



**rijksuniversiteit
groningen**

M1 en M2 Macrofagen en hun Rol in de Vreemd-Lichaam Reactie op Biomaterialen

Naam:	E.A. Selier
Studentnummer:	s1856200
Inhoud:	Bachelor Scriptie
Studie:	Biomedische Technologie
Begeleider:	T.G. van Kooten
Tweede begeleider:	R. Kuijer
Datum:	26-07-2012

Samenvatting

Macrofagen zijn een belangrijk onderdeel van het menselijke immuunsysteem. In het aangeboren immuunsysteem spelen ze een rol vanwege hun grote fagocyterende capaciteiten. T-helper-lymfocyten (Th-lymfocyten) van het aangeboren immuunsysteem kunnen macrofagen activeren. Dit doen ze door cytokinen uit te scheiden. Op basis van uitscheiding van cytokinen kan er onderscheid gemaakt worden tussen twee Th-lymfocyten: Th-1 type lymfocyten en Th-2 type lymfocyten.

Macrofagen kunnen op twee manieren door de Th-lymfocyten geactiveerd worden: op een klassieke manier en op een alternatieve manier. Klassiek geactiveerde macrofagen (M1 genoemd) worden door Th-1 type lymfocyten en natural killer cellen geactiveerd, door de uitscheiding van tumor necrosis factor- γ (TNF- γ). Daarnaast kunnen ze door antigeen presenterende cellen geactiveerd worden, door de uitscheiding van interleukine-12 (IL-12) en IL-18. M1 macrofagen hebben als belangrijkste eigenschap dat ze een ontstekingsreactie kunnen opwekken. Voornamelijk door de uitscheiding van nitriet oxide kunnen ze veel micro-organismen doden.

Alternatief geactiveerde macrofagen worden M2 macrofagen genoemd. Ze worden geactiveerd door Th-2 type lymfocyten die IL-4 en IL-13 uitscheiden. Kenmerken van M2 macrofagen zijn capaciteiten om ontsteking te remmen en weefsel te herstellen.

Het verschil tussen M1 en M2 macrofagen kan gebruikt worden in de vreemd-lichaam reactie op biomaterialen. Wanneer een biomateriaal in het lichaam geïmplant wordt, worden macrofagen naar de implantatiezijde toegetrokken. Daar zullen ze het biomateriaal willen fagocyteren, omdat het herkend wordt als lichaamsvreemd. Als de macrofaag activatie meer richting M2 macrofagen gestuurd kan worden, zal er minder ontstekingsreactie plaatsvinden en meer weefselherstel. Dit is gunstig voor de patiënt en bovendien wordt de levensduur van het implantaat vergroot. In de toekomst zal er door middel van modulatie van de macrofaag activatie veel winst te behalen vallen op de kwaliteit van biomaterialen die als implantaat in het menselijk lichaam worden geplaatst.

Inhoudsopgave

Inleiding	4
Hoofdstuk 1: Algemeen Overzicht van het Immuunsysteem.....	5
Hoofdstuk 2: M1 en M2 Macrofagen.....	10
Hoofdstuk 3: Macrofaag Plasticiteit tijdens de Ontstekingsreactie	16
Hoofdstuk 4: Macrofagen en Biomaterialen.....	19
Hoofdstuk 5: Discussie	22
Nawoord.....	24
Referenties	25

Inleiding

De zoektocht naar het perfecte biomateriaal is nog altijd in volle gang. Er wordt gestreefd naar een biomateriaal dat zo min mogelijk ontstekingsreactie (ook wel vreemd-lichaam reactie genoemd) bij de mens opwekt als het materiaal wordt geïmplant. Met andere woorden, het te implanteren biomateriaal moet zo biocompatibel mogelijk zijn. Er zijn veel manieren om de biocompatibiliteit van een biomateriaal te verbeteren. De reactie van het menselijke immuunsysteem op het biomateriaal zou bijvoorbeeld kunnen worden gemoduleerd. Dit is een interessant onderwerp, omdat de afgelopen twintig jaar nieuwe ontdekkingen zijn gedaan wat macrofaag activatie betreft. Er is namelijk niet één soort macrofaag, wat men vooralsnog altijd dacht, maar er zijn zeker twee typen te onderscheiden: M1 en M2 macrofagen. Beide macrofagen worden op een andere manier geactiveerd en deze verschillen in activatie kunnen in verband worden gebracht met de ontstekingsreactie op biomaterialen. Wanneer het fenotype macrofaag gemoduleerd kan worden, dan kan de biocompatibiliteit van een biomateriaal gestuurd worden.

De onderzoeksvraag van deze scriptie luidt dan ook als volgt:

Wat is de rol van M1 en M2 macrofagen in de vreemd-lichaam reactie op biomaterialen?

Om deze vraag te beantwoorden, wordt in het eerste hoofdstuk de basis van het menselijke immuunsysteem uitgelegd. Zonder deze kennis zijn de verschillen tussen M1 en M2 macrofagen en met name de termen die daarbij horen, lastig te begrijpen. Vervolgens worden M1 en M2 macrofagen toegelicht, van verschil in activatie tot en met de belangrijkste kenmerken. Met deze informatie worden vervolgens twee artikelen uiteengezet. Het eerste artikel gaat over de rol van M1 en M2 macrofagen tijdens de ontstekingsreactie. Er wordt hierbij gekeken hoe plastic macrofagen zijn en of componenten van de extracellulaire matrix de plasticiteit beïnvloeden. Het tweede artikel gaat over macrofagen en biomaterialen. In dit artikel onderzoekt men of het type cytokine dat wordt uitgescheiden door macrofagen afhangt van chemische modificatie van het oppervlakte van biomaterialen.

Hoofdstuk 1

Algemeen Overzicht van het Immuunsysteem

Het immuunsysteem van de mens bestaat uit cellen, weefsels en moleculen die weerstand bieden tegen infecties. De gecoördineerde reactie van deze cellen en moleculen op (ziekteverwekkende) micro-organismen wordt de immuunrespons genoemd. De informatie voor dit hoofdstuk is met name afgeleid van Immunologie – Rijkers, G.T. (1) en Basic Immunology – Abbas, A.K. (2).

Het immuunsysteem bestaat uit twee onderdelen:

