

University of Groningen

## The role of accelerated ageing in aberrant lung tissue repair and remodelling in COPD

Woldhuis, Roy

DOI:  
[10.33612/diss.155044507](https://doi.org/10.33612/diss.155044507)

**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:*  
2021

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

*Citation for published version (APA):*  
Woldhuis, R. (2021). *The role of accelerated ageing in aberrant lung tissue repair and remodelling in COPD*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.155044507>

### 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.

# **CHAPTER 9**

**Dutch summary / Nederlandse samenvatting**

De chronische obstructieve longziekte COPD is een progressieve longziekte die vooral wordt veroorzaakt door blootstelling aan schadelijke stoffen, waarvan sigarettenrook de belangrijkste is. De blootstelling hieraan veroorzaakt een ontstekingsreactie in de longen wat uiteindelijk resulteert in longweefsel schade en vernauwing van de luchtwegen door verdikking van de luchtwegwand. In de luchtwegen zorgt dit ervoor dat de instroom van lucht wordt beperkt en dat slijm overmatig wordt aangemaakt, wat chronische bronchitis wordt genoemd. Dieper in de longen is er schade aan de kleine luchtwegen en longblaasjes. Als de longblaasjes kapotgaan wordt dit longemfyseem genoemd, dit resulteert in verminderde zuurstof opname. Deze verminderde functies van de longen veroorzaken benauwdheid en hoesten, en dit heeft een grote impact op het dagelijks leven van COPD-patiënten. De ziekte en ook de symptomen ontwikkelen zich langzaam en komen pas tot uiting op latere leeftijd van ongeveer 65 of ouder. De diagnose wordt bepaald door een combinatie van het ziektebeeld en een longfunctie test genaamd spirometrie. Hiermee wordt de totale hoeveelheid geforceerd uitgeademde lucht (FVC) gemeten en de geforceerde uitgeademde lucht in 1 seconde ( $FEV_1$ ). De diagnose COPD wordt gesteld bij een verhouding van de  $FEV_1/FVC$  minder dan 70%. Aan de hand van spirometrie wordt ook de ernst van de ziekte bepaald, namelijk door de  $FEV_1$  (zie tabel 1). Deze wordt uitgedrukt in een percentage van de gemiddelde waarde die voorspeld wordt op basis van leeftijd, geslacht en lengte.

Naar schatting waren er in 2016 wereldwijd 251 miljoen mensen met de ziekte COPD. Op dit moment is COPD de op twee na meeste voorkomende doodsoorzaak wereldwijd met in 2015 een dodental van 3 miljoen. Naar verwachting zal dit aantal de komende jaren verder toenemen gezien de veroudering van de populatie wereldwijd. In Nederland is COPD de 6<sup>e</sup> meest voorkomende doodsoorzaak en de ziektelast wordt op de 4<sup>e</sup> plek ingeschaald. In 2017 zijn 33.735 ziekenhuis opnames van COPD-patiënten geweest en waren de totale zorgkosten 912 miljoen. Patiënten met ernstige COPD met meer symptomen vormen het grootste deel van sterfgevallen, opnames en zorgkosten.

Ondanks dat roken de grootste risico factor is voor COPD hebben naar schatting 25% van de COPD-patiënten nooit gerookt en daarbij ontwikkelen niet alle rokers COPD. Daaruit blijkt dat de genetische achtergrond ook een belangrijke rol speelt in de risico op en in de ontwikkeling van COPD. Er zijn enkele gen varianten bekend die de kans op COPD vergroten, maar hoe deze varianten bijdragen aan risico, ontstaan en variatie in ontwikkeling van COPD is nog grotendeels onbekend. Mede daarom zijn er nog geen effectieve medicijnen beschikbaar om het ziekteproces te vertragen of om te keren. Op dit moment zijn de behandelingen met medicijnen vooral gericht op het verbeteren en voorkomen van symptomen. De belangrijkste methode op dit moment voor zowel verbetering van klachten en beperken van verder achteruitgang is het voorkomen van de blootstelling aan de giftige stoffen, en dus stoppen met roken. E-sigaretten zijn recent op de markt gekomen als alternatief voor tabaks-sigaretten en als hulpmiddel voor het stoppen

