

# Immune regulation by mimethyl fumarate (DMF) in relapsing-remitting multiple sclerosis patients

Citation for published version (APA):

Montes Diaz, G. (2020). *Immune regulation by mimethyl fumarate (DMF) in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. [Doctoral Thesis, Maastricht University, tUL-Universiteit Hasselt (UHasselt)]. UHasselt / Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20201015gmd>

## Document status and date:

Published: 01/01/2020

## DOI:

[10.26481/dis.20201015gmd](https://doi.org/10.26481/dis.20201015gmd)

## 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.

Download date: 12 Sep. 2024

# 6

---

Nederlandse samenvatting

---

## **6 Nederlandse samenvatting**

### **6.1 Wat is multiple sclerose?**

Multiple sclerose (MS) is een chronische auto-immuunziekte, waarbij de eigen immuuncellen het centraal zenuwstelsel beschadigen door myeline af te breken in een proces dat demyelinisatie genoemd wordt. Het myeline beschermt de neuronen en ondersteunt een versnelde impulsgeleiding als isolerende laag rond de axonen. Wanneer myeline wordt afgebroken ten gevolge van MS wordt de signaalgeleiding tussen neuronen verstoord en treden symptomen op zoals vermoeidheid, gevoelloosheid in de ledematen, oogzenuw ontsteking, verminderde coördinatie en cognitieve stoornissen, maar ook verlamningsverschijnselen.

Het klinisch ziektebeeld van MS kan gecategoriseerd worden als ofwel primair progressieve MS (PPMS), relapsing-remitting MS (RRMS), en secundair progressieve MS (SPMS). Patiënten met PPMS hebben een ziekteverloop dat vanaf de start van de ziekte progressief verergert zonder periodes van herstel, met onherstelbare schade tot gevolg. Het overgrote deel van de MS patiëntenpopulatie (85-90%) wordt gediagnosticeerd met RRMS, waarbij periodes van opstoten (relapses) worden afgewisseld met periodes van gedeeltelijk herstel (remissie). Het ziekteverloop van patiënten met RRMS kan na verloop van tijd overgaan naar de SPMS vorm, waarbij de ziekte progressief verergert zonder periodes van herstel.

De diagnose van MS wordt gebaseerd op klinische vervolg, het voorkomen van een tweede opstoot en een neurologisch onderzoek, waarbij laesies (plaques) in de hersenen gevisualiseerd worden door medische beeldvorming (magnetic resonance imaging, MRI). MS wordt in het algemeen gediagnosticeerd bij jonge mensen met een leeftijd van 20 tot 40 jaar, en dit driemaal vaker bij vrouwen dan bij mannen.

De oorzaak van MS is niet geheel gekend, maar lijkt vrij complex omdat meerdere factoren kunnen een rol spelen bij de ontwikkeling van de ziekte, zoals genetica en omgevingsfactoren. Het immuunsysteem beschikt over mechanismen die ervoor zorgen dat lichaamseigen componenten niet worden aangevallen. Dit wordt tolerantie genoemd. In MS werken deze mechanismen niet meer zo efficiënt,

waardoor er een auto-immuun respons ontstaat waarbij auto-reactieve immuuncellen zoals T- en B-cellen geactiveerd geraken en het myeline aanvallen.

## **6.2 Welke immuuncellen spelen een rol bij MS?**

De pathogenese van MS wordt gekarakteriseerd door een verstoorde balans in het immuunsysteem, waarbij er meer pro-inflammatoire immuuncellen aanwezig zijn dan anti-inflammatoire immuuncellen. Het menselijke immuunsysteem bestaat uit een zogenaamde aangeboren en een verworven component. Het aangeboren immuunsysteem bestaan uit cellen (zoals bijvoorbeeld monocyten, granulocyten, natural killer cellen) die instaan voor de snelle en aspecifieke respons tegen lichaamsvreemde cellen in het lichaam. Daarentegen bestaat het verworven immuunsysteem uit lymfocyten (T- en B-cellen), die een vertraagde immuunrespons uitvoeren die meer specifiek is tegen lichaamsvreemde cellen. Historisch gezien werden T-cellen beschouwd als de belangrijkste immuuncellen in het ziekteproces van MS. De laatste jaren werd echter duidelijk dat zowel T- als B-cellen hierin een centrale rol spelen.

