillende fenotypes ontwikkelen. Elke fenotype heeft specifieke functies en wordt herkend aan de hand van de markers die ze tot expressie brengen. Het is al aangetoond dat verschillende macrofaag fenotypen bij astma betrokken zijn.

Niet-allergisch astma

Niet-allergisch (intrinsiek) astma is vaak een ernstiger vorm van de ziekte en moeilijker te behandelen dan allergisch astma aangezien patiënten vaak niet reageren op de reguliere behandeling met geïnhalede corticosteroiden. In deze gevallen zijn langdurige behandelingen met systemische corticosteroiden nodig. Over het algemeen ontwikkelt niet-allergisch astma zich later in het leven en komt het vaker voor bij vrouwen, in combinatie met obesitas. Ook een aanzienlijk deel van beroepsastma is niet-allergisch, wat vaak voorkomt bij agrarisch-gerelateerde beroepen. De mechanismen die bijdragen aan niet-allergisch astma zijn minder goed begrepen dan de mechanismen die een rol spelen bij allergisch astma, maar het is bekend dat terwijl bij allergisch astma de eosinofielen de meest prominente cellen in de longen zijn, bij niet-allergisch astma de neutrofielen overheersen. Ook de betrokkenheid van het cytokine IL-17 is aangetoond bij dit soort astma.

Hygiëne hypothese

Hoewel verschillende studies hebben aangetoond dat boeren en personen met agrarisch-gerelateerde beroepen een hoger risico hebben op het ontwikkelen van longziekten, zoals niet-allergisch astma, chronische bronchitis en chronische obstructief longlijden (COPD), is ook aangetoond dat blootstelling aan de boerderij omgeving geassocieerd is met een beschermend effect op de ontwikkeling van atopie en allergisch astma. Dit is in overeenstemming met de door Strachan in 1989 voorgestelde theorie, waarin hij stelde dat de toegenomen prevalentie van hooikoorts en eczeem, beide allergische ziekten, kan worden verklaard door de daling van de grootte van het gezin en de hogere normen van de persoonlijke hygiëne.

Volgens deze theorie, worden kinderen in grotere gezinnen meer blootgesteld aan microben op jonge leeftijd, wat beschermt tegen de ontwikkeling van allergische aandoeningen op latere leeftijd. Kinderen in Westerse landen worden in het begin van hun leven beter beschermd tegen het krijgen van besmettelijke ziektes en hebben daardoor een verhoogd risico op het krijgen van allergische aandoeningen op latere leeftijd. Het voorgestelde immunologisch mechanisme achter deze "hygiëne hypothese" is dat het immuunsysteem dat Th2 dominant is bij de geboorte, de kans moet krijgen om met behulp van blootstelling aan (luchtweg)infecties een gezonde balans tussen Th1- en Th2 immuunreacties te ontwikkelen. Om deze ontwikkeling te starten, is dus een bepaalde dosis aan microbiële blootstellingen nodig. Een ander voorgesteld mechanisme is dat de blootstelling van monocytten, macrofagen en dendritische cellen aan microben tot gevolg hebben dat IL-10 wordt afgescheiden. Omdat IL-10 anti-inflammatoire effecten heeft, zou microbiële blootstelling gunstig zijn om de werking van zowel Th1 als Th2 responsen te reduceren, met als doel homeostase.

Soortgelijke bescherming tegen allergische aandoeningen wordt gezien bij kinderen die vanaf de geboorte naar de kinderopvang gaan, en bij kinderen die op een boerderij opgegroeid zijn.

In dit proefschrift werden beide effecten van boerderij blootstellingen op het immuunsysteem onderzocht: het beschermende effect tegen allergisch astma en de inductie van niet-allergisch astma. Dit onderzoek werd uitgevoerd onder agrarische medewerkers, en binnen muismodellen voor allergische en niet-allergische

longontsteking. Daarnaast werd de aanwezigheid van verschillende macrofagen fenotypen in diermodellen voor allergisch en niet-allergisch astma onderzocht, als ook de effecten van blootstelling aan boerderijstof op een macrofagen cellijn.

Hoofdstuk 2 beschrijft een studie waarin zowel het beschermende effect als het schadelijke effect van blootstelling aan boerderijstoffen werd onderzocht. De effecten van boerderijstof van verschillende soorten boerderijen (vee- en varkensbedrijven, uien en bloembollen industrie) werden onderzocht bij muizen en agrarisch blootgestelde personen. Alle soorten boerderijstoffen gaven in de muis bescherming tegen de verschillende parameters van allergische longontsteking. Daarnaast induceerden alle 4 soorten boerderijstof een niet-allergische ontsteking in de long van deze muizen. Agrarisch blootgestelde personen hadden in vergelijking tot niet-blootgestelde gezonde individuen hogere aantallen geactiveerde T cellen, die spontaan markers van niet-allergische ontsteking tot expressie brachten en lagere aantallen geactiveerde allergie-gerelateerde Th cellen.

