

University of Groningen

## Cigarette smoke-induced oxidative stress in COPD

Hoffmann, Roland Frederik

**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:*

2016

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

*Citation for published version (APA):*

Hoffmann, R. F. (2016). *Cigarette smoke-induced oxidative stress in COPD: Effects on mitochondrial function, the lipidome and glucocorticoid responsiveness in airway epithelium*. Rijksuniversiteit Groningen.

### 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 8

---

Nederlandse samenvatting

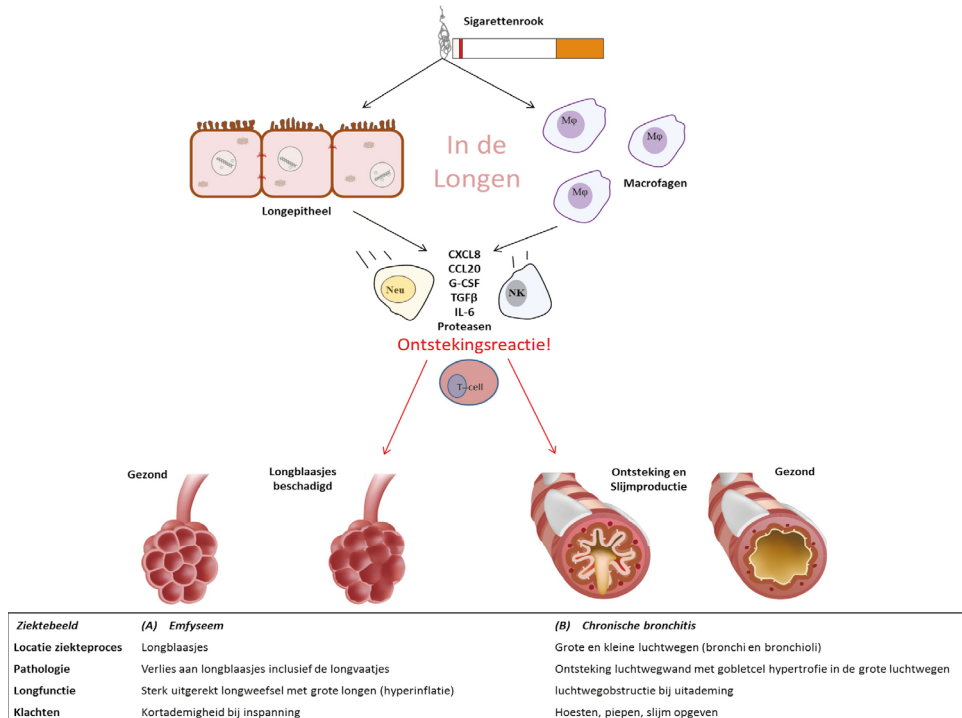
---



## Wat is COPD

Chronische obstructieve longziekte (COPD) is een ziekte die zich voornamelijk in de longen manifesteert en, vooral bij ouderen, gepaard gaat met een hogere kans op morbiditeit en mortaliteit. De meest prominente risicofactor van COPD is actief roken of passief meeroken. Daarnaast vormt de inademing van andere schadelijke deeltjes en gassen zoals fijnstof, brandstoffen, chemicaliën en houtrook een risico. Slechts 10-15% van de rokers ontwikkelt COPD, wat wijst op een genetische vatbaarheid die bijdraagt aan de ontwikkeling van COPD. Er zijn ook niet-omgeving gerelateerde risicofactoren voor het ontwikkelen van COPD zoals genetische afwijkingen, in het bijzonder de alfa1-antitrypsine-deficiëntie. Het roken van tabak is voor de gezondheidszorg een groot probleem in de westerse wereld en in de opkomende industrielanden. Schattingen van de 'World Health Organization' (WHO) stellen dat 65 miljoen mensen wereldwijd een matige tot ernstige vorm van COPD hebben, wat leidt tot hoge zorgkosten. Het is momenteel de vierde belangrijkste doodsoorzaak, en de verwachting is dat het in 2030 de derde belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd zal zijn.

