

University of Groningen

Inflammation and remodelling in experimental models of COPD - Mechanisms and therapeutic perspectives

Pera, Tonio

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:

2011

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

Citation for published version (APA):

Pera, T. (2011). *Inflammation and remodelling in experimental models of COPD - Mechanisms and therapeutic perspectives*. s.n.

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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Nederlandse samenvatting

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), voornamelijk veroorzaakt door roken, wordt gekenmerkt door een progressieve afname van de longfunctie. Ontsteking in de long leidt tot de ontwikkeling van structurele afwijkingen, zoals emfyseem en luchtwegremodelling, die bijdragen aan de luchtwegobstructie en longfunctieafname bij deze ziekte. Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was het ontrafelen van nieuwe potentiële mechanismen voor de pathofysiologie van COPD.

Effecten van sigarettenrookextract en lipopolysaccharide op luchtweg- gladde spiercellen

Verschillende studies hebben aangetoond dat toename van de luchtweg-gladde spier massa bij kan dragen aan luchtwegremodelling in COPD. Groeifactoren en extracellulaire matrix eiwitten induceren proliferatie van luchtweg-gladde spiercellen waardoor deze een proliferatief, hypocontractiel fenotype kunnen aannemen, dat mogelijk betrokken is bij de verdikking van de spierlaag. De exacte mechanismen die een rol spelen bij de toename van luchtweg-gladde spiermassa in COPD zijn niet volledig bekend, maar ontsteking van de luchtwegen speelt hierbij vermoedelijk een belangrijke rol.

Enkele studies hebben aangetoond dat ook het blootstellen van luchtwegen aan sigarettenrook remodelling van de luchtwegwand kan induceren, onafhankelijk van de effecten van inflammatoire celinfiltratie. Sigarettenrook-blootstelling van tracheale preparaten van ratten resulteerde in verhoogde expressie van profibrotische groeifactoren in de luchtwegwand. Daarnaast resulteerde sigarettenrook-blootstelling van muizen in verhoogde expressie van procollageen, connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor- β (TGF- β) en platelet-derived growth factor (PDGF) in de luchtwegwand, nog voordat de infiltratie van ontstekingscellen was opgetreden. Deze studies tonen aan dat blootstelling aan CS remodelling kan induceren door een direct effect op de luchtwegwand, zonder een associatie met ontsteking.

De studies beschreven in **Hoofdstuk 2** ondersteunen deze stelling en geven aan dat sigarettenrookextract en lipopolysaccharide (LPS) een sterke en concentratie-afhankelijke toename van celproliferatie van de runder tracheale gladde spiercellen induceren. Voor sigarettenrookextract, is korte pulsatiele stimulatie van de cellen noodzakelijk om celproliferatie te induceren, aangezien langdurige blootstelling aan deze stimulus celdood induceert. Bovendien werd aangetoond dat, net als voor PDGF, sigarettenrookextract-en LPS-geïnduceerde proliferatie

van runder tracheale gladde spiercellen gemedieerd wordt door activatie van ERK 1/2 en p38 MAP kinase. Ook ging de celproliferatie gepaard met een verhoogde expressie van cycline D1 en resulteerde langdurige behandeling van runder tracheale gladde spierpreparaten met sigarettenrookextract of LPS in een verlaagde contractiliteit van het weefsel, wat consistent is met de inductie van een proliferatief fenotype. Samengevat tonen onze bevindingen aan dat sigarettenrookextract en LPS rechtsreeks een proliferatief, hypocontractiel fenotype van luchtweg-gladde spier kunnen induceren, wat niet afhankelijk is van effecten op andere structurele of ontstekingscellen in de luchtwegen. LPS was nauwelijks detecteerbaar in het sigarettenrookextract, en in veel lagere concentraties dan nodig om proliferatie van luchtweg-gladde spiercellen te induceren. Toch werd geen extra effect van de combinatie van sigarettenrookextract en LPS op de celproliferatie waargenomen. Dit suggereert dat LPS niet bijdraagt aan de sigarettenrookextract-geïnduceerde celproliferatie, terwijl overeenkomstig eerdere waarnemingen sigarettenrookextract en LPS mogelijk wel een gemeenschappelijke signaaltransductieroute activeren.