met roken, maar de veiligheid hiervan is grotendeels onbekend en wordt steeds meer betwijfeld. Als COPD zich tot een zeer ernstige vorm heeft ontwikkeld is uiteindelijk de enige behandelmogelijkheid een longtransplantatie. Om die ernstige vorm te voorkomen en veel vroegtijdiger effectief te kunnen ingrijpen zijn nieuwe behandelmogelijkheden nodig en daarvoor is meer kennis nodig over de processen die betrokken zijn bij het ziekteproces van COPD.

**Tabel 1: Classificatie van COPD GOLD stadia gebaseerd op longfunctie**

GOLD stadium	Ernst van de ziekte	FEV <sub>1</sub> % voorspeld
I	Mild	> 80 %
II	Gematigd	50 – 80 %
III	Ernstig	30 – 50 %
IV	Zeer ernstig	< 30 %

*COPD is gediagnostiseerd bij FEV<sub>1</sub>/FVC <70%.*

*FEV<sub>1</sub>: geforceerde uitgeademde lucht in 1 seconde. Gemeten met spirometrie.*

*FVC: totale hoeveelheid geforceerd uitgeademde lucht. Gemeten met spirometrie.*

De levensverwachting wereldwijd neemt toe en daarom is er steeds meer interesse in de rol van veroudering in gezondheid en ziekte. Veroudering is de progressieve afname van het in evenwicht houden van de normale processen en functies in het lichaam, genaamd homeostase. Het verliezen van dit evenwicht zorgt ervoor dat de kans op ziektes en overlijden toenemen. Recentelijk zijn negen kenmerken van veroudering beschreven die onderverdeeld kunnen worden in de oorzaken van schade, de reactie op schade en de uiteindelijke veranderingen die optreden bij veroudering.

Bij normale long veroudering neemt de longfunctie af en vergroten de longblaasjes, wat de zuurstof opname vermindert. Deze normale veroudering wordt veroorzaakt door verlies van longelasticiteit en wordt seniel of ouderdoms-emfyseem genoemd. Dit is in zeker mate vergelijkbaar met het pathologische emfyseem in COPD, maar in COPD wordt dit veroorzaakt door de directe schade van rook of andere gassen en de chronische ontsteking, en hierbij is de schade ook erger. Recentelijk zijn meerdere overeenkomsten aangetoond tussen verouderde longen en longen van COPD-patiënten, waaronder cellulaire senescentie. Cellulaire senescentie is een onomkeerbare stop van de groei van cellen, wat wordt veroorzaakt door allerlei soorten schade aan cellen en verminderde reparatie van deze schade. Deze senescente cellen hebben niet meer hun originele functie en kunnen weefselschade in het omliggende weefsel veroorzaken, onder

andere door de eiwitten die ze uitscheiden. De uitscheiding van deze eiwitten wordt senescence geassocieerde secretie fenotype (SASP) genoemd. Aangezien meerdere verouderingskenmerken aangetoond zijn in COPD-patiënten vergeleken met ex-rokers zonder COPD van dezelfde leeftijd, wordt COPD ook wel gezien als ziekte met versnelde longveroudering.

Een groep van COPD-patiënten die vooral relevant is met betrekking tot versnelde longveroudering zijn de relatief jonge COPD-patiënten met de meest ernstige vorm van COPD, ook wel 'severe, early-onset COPD' genoemd (SEO-COPD). Deze patiënten hebben zeer ernstig COPD ontwikkeld rond een leeftijd van 50-55 jaar ondanks een vaak relatief korte geschiedenis van roken. Deze SEO-COPD patiënten lijken dus extra vatbaar om COPD te ontwikkelen en op dit moment begrijpen de nog niet goed waarom. Mogelijk speelt versnelde longveroudering juist een belangrijke rol bij deze groep COPD-patiënten.