COPD wordt gekenmerkt door chronische ontsteking in de longen die gepaard gaat met toenemende longschade, onomkeerbare luchtwegobstructie, en versnelde achteruitgang van de longfunctie. Ingeademde sigarettenrook prikkelt en beschadigt het bekleedende luchtwegepitheel, en zorgt ervoor dat zowel epitheelcellen als macrofagen (beiden behorend tot het aangeboren immuunsysteem) geactiveerd raken en er een ontstekingsreactie optreedt. De cellen van COPD patiënten reageren heftiger op de ingeademde rookdeeltjes dan cellen van rokers die geen COPD ontwikkelen, waardoor er meer ontsteking optreedt. Bij COPD patiënten produceren bovengenoemde epitheelcellen en macrofagen chemische signaalstoffen (cytokines en chemokines, waaronder het zogenaamde CXCL8/IL-8), die op hun beurt weer andere immuuncellen in de longen en het bloed aantrekken en activeren, waaronder neutrofielen en cellen van het aangeleerde immuunsysteem, T-cellen. Deze geactiveerde cellen dragen bij aan het onderhouden van de boven beschreven ontstekingsreactie en zorgen er voor dat er meer schade optreedt aan het longweefsel (Figuur 1). COPD omvat chronische bronchitis en longemfyseem. Chronische bronchitis wordt gekenmerkt door een ontstekingsreactie ('itis') in de grote en kleine luchtwegen (de bronchi), die leidt tot verdikking van de luchtwegwand. Bij patiënten die lijden aan chronische bronchitis toont longfunctie onderzoek een luchtwegobstructie bij uitademing aan, en de patiënten hebben vaak last van hoesten en slijm opgeven. Longemfyseem wordt gekenmerkt door een ontstekingsreactie die tot afbraak van eiwitten in de longblaasjes (alveoli) leidt en uiteindelijk tot verlies van het alveolair weefsel. Hierbij is de rek uit de longen ("slappe long"), wat leidt tot verlies van longfunctie, en de patiënt heeft last van kortademigheid bij inspanning. Deze ziektebeelden kunnen afzonderlijk voorkomen, maar ook naast elkaar aanwezig zijn bij dezelfde patiënt.



**Figuur 1. Overzicht van een sigarettenrook ontstekingsreactie in de longen.** A) beschadiging van de longblaasjes (Emfyseem) en/of B) aantasting van de grote luchtwegen met slijmproductie (Chronische Bronchitis). Sigarettenrook activeert epitheelcellen en Macrofagen in de long die vervolgens chemokines uitscheiden zoals, CXCL8, G-CSF, TGF $\beta$ , IL-6. Hierdoor worden andere cellen van het immuunsysteem, zoals Neutrofielen (Neu), Natural Killer (NK) cellen en T-cellen, aangetrokken en geactiveerd. Deel van dit figuur was gemodificeerd aan de hand van een figuur getoond op de site van Beth Israël Deaconess Medical Center (<http://www.bidmc.org/Centers-and-Departments/Departments/Surgery/Chest-Disease-Center/Programs-and-Services/COPDEmphysemaClinic/DiagnosingCOPD.aspx>).

## Behandeling van COPD

Er is momenteel geen behandeling beschikbaar die COPD kan genezen. De belangrijkste maatregel is stoppen met roken, waarvan aangetoond is dat het de verslechtering van COPD een halt toe roept, hoewel het de achteruitgang in longfunctie niet kan terugdraaien. Griepvaccinaties kunnen virusinfecties en daarmee gepaard gaande longaanvallen (plotselinge verslechtering van het ziektebeeld) gedeeltelijk voorkomen. Verder kan longrevalidatie de patiënt leren omgaan met zijn/haar ziekte. Wat betreft de behandeling met geneesmiddelen is deze vooral gericht is op symptoombestrijding. Voorbeelden hiervan zijn luchtwegverwijders die geïnhaled worden zoals antibiotica, slijmverdunners en glucocorticoiden (GC). GC hebben een sterke ontstekingsremmende werking en worden daardoor effectief gebruikt bij bijvoorbeeld astma, maar bij COPD patiënten zijn ze helaas weinig effectief en onderdrukken ze de onderliggende ontstekingsreactie onvoldoende.