De B-cel en T-cel populatie bestaat uit verschillende subtypes van cellen, die niet allemaal betrokken zijn bij de pathogenese van MS. Naïeve B- en T-cellen zijn lymfocyten die circuleren door het lichaam, maar eerder nog niet geactiveerd werden. Eens geactiveerd, zullen deze cellen vermeerderen in aantal en krijgen ze meer specifieke functies, waardoor geheugen cellen en effector cellen gevormd worden. Het zijn deze geheugen en effector cellen die van belang zijn in de ziekteprocessen van MS. De T-cel populatie kan onderverdeeld worden in CD4<sup>+</sup> helper T-cellen (Th cellen) en CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-cellen. Subtypes van de Th cellen, zoals Th1 en Th17 cellen, verergeren het ziektebeeld van MS door de productie van interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en interleukine 17 (IL-17), die beide moleculen zijn die zorgen voor ontstekingsreacties. Cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-cellen verergeren ook het ziektebeeld van MS door de productie van moleculen zoals granzyme B en perforine, die zorgen voor ontstekingsreacties en cytotoxiciteit (doden van cellen). Geheugen B-cellen (CD27<sup>+</sup>) worden beschouwd als het belangrijkste B-cel subtype in het ziektebeeld van MS omdat ze pro-inflammatoire cytokines en antilichamen produceren, en omdat ze T-cellen activeren via co-stimulatie en antigeen presentatie. Naast geheugen B-cellen worden dubbel negatieve B-cellen (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>; DN B-cellen) meer recentelijk eveneens aangeduid als mogelijke

belangrijke speler in het ziekteverloop van MS. In het gezonde lichaam wordt een pro-inflammatoire respons steeds beperkt gehouden door een anti-inflammatoire respons die de ontsteking kan verminderen en kan doen stoppen. Deze anti-inflammatoire respons is eveneens belangrijk voor het voorkomen van auto-immuunziekten. Anti-inflammatoire immuuncellen zoals regulatoire T- (Treg) en B-cellen en regulatoire NK-cellen produceren minder anti-inflammatoire cytokines en kunnen auto-reactieve T- en B-cellen minder efficiënt onderdrukken in MS. Dit versterkt de verstoorde balans nog verder.

Naast het verworven immuunsysteem kan ook het aangeboren immuunsysteem, bestaande uit natural killer (NK) cellen en monocyten, een rol spelen in het ziektebeeld van MS.

### **6.3 Welke behandelingen zijn er voor MS?**

De eerste therapie voor MS, namelijk interferon- $\beta$ , werd ontwikkeld in 1993. Dit was voor lange tijd de enige behandeling beschikbaar voor MS-patiënten. Momenteel zijn er twaalf behandelingen voor handen die goedgekeurd zijn door de *European Medicines Agency* voor de behandeling van MS. De huidige therapieën zijn ofwel immunomodulerend ofwel immunosuppressief. Eerstelijnsbehandelingen bestaan uit interferon- $\beta$ , glatirameer acetaat, teriflunomide en dimethyl fumarate (DMF). Hiervan zijn de laatste twee de eerste orale eerstelijns therapieën die ontwikkeld werden voor de behandeling van MS. Wanneer de eerstelijns therapieën onvoldoende effectief zijn, of in geval van agressief beginnend MS wordt overgegaan naar tweede- of derdelijnsbehandelingen, zoals alemtuzumab, natalizumab, fingolimod, ocrelizumab en cladribine. In het algemeen zijn deze tweede- en derdelijnsbehandelingen meer effectief, maar gaan deze gepaard met een complexer risico op bijwerkingen en vergen deze behandelingen intensievere monitoring.