Recentelijk zijn abnormale veranderingen in het bindweefsel (extracellulaire matrix (ECM)) beschreven als aanvullend kenmerk voor long veroudering. ECM vormt de structuur van de longen en is belangrijk voor de stevigheid en elasticiteit. Bij normale veroudering verandert de ECM met vooral een toename van bindweefselvorming wat leidt tot stijfheid en een verlies aan elasticiteit. Een bekend zichtbaar voorbeeld hiervan is het rimpelen van de huid. In COPD-longen is de ECM sterk veranderd met ook een toename in bindweefselvorming in de luchtwegwand, maar afbraak van ECM in de longblaasjes. Onlangs hebben we aangetoond dat de mate van activiteit van de genen die coderen voor de ECM-eiwitten veranderd met veroudering in longweefsel. We vonden hierbij dat de veranderingen in de bindweefsel genen groter was in COPD-patiënten vergeleken met controles. De longcellen die vooral belangrijk zijn voor de productie van ECM en de regulatie ervan zijn long fibroblasten. Een ander celtype die ECM-eiwitten aanmaken zijn gladde spiercellen in de luchtwegwand. Deze twee celtypen spelen dus een belangrijke rol bij het vormen, in stand houden en herstellen van de ECM van de longen. In COPD is er een verdikking in de gladde spiercel laag in de luchtwegen en is er verhoogde ECM-productie in de luchtwegwanden. De ECM in longen van COPD-patiënten is veranderd met verhoogde productie van de ECM-eiwitten collageen en versican en verlaagde productie van elastine, decorine en perlecan. Ook na stimulatie van long fibroblasten met sigaretten rook extract is de ECM-productie veranderd. Het is dus bekend dat er ECM-veranderingen optreden tijdens veroudering en bij COPD-patiënten, maar wat de rol is van versnelde veroudering in COPD in relatie tot longweefsel herstel en ECM veranderingen is tot nu toe onbekend.

Het doel van dit proefschrift was om vast te stellen wat de rol is van versnelde long veroudering in COPD met betrekking tot longweefsel herstel en ECM-veranderingen.

Om inzicht te krijgen in de overlap van long veroudering en COPD, hebben we in **hoofdstuk 2** een overzicht gegeven van de studies die verouderingskenmerken hebben aangetoond in COPD. Dit laat zien dat in COPD-longweefsel veel verouderingskenmerken aanwezig zijn wat onderschrijft dat versnelde veroudering een rol speelt in COPD. Dit overzicht heeft ook aangetoond dat er nog weinig bekend was over veroudering in long fibroblasten en luchtweg gladde spiercellen van COPD-patiënten. Deze cellen spelen een belangrijke rol in longweefsel herstel en ECM-veranderingen. Wat ook duidelijk werd in dit overzicht was dat er nog bijna geen gegevens zijn over veroudering in de specifieke jonge groep patiënten met SEO-COPD. Daarom was **hoofdstuk 2** de basis en aanleiding voor de studies die zijn beschreven in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3** hebben we gekeken naar veranderingen op mRNA en miRNA niveau met normale veroudering in luchtwegbiopten van gezonde individuen. Het mRNA in cellen wordt omgezet in eiwit, genaamd translatie, wat uiteindelijk het functionele effect in cellen heeft. MiRNAs zijn kleine RNA-moleculen die kunnen binden aan specifieke mRNAs en daardoor deze mRNA afbreken of de translatie blokkeren. Door naar de veranderingen hiervan te kijken met veroudering probeerden we meer inzicht te krijgen in welke genen (mRNA) en welke gen regulatoren (miRNA) een rol spelen in normale veroudering. We hebben 285 mRNAs en 27 miRNAs gedetecteerd die waren veranderd met veroudering. Uit dit onderzoek bleek dat de genen met verlaagde expressie met veroudering betrokken zijn bij bepaalde signaal routes die onderdeel uitmaken van 3 van de 9 algemene verouderingskenmerken; genomische instabiliteit, cellulaire senescentie en veranderde intercellulaire communicatie. Deze resultaten suggereren dat deze verouderingskenmerken een rol spelen in normale longveroudering.