De rol van TAK1 in de regulatie van fenotype en synthetische functie van de luchtweg-gladde spier

De studies beschreven in **Hoofdstuk 3 en 4** zijn de eerste die een functionele rol voor TGF- β -geactiveerd kinase 1 (TAK1) in luchtweg-gladde spier aantonen. TAK1 werd eerder geïdentificeerd als een belangrijke component van Toll-like receptor, IL-1 receptor en TNF- α receptor signaaltransductieroutes. Ook speelt TAK1 een belangrijke rol in de embryonale ontwikkeling, door de betrokkenheid van dit kinase bij de TGF- β /BMP signaaltransductie. In verschillende celtypes is aangetoond dat TAK1 proliferatie reguleert. Bovendien werd aangetoond dat TAK1 betrokken is bij cardiale remodelling en de ontwikkeling van de vasculaire gladde spier.

Uit de studies in **Hoofdstuk 3** blijkt dat zowel in BTSM cellen als in humane tracheale gladde spiercellen, TAK1 de groeifactor-geïnduceerde proliferatie reguleert. De PDGF- of serum-geïnduceerde DNA-synthese en toename in celproliferatie werden sterk geremd door de specifieke TAK1 remmer, LL-Z-1640-2. Ook werd de PDGF-geïnduceerde ERK 1/2 fosforylatie sterk verlaagd door LL-Z-1640-2 of door de expressie van een dominant-negatieve TAK1 mutant (TAK1 DN). Daarnaast werd ook de PDGF-geïnduceerde hypocontractiliteit en afname van contractiele eiwitexpressie geremd door LL-Z-1640-2. Deze bevindingen identificeren een nieuwe regulerende rol voor TAK1 bij PDGF-geïnduceerde ERK 1/2-activatie en geven aan dat TAK1 hiermee een belangrijke

rol speelt in de groeifactor-geïnduceerde fenotypische modulatie van de luchtweg-gladde spier.

Naast hun rol in de regulatie van de luchtwegdiameter, hebben luchtweg-gladde spiercellen ook een synthetische functie. Zij zijn een bron van pro-inflammatoire cytokines, pro-fibrotische groeifactoren en extracellulaire matrix eiwitten, en kunnen daardoor bijdragen aan luchtwegontsteking en remodelling bij COPD. Eerder werd al aangetoond dat sigarettenrookextract de productie van het chemokine IL-8 door humane luchtweg-gladde spiercellen induceert. Hoewel de moleculaire mechanismen die hieraan ten grondslag liggen nog niet volledig opgehelderd zijn, suggereert recent onderzoek dat activatie van NF- κ B en ERK 1/2 hierbij een rol speelt. Aangezien TAK1 NF- κ B en ERK 1/2 kan activeren, zou het betrokken kunnen zijn bij de sigarettenrookextract-geïnduceerde IL-8 productie.

De studies beschreven in **Hoofdstuk 4** bevestigen dat sigarettenrookextract IL-8-productie door humane luchtweg-gladde spiercellen induceert. De bijdrage van NF- κ B en ERK 1/2 aan dit proces wordt ondersteund door de sterke remming van de sigarettenrookextract-geïnduceerde IL-8-productie door farmacologische remmers van NF- κ B- en ERK 1/2-activatie. Door expressie van de TAK1 DN mutant of door voorbehandeling met LL-Z-1640-2 kon zowel de I κ B α afbraak als de ERK 1/2 fosforylering door sigarettenrookextract- worden geremd. LL-Z-1640-2 remde tevens de sigarettenrookextract-geïnduceerde IL-8-productie. Deze resultaten tonen aan dat TAK1 een belangrijke rol speelt bij de sigarettenrookextract-geïnduceerde NF- κ B- en ERK 1/2 activatie in humane luchtweg-gladde spier cellen, hetgeen tot een verhoogde IL-8-productie door deze cellen leidt.