### **6.4 Wat is het doel van de studie?**

De laatste jaren zijn een aantal nieuwe immunomodulerende therapieën voor de behandeling van MS op de markt gekomen, zonder dat het werkingsmechanisme volledig duidelijk was. Aangezien patiënten en hun dokters tussen verschillende behandelingsopties kunnen en moeten kiezen, is het belangrijk om te weten hoe

deze therapieën precies werken. Op deze manier kunnen voorspellingen gedaan worden over de effectiviteit en veiligheid van een therapie voor een specifieke patiënt en kan eveneens extra aandacht worden besteed aan typische (bij)werkingen van de therapie die verwacht kunnen worden als gevolg van het mechanisme. In 2013 kwam DMF op de markt als eerstelijns therapie. DMF werd initieel gebruikt voor de behandeling van psoriasis, maar werd eveneens veilig en efficiënt bevonden voor de behandeling van MS. Desondanks was het werkingsmechanisme van DMF op dat moment grotendeels onbekend. Het doel van deze studie is om te achterhalen op welke manier DMF kan bijdragen tot het herstellen van de verstoorde immuun balans.

Verder is er in deze studie opgemerkt dat een specifiek subtype van B-cellen, namelijk de DN B-cellen, door DMF wordt gereduceerd. Voorgaand onderzoek van onze onderzoeksgroep had aangetoond dat er een toename is van dit B-cel subtype in het bloed van MS-patiënten en dat deze cellen mogelijk een pathogene rol hebben in MS aangezien ze teruggevonden zijn in de cerebrospinale vloeistof van MS-patiënten en een pro-inflammatoir cytokine profiel vertoonden. Daarom was het voor onze onderzoeksgroep belangrijk om te bekijken welk ontwikkelingsfenotype(s) en migratiecapaciteit deze cellen vertonen.

## **6.5 Wat zijn de resultaten van de studie?**

### **Hoe verandert DMF behandeling de immuunbalans van MS-patiënten?**

DMF is een fumarate ester, een kleine molecuule met immunomodulerende, anti-inflammatoire en anti-oxidatieve eigenschappen. In MS-patiënten was reeds geweten dat DMF effectief en veilig is. Echter was het effect van DMF op het aangeboren en verworven immuunsysteem van MS-patiënten nog niet bestudeerd. DMF wordt in de darm grotendeels omgezet in monomethyl fumarate (MMF), hetgeen (mede-)verantwoordelijk is voor de verschillende werkingsmechanismen van DMF.

In **Hoofdstuk 2** werden de longitudinale effecten van DMF behandeling bestudeerd in een follow-up studie met 21 RRMS-patiënten. Hier werd eerst gekeken naar klinische parameters zoals medische beeldvorming, ziektescore (*expanded disability status score*, EDSS), motor en cognitieve functies en vermoeidheid. DMF werd in onze studie goed getolereerd; slechts 2 MS-patiënten

hebben de studie verlaten wegens langdurige bijwerkingen zoals gastro-intestinale symptomen en opvliegers (flushing). We zagen een verbetering in cognitieve functie, terwijl motorische functies en de vermoeidheid van de patiënten stabiel bleven gedurende de behandelingsperiode. Daarnaast waren van 18 MS-patiënten MRI beelden beschikbaar. Hierbij werd aangetoond dat 4/18 MS-patiënten een reductie vertoonden in het volume van de laesies of een algemene verbetering ten opzichte van MRI beelden genomen voor de DMF-behandeling. De overige 14 MS-patiënten vertoonden een stabiel ziektebeeld zonder nieuwe of vergrote laesies.