1. Het aangeboren immuunsysteem.
2. Het verworven immuunsysteem.

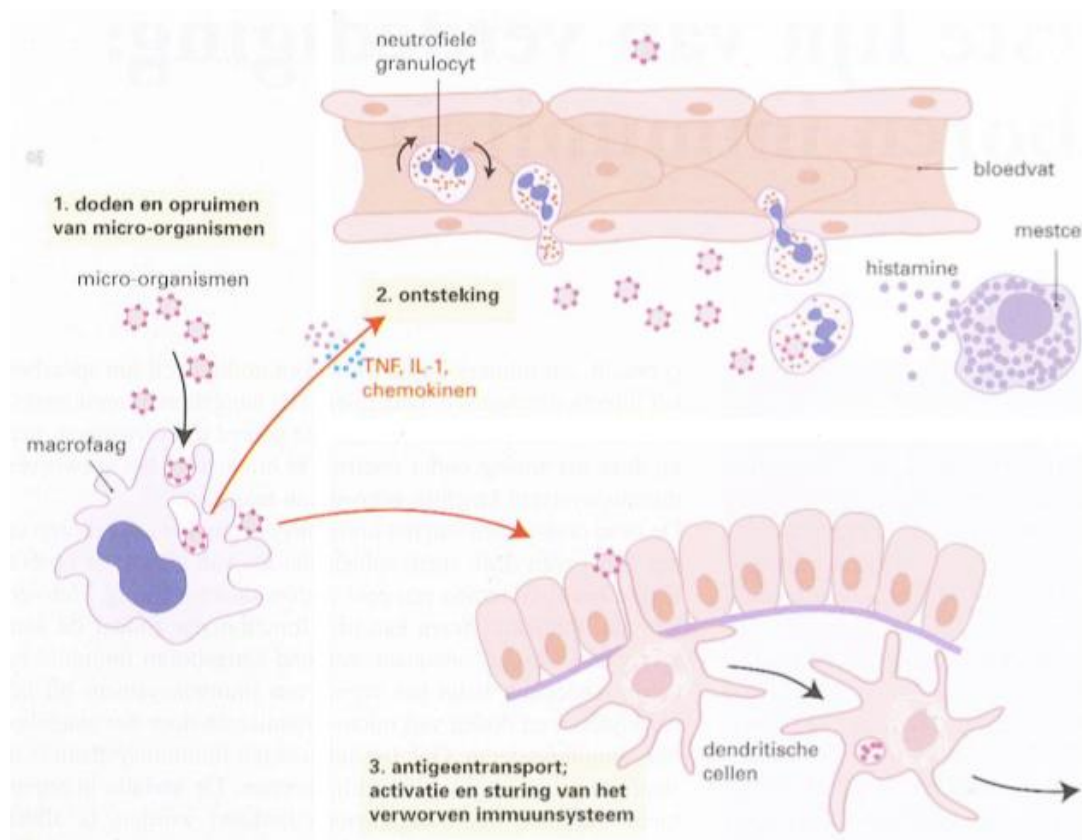
Het aangeboren immuunsysteem

Dit systeem dient als eerstelijns bescherming tegen micro-organismen. De eerste verdediging van de mens is het epitheel, waarin zich gespecialiseerde cellen en natuurlijke antibiotica bevinden. Andere onderdelen van de eerste verdediging zijn trilharen, de zuurgraad, vetzuren en slijm. Micro-organismen zouden hierdoor geremd kunnen worden, maar als ze toch door het epitheel heen naar binnen dringen, komen ze in weefsels of in de circulatie terecht. Daar worden de micro-organismen aangevallen door fagocyten, natural killer cellen (NK-cellen) en dendritische cellen.

Macrofagen (en hun voorlopercellen, monocytten), neutrofiële granulocyten en eosinofiele granulocyten zijn celtypen die behoren tot de fagocyten. Het belangrijkste mechanisme achter het aangeboren immuunsysteem is fagocytose, waarbij fagocyten micro-organismen opnemen en doden, of schade aan hen aanrichten. Daarnaast scheiden macrofagen ontstekingsbevorderende cytokinen uit, eiwitten die een regulerend effect hebben in de immuunrespons. De andere groep effector cellen, NK-cellen, kunnen cellen die met een virus geïnfecteerd zijn aanvallen en vernietigen. Tenslotte kunnen dendritische cellen antigenen presenteren op hun celmembraan. Deze antigenen kunnen aangeboden worden aan het verworven immuunsysteem en zodoende zorgen dendritische cellen voor een verbinding tussen de twee immuunsystemen. Een overzicht van de eigenschappen van het aangeboren immuunsysteem wordt gegeven in afbeelding 1.

De cellen van het aangeboren immuunsysteem moeten de micro-organismen die ze willen bestrijden wel eerst herkennen. Dit gebeurt via receptoren op het celmembraan van de effector cellen. Deze receptoren worden Pattern Recognition Receptors (PRR) genoemd. Voorbeelden hiervan zijn Toll-like receptoren en mannose receptoren. De PRR herkennen

verschillende groepen van moleculaire patronen op micro-organismen. Deze patronen worden pathogen-associated molecular patterns (PAMP's) genoemd.



Afbeelding 1. Overzicht van eigenschappen van het aangeboren immuunsysteem. 1 en 2: Macrofagen kunnen micro-organismen fagocyteren en ontstekingsbevorderende cytokinen uitscheiden. 3: Dendritische cellen presenteren antigenen aan het verworven immuunsysteem. (1)

Het verworven immuunsysteem

Het verworven immuunsysteem komt langzamer op gang. Dit kan soms dagen of weken duren. De belangrijkste cellen van het verworven immuunsysteem zijn lymfocyten, een type leukocyt. Het systeem is specifiek, dat wil zeggen dat het antilichamen voor antigenen bezit volgens het sleutel-slot-principe. De lymfocyten bezitten antigeenreceptoren op hun oppervlakte. Door binding van een passend antigeen met een antigeenreceptor, kan de lymfocyt geactiveerd worden. Een geactiveerde lymfocyt kan in grote hoeveelheden antilichamen vormen en uitscheiden. De antilichamen die worden uitgescheiden zorgen ervoor dat het antigeen geïnactiveerd of verwijderd wordt door cellen van het aangeboren immuunsysteem.

Het verworven immuunsysteem is onder te verdelen in twee typen: de humorale immuniteit en de cellulaire immuniteit. De humorale immuniteit wordt uitgevoerd door B-lymfocyten die antilichamen uitscheiden om extracellulaire antigenen te bestrijden.

Vervolgens kunnen de antigenen verwijderd worden door cellen van het verworven immuunsysteem. Echter, zodra een micro-organisme zich intracellulair in een cel heeft genesteld, kan het niet meer bestreden worden door antilichamen van B-lymfocyten. Hier moet dan de cellulaire immuniteit aan te pas komen, de T-lymfocyten.

T-lymfocyten bezitten net als B-lymfocyten antigeenreceptoren, maar de antigeenreceptoren van T-lymfocyten kunnen antigenen niet direct herkennen. Hiervoor moeten de antigenen eerst aan de T-lymfocyt worden aangeboden. Dit gebeurt door de antigenen te binden aan eiwitten van het Major Histocompatibility Complex (MHC), die op hun beurt gebonden zijn aan de antigeen presenterende cellen (APC's) van het aangeboren immuunsysteem. Als de T-cel antigeenreceptor het antigeen herkend heeft, kunnen de T-lymfocyten geactiveerd worden en uitgroeien tot een effector cel. De T-lymfocyten kunnen zelf het antigeen onschadelijk maken, daar hebben ze geen hulp van het aangeboren immuunsysteem bij nodig.

Van T-lymfocyten zijn twee soorten: cytotoxische T-lymfocyten (Tc-lymfocyten) en helper T-lymfocyten (Th-lymfocyten). Beide T-lymfocyten kunnen uitgroeien tot effector cellen. Effector-Tc-lymfocyten doden cellen die met een virus zijn geïnfecteerd. Effector-Th-lymfocyten scheiden cytokinen uit waarmee ze macrofagen kunnen activeren. Op basis van de cytokinen die ze uitscheiden kunnen effector Th-lymfocyten ingedeeld worden in twee groepen: Th-1 type lymfocyten en Th-2 type lymfocyten. De producten die ze uitscheiden zijn belangrijke informatie voor de volgende hoofdstukken.

Th-1 lymfocyten scheiden cytokinen IFN- γ , TNF- α en IL-2 uit.