Samengevat duiden de bevindingen uit **Hoofdstuk 3 en 4** op een belangrijke rol voor TAK1 bij de proliferatieve en ontstekingsbevorderende signaaltransductie in luchtweg-gladde spiercellen en geven daarmee aan dat TAK1 een potentieel nieuw doelwit is voor de behandeling van ontsteking en luchtwegremodelling bij obstructieve longziekten, zoals COPD.

Caviamodel voor LPS-geïnduceerde COPD

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, kan de ontwikkeling van een diermodel voor COPD op verschillende manieren worden benaderd. Voor ons onderzoek naar de pathofysiologische mechanismen en farmacologische behandeling van COPD, hebben wij een caviamodel voor COPD ontwikkeld, waarbij gebruik is gemaakt van LPS als ziekte-inducerende stimulus. LPS is een relevante stimulus voor

zowel de ontwikkeling als de exacerbaties van COPD. Chronische toediening van LPS in de luchtwegen induceert een breed scala aan ontstekingsreacties en structurele veranderingen in de long die kenmerkend zijn voor COPD. Bovendien houden, net als bij COPD, de LPS-geïnduceerde ontsteking en remodelling langdurig aan, ook wanneer de longen niet meer aan LPS worden blootgesteld. De studies beschreven in **Hoofdstuk 5 en 7** tonen aan dat herhaalde intranasale instillatie van LPS (1 mg / 200 µl; tweemaal per week gedurende 12 weken) in de cavia resulteert in neutrofiële ontsteking van de longen, verhoogde IL-8-expressie in het longweefsel, verhoogde MUC5A/C-expressie door het luchtwegepitheel, luchtwegfibrose, longemfyseem en rechterventrikel hypertrofie. Dit zijn karakteristieke kenmerken van COPD.

Verhoogde cholinerge tonus is de primaire reversibele component van luchtwegobstructie bij COPD, zoals blijkt uit de effectiviteit van anticholinergica als bronchusverwijders bij deze ziekte. Recente bevindingen, onder andere uit de UPLIFT studie, geven echter aan dat het langwerkende anticholinergicum tiotropium ook gunstige effecten bij COPD-patiënten kan hebben die niet berusten op bronchusverwijding. Zo werd aangetoond dat tiotropium het aantal exacerbaties en de sterfte onder COPD-patiënten vermindert. Hoewel er op de longfunctie-afname in de gehele studiepopulatie geen significant effect werd waargenomen, werd deze afname wel vertraagd door tiotropium bij patiënten die geen andere medicatie gebruikten, bij patiënten met matig (stadium II) COPD en bij jonge patiënten met versneld longfunctieverlies. De onderliggende mechanismen van deze effecten van tiotropium zijn nog maar ten dele bekend.

Verschillende studies hebben aangetoond dat muscarinereceptorstimulatie de productie van ontstekingsbevorderende chemokines door diverse cellen in de luchtwegen, waaronder epitheel- en luchtweg-gladde spiercellen en macrofagen, bevordert. Bovendien bevordert muscarinereceptorstimulatie de productie van collageen door en de proliferatie van longfibroblasten en potentieert het de groeifactor-geïnduceerde proliferatie van luchtweg-gladde spiercellen. Deze bevindingen suggereren een rol voor acetylcholine bij ontsteking, fibrose en remodelling van de luchtweg-gladde spier. Onlangs is aangetoond dat voorbehandeling met tiotropium de sigarettenrook-geïnduceerde ontstekingsbevorderende cytokine-expressie en infiltratie van ontstekingscellen in de bronchoalveolaire lavagevloeistof (BAL) van muizen remt, hetgeen erop wijst dat endogeen acetylcholine aan de sigarettenrook-geïnduceerde ontsteking bijdraagt. Ook hebben eerdere studies in een diermodel voor chronisch astma een potentiële rol van acetylcholine bij luchtwegontsteking en –remodelling aangetoond. Voorbehandeling met tiotropium remde in dit model de door

allergeen geïnduceerde eosinofiele ontsteking van de luchtwegen, remodelling van de luchtweg-gladde spier en slijmbekercelhyperplasie.