Om te kijken naar het effect van versnelde veroudering op normaal longweefsel herstel in COPD-patiënten hebben we in **hoofdstuk 4** onderzocht of long fibroblasten van ex-rokers met COPD meer kenmerken van veroudering laten zien dan fibroblasten van ex-rokers zonder COPD. Hierbij werd speciaal aandacht besteed aan de jonge SEO-COPD patiënten aangezien onze hypothese is dat versnelde veroudering vooral in deze patiënten een rol kan spelen. Deze verouderingskenmerken werden geanalyseerd na het kweken van long fibroblasten geïsoleerd uit longen van COPD-patiënten en uit ex-rokers zonder COPD als controles. Uit deze studie bleek dat meerdere kenmerken van veroudering hoger zijn in COPD-patiënten in vergelijking met de controles met ook hogere waarden van cellulaire senescentie, DNA-schade en oxidatieve stress. Deze effecten waren vooral zichtbaar in de fibroblasten van SEO-COPD patiënten vergeleken met de controles van dezelfde leeftijd. In relatie tot ECM vonden we dat hogere waarden van cellulaire senescentie geassocieerd waren met lagere genexpressie van het ECM-eiwit decorine. Deze combinatie vonden we vervolgens ook in het totale longweefsel van COPD-patiënten vergeleken met controles. Vervolgens hebben we cellulaire senescentie geïnduceerd met Paraquat, wat een bekend model hiervoor is. Paraquat werd vroeger gebruikt als onkruidverdelger en kan daardoor door beroepsmatige blootstelling een risico factor zijn voor COPD. Na inductie van cellulaire

senescentie vonden we veranderingen in genexpressie van meerdere ECM-eiwitten waaronder verlaagde decorine expressie, in overeenstemming met hier bovenstaande resultaten. Dit bevestigt dat hogere waarden van cellulaire senescentie kunnen resulteren in ECM-veranderingen in COPD.

Om meer inzicht te krijgen in de potentiële consequenties van versnelde veroudering in long fibroblasten van COPD-patiënten hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht of deze cellen hogere waarden van de SASP (senescentie geassocieerde secretie fenotype) eiwitten uitscheiden in vergelijking met fibroblasten van controles zonder COPD. Eerst hebben we met Paraquat cellulaire senescentie geïnduceerd in long fibroblasten en de eiwitten die meer dan 3 keer zoveel worden uitgescheiden dan niet-gestimuleerde fibroblasten gedefinieerd als SASP-eiwitten. Na senescentie inductie hebben we 124 SASP eiwitten geïdentificeerd. Van deze 124 eiwitten werden 42 eiwitten in hogere mate uitgescheiden door fibroblasten van COPD-patiënten vergeleken met die van controles. Van deze 42 COPD-geassocieerde eiwitten werden 35 eiwitten uitgescheiden in hogere mate door fibroblasten van SEO-COPD patiënten vergeleken met controles van dezelfde leeftijd. Na analyse van de signaalroutes van deze eiwitten bleek dat veel van deze eiwitten betrokken zijn bij chronische ontstekingen en daarom zouden kunnen bijdragen aan het ziekteproces van COPD.

Aangezien luchtweg gladde spiercellen ook een rol spelen bij de regulatie van ECM-productie hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of deze cellen van COPD-patiënten ook kenmerken hebben van veroudering vergeleken met de gladde spiercellen van ex-rokers zonder COPD als controles. Luchtweg gladde spiercellen en long fibroblasten werden geïsoleerd uit longen van COPD-patiënten en ex-rokers zonder COPD. Ten eerste bleek dat de waarden van cellulaire senescentie hoger lagen in luchtweg gladde spiercellen dan in long fibroblasten van dezelfde patiënten. Echter, cellulaire senescentie was niet hoger in luchtweg gladde spiercellen van COPD-patiënten vergeleken met controles. Daarnaast was er ook geen associatie tussen cellulaire senescentie en genexpressie van enkele ECM-eiwitten, inclusief decorine. Deze resultaten suggereren dat, in tegenstelling tot in long fibroblasten, hogere waarden van cellulaire senescentie in luchtweg gladde spiercellen geen grote rol spelen in COPD.