In **hoofdstuk 3** wordt het onderzoek beschreven naar het zogenaamde “healthy worker survival effect”. Dit betrof een vijf-jaar follow-up studie van het door ons onderzochte cohort van agrarisch blootgestelde personen. Healthy worker survival effect is een fenomeen waarbij medewerkers die klachten hebben ten gevolge van de blootstellingen op hun werk hun baan verlaten en kiezen voor een baan waarbij ze niet blootgesteld worden aan stoffen waar ze last van hebben. Als dit gebeurt, is de bevinding dat een hoge microbiële blootstelling is geassocieerd met minder atopie bij agrarisch blootgestelde personen een gevolg van selectie van arbeiders die geen last hebben van deze blootstelling. Om de aanwezigheid van healthy worker survival effect te kunnen onderzoeken werd de data van landarbeiders die 5 jaar later nog steeds dezelfde baan hadden vergeleken met de data van werknemers die van baan veranderd waren. De parameters die onderzocht werden waren: de algemene kenmerken, de gezondheid van de luchtwegen, atopie en endotoxine blootstelling. Binnen ons cohort van agrarisch blootgestelde personen werd geen healthy worker survival effect gevonden. Dit betekent dat de bevinding dat werknemers met hoge endotoxine blootstelling minder atopie hebben in ons onderzoekscohort niet een gevolg is van een selectie van arbeiders.

In **hoofdstuk 4** werd het effect van fluticasonpropionaat behandeling onderzocht in niet-allergische longontsteking en hyperreactiviteit, geïnduceerd door boerderij stof. Daarnaast werden in dit hoofdstuk de parameters onderzocht die het best de luchtweg hyperreactiviteit kunnen voorspellen in de modellen voor allergisch en niet-allergische astma. Fluticasonpropionaat behandeling vermindert luchtweghyperreactiviteit en bepaalde ontstekings parameters, terwijl het geen invloed heeft op het aantal neutrofielen in de longen. Bij allergische muizen verlaagde deze behandeling de luchtweg hyperreactiviteit, Th2 cytokines niveaus en aantallen eosinofielen in longen, zoals verwacht. Parameters die het best luchtweg hyperreactiviteit voorspellen zijn afhankelijk van het gebruikte diermodel: in het boerderijstof model, waren IL-1 β en IL-17 de beste voorspellers van luchtweg hyperreactiviteit, terwijl in het allergische model TNF α en IL-6 de beste voorspellers van luchtweg hyperreactiviteit waren.

In **hoofdstuk 5** wordt een studie beschreven waarin macrofaag fenotypes werden gekarakteriseerd en gekwantificeerd in drie modellen van huisstofmijt-geïnduceerd astma. M1, M2 en anti-inflammatoire macrofaag fenotypen werden geïdentificeerd door middel van immunohistochemie volgens de expressie van specifieke markers. Er werden hogere percentages van eosinofielen in aan huisstofmijt blootgestelde muizen gevonden ten opzichte van controle muizen en deze waren gecorreleerd met hogere aantallen M2 macrofagen. Aantallen M1 macrofagen waren negatief gecorreleerd met aantallen M2 macrofagen. Er werden lagere aantallen anti-inflammatoire macrofagen gevonden na blootstelling aan huisstofmijt en deze waren negatief gecorreleerd met M2 macrofagen. Deze data suggereert een balans tussen de macrofaag fenotypen en laat zien dat M2 macrofagen gerelateerd zijn aan allergisch astma.

In **hoofdstuk 6** werden macrofaag fenotypes door middel van flowcytometrie en immunohistochemie gekarakteriseerd in modellen van allergisch en niet-allergisch astma. Beide modellen toonden een toename van het totaal aantal macrofagen na blootstelling aan boerderijstof en huisstofmijt. Het fenotype van de macrofagen was echter afhankelijk van de blootstelling en soort ontsteking in de long. Terwijl bij allergisch astma M2 macrofagen overheersten in de longen, waren bij niet-allergisch astma M1 macrofagen prominenter. Anti-inflammatoire macrofagen waren hoger bij controle muizen dan bij aan boerderijstof of huisstofmijt blootgestelde muizen. Macrofaag blootstelling aan boerderijstof in een macrofagen cellijn (RAW cellen) induceerde uitsluitend het M1 fenotype. Inductie van M1 macrofagen, en daarmee afwezigheid van M2 macrofagen kan bijdragen aan een niet-allergische ontsteking die geïnduceerd wordt door boerderijstof blootstelling.