De studies beschreven in **Hoofdstuk 5** tonen aan dat in het caviamodel voor COPD de door LPS geïnduceerde neutrofiële ontsteking in luchtwegen en longparenchym, verhoogde MUC5A/C-expressie in het luchtwegepitheel en luchtwegfibrose geremd worden door tiotropium. Deze bevindingen suggereren dat endogeen acetylcholine een belangrijke rol speelt bij de pulmonale ontsteking en luchtwegremodelling in deze ziekte. Daarnaast werd in dit model remodelling van de luchtwegmicrovasculatuur aangetoond. Het aantal gemusculariseerde microvaten in de adventitia van de kraakbeenhoudende grote luchtwegen nam als gevolg van de LPS-blootstelling toe. Zowel de mechanismen als het gevolg van dit type remodelling zijn nog onduidelijk, maar de bevinding dat tiotropium de muscularisatie van de microvaten remt is een eerste aanwijzing dat acetylcholine ook aan vasculaire remodelling bij kan dragen. In dit model werden geen veranderingen van de dimensies van de pulmonale bloedvaten waargenomen. Herhaalde blootstelling aan LPS resulteerde eveneens in de ontwikkeling van emfyseem, waarop tiotropium geen effect bleek te hebben. Dit suggereert dat acetylcholine niet bijdraagt aan alveolaire remodelling in dit model.

Samengevat suggereren deze bevindingen dat endogeen acetylcholine, via activatie van muscarinereceptoren, een belangrijke rol speelt bij de pulmonale ontsteking en luchtwegremodelling in COPD. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de gunstige niet-bronchusverwijdende effecten van tiotropium bij deze ziekte.

De rol van arginase bij COPD

Stikstofmonoxide (NO), een molecuul dat sterke bronchusverwijdende en ontstekingsremmende eigenschappen heeft, wordt gesynthetiseerd uit het aminozuur L-arginine door stikstofmonoxide synthase (NOS) iso-enzymen. Onder pathofysiologische condities, zoals bijvoorbeeld bij astma, leidt verhoogde expressie en activiteit van het enzym arginase - dat L-arginine omzet in L-ornithine en ureum - tot een verminderde biologische beschikbaarheid van L-arginine voor NOS. Dit leidt niet alleen tot een verminderde NO-productie, maar ook tot een verhoogde aanmaak van de ontstekings- en contractiebevorderende NO-metabooliet peroxynitriet. In experimentele modellen voor astma werd aangetoond dat zowel de daling van de NO-concentratie als de toename van de peroxynitrietconcentratie bij kunnen dragen aan luchtweghyperreactiviteit en -ontsteking bij astma. Daarnaast werd in een recente studie aangetoond dat verhoogde arginase-activiteit eveneens een belangrijke rol kan spelen bij

luchtwegremodelling in chronisch astma. Hoewel recent een verhoogde arginase-activiteit werd aangetoond in de BAL van COPD-patiënten, is de rol van arginase in de pathofysiologie van deze ziekte nog onbekend.

De studies beschreven in **Hoofdstuk 7** waren toegespitst op het ontrafelen van de rol van arginase bij COPD. In het caviamodel voor COPD werd aangetoond dat chronische blootstelling aan LPS via de luchtwegen leidt tot een toename van de arginase-activiteit in de longen, hetgeen wijst op een verhoogde expressie van het enzym. Dit is in overeenstemming met eerdere studies in muizen, die aantoonde dat een enkele LPS-blootstelling een toename van de arginase-genexpressie induceert in de long. De LPS-geïnduceerde toename van de arginase-activiteit in onze studie resulteerde eveneens in een verhoogde L-ornithine/L-arginine ratio in het longweefsel. De verhoogde arginase-activiteit was eveneens geassocieerd met een verhoogde long IL-8-concentratie, neutrofiële ontsteking, verhoogde MUC5A/C-expressie en luchtwegfibrose.