In **hoofdstuk 7** hebben we onderzoek gedaan naar de schadelijke effecten van E-sigaretten op long fibroblasten. E-sigaretten worden gebruikt als vervanging voor tabak roken en als hulpmiddel bij het stoppen van roken aangezien deze minder schadelijk worden geacht. Daarom worden ze ook vaak gebruikt door COPD-patiënten. Om te onderzoeken of E-sigaretten effect kunnen hebben op longveroudering hebben we long fibroblasten behandeld met kweekmedium waar de damp, ook vape genoemd, van E-sigaretten doorheen is gestroomd en hetzelfde deden we met rook van tabaks-sigaretten. Nadat eerder was aangetoond dat door behandeling met sigaretten rook cellulaire senescentie geïnduceerd kan worden in long fibroblasten, zagen wij dit ook na behandeling met E-

sigaretten vape. Daarnaast bleek dat na inductie van cellulaire senescentie door E-sigaretten vape, en ook door tabaks-sigaretten rook en Paraquat, de herstelfunctie van deze fibroblasten was verminderd. Uit deze resultaten blijkt dat het onwaarschijnlijk is dat vaperen van E-sigaretten een veilig alternatief is voor tabaks-sigaretten en dat ook dit dus zou kunnen bijdragen aan longveroudering en long ziekten, inclusief COPD.

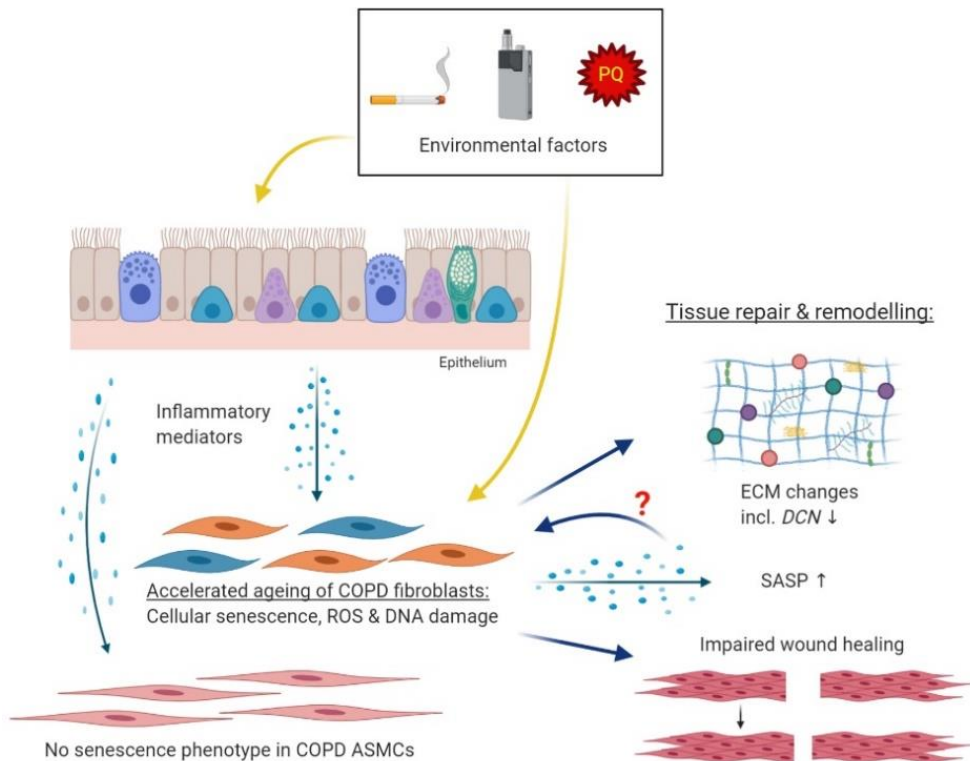
In Figuur 1 is een overzicht weergegeven van de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift. Natuurlijk zijn er nog veel verdere vragen te beantwoorden en ook nieuwe vragen voortgekomen uit ons onderzoek. Zo moet er verder nog onderzoek gedaan worden om de exacte oorzaak van de versnelde veroudering van de longfibroblasten van COPD-patiënten beter op te helderen. Ditzelfde geldt voor het effect van de versnelde veroudering van de fibroblasten op het omliggende longweefsel. Dit zou kunnen resulteren in longweefsel disfunctie door chronische ontstekingen, inductie van cellulaire senescentie in omliggende cellen en veranderingen in de ECM. In hoofdstuk 4 vonden we een associatie tussen verhoogde cellulaire senescentie en ECM-regulatie, maar of dit effect direct of indirect is en wat het functionele effect op de ECM-productie, structuur en organisatie is, is nog onbekend. Vervolgstudies zouden deze vragen over cellulaire senescentie in long fibroblasten van COPD-patiënten moeten beantwoorden.