Hoofdstuk 7 beschrijft de effecten van blootstelling van gepolariseerde M1 en M2 macrofagen aan boerderijstof. Boerderijstof blootstelling blokkeerde de effecten van IL-13 op RAW macrofagen en voorkwam daarmee M2 polarisatie die gerelateerd is aan allergisch astma. Hoge doses boerderijstof extract induceerde IL-10 expressie op anti-inflammatoire macrofagen. Deze fenotypische veranderingen van macrofagen kunnen bijdragen aan het beschermende effect van boerderijstof blootstelling tegen de ontwikkeling van allergische ziektes.

Conclusie

In dit proefschrift wordt aangetoond dat en beroepsmatige blootstelling aan een boerderij milieu en blootstelling aan boerderijstof extracten bij muizen leiden tot een verschuiving in het immuunsysteem richting niet-allergische ontsteking. Deze verschuiving biedt aan de ene kant bescherming tegen ontwikkeling van allergische aandoeningen, zoals allergisch astma, maar wordt ook geassocieerd met het risico op niet-allergisch astma ontwikkeling. Daarnaast is gevonden dat binnen de verschillende astma fenotypen, verschillende ontstekingsmediatoren en -cellen belangrijk zijn bij de ontwikkeling en ernst van luchtweg hyperreactiviteit.

Acknowledgements

After 4,5 years of dedication and hard work, it is finally done! This thesis is finished! During the past years I have worked with joy and pleasure on this thesis, but it feels amazing now that it is done. Now it is time for something new. Also time to look back and thank all the people who helped me along the way and made this work possible.

First I would like to thank my co-promotor and direct supervisor Machteld Hylkema for giving me the opportunity to join this PhD program and for being my direct supervisor. Machteld, although we have very different personalities, we always worked very well together. I learned a lot from you and grew up a lot during the past years, not only as a researcher, but also as a person. This is partially due to the freedom you gave me to follow my own path, and even though I was not always happy with that, now I see how this contributed to my independence, creativity and self-confidence. Thank you for your support and for always believing in me, I really appreciate it.

My promotor, Wim Timens, thank you for guidance, especially during the final phase of this PhD. Also thank you for your critic comments on my manuscripts, they certainly contributed substantially to the quality of my work and I learned a lot from them.

Next I would like to thank my paranimf Marjan Reinders for all the help at the lab and for always being there for me. Marjan, you were involved in almost every result on this thesis, in one way or the other (even the cover lay-out!) and I am really grateful for that. Also thank you for the nice time we had at the lab, it was always fun working with you. I'm happy we have become friends and that our boys love playing together. From now on, no more asking for help with stainings, ELISA's and luminexes, but only talking about fun stuff ☺. Also many thanks to my other paranimf and roommate, Corry-Anke Brandsma for all the help and the nice time in the last few years. I always enjoyed our talks, lunches, cups of thee, trips to the U.S., and dinners together. Besides all the fun, I also would like to thank you for your critic comments on my manuscripts and during our talks about my project. I learned a lot from you and think that you are an example to be followed ☺. Seeing how much you have grown as a researcher in the past years really inspires me. I'm happy to see that all your hard work has been recognized and I am sure you will have a long and successful career in research.

Then I would like to thank Barbro Melgert and Christina Draijer for the the help, especially with the macrophage studies. Barbro, thank you for your contagious enthusiasm about this special cell type, I learned a lot from this whole "macrophage experience". Christina, your unlimited patience and willingness to help others are an inspiration. It was really a pleasure working with you and I wish you good luck with finishing your PhD.

Many thanks to our collaborators from Utrecht, Inge Wouters and Annejet Spierenburg for making this project possible and for always reviewing our papers with a fresh look and making important contributions to them.

I would like to thank the members of the reading committee, Prof. dr Torben Sigsgaard, Prof. dr. Herman Meurs and Prof. dr. Ewoud Dubois for your willingness to read and evaluate this thesis. I hope you enjoyed reading it.

To my former roommates and fellow PhD students, thanks for the nice talks and support during the last years. Fatemeh, I really enjoyed working with you, you are such a kind and warm person and I wish you all the best in the U.S. Junjun, Vijay, Karo, Juan and Jenny: good luck with finishing your PhDs.