Voorbehandeling met de arginaseremmer 2(S)-amino-6-boronohexanoic acid (ABH) door middel van inhalatie remde de LPS-geïnduceerde toename van de arginase-activiteit, wat bleek uit een daling van de L-ornithine/L-arginine ratio in het longweefsel. De LPS-geïnduceerde arginase-expressie werd niet beïnvloed door ABH, aangezien de ABH voorbehandeling *in vivo* geen effect had op de LPS-geïnduceerde arginase-activiteit *ex vivo*, gemeten in afwezigheid van de arginaseremmer. Dit is in overeenstemming met resultaten van eerdere studies, waaruit bleek dat LPS een directe stimulus is voor de arginase-expressie.

ABH voorbehandeling remde ook de door LPS geïnduceerde toename van IL-8-concentratie in de long, de neutrofiële ontsteking, de verhoogde MUC5A/C-expressie in het luchtwegepitheel en de luchtwegfibrose, wat wijst op een belangrijke bijdrage van de toegenomen arginase-activiteit aan de luchtwegontsteking en -remodelling. Een potentieel onderliggend mechanisme voor de bijdrage van arginase aan deze processen is verhoogde vorming van peroxynitriet. Dit is het gevolg van ontkoppeling van induceerbaar NO-synthase (iNOS) bij een lage beschikbaarheid aan L-arginine, waarbij gelijktijdig NO en superoxide anionen gesynthetiseerd worden. Eerder is aangetoond dat peroxynitriet IL-8-expressie in verschillende celtypen induceert; hiermee zou het kunnen bijdragen aan de neutrofiële ontsteking. Daarnaast kan peroxynitriet direct MUC5A/C-expressie induceren in luchtwegepitheelcellen. Verhoogde peroxynitrietvorming en verminderde NO-productie werden al eerder in verband gebracht met fibrotische processen. Bovendien kan het door arginase gesynthetiseerde L-ornithine worden omgezet in L-proline, een aminozuur dat

essentieel is voor de synthese van collageen, en daarmee bijdragen aan fibrose. Arginase werd eerder geïdentificeerd als een belangrijke speler bij TGF- β -geïnduceerde collageensynthese in longfibroblasten.

Naast ontsteking en remodelling in de long, werd in **Hoofdstuk 7** ook aangetoond dat LPS rechterventrikel hypertrofie induceert. Dit impliceert dat in dit model sprake is van de ontwikkeling van pulmonale arteriële hypertensie. Pulmonale arteriële hypertensie is aanwezig in een groot aantal COPD-patiënten en wordt geassocieerd met een slechtere ziekteprognose. Chronische ontsteking en hypoxie kunnen tot endotheliale dysfunctie van de pulmonale arteriën leiden, door verminderde endotheliale NOS-expressie en NO-productie alsmede een toegenomen productie van contractiele agonisten, zoals endotheline-1. Bovendien kan vasculaire remodelling, gekenmerkt door intimaprolikeratie en verdikking van de vaatwand, bijdragen aan pulmonale arteriële hypertensie. De stijging van de pulmonale weerstand, als gevolg van verhoogde pulmonale vasculaire druk, resulteert in rechterventrikel hypertrofie. Verhoogde arginase-activiteit is aangetoond in endotheelcellen van patiënten met pulmonale arteriële hypertensie, en wordt geassocieerd met een verminderde biologische beschikbaarheid van L-arginine en een verminderde NO synthese. Orale L-arginine therapie en NO inhalatie leiden tot een daling van de pulmonale arteriële druk bij deze ziekte. Dit wijst erop dat de verstoorde NO-homeostase een belangrijke rol speelt bij pulmonale arteriële hypertensie. De afmetingen van de pulmonale arteriële vaatwand werden niet beïnvloed door de LPS-instillatie in onze studie, hetgeen suggereert dat toegenomen vasoconstrictie ten grondslag ligt aan de rechterventrikel hypertrofie in ons model. Onze bevindingen tonen tevens aan dat ABH voorbehandeling de LPS-geïnduceerde ontwikkeling van rechterventrikel hypertrofie remt, waarmee een belangrijke rol voor verhoogde arginase-activiteit in dit proces wordt gesuggereerd.