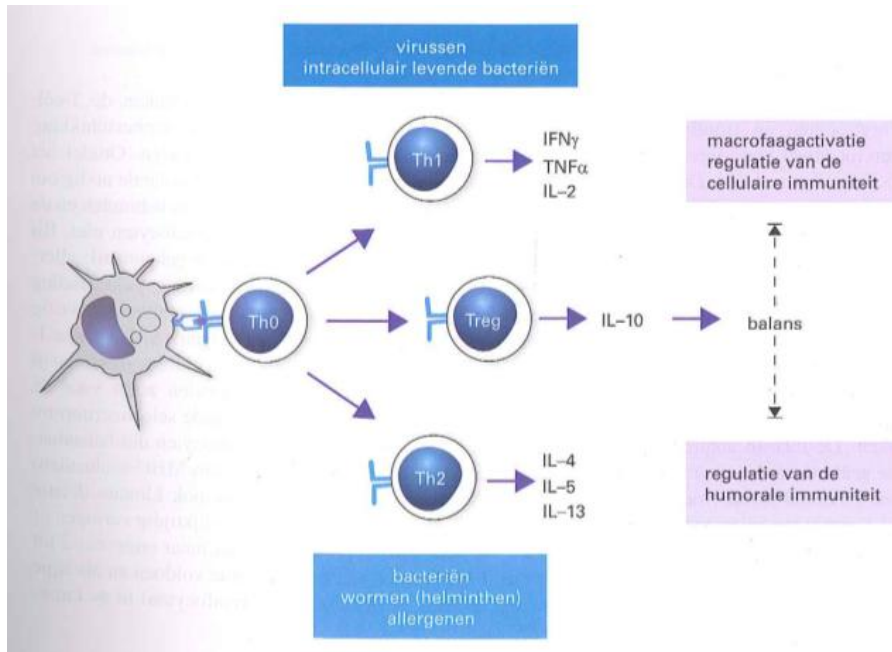
- IFN- γ zorgt voor activatie van macrofagen.
- TNF- α stimuleert het ontstekingsproces.
- IL-2 zorgt voor proliferatie van T-lymfocyten zelf. Na proliferatie kunnen T-lymfocyten uitgroeien tot effector T-lymfocyten.

Th-2 lymfocyten scheiden cytokinen IL-4, IL-5 en IL-13 uit.

- IL-4 & IL-5 zijn nodig voor de humorale immuniteit en belangrijk bij de vorming van plasmacellen.
- IL-13 zorgt voor differentiatie en groei van B-lymfocyten. Daarnaast vermindert IL-13 de macrofaag activiteit, waardoor de ontstekingsreactie en de productie van ontstekingsbevorderende cytokinen ook vermindert.

Er is nog een derde groep T-lymfocyten: CD4⁺ T-lymfocyten, dit zijn regulerende T-lymfocyten. Een andere naam voor deze lymfocyten is Tregs en ze zorgen voor de balans

tussen Th-1 en Th-2 type lymfocyten. Tregs scheiden daarnaast ook het cytokine IL-10 uit (Afb. 2).



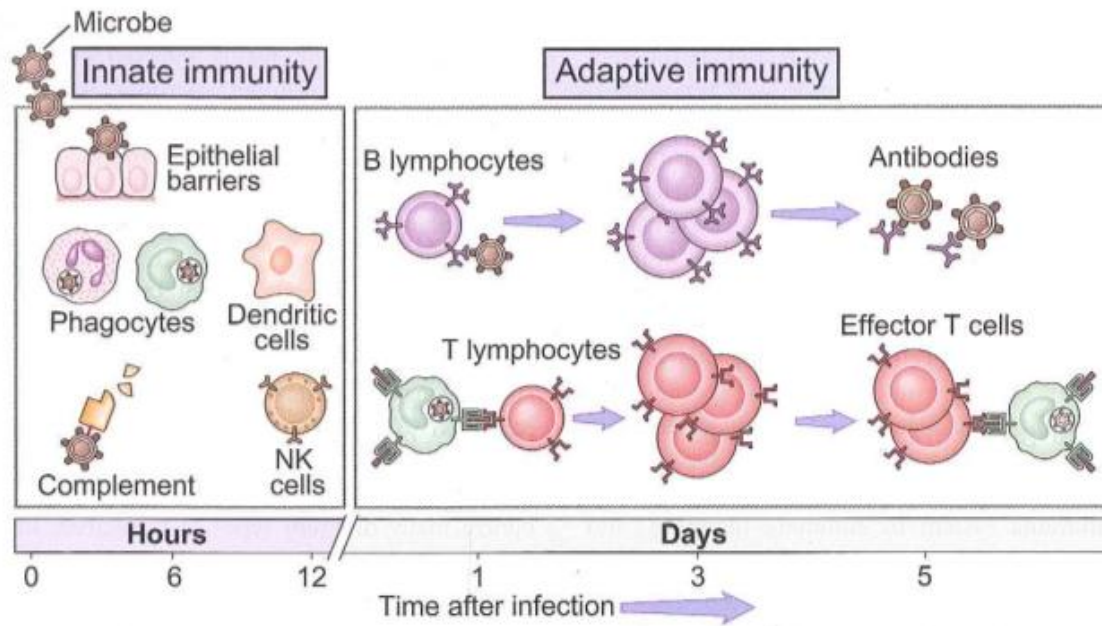
Afbeelding 2. T-lymfocyten kunnen splitsen in Th-1, Th-2 en Tregs. (1)

Conclusie

Al met al kunnen de volgende conclusies getrokken worden over de verschillen tussen het aangeboren en het verworven immuunsysteem.

Het aangeboren immuunsysteem is de eerste verdediging van het menselijk lichaam tegen micro-organismen. De belangrijkste functie is het fagocyteren van micro-organismen en macrofagen spelen hierin de grootste rol. Daarnaast scheiden macrofagen ontstekingsbevorderende cytokinen uit. Tenslotte transporteert het aangeboren immuunsysteem antigenen door middel van dendritische cellen die als APC functioneren. De APC's dienen als brug naar de verworven immuniteit.

Het verworven immuunsysteem komt later op gang en bestaat uit B-lymfocyten en T-lymfocyten. B-lymfocyten (humorale immuniteit) bestrijden extracellulaire micro-organismen. Deze worden direct herkend en geïnactiveerd door antilichamen of aangeboden voor fagocytose aan het aangeboren immuunsysteem. T-lymfocyten (cellulaire immuniteit) bestaan uit Tc-lymfocyten en Th-lymfocyten. Tc-lymfocyten bestrijden met virus geïnfecteerde cellen. Th-lymfocyten zijn een belangrijke modulator van het immuunsysteem door de uitscheiding van cytokinen, waarmee ze macrofagen kunnen activeren. Th-1 en Th-2 lymfocyten scheiden beide een ander scala aan cytokinen uit. Afbeelding 3 geeft een overzicht van de zojuist genoemde cellen.



Afbeelding 3. Een overzicht van de belangrijkste cellen van het aangeboren en verworven immuunsysteem. (2)

Nu het duidelijk is hoe het immuunsysteem van de mens in elkaar zit, kan er dieper op worden ingegaan. Over het onderscheid tussen verschillende geactiveerde macrofagen is de laatste jaren veel verschenen in de literatuur. Verschillende macrofaag activatie staat in verband met de vreemd-lichaam reactie op biomaterialen. Hier zullen de volgende hoofdstukken aan gewijd worden.

Hoofdstuk 2

M1 en M2 Macrofagen

In de literatuur wordt de laatste jaren veel geschreven over M1 en M2 macrofagen. Er is in deze artikelen veel consensus over dit onderwerp, waardoor de reviews veelal dezelfde conclusies hebben. Maar er worden ook veel verschillende begrippen gebruikt en de processen die voorafgaan aan en geïnduceerd worden door macrofaag activatie zijn diepgaand en ingewikkeld. In dit hoofdstuk zullen de belangrijkste visies en conclusies beschreven worden wat M1 en M2 macrofaag activatie betreft.

