

# Advanced glycation endproducts in multiple sclerosis

## Citation for published version (APA):

Wetzels, S. M. W. (2019). *Advanced glycation endproducts in multiple sclerosis*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20190221sw>

## Document status and date:

Published: 01/01/2019

## DOI:

[10.26481/dis.20190221sw](https://doi.org/10.26481/dis.20190221sw)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

7

**Nederlandse samenvatting**

## Samenvatting

Multiple sclerose (MS) is een auto-immuun ziekte die het centraal zenuwstelsel (CZS) aantast. Tijdens MS zorgt de activatie van zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem voor demyelinisatie, waarbij de myelinschede rond de axonen wordt aangetast. Geschat wordt dat er 2.5 miljoen mensen wereldwijd lijden aan MS. Deze patiënten hebben uiteenlopende symptomen die variëren van tintelingen, krachtverlies, problemen met het gezichtsvermogen en spraakstoornissen. De symptomen zijn afhankelijk van het gebied in het CZS dat door demyelinisatie is aangetast. De exacte oorzaak van MS is nog onbekend. Men gaat ervan uit dat de ziekte een samenspel is van genetische factoren en omgevingsfactoren. Tot op heden is er geen geneesmiddel voor MS. MS-patiënten zijn daarom toegewezen op zogenaamde ziekte modificerende therapieën die de inflammatoire component van de ziekte verlaagd en hierdoor verlichting geeft van de symptomen. In dit proefschrift hebben wij onderzocht of "advanced glycation endproducts" (AGEs) een rol spelen in het ziekteproces van MS. De belangrijkste bevindingen van het onderzoek worden in dit hoofdstuk samengevat en bediscussieerd.

### *In vivo* vorming van AGEs

MS wordt gekarakteriseerd door de infiltratie van immuuncellen in het CZS. Wanneer autoreactieve T-cellen eenmaal in het CZS zijn geïnfiltrerd, worden ze gereactiveerd door myeline fagocyterende macrofagen en microglia. Daarnaast zorgt de activatie van astrocyten voor de productie van pro-inflammatoire cytokines en chemokines. Dit draagt bij aan de ontstekingsreactie in het CZS en de degeneratie van zenuwcellen. De activatie van macrofagen, microglia en astrocyten zorgt voor een cellulaire switch in metabolisme, waarbij glycolyse wordt geïnduceerd. Dit kan zorgen voor de productie van glycolyse-bijproducten zoals methylglyoxaal (MGO) en glyoxaal (GO), ook wel  $\alpha$ -dicarbonyls genoemd. Zowel MGO als GO kan aminozuren modificeren waardoor AGEs ontstaan zoals CML, CEL en MG-H1. Wanneer deze AGEs binden aan de receptor voor AGEs (RAGE) induceren ze de productie van pro-inflammatoire cytokines. Dit kan uiteindelijk bijdragen aan de inflammatoire omgeving van het CZS.

### *In vivo* vorming van AGEs in MS-patiënten

In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of AGEs verhoogd aanwezig zijn in MS laesies ten opzichte van hersenweefsel afkomstig van niet-dementerende controles (NDCs). We vonden dat eiwitgebonden MG-H1 significant was verhoogd in MS laesies, terwijl CML en CEL onveranderd waren. Tevens hebben we uitgesloten dat post-mortem delay (PMD), de tijd tussen het overlijden van de MS-patiënt en het verzamelen van het weefsel, een bijdrage levert aan verhoogde AGE niveaus.

Door middel van fluorescente dubbelkleuringen, hebben we in **hoofdstuk 2** laten zien dat astrocyten de belangrijkste bijdrage leveren aan de accumulatie van MG-H1 in MS laesies. RAGE was aanwezig op macrofagen en microglia,

maar niet op astrocyten. Hierdoor kan er een paracrine werking optreden van astrocyte-geproduceerde AGEs op RAGE-positieve macrofagen en microglia. RAGE activatie kan op meerdere manieren bijdragen aan de inflammatie. Dit kan enerzijds door de activatie van de nucleaire transcriptiefactor NF- $\kappa$ B en de productie van pro-inflammatoire cytokines. Anderzijds zorgt RAGE activatie voor oxidatieve stress, dat direct kan bijdragen aan demyelinisatie. We kunnen echter niet uitsluiten dat de vorming van AGEs een gevolg is van de inflammatoire processen in het CZS van MS-patiënten, zonder dat het een effect heeft op de neuroinflammatie.