Samengevat hebben de studies beschreven in **Hoofdstuk 7** aangetoond dat verhoogde arginase-activiteit bijdraagt aan pulmonale ontsteking, luchtwegremodelling en rechterventrikel hypertrofie in ons caviamodel voor COPD. Dit suggereert dat arginaseremmers therapeutisch potentieel hebben voor de behandeling van deze ziekte.

Conclusies

De belangrijkste conclusies van dit proefschrift zijn:

- Sigarettenrook en LPS leiden tot een proliferatief, hypocontractiel fenotype van de luchtweg-gladde spier. Dit wordt gemedieerd door activering van ERK 1/2 en p38 MAP-kinase, en kan het gevolg zijn van een direct effect van deze stimuli op de gladde spier, zonder betrokkenheid van andere structurele of ontstekingscellen in de luchtweg (**Hoofdstuk 2**).
- Korte, pulsatiele stimulatie van cellen of weefsel met sigarettenrookextract is een geschikte methode voor het *in vitro* modelleren van sigarettenrook-blootstelling *in vivo* (**Hoofdstuk 2**).
- Sigarettenrookextract en LPS hebben een gemeenschappelijke signaaltransductieroute bij de proliferatie van luchtweg-gladde spiercellen, maar het is onwaarschijnlijk dat LPS de sigarettenrookextract-geïnduceerde effecten medieert (**Hoofdstuk 2**).
- TAK1 speelt een belangrijke rol bij de PDGF-geïnduceerde ERK 1/2-activatie in luchtweg-gladde spier en bij de groeifactor-geïnduceerde fenotypische modulatie van luchtweg-gladde spier (**Hoofdstuk 3**).
- TAK1 speelt een belangrijke rol bij de sigarettenrookextract-geïnduceerde NF- κ B- en ERK 1/2-activatie in luchtweg-gladde spiercellen, alsmede in de hiermee geassocieerde IL-8-release door deze cellen (**Hoofdstuk 4**).
- TAK1 is een nieuw doelwit voor de inhibitie van luchtwegontsteking en -remodelling bij obstructieve longziekten, zoals COPD (**Hoofdstuk 3 en 4**).
- Herhaalde LPS-blootstelling in een caviamodel voor COPD resulteert in de ontwikkeling van neutrofiele ontsteking, verhoogde IL-8 productie, emfyseem, verhoogde epitheliale MUC5A/C-expressie en luchtwegfibrose in long, alsmede in rechterventrikel hypertrofie (**Hoofdstuk 5 en 7**). De inductie van deze belangrijke kenmerken van COPD geeft aan dat dit model geschikt is voor het bestuderen van pathofysiologische processen en therapeutische behandeling van deze ziekte.

- Endogeen acetylcholine draagt bij aan neutrofiele ontsteking in de long, verhoogde MUC5A/C-expressie door het luchtwegepitheel, luchtwegfibrose en remodelling van de luchtwegmicrovasculatuur in een diermodel voor COPD (**Hoofdstuk 5**). De potentiële betrokkenheid van acetylcholine bij pulmonale ontsteking en luchtwegremodelling kan ten grondslag liggen aan de niet-luchtwegverwijdende effecten van tiotropium bij COPD-patiënten.
- Verhoogde arginase-activiteit speelt een belangrijke rol bij pulmonale ontsteking, luchtwegremodelling en rechterventrikel hypertrofie in een caviamodel voor COPD. Inhalatietherapie met arginaseremmers is daarom een interessante nieuwe invalshoek voor de behandeling van deze ziekte (**Hoofdstuk 7**).