Het verschil tussen M1 en M2 macrofagen

Siamon Gordon heeft veel gepubliceerd op het gebied van macrofaag activatie. In één van zijn reviews (3) beschrijft hij de verschillen tussen klassiek geactiveerde macrofagen (M1) en alternatief geactiveerde macrofagen (M2). Hij richt zich vooral op de M2 macrofagen die geactiveerd worden door IL-4 en IL-13, waardoor hij met deze afbakening een beter inzicht kan geven op de beperkingen en de relevantie van M2 macrofagen in het immuunsysteem en in de ontstekingsreactie.

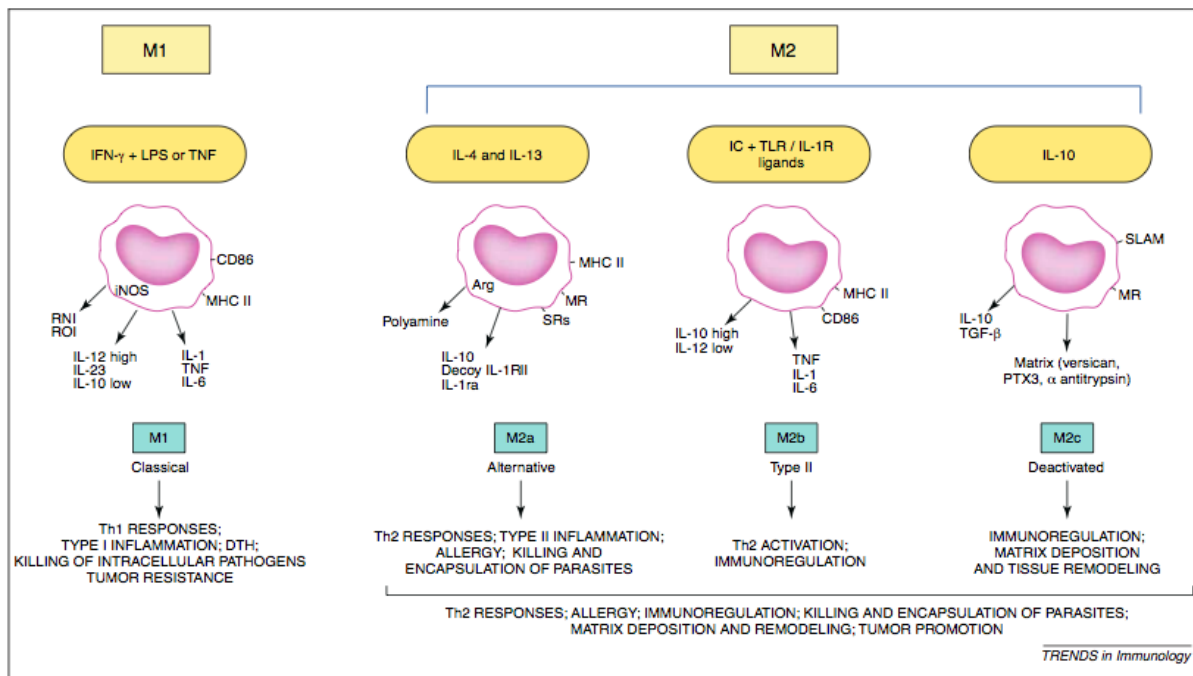
De klassieke immuunactivatie van macrofagen is al bekend sinds 1960, toen Mackaness *et al.* (4) hier onderzoek naar deden. Sindsdien is men steeds meer te weten gekomen over M1 macrofaag activatie. Klassieke macrofaag activatie komt tot stand door IFN- γ , een product dat afkomstig is van Th-1 lymfocyten en NK's. Daarnaast spelen APC's een rol doordat ze een spectrum van cytokinen uitscheiden, waaronder IL-12 en IL-18 (3) en tumor-necrosis factor (TNF). (5)

Over het type macrofaag dat op een alternatieve manier wordt geactiveerd is minder bekend, hier wordt pas de afgelopen 20 jaar onderzoek naar gedaan. In 1992 werd hierover door Stein *et al.* (6) één van de eerste artikelen gepubliceerd. In de loop der jaren ontdekt men steeds meer over de alternatief geactiveerde macrofagen. Bijvoorbeeld dat M2 macrofagen voornamelijk worden geactiveerd tijdens allergische reacties en reacties op parasieten, zoals wormen. De meeste onderzoeken zijn *in vitro* of in muismodellen uitgevoerd. Hierover is bekend dat M2 macrofagen worden gestimuleerd door een Th-2 type reactie, waarin de cytokinen IL-4 en IL-13 een rol spelen. Ook het cytokine IL-10 kan aanzetten tot alternatieve activatie van macrofagen. Maar zoals eerder vermeld houdt Siamon Gordon het liever bij een afbakening met IL-4 en IL-13. IL-10 reageert namelijk met een andere receptor op het plasmamembraan van de macrofagen en de effecten op de genexpressie zijn verschillend. De auteur zegt: "I therefore propose to limit the term 'alternative activation of macrophages' to the effects of IL-4 and IL-13 only. Otherwise, it

would be necessary to subdivide this category further according to each immunomodulatory cytokine and inhibitor, making the concept unwieldy.” waarmee hij aangeeft dat het onderwerp zeer complex is. (3)

Sommige auteurs houden zich niet aan deze afbakening en verdelen M2 macrofagen wel in verschillende subcategorieën. Bijvoorbeeld Mantovani *et al.*, die in een review (7) het chemokine systeem van de macrofaag activatie beschrijven. M2 macrofagen worden hier onderverdeeld in drie categorieën (Afb. 4):

- M2a: geactiveerd door IL-4 of IL-13.
- M2b: geactiveerd door de blootstelling aan immuun complexen (IC) en agonisten van Toll-like receptoren of IL-1R.
- M2c: geactiveerd door IL-10 en glucocorticoïde hormonen.



Afbeelding 4. Overzicht van M1 en M2a, M2b en M2c macrofagen. Afbeelding uit (7).

De kenmerken van M1 en M2 macrofagen

Nu duidelijk is hoe de verschillende fenotypen macrofagen worden geactiveerd, kunnen de verschillen tussen M1 en M2 wat kenmerkende eigenschappen betreft verder worden toegelicht.

Klassiek geactiveerde macrofagen spelen een rol in de cellulaire immuunrespons en worden geactiveerd door effector Th1-lymfocyten. M1 macrofagen hebben de capaciteit om micro-organismen en tumoren te doden en scheiden ontstekingsbevorderende cytokinen en mediators uit. M1 macrofagen spelen ook een rol in de aangeboren immuunrespons. Hierbij

worden ze geactiveerd door NK's die IFN- γ uitscheiden. IFN- γ zet M1 macrofagen aan om ontstekingbevorderende cytokinen en grote hoeveelheden superoxide anionen en nitriet oxide (NO) uit te scheiden, allerlei middelen om micro-organismen te kunnen doden. Zoals bekend is uit hoofdstuk 1, zorgt de aangeboren immuunrespons voor de eerste bescherming betreft weerstand tegen infecties, maar duurt de respons maar kort. De verworven immuunrespons met IFN- γ geproduceerd door Th-1 type cellen is nodig voor langere bescherming door M1 macrofagen. T-cellen zijn antigeen specifiek, maar de M1 macrofagen die ze via IFN- γ induceren zijn onwillekeurig in het doden van micro-organismen. (8) (5)

In een review van Gordon en Varin. (9) worden de eigenschappen van alternatief geactiveerde macrofagen beschreven. Eén van de belangrijkste eigenschappen van M2 macrofagen is de ontstekingsremmende eigenschap. M2 macrofagen remmen ontstekingsbevorderende cytokinen zoals IL-12 en de antagonist van IL-1R en produceren daarnaast zelf ontstekingsremmende cytokinen zoals IL-1, IL-6, IL-12, tumor necrosis factor- α (TNF- α) en het chemokine macrophage inflammatory protein- α (MIP- α).