### ***In vivo* vorming van AGEs in het EAE model**

In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of AGEs ook opstapelen in een diermodel voor MS, het experimentele auto-immuun encefalomyelitis (EAE) model. In dit model wordt de immuunrespons van MS-patiënten nagebootst. Dit zorgt voor een infiltratie van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen, B-cellen en monocytten in het CZS en de inductie van myeline afbraak. In tegenstelling tot de humane data vonden we in het EAE model een verhoging van ongebonden CML, CEL en MG-H1 in het ruggenmerg, terwijl de eiwitgebonden AGEs onveranderd bleven. Waarom eiwitgebonden MG-H1 verhoogd is in humane MS laesies en vrije AGEs in het ruggenmerg van EAE muizen blijft onbeantwoord. Het is mogelijk dat de afbraak van eiwitgebonden AGEs bijdraagt aan de niveaus van ongebonden AGEs.

Onze resultaten laten zien dat, in zowel humane MS laesies als in het diermodel van MS, AGEs verhoogd zijn. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** onderzocht wat het effect is van het verlagen van AGE niveaus tijdens EAE. Er werden twee interventies uitgevoerd om de AGEs te verlagen. Als eerste interventie hebben we de muizen twee maal daags behandeld met pyridoxamine. Pyridoxamine is een vitamine B6 variant en kan AGEs verlagen door het wegvangen van de precursor MGO. Orale toediening van pyridoxamine tijdens de EAE liet geen effect zien op het ziekteverloop. Daarbij kon pyridoxamine toediening niet zorgen voor een verlaging van de AGE levels in het CZS van de muizen. Als tweede interventie hebben we gebruik gemaakt van de Glo-1 transgene muizen. Deze muizen hebben een overexpressie van het humane enzym glyoxalase 1 (Glo-1). Glo-1 is betrokken bij de afbraak van MGO en kan dus zorgen voor lage AGE levels. Het gebruik van Glo-1 transgene muizen liet geen verschil zien op het ziekteverloop van EAE. Ook met deze interventie konden we de AGE niveaus niet verlagen. Omdat beide benaderingen om AGEs te reduceren geen verlaging van de AGE niveaus in het CZS induceerden, kunnen we geen uitspraak doen over het mogelijk effect van AGE verlaging op het ziekteverloop van EAE.

### **AGEs als een potentiële marker van ziekte progressie**

Om te bepalen of AGEs gebruikt kunnen worden als potentiële biomarker voor de progressie van MS, hebben we in **hoofdstuk 2** onderzocht of er een correlatie aanwezig is tussen  $\alpha$ -dicarbonyl en AGE niveaus in het plasma en hersenvocht (CSF) van MS-patiënten. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van plasma en

CSF monsters van dezelfde patiënten. Correlatie analyses toonden aan dat  $\alpha$ -dicarbonyl en vrije AGE niveaus in het plasma correleren met hun respectievelijke waarden in het CSF. De eiwitgebonden AGEs bleken niet te correleren tussen het plasma en het CSF.

Verder hebben we onderzocht of  $\alpha$ -dicarbonyl en AGE niveaus in het CSF correleren met indicatoren voor MS ziekte progressie zoals de "expanded disability status scale" (EDSS), het aantal "relapses", oftewel aanvallen van het immuun systeem op de myeline in het CZS, en de ziekteduur. Onze resultaten toonden aan dat er geen positieve correlaties waren tussen  $\alpha$ -dicarbonyl en AGE niveaus in het CSF met de drie bovengenoemde indicatoren voor ziekte progressie. Daarbij vonden we ook geen correlatie tussen AGE niveaus en EAE ziektes scores. We kunnen hieruit concluderen dat AGEs niet gebruikt kunnen worden als merker voor ziekte progressie.

### **Inflammatie geïnduceerde AGE vorming**

Het gebrek aan correlatie tussen AGE niveaus en ziekte progressie (zowel in de humane weefsels als in het diermodel) lijkt aan te duiden dat AGE accumulatie een bijeffect is van de inflammatie in het CZS. In het **addendum** van hoofdstuk 3 hebben we onderzocht of demyelinisatie op zichzelf ook kan zorgen voor een verhoging van AGE niveaus in het CZS, zonder perifere inflammatoire reacties. Demyelinisatie wordt geïnduceerd door cuprizone toe te voegen aan het voer van muizen. Dit leidt tot apoptose van oligodendrocyten, waardoor demyelinisatie optreedt. In het cuprizone model werden geen significante verhoogde  $\alpha$ -dicarbonyl en AGE niveaus vast gesteld. Het lijkt er dus op dat demyelinisatie op zichzelf niet kan zorgen voor verhoogde AGE niveaus. Ondanks dat de verhoogde  $\alpha$ -dicarbonyl en AGE niveaus in MS laesies en in het EAE model niet correleren met de ernst van de ziekte, kunnen we concluderen dat de inflammatoire omgeving van het CZS leidt tot productie van  $\alpha$ -dicarbonyls en AGEs.