Vervolgens werd het totale aantal van immuuncel subtypes bepaalde in het perifere bloed vóór en op verschillende tijdstippen na behandeling met DMF. Hierbij werd aangetoond dat vooral de cellen van het verworven immuunsysteem afnamen na 12 maanden behandeling. Het totaal aantal pro-inflammatoire immuuncel subtypes, zoals geheugen CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen, geheugen B-cellen en DN B-cellen, was verlaagd na 12 maanden behandeling. Naïeve CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen, naïeve en transitionele B-cellen, die allen niet betrokken zijn bij de pathologie van MS, bleven onveranderd na 12 maanden behandeling. Ook het totaal aantal monocyt en neutrofielen, bleef stabiel na 12 maanden behandeling. Zelfs na twaalf maanden bleef dit effect voortduren. Verder werd een vermindering waargenomen in het totale aantal pro-inflammatoire NK cellen, terwijl het aantal regulatoire NK-cellen constant bleef.

Ook de relatieve frequenties van de immuuncel subtypes werden gemeten in het perifere bloed om op deze manier de relatieve samenstelling van het overblijvende lymfocyt repertoire na DMF behandeling te evalueren. Na behandeling met DMF waren de frequenties van verschillende subtypes van geheugen CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen verlaagd. De frequenties van naïeve CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen waren dan weer verhoogd in MS-patiënten behandeld met DMF. DMF behandeling vertoonde vergelijkbare effecten op B-cellen, met een vermindering van de frequenties van geheugen B-cellen en DN B-cellen en een verhoging van naïeve en transitionele B-cellen in behandelde MS-patiënten. Dit leidde tot de conclusie dat de depletie van geheugen T- en B-cellen één van de werkingsmechanismen is van DMF behandeling in MS. Op deze manier heeft DMF de mogelijkheid om de verstoorde

balans van het immuunsysteem te herstellen tot een minder pro-inflammatoir profiel.

*Ex vivo* stimulatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen van MS-patiënten behandeld met DMF resulteerde in een verlaagde frequentie van pro-inflammatoire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, en IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cellen. De frequentie van IL-4<sup>+</sup> en IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cellen bleef constant. Deze resultaten suggereerden dat DMF behandeling de inflammatoire Th1 en Th17 respons veranderde naar een meer neutrale immunrespons in MS-patiënten.

Als conclusie bleek dat DMF vooral de pro-inflammatoire immuuncellen deed afnemen waardoor de verstoorde balans in het immuunsysteem hersteld werd.

### **Worden B-cellen direct beïnvloed door DMF behandeling?**

We onderzochten het effect van DMF behandeling op verschillende B-cel functies. In **Hoofdstuk 2** toonden we aan dat DMF behandeling het totale aantal B-cellen vermindert en dat het de verdeling van verschillende B-cel subtypes verandert, met onder andere een vermindering van de frequentie aan geheugen B-cel subtypes. In **Hoofdstuk 3** werd DMF *in vitro* toegevoegd aan B-cellen van gezonde controles of onbehandelde MS-patiënten waarna het effect hiervan op verschillende B-cel functies werd bepaald. Zo werd gekeken naar productie van cytokines en expressie van markers voor overleving, antigeen presentatie en costimulatie.

Vanwege het verminderde totale aantal B-cellen in DMF behandelde MS-patiënten, onderzochten we eerst of DMF apoptose van B-cellen induceert. *In vitro* behandeling met DMF, maar niet met MMF, induceerde apoptose bij geactiveerde B-cellen van gezonde controles en MS-patiënten. Deze apoptose nam toe met een steeds hogere concentratie van DMF, met een sterker effect op B-cellen van MS-patiënten.

B-cellen zijn onder andere betrokken bij de pathologie van MS door de stimulatie van pro-inflammatoire T-cel responsen. Het zijn efficiënte antigeen presenterende cellen die ook costimulatoire moleculen tot expressie brengen voor T-cel activatie. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**, was de expressie van moleculen betrokken bij deze processen op B-cellen verlaagd na *in vitro* behandeling met DMF.