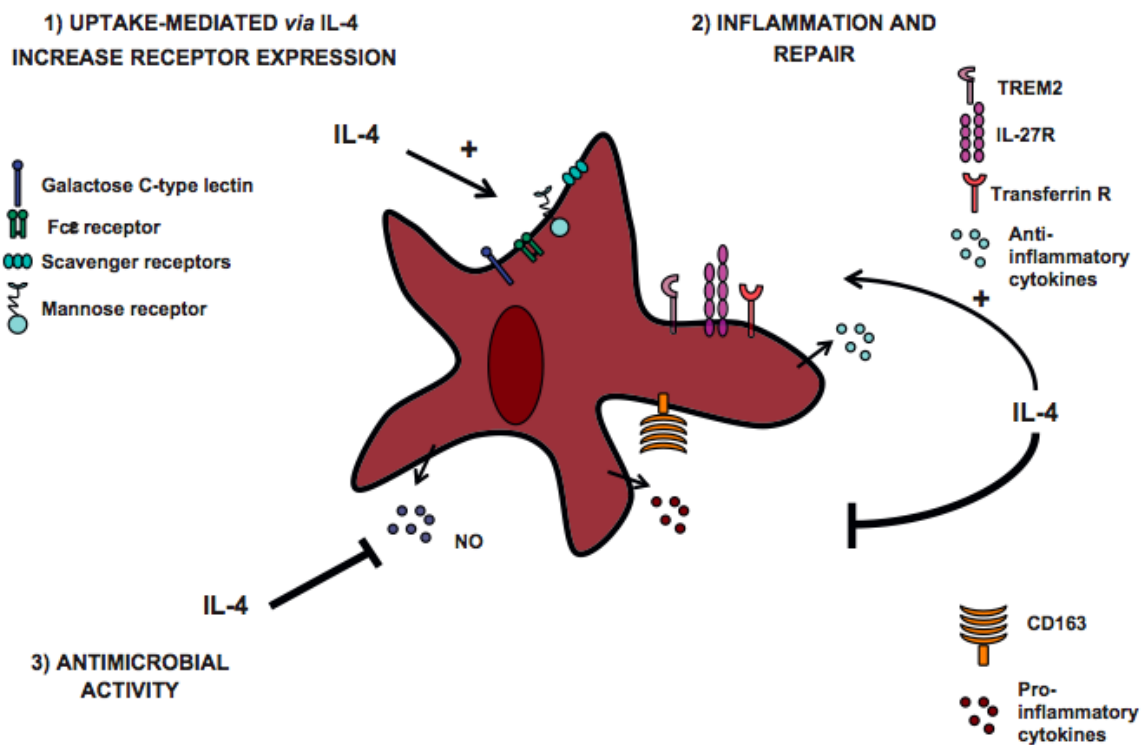
Daarnaast zorgen M2 macrofagen voor de werving van APC's naar de ontstekingshaard door chemokines uit te scheiden (o.a. macrophage-derived chemokine (MDC) en thymus and activation-regulated chemokine (TARC)) die de APC's aantrekken.

Een andere eigenschap van M2 macrofagen is het vermogen om weefsel te herstellen. M2 macrofagen zorgen namelijk voor de aanmaak van componenten van de extracellulaire matrix. Ze produceren matrixeiwitten zoals fibronectine, β IGH3 en arginase 1. Arginase 1 hydrolyseert L-argenine tot urea en L-ornithine, wat gebruikt wordt om polyamine (draagt bij aan celproliferatie) en proline (collageenproductie) te maken. Beide van deze eindproducten zijn nuttig voor het weefselherstel. Daarnaast zijn M2 macrofagen in staat om angiogenese te induceren, wat ook bijdraagt aan weefselherstel.

M2 macrofaag activatie leidt tot een verandering in expressie van membraan receptoren op het celmembraan. Deze membraanreceptoren (PRR's, zie hoofdstuk 1) kunnen bepaalde structuren van micro-organismen herkennen en hieraan binden. De expressie van de mannose receptor bijvoorbeeld, wordt sterk vergroot. Hierdoor kunnen meer glycoproteïnen die mannose op hun oppervlak hebben gebonden, worden gebonden. Ook de expressie van de β glucan receptor en de macrofaag galactose-type C-type lectines is groter. Al deze receptoren leiden tot een vergrote opname van micro-organismen en tot de expressie van meer MHC-II moleculen, wat zorgt voor de vorming van meer APC's en de differentiatie van T-cellen tot antigeen-specifieke Th-2 cellen.

Als laatste eigenschap hebben M2 macrofagen andere endocytose en fagocytose capaciteiten om het lichaam te beschermen tegen micro-organismen. Echter is er over dit onderdeel nog veel discussie en blijft het voornamelijk onduidelijk welke micro-organismen wel

en welke niet worden opgenomen door M2 macrofagen. (9) Afbeelding 5 geeft een paar eigenschappen van M2 macrofagen nogmaals weer.

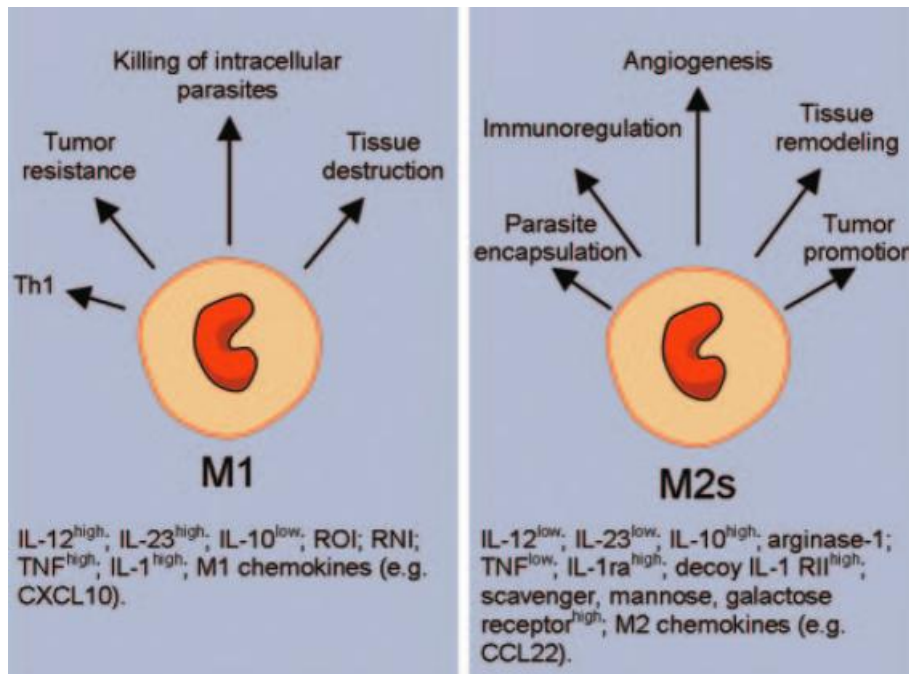


Afbeelding 5. 1) M2 macrofagen bezitten andere receptoren op het celmembraan, waardoor fagocytose en endocytose beïnvloedt worden. 2) M2 macrofagen hebben ontstekings-remmende en weefsel-herstellende capaciteiten. 3) M2 macrofagen verminderen de ontstekingsreactie door de NO productie van M1 macrofagen te remmen. Afbeelding uit (9).