### **AGEs uit de voeding**

De vorming van AGEs vindt ook plaats tijdens het bereiden van voedsel, een proces dat de Maillard-reactie heet. Deze reactie wordt versneld wanneer er voedsel met hoge hitte wordt bereid. AGEs in de voeding dragen bij aan de smaak en aroma van voedsel en komen veel voor in het Westerse dieet dat grotendeels bestaat uit gefrituurd, gegrild en gebakken voedsel.

In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of AGEs uit de voeding kunnen opstapelen in het CZS van gezonde jonge muizen. Onze data laten zien dat verhoogde inname van MGO en AGEs zorgen voor accumulatie van vrij CEL en MG-H1 in zowel het plasma als het CZS van deze gezonde muizen. Deze resultaten impliceren dat vrije AGEs, opgenomen vanuit de voeding, over de bloed-hersen barrière getransporteerd worden en accumuleren in het CZS. Bovendien is de genexpressie van pro-inflammatoire genen verhoogd in het CZS

van muizen bij een hoge MGO en AGE inname. Het lijkt er daarom op dat AGEs uit de voeding kunnen bijdragen aan de inflammatoire status van het CZS, zelfs in gezonde individuen.

### **Voedings-AGEs als modulator van het EAE model?**

Omdat een hoge inname van MGO en AGEs zorgt voor opstapeling van AGEs in het CZS en kan bijdragen aan verhoogde genexpressie van pro-inflammatoire genen, hebben we de hypothese gesteld dat de toename van AGEs tijdens de EAE zorgt voor een verergering van het ziekteverloop. In **hoofdstuk 5** hebben we het effect van AGEs uit de voeding op het EAE verloop onderzocht. We vonden dat, bovenop de accumulatie van AGEs uitsluitend door EAE, de AGE niveaus nog verder verhoogd waren door een hoog AGE dieet. Desondanks werd er geen effect waargenomen op ziekteverloop en daarbij ook geen verandering in de genexpressie van pro-inflammatoire genen.

### **Glyoxalase-1 in MS en EAE**

Om de vorming van AGEs tegen te gaan, worden  $\alpha$ -dicarbonyls MGO en GO gedetoxificeerd door het glyoxalase systeem. Dit systeem bestaat uit twee enzymen: glyoxalase-1 (Glo-1) en glyoxalase-2 (Glo-2), die samen met gereduceerd glutathion (GSH) zorgen voor een detoxificatie tot D-lactaat. Hierbij is Glo-1 het belangrijkste enzym aangezien de omzetting van MGO door Glo-1 de snelheidsbeperkende stap is.

In **hoofdstuk 2** hebben we laten zien dat de Glo-1 activiteit niet veranderd is tussen MS laesies en de witte stof van NDCs. In het EAE model is de Glo-1 activiteit verlaagd in het ruggenmerg (**hoofdstuk 3**). Daarbij hebben we laten zien dat de inflammatoire activatie van primaire humane astrocyten zorgt voor een verlaging van Glo-1 activiteit (**hoofdstuk 2**). Deze resultaten impliceren dat tijdens inflammatie de activiteit van Glo-1 afneemt. Als gevolg hiervan kan een inflammatoire omgeving de detoxificatie van MGO verminderen, waardoor de vorming van AGEs wordt geïnduceerd. Inname van MGO uit de voeding zorgt mogelijk voor een verhoging van de Glo-1 activiteit in het CZS als beschermingsmechanisme om de vorming van AGEs te onderdrukken.

## **Conclusie**

Samenvattend leidt de inductie van EAE tot de vorming van  $\alpha$ -dicarbonyls en AGEs in het CZS. We vonden verhoogde eiwit-gebonden MG-H1-niveaus in post-mortem-materialen van MS-laesies. We vonden echter geen positieve correlaties tussen AGE niveaus in het CSF en de ernst van MS. Deze resultaten tonen aan dat AGEs waarschijnlijk geen significant bijdragen hebben aan de progressie van de ziekte. Dit beperkt de therapeutische toepassing voor MS-patiënten. Experimentele diermodellen zijn echter niet in staat om alle aspecten van MS na te bootsen en daarom zal verder onderzoek uitgevoerd moeten worden op MS-patiënten. Deze patiënten hebben mogelijk een langdurige AGE-accumulatie in

het CZS, zowel als gevolg van de ziekte, maar ook als gevolg van een inname via de voeding die de ziekteprogressie anders zou kunnen beïnvloeden. Klinische studies die de voedingsinname van MS-patiënten onderzoeken aan de hand van voedselfrequentievragenlijsten, het volgen van de plasma  $\alpha$ -dicarbonyl- en AGE-niveaus en de ziekteprogressie (bijvoorbeeld EDSS en het aantal recidieven) kunnen bijdragen aan een beter inzicht in de rol van AGEs bij MS-progressie. We hebben bevestigd dat er bij MS-patiënten onder inflammatoire condities AGEs worden geproduceerd, echter zal verder onderzocht moeten worden wat de exacte rol hiervan is bij MS-patiënten.