In de follow-up studie, beschreven in **Hoofdstuk 2** was de frequentie van transitionele B-cellen in het perifere bloed van MS-patiënten verhoogd na behandeling met DMF. Van transitionele B-cellen is geweten dat ze kunnen differentiëren naar regulatoire B-cellen (Breg), die kunnen zorgen voor een onderdrukking van de immuunrespons. In **Hoofdstuk 3** werd aangetoond dat directe behandeling van B-cellen met DMF resulteert in een trend tot een verhoogde Breg frequentie. Bovendien was de frequentie van pro-inflammatoire tumor necrose factor- $\alpha$ <sup>+</sup> B-cellen verlaagd na behandeling met MMF. Deze data dragen bij tot de door DMF geïnduceerde shift in immuunbalans naar een anti-inflammatoir profiel.

### **Zijn DN B-cellen belangrijk voor de pathogenese van MS?**

In **Hoofdstuk 2** werd een verlaagd percentage geheugen en DN B-cellen aangetoond in het perifere bloed van MS-patiënten behandeld met DMF. DN B-cellen zijn geassocieerd met immuunveroudering. In de geriatrische populatie is er aangetoond dat DN B-cellen in aantal vermeerderd zijn door een proces dat inflamm-aging genoemd wordt, hetgeen duidt op frequente ontstekingsreacties als gevolg van ouderdom. Op dit moment is nog niet veel geweten over DN B-cellen, en zeker niet over hun (mogelijke) rol in MS. Onze onderzoeksgroep heeft eerder al aangetoond dat er een verhoogde frequentie is van DN B-cellen in het bloed van jonge MS-patiënten. Deze DN B-cellen werden ook teruggevonden in de cerebrospinale vloeistof van MS-patiënten en vertoonden een pro-inflammatoir cytokine profiel. DN B-cellen spelen dus mogelijk een rol in de pathologie van MS. In **Hoofdstuk 4** werd bestudeerd in welke ontwikkelingsfase de DN B-cellen zich bevonden. Verder werd hun capaciteit tot migratie naar inflammatoir weefsel onderzocht.

DN B-cellen vertoonden een expressie profiel van ontwikkelingsmarkers dat sterk gelijkend was op dat van geheugen B-cellen. Bovendien waren de meerderheid van de DN B-cellen mature cellen en brachten ze immunoglobuline (Ig)G of IgA tot expressie. Deze Igs zijn betrokken bij de secundaire immuunrespons, wat opnieuw wijst op een geheugen fenotype. Er werden echter ook verschillen waargenomen tussen de DN en geheugen B-cellen. Zo was de frequentie van geactiveerde CD95<sup>+</sup> cellen en IgA<sup>+</sup> cellen lager bij de DN B-cellen. Over het algemeen kan besloten worden dat de DN B-cellen zich in een ontwikkelingsfase

bevinden tussen de naïeve en geheugen B-cellen in. Verder werden geen verschillen gevonden in de onderzochte markers bij DN B-cellen van gezonde controles en MS-patiënten, wat erop wijst dat DN B-cellen zich in dezelfde ontwikkelingsfase bevinden bij beide groepen.

Verder hebben we onderzocht of CD21<sup>low</sup> B-cellen (een ander B-cel subtype gerelateerd aan veroudering) en DN B-cellen van MS patiënten T-bet tot expressie brengen. T-bet is een transcriptiefactor die reeds beschreven werd in immuunverouderde B-cellen in muizen met systemische lupus erythematosus. Daar werd bovendien aangetoond dat de T-bet<sup>+</sup> B-cellen verantwoordelijk zijn voor de productie van auto-antilichamen. Bij MS-patiënten waren ongeveer 23% van de DN B-cellen positief voor T-bet, in vergelijking met ongeveer 70% van de CD21<sup>low</sup> B-cellen (**Hoofdstuk 4**). Dit leert ons dat CD21<sup>low</sup> B-cellen waarschijnlijk het humane equivalent zijn van de T-bet<sup>+</sup> B-cellen die beschreven werden in muizen. Voorts suggereren deze resultaten dat er verschillende subtypes bestaan in de DN B-cel populatie die elk een andere functie kunnen uitoefenen in de pathologie van MS.