De keerzijde van alle ontstekingsremmende eigenschappen van de M2 macrofagen is dat het lichaam tijdelijk slechter beschermd is tegen pathogenen. Immers, arginase 1 kan ook worden omgezet door iNOS in L-hydroxy-arginine, wat leidt tot de aanmaak van citrulline en nitriet oxide (NO). Omdat er door de activatie van de M2 macrofagen nu meer arginine 1 wordt omgezet in L-ornithine in plaats van L-hydroxy-arginine, wordt er minder NO aangemaakt, één van de belangrijkste middelen van M1 macrofagen om microben te doden. Daarnaast remmen M2 macrofagen zoals eerder gezegd de ontstekingsbevorderende eigenschappen van M1 macrofagen, waardoor de Th1-type immuunreactie en de humorale afweer tijdelijk geremd worden.

M2 macrofagen kunnen ook bijdrage aan de vorming van macrofaag reuscellen. Voornamelijk IL-4 induceert fusie van macrofagen. Echter, of de vorming van reuscellen tot stand komt ter (extra) bescherming van het menselijk lichaam, of dat het geïnduceerd wordt door de vreemd-lichaam reactie als mechanisme om het immuunsysteem binnen te dringen, is nog onduidelijk. (9) In een artikel van Goerd *et al.* (10) wordt kort beschreven dat M2

macrofagen ook tumor-inducerend kunnen zijn. Ten eerste omdat M2 macrofagen de anti-tumor effector cellen Th-1 en Tc-1 inhiberen en tweede omdat M2 macrofagen groeifactoren uitscheiden en angiogenese stimuleren, wat beiden als voeding kan dienen voor de tumor. (10)



Afbeelding 6. Het verschil tussen M1 en M2 macrofagen. Afbeelding uit (11).

Conclusie

De verschillen tussen M1 en M2 macrofagen worden in de literatuur als volgt beschreven. M1 macrofagen worden klassiek geactiveerd met als belangrijkste activator TNF- γ , uitgescheiden door Th-1 lymfocyten en NK's. Daarnaast spelen APC's een rol in M1 macrofaag activatie, door de uitscheiding van IL-12 en IL-18. De belangrijkste eigenschap van M1 macrofagen is dat ze een ontstekingsbevorderende reactie opwekken. Via de cellulaire immuunrespons hebben ze een grote capaciteit om microben te doden, onder andere door de uitscheiding van NO.

M2 macrofagen worden alternatief geactiveerd. Cytokinen IL-4 en IL-13 uitgescheiden door Th-2 lymfocyten zijn hierin de hoofdrolspelers. M2 macrofagen worden gekenmerkt door hun ontstekingsremmende eigenschappen, het herstellen van weefsel (o.a. door angiogenese en de aanmaak van extracellulaire matrix componenten), de vergrootte expressie van mannose receptoren en de vergrootte capaciteit voor endocytose en fagocytose. Een nadelige uitwerking van M2 macrofagen is dat ze M1 macrofagen remmen, waardoor het lichaam slechter is tegen pathogenen. Bovendien zouden M2 macrofagen

tumor-inducerend kunnen zijn. Afbeelding 6 geeft een overzicht van de verschillen tussen M1 en M2 macrofagen.

Wat voor biomedische technologische toepassingen interessant is om te weten, is hoe M1 en M2 macrofagen zich verhouden tot de vreemd-lichaam reactie op geïmplanteerde biomaterialen. In de volgende hoofdstukken zal door middel van twee artikelen toegelicht worden welke samenhang er bestaat tussen macrofaag fenotypes en de vreemd-lichaam reactie.

Hoofdstuk 3

Macrofaag Plasticiteit tijdens de Ontstekingsreactie

Dit hoofdstuk is met name afgeleid van het volgende artikel:

Human macrophages primed with angiogenic factors show dynamic plasticity, irrespective of extracellulair components – Ploeger *et al.* (12)

Inleiding

Macrofagen zijn een belangrijk onderdeel van ontsteking, welke een reactie is van het lichaam op implantatie van een biomateriaal. Onderdelen van ontsteking zijn weefselherstel, angiogenese en het vernieuwen van de extracellulaire matrix (ECM). Macrofagen worden verkregen door de differentiatie van monocyten. Voordat differentiatie plaatsvindt, migreren monocyten naar de plek van de ontsteking. Eenmaal in de ontstekingshaard wordt de differentiatie bepaald door stimuli uit de omgeving. Vooral componenten van de ECM, ontstekingscytokinen en groeifactoren kunnen de differentiatie van monocyten naar macrofagen beïnvloeden. Wanneer differentiatie heeft plaatsgevonden, kunnen macrofagen verschillende processen beïnvloeden en acties uitoefenen zoals beschreven in hoofdstuk 2. Het fenotype macrofaag (M1 of M2) bepaalt hun rol in weefselherstel en ontsteking. Mede door het verschil in kenmerken van beide fenotypes is het handig als macrofagen zich snel aan een veranderend milieu kunnen aanpassen.

De wetenschappers van dit artikel hebben zich laten inspireren door meerdere recente onderzoeken. Het eerste onderzoek is van Stout *et al.* (13), waaruit blijkt dat het secretiepatroon van cytokinen door macrofagen beïnvloedbaar is door een dynamisch milieu. Het tweede onderzoek is uitgevoerd door Gratchev *et al.* (14). Zij ontdekten dat M1 macrofagen *in vitro* kunnen repolariseren tot M2 macrofagen en andersom, waarbij ze gebruik maakten van de activatie stimuli IFN- γ /LPS en IL-4/IL-13. Tenslotte maken de auteurs gebruik van de informatie dat gedurende transmigratie, en later ook gedurende migratie naar onderliggende weefsels, macrofagen steeds in contact zijn met componenten van het ECM. Dit contact beïnvloedt de functionaliteit van de macrofagen, omdat macrofagen die volgroeid zijn op het ECM beter kunnen fagocyteren dan macrofagen die volgroeid zijn op tissue culture polysterene (TCPS). (15) Echter is er over de precieze werking achter dit proces nog weinig bekend.

Al met al heeft deze achtergrondinformatie tot de volgende onderzoeksvraag geleid:

Wat is de invloed van een angiogenese-bevorderend milieu gecombineerd met componenten van het ECM op de dynamica van polarisatie van menselijke macrofagen?

Voor het beantwoorden van deze onderzoeksvraag hebben de wetenschappers naar drie aspecten gekeken.

1. In welke richting menselijke primaire macrofagen polariseren als ze gekweekt worden onder angiogenese condities op TCPS, collageen I (COL 1) en fibronectine (FN).
2. Hoe de polarisatie van macrofagen naar M1 en M2 onder angiogenese condities verloopt door stimulatie met LPS/IFN- γ en IL-4/IL-13.
3. Hoe de polarisatie van M1 naar M2 en van M2 naar M1 tot stand komt door stimulatie met geconditioneerd medium van M1 of M2 macrofagen onder angiogenese condities.

Resultaten

Voor elk van de drie aspecten zullen de belangrijkste resultaten toegelicht worden.

1. In welke richting polariseren menselijke primaire macrofagen als ze gekweekt worden onder angiogenese condities op TCPS, collageen I (COL 1) en fibronectine (FN)?