The work at the CDP would not be possible without the help of Pieter Klok and the microsurgery team. Pieter, thanks for your patience, support and all the nice talks during my first animal experiment, I learned a lot from you! Annemiek, Michel, Bianca, Pieter, Laura and Christina: thanks a lot for your help with the Flexivent-experiments. Those were intensive days, but always “gezellig” ☺.

The ATS conferences in San Francisco and San Diego are memories that I will cherish for many years to come. Tanks Corry, Christina, Machteld Barbro and Carian for all the talks laughs dinners support during presentations and of course, shopping! My first “outlet experience” is something I will never forget.

To the colleagues of the O&O lab: Lydia, Marian, Weird, Monique, Marinda, Rianne, Tineke, Bea and Lisette, many thanks for all the help, talks and laughs at the lab. Sweet Sharon, you brought warmth and joy to this lab and I always enjoyed working with you. You have a talent for getting along with everybody (or almost everybody). This is something I really admire on you, I wish I had just half of your talent! It’s a pity that your contract ended and you left the lab too soon. Luckily we still meet for lunch now and then and I really enjoy that.

I was very lucky to supervise some good Bachelors’ and Masters’ students working on my project: Marco, Rianne, Niel, Lisette and Thiago thank you very much for work and contributions to this thesis. I learned a lot with each one of you.

I also would like to thank Geny Groothuis and Inge de Graaf for accepting me as technician in their group, even when I had no experience with many of the techniques you worked with. You both believed in me and I will never forget that. Working with you was inspiring and the start of my scientific journey here in the Netherlands. Also many thanks to all my former colleagues at the Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting group for the nice time working with all of you.

My dear friend Adriana, it all started with you. Thanks a lot for your motivation, support and friendship. I miss you so much! I also would like to thank my Brazilian girlfriends in Groningen: Aina, Aline, Andrea, Joana, Monica and Susie. Your friendship and our regular get-togethers make my life here in Groningen much happier. Thank you for your support and friendship.

To my soka-family: thank you for all the support at all times. I was very lucky to be part of this wonderful organization in Brazil and to be able to find true friends also here in the Netherlands.

To my dearest friend Andressa, thank you for being my best friend for more than 20 years and for being so close even when we are 10.000 km away from each other. I think we are the living proof that when friendship is real, physical distance doesn’t matter. Thank you so much for everything!

Of course, many thanks to my parents, brother and sister-in-law for their love and support. Mãe and pai, thank you for always setting our education as number one priority. I am very grateful for all the efforts you both made to give us the best education possible and I am proud to be the first of the family with a PhD. Thank you so much for always being there for me, despite the distance, and thank you for being present at this important day in my life. Having you here means a lot for me. Rico and Lu, thanks a lot for your support during my PhD and at all times. I love you all very much.

Joyce, Lynette and Xaf, thank you guys for welcoming me when I came to the Netherlands and for being my “bonus-children” ☺. My sweet boys, Johan and Bruce, I love you guys

more than words can express. Thank you for all the love, support and affection I get from you everyday. Johan, my husband and best friend, thank you for supporting me in all my decisions and for always being there for me. I am so happy that I took the step to move to the Netherlands to be with you. It was all worth it. Bruce, my love, you are the best son I could ever wish for and I am so proud of you. I hope when you grow up and can read this you will understand that I always did my best to combine work and being your mom and that you will be proud of me. And I also hope for more free time to spend with you now. Eu te amo do tamanho do mundo!

Patricia

Curriculum Vitae

Patricia Gonçalves Dias Pereira was born 21 December 1978 in Rio de Janeiro, Brazil. She studied Veterinary at the Universidade Federal Fluminense (Federal University of Rio de Janeiro) and after that she started her Master Program in Veterinarian Sciences at the same University, under supervision of Prof. Dr. Rogerio Tortelly. After graduation in 2004, she started working as a lecturer at the University Fundação Educacional Serra dos Órgãos, in Teresópolis, Rio de Janeiro. After 2 years teaching Veterinary Pathology to 2nd year Veterinary students, she decided to move to the Netherlands. In 2008, she started as a technician at the Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting at the University of Groningen, where she worked until November 2010, when she started her PhD program under supervision of Dr. M. N. Hylkema and Prof. dr. W. Timens at the Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen. Here she studied the effects of farming exposures on the development of allergic and nonallergic asthma. This project was partially funded by the Dutch Lung Foundation (grant number: 3.2.09.36) and the results are presented in this thesis.