Andere belangrijke vragen met betrekking tot versnelde veroudering in COPD die nog onbeantwoord zijn, zijn wat de exacte oorzaak van deze versnelde veroudering in het totale longweefsel van COPD-patiënten is en of dit aan COPD bijdraagt of dat dit juist het gevolg is van de ziekte. Sommige studies probeerden deze vraag te beantwoorden door versnelde veroudering te veroorzaken in muis modellen en dan te onderzoeken of deze muizen COPD ontwikkelen en in enkele gevallen bleek dit zo te zijn. Echter is nog veel onbekend hierover en zal verder onderzoek gedaan moeten worden door bijvoorbeeld mensen met een verhoogd risico voor COPD over langere tijd te volgen in een zogenaamd longitudinale studie.

Nu dit proefschrift en meerdere andere studies aantonen dat versnelde longveroudering een belangrijke rol kan spelen in COPD-patiënten zou het interessant kunnen zijn om te interfereren in de processen van veroudering. Op het moment worden vooral twee strategieën onderzocht in relatie met veroudering en versnelde veroudering, genaamd senostatics en senolytics. Met senostatics wordt geprobeerd om veroudering tegen te gaan door vooral de oorzaken van cellulaire senescentie te remmen met behulp van het verbeteren van cellulaire reparatie mechanismen. Door middel van senolytics wordt specifieke celdood veroorzaakt in alleen senescente cellen. Beide strategieën laten veelbelovende resultaten zien in celweek experimenten en diermodellen. Op dit moment zijn ook enkele klinische studies bezig om de potentie van zulke therapieën te onderzoeken. Het nadeel van het tegen gaan van versnelde veroudering is dat dit kan leiden tot bijwerkingen, met vooral risico op ontwikkeling van kanker. Cellulaire senescentie is



namelijk ook een belangrijk proces bij het remmen van abnormale celgroei. Het aanpakken van cellulaire senescentie kan daarom zorgen voor abnormale celgroei en tumor vorming. Om deze reden is het belangrijk om de gezonde balans hierin te vinden en om specifieke cel-gerichte therapieën te ontwikkelen. Ondanks dat anti-verouderingstherapieën veelbelovend lijken, is nog veel onderzoek nodig om dit te kunnen gebruiken in ziektes met versnelde veroudering, zoals COPD.



**Figuur 1: Overzicht van de rol van versnelde veroudering in long fibroblasten van COPD.**

Schadelijke stoffen, zoals sigarettenrook, E-sigaretten en Paraquat (PQ) kunnen kenmerken van versnelde veroudering induceren in long fibroblasten. Long fibroblasten van COPD-patiënten hebben kenmerken van versnelde veroudering, inclusief hogere cellulaire senescentie, oxidatieve stress (ROS) en DNA-schade. Deze versnelde veroudering kan een direct effect zijn van de schadelijke stoffen of indirect, bijvoorbeeld via het epitheel. Hogere waarden van cellulaire senescentie resulteerden in ECM-veranderingen, inclusief verlaagde decorine expressie, hogere uitscheiding van SASP-eiwitten en een verlaagde longweefsel herstel functie. Deze drie functionele consequenties zijn betrokken bij het ziekteproces van COPD. Gecreëerd met BioRender.com