- Alle cellen hadden een lage expressie van de monocyte marker CD14, wat betekent dat alle monocytten naar macrofagen zijn gedifferentieerd. Daarnaast hadden alle cellen een hoge expressie van de macrofaag marker CD68.
- Alle cellen hadden dezelfde expressie van ontstekingsbevorderende mediators zoals IL-1 β en CCL3.
- De expressie van CD163 en CD206, markers voor M2 macrofagen, was voor alle cellen hoog. De relatief hoge expressie van deze markers op FN en COL 1 duidt erop dat de macrofagen gepolariseerd waren naar een M2 macrofaag type.

2. Hoe verloopt de polarisatie van macrofagen naar M1 en M2 onder angiogenese condities na stimulatie met LPS/IFN- γ (klassieke stimulatie) en IL-4/IL-13 (alternatieve stimulatie)?

- Na stimulatie met IFN- γ /LPS vertoonden macrofagen een hogere expressie van CCL3, IL-1 β en IL-6 vergeleken met macrofagen gestimuleerd met IL-4/IL-13. Daarnaast was de expressie van de bovengenoemde markers het hoogste op de met ECM gecoate kweekmaterialen (FN en COL 1).

- Na stimulatie met IL-4/IL-13 vertoonden macrofagen meer expressie van macrofaag galactose N-acetyl-galactosamine specific Lectine-1 (MGL-1) en bovendien meer expressie van CD163 en CD206 ten opzichte van M1 gestimuleerde macrofagen.

3. Hoe komt de polarisatie van M1 naar M2 en van M2 naar M1 tot stand door stimulatie met geconditioneerd medium (CM) van M1 of M2 macrofagen onder angiogenese condities?

- De expressie van IL-1 β , CCL3 en IL-6 door M1 macrofagen werd onmiddellijk gestopt door de behandeling met geconditioneerd medium van M2 macrofagen. De behandeling zorgde voor de expressie van M2 marker genen als MGL-1, CD163 en CD206. Hieruit blijkt dat M1 macrofagen door middel van CM van M2 macrofagen binnen 24 uur richting M2 macrofagen kunnen depolariseren.
- De MGL-1 expressie door M2 macrofagen werd minder, evenals die van CD163 en CD206, door behandeling met geconditioneerd medium van M1 macrofagen. De M2 macrofagen gingen meer IL-1 β en IL-5 produceren. Hieruit blijkt dat M2 macrofagen binnen 24 uur snel en bijna volledig kunnen depolariseren naar M1 macrofagen door stimulatie met CM van M1 macrofagen.

Conclusie

De belangrijkste conclusies van het onderzoek zijn:

1. De onder angiogenese bewerkte menselijke monocyten differentiëren in eerste instantie naar M2 macrofagen.
2. Deze M2 macrofagen polariseren naar M1 macrofagen na stimulatie met IFN- γ en LPS. De M2 capaciteiten werden verder ontwikkeld na stimulatie met IL-4 en IL-13.
3. M1 en M2 polarisatie kan omgedraaid worden door behandeling met geconditioneerd medium van respectievelijk M2 en M1 macrofagen.
4. De ECM componenten fibronectine en collageen 1 spelen geen primaire rol in de dynamische wisselingen van macrofaag polarisatie.

Hoofdstuk 4

Macrofagen en Biomaterialen

Dit hoofdstuk is met name afgeleid van het volgende artikel:

Biomaterials surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro – Brodbeck *et al.* (16)

Inleiding

De biocompatibiliteit van een biomateriaal wordt bepaald door de vreemd-lichaam reactie die optreedt als reactie op het oppervlakte van het biomateriaal. Het oppervlakte wordt namelijk direct na implantatie bedekt met plasma eiwitten. Deze eiwitten kunnen door middel van signaalmoleculen cellen, zoals monocytten, aantrekken naar de ontstekingshaard. Ook kunnen plasma eiwitten cellen van de ontstekingsreactie activeren. Eenmaal in de ontstekingshaard kunnen de aangetrokken monocytten differentiëren naar macrofagen en de macrofagen kunnen op hun beurt fuseren tot reuscellen ofwel foreign body giant cells (FBGC). Macrofagen en FBGC kunnen het implantaat beschadigen en afbreken door hun fagocyterende capaciteiten en de uitscheiding van reactive oxygen species (ROS). Ook cytokinen spelen hierbij een rol, wat ondertussen duidelijk is geworden in de vorige hoofdstukken. De auteurs van dit artikel maken onderscheid tussen:

- IL-1 β , TNF- α en IL-8 als ontstekingsbevorderende cytokinen.
- IL-6, IL-10 en IL-1RA als ontstekingsremmende/weefselherstellende cytokinen.

De hechting van plasma eiwitten aan het oppervlakte van het biomateriaal heeft dus als gevolg dat er monocytten worden aangetrokken die differentiëren naar macrofagen. De macrofagen kunnen fuseren tot reuscellen en scheiden cytokinen uit. Omdat hieruit blijkt dat er een verband is tussen de uitscheiding van cytokinen en de hechting van plasma eiwitten aan het oppervlakte van het biomateriaal, hebben de auteurs de volgende onderzoeksvraag geformuleerd:

Hoe dragen verschillend chemisch gemodificeerde oppervlakten van biomaterialen bij aan de uitscheiding van cytokinen door monocytten/macrofagen die zich aan het oppervlakte materiaal hebben gehecht?

Voor het onderzoek wordt er gebruik gemaakt van vijf soorten biomaterialen met elk een andere oppervlakte eigenschap.

Biomateriaal:	Opp. eigenschap:
Polyethylene terephthalate (PET)	Licht hydrofoob
Poly(benzyl <i>N,N</i> -diethylthiocarbamate-co-styrene (BDEDTC)	Hydrofoob
Polyacrylamide (PAAm)	Hydrofiel
Sodium zout van poly(acrylic acid) (PAANa)	Anionisch
Methiodide van poly(dimethylaminopropyl-acrylamide) (DMAPAAmMeI)	Cationisch

Daarnaast wordt er gebruik gemaakt van menselijke monocytten en macrofagen en de cytokine expressie wordt gemeten met semi kwantitatieve RT-PCR.

Resultaten

Hydrofiel en anionische oppervlakten

PAAm (hydrofiel) en PAANa (anionisch) oppervlakten hadden een verlaagde expressie van IL-8 en IL-10 door gehechte monocytten/macrofagen.

IL-8 heeft als eigenschap dat het kan dienen als chemoattractant. Een verlaging van IL-8 leidt tot een verlaging in chemotaxis van leukocyten naar de implantatiezijde. IL-10 heeft als eigenschap dat het de cytokine productie van andere cellen kan verlagen, waardoor de cellulaire activiteit wordt verminderd. Een verhoging van IL-10 leidt dus tot een onderdrukte respons op het biomateriaal. In totaal zorgt een verlaging van IL-8 en een verhoging van IL-10 ervoor dat de vreemd-lichaam reactie op een biomateriaal wordt verminderd.

Cationische oppervlakten

DMAPAAmMeI oppervlakten hadden een verlaagde expressie van IL-1RA en IL-10 door gehechte monocytten/macrofagen.

Een verlaging in IL-1Ra leidt tot een verhoging van IL-1 β , omdat IL-1RA de receptor antagonist is van IL-1 β . *In vivo* leidt dit tot een verhoging in cellulaire activatie van cellen die betrokken zijn bij het wondhelingsproces en de ontstekingsreactie. IL-10 verlaging zorgt voor een verminderde onderdrukking van de cytokine productie van andere cellen.

De rol van IL-4

IL-4 heeft de cytokine expressie nauwelijks beïnvloed. Slechts de expressie van IL-8 bij PAANa en IL-1RA bij DMAPAAmMeI werden verminderd door de aanwezigheid van IL-4.