Om de verhoogde frequentie van DN B-cellen in de cerebrospinale vloeistof van MS-patiënten verder te verklaren, werd de migratie capaciteit (fenotype en functie) en expressie van adhesiemoleculen op DN B-cellen onderzocht in **Hoofdstuk 4**. De gemeten pro-inflammatoire chemokine receptoren en adhesiemoleculen kwamen tot expressie op de DN B-cellen. Verder werd aangetoond dat DN B-cellen van MS-patiënten de capaciteit hebben om te migreren naar de pro-inflammatoire chemokines CXCL13 en CXCL10 met een efficiëntie die vergelijkbaar was met die van geheugen B-cellen. Ons onderzoek bewees dus dat DN B-cellen in staat zijn om te migreren naar pro-inflammatoire chemokines die aanwezig zijn in het centrale zenuwstelsel. Een volgende stap zou zijn om de aanwezigheid van DN B-cellen aan te tonen in hersenlaesies van MS-patiënten.

Verder hebben we in **Hoofdstuk 4** het proliferatie en activatie potentieel van DN B-cellen onderzocht. Na *in vitro* stimulatie vertoonden de DN B-cellen van gezonde controles de sterkste proliferatie en hoogste expressie van activatie markers (CD80 en CD25) in vergelijking met naïeve en geheugen B-cellen. Echter, door het lage aantal geïncludeerde gezonde controles was dit resultaat niet significant.

Deze resultaten spreken een vroegere theorie tegen dat DN B-cellen functioneel uitgeput zouden zijn. Om de rol van de DN B-cellen in de pathologie van MS verder te onderzoeken, zou een volgende stap zijn om te bekijken of MS-patiënten met een toename in de DN B-cellen ook een ernstiger klinisch verloop van de ziekte hebben.

## **6.6 Wat is de conclusie van de studies?**

De resultaten die in dit doctoraat behaald werden, bewijzen dat het werkingsmechanisme van DMF bij MS-patiënten multifactorieel is. In het algemeen oefent DMF een immuunmodulerend effect uit en verschuift het de verstoorde immuunbalans van MS-patiënten weg van een pro-inflammatoir profiel. Verder reduceert DMF selectief CD8<sup>+</sup> T-cellen en inflammatoire geheugen subtypes van T- en B-cellen in MS-patiënten. DMF induceert apoptose van B-cellen en reduceert de expressie van markers voor overleving, antigeen presentatie en costimulatie op B-cellen. Bijgevolg kan DMF behandeling de auto-immunreacties in de pathogenese van MS verminderen door het aantal en de functie van pro-inflammatoire immuuncellen te verminderen via moleculaire mechanismen.

DMF behandeling vermindert de frequentie van DN B-cellen in het perifere bloed van MS-patiënten. Deze immuunverouderde DN B-cellen zijn mature cellen die een geheugen fenotype hebben maar toch in een vroegere ontwikkelingsfase lijken te zitten ten opzichte van de geheugen B-cellen. Verschillende subtypes van DN B-cellen zullen mogelijk verschillende functies uitvoeren. Er moet nog bepaald worden welk subtype of welke subtypes betrokken zijn in de pathologie van MS.

Verder kunnen DN B-cellen na *in vitro* stimulatie prolifereren en geactiveerd worden. Ook hebben ze een hoge capaciteit om te migreren naar pro-inflammatoire chemokines die betrokken zijn bij B-cel migratie naar het centrale zenuwstelsel van MS-patiënten. Al deze bevindingen samen wijzen naar de betrokkenheid van DN B-cellen in de pathogenese van MS. Verder onderzoek is nodig om de onderliggende moleculaire mechanismen van de verhoogde DN B-cel frequenties bij MS te identificeren. Bovendien moeten de verschillende functies van DN B-cellen in de pathologie van MS verder onderzocht worden.