De auteurs hadden IL-4 bij dit onderzoek betrokken omdat van dit cytokine bekend is dat het bijdraagt aan de macrofaag fusie *in vivo* en *in vitro*. Er werd verwacht dat als IL-4

werd toegediend aan de biomaterialen, de vorming van FBGC zou toenemen tijdens de uitscheiding van ontstekingsbevorderende cytokinen.

Conclusie

Al met al kunnen de volgende conclusies getrokken worden uit dit onderzoek:

1. Hydrofiele en anionische oppervlakten wekken een ontstekingsremmende respons op. Dit is bevorderend voor de biocompatibiliteit van het geïmplanteerde biomateriaal.
2. Cationische oppervlakten wekken een ontstekingsbevorderende respons op. Dit is slecht voor de biocompatibiliteit van het geïmplanteerde biomateriaal.
3. IL-4 beïnvloedt de cytokine expressie van monocyten en macrofagen die gehecht zijn aan het biomateriaal oppervlakte niet zozeer als werd gedacht.

Hoofdstuk 5

Discussie

Naar aanleiding van de in hoofdstuk 3 en 4 beschreven artikelen kunnen er verschillende punten bediscussieerd worden als het om M1 en M2 macrofagen en hun rol in de vreemd-lichaam reactie op biomaterialen gaat.

De resultaten uit hoofdstuk 3 (12) laten zien dat polarisatie van M1 en M2 macrofagen dynamisch is onder angiogenese condities. Zelfs als macrofagen eerst klassiek geactiveerd worden kunnen ze nog polariseren tot alternatief geactiveerd, en andersom. Dit kan goed van pas komen tijdens de vreemd-lichaam reactie als gevolg van een geïmplanteed biomateriaal. Door macrofagen meer richting M2 te stimuleren zou het ontstekingsproces op een biomateriaal verminderd kunnen worden en kan er eerder weefselherstel plaatsvinden. Dit is gunstig voor de patiënt en voor de kwaliteit van het implantaat.

Een kritisch puntje bij dit artikel is het gebruik van LPS als klassieke activatie stimuli. LPS kan leiden tot een expressie van (ontstekings)cytokinen die niet meer in proportie is in tegenstelling tot andere activatie stimuli. Wanneer er gebruik gemaakt zou zijn van bijvoorbeeld IFN- γ en IL-12, IL-18 of TNF als activatie stimuli, dan zou het onderzoek wellicht betere resultaten hebben geleverd voor *in vivo* vervolg onderzoek.

Het artikel uit hoofdstuk 4 (16) over de combinatie van materialen en de reactie van cellen daarop is vanuit biomedisch technologisch gebied gezien een ideaal onderwerp. Een nadeel van dit artikel is dat het in 2002 gepubliceerd is. De onderzoeksresultaten kunnen op dit moment achterhaald zijn geworden. Dat neemt niet weg dat het interessant is dat deze onderzoekers destijds al een verband hebben gelegd tussen de verschillende soorten cytokinen (ontstekingsremmend/ontstekingsbevorderend) terwijl het onderzoek naar verschillende macrofaag activaties nog volop in ontwikkeling was.

Als hetzelfde onderzoek op dit moment uitgevoerd zou worden, wordt waarschijnlijk de expressie van cytokinen onderzocht die nu worden toegeschreven aan M1 en M2 macrofaag activatie. Dat wil zeggen, cytokinen IFN- γ , IL-12, IL-18 en TNF (i.p.v. IL-1 β , TNF- α en IL-8) voor M1 macrofagen en cytokinen IL-4 en IL-13 (i.p.v. IL-6, IL-10 en IL-1RA) voor M2 macrofagen.

Daarnaast zijn er op dit moment meer manieren ontwikkeld om biomateriaal oppervlakten van bijvoorbeeld polymeren te modifieren. Zo kan er gebruik gemaakt worden van γ -stralen en UV-stralen om het polymeernetwerk te verstevigen of juist te verslappen. Deze technieken worden al bekeken op macrofaag adhesie en dit zou verder uitgebreid

kunnen worden naar het bekijken van de adhesie van de verschillende fenotypen macrofagen.

Een ander discussiepunt is de nieuwe generatie biomaterialen. Deze biomaterialen bevatten veelal een eiwitcoating, omdat een patroon van eiwitten het biomateriaal zou moeten verbeteren. Echter zorgt de eiwit laag voor een immuunrespons van een andere orde dan in deze scriptie is beschreven (de migratie van monocyten/macrofagen naar de implantatiezijde). Het lichaam gaat namelijk antilichamen produceren tegen de eiwitten op het biomateriaal. In deze immuunrespons zijn veel T-lymfocyten en B-lymfocyten betrokken. Naar de immuunrespons op met eiwit gecoate biomaterialen wordt al steeds meer onderzoek gedaan en dit zal ook in de toekomst nog veel gaan plaatsvinden.

Met het onderscheid in verschillende macrofaag activatie valt veel winst te behalen op het gebied van biomaterialen en de vreemd-lichaam reactie erop. De komende jaren zullen wetenschappers hier nog veel onderzoek naar doen en wie weet zullen er uiteindelijk biomaterialen geproduceerd worden die de M1 en M2 macrofaag activatie precies zo kunnen sturen als dat gewenst is als vreemd-lichaam reactie en zal de zoektocht naar het perfecte biomateriaal weer een stukje dichterbij zijn.

Nawoord

Met een goed gevoel kijk ik terug op het schrijven van mijn bachelor scriptie. Ik heb gemerkt dat ik het lastig vond om een begin te maken. Van welke literatuur ga je gebruik maken, hoe deel je de scriptie in en wat wil je uiteindelijk vertellen? Dit waren vragen waar ik veel over nagedacht heb. Maar toen ik eenmaal de literatuur onder de knie had, ging het schrijven ook een stuk makkelijker. Het leukste vond ik om het biologische deel – over de M1 en M2 macrofaag activatie – te koppelen aan mijn interesseveld, biomedische technologie. Na drie jaar bachelor BMT vind ik mijn scriptie een mooie afsluiting geworden.

Ik wil graag mijn begeleider, Theo van Kooten, bedanken voor het aanreiken van het onderwerp voor mijn scriptie en voor zijn begeleiding tijdens het schrijven ervan.

Referenties

1. Rijkers GT, Kroese FGM, Kallenberg CGM, Derksen RHW. Immunologie. 1e Druk ed. van Loghum BS, editor. Houten: Springer Uitgeverij; 2009.
2. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology. 3rd ed. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
3. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35.
4. Mackaness G. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med*. 1964;120(1):105.
5. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
6. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):287-92.
7. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
8. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003;73(2):209-12.
9. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214(7):630-41.
10. Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*. 1999;67(5-6):222-6.
11. Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: In vivo veritas. *Blood*. 2006;108(2):408-9.
12. Ploeger DT, van Putten SM, Koerts JA, van Luyn MJ, Harmsen MC. Human macrophages primed with angiogenic factors show dynamic plasticity, irrespective of extracellular matrix components. *Immunobiology*. 2012 Mar;217(3):299-306.
13. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):342-9.
14. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Müller-Moliné I, Kannookadan S, Utikal J, et al. M [phi] 1 and M [phi] 2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):473-86.
15. Philippeaux MM, Bargetzi JP, Pache JC, Robert J, Spiliopoulos A, Mauél J. Culture and functional studies of mouse macrophages on native-like fibrillar type I collagen. *Eur J Cell Biol*. 2009;88(4):243-56.

16. Brodbeck W, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats N, Anderson J. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine*. 2002;18(6):311-9.