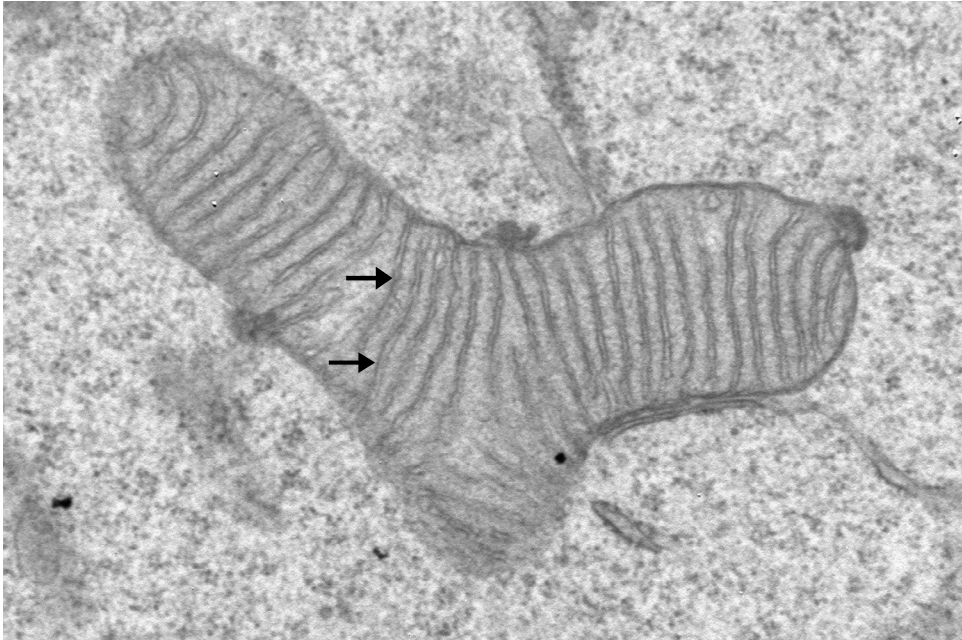
De vraag is waarom deze GC niet effectief zijn bij astma bij COPD. Mogelijk is een van de mogelijke oorzaken de oxidatieve stress (zie hieronder) die wordt veroorzaakt door het roken bij COPD patiënten.

### Roken en oxidatieve stress

Sigarettenrook veroorzaakt de productie van zogenaamde vrije zuurstofradicalen. Dit zijn agressieve en uiterst reactieve deeltjes die de cellen in ons lichaam kunnen aanvallen. Als deze vrije zuurstofradicalen niet op tijd geneutraliseerd worden door antioxidanten, kunnen ze voor het lichaam belangrijke biologische moleculen beschadigen. Het betreft moleculen zoals vetten en eiwitten, die ook voorkomen in onze longcellen. De productie van vrije zuurstofradicalen wordt oxidatieve stress genoemd. Men neemt aan dat de longcellen van COPD patiënten niet de capaciteit hebben om al deze oxidatieve stress te neutraliseren. Onder meer het eiwit genaamd glucocorticoidreceptor  $\alpha$ , dat verantwoordelijk is voor een goede werking van GC, kan hierdoor beschadigd raken en zijn ontstekingsremmende functie verliezen. Ook kunnen vrije radicalen inwerken op andere belangrijke eiwitten die de ontstekingsremmende activiteit verminderen of kunnen ze deze eiwitten zelfs `uitzetten`. Van enkele eiwitten (zoals Histone Deacetylase 2, HDAC2, wat een rol speelt bij de ontstekingsremmende werking van GC) is in de literatuur inderdaad beschreven dat ze door in-activatie, veroorzaakt door vrije radicalen, de GC-gevoeligheid kunnen verminderen. Of dit mechanisme ook een rol speelt bij verminderde GC gevoeligheid van een belangrijke aandrijver van de ontstekingsreactie bij COPD, het longepitheel, is op dit moment onbekend. Het begrijpen van de specifieke mechanismen van GC ongevoeligheid bij COPD kan leiden tot belangrijke nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van COPD.

### Mitochondriën

Mitochondriën zijn organellen in de cel die vaak 'energie fabrieken' worden genoemd. Ze zijn samengesteld uit verschillende compartimenten die meerdere gespecialiseerde functies uitoefenen met betrekking tot de energieproductie in de cel. Mitochondriën zijn ovale of staafvormige organellen die een dubbele membraanstructuur hebben. Het binnenste membraan wordt lobulair gevormd waardoor het oppervlak sterk vergroot wordt ten behoeve van de productie van adenosine trifosfaat (ATP) (Figuur 2). Energie wordt geproduceerd uit een proces dat oxidatieve fosforylering (OXPHOS) heet. Bij dit proces geven elektronen hun energie af door middel van redoxreacties die worden uitgewisseld via het binnenmembraan. Vervolgens kunnen de protonenpompen de productie van energie verzorgen in de vorm van ATP. Naast het produceren van energie zijn de mitochondriën verantwoordelijk voor het reguleren van geprogrammeerde celdood, calcium opslag, celgroei (proliferatie), hormoon- en heemsynthese en de overdracht van signalen binnen de cel. Mitochondriën zijn dus erg belangrijk voor de functie van de cel en het functioneren van het lichaam.



**Figuur 2. Een voorbeeld van een mitochondrion.** De zwarte pijlen geven de lobulaire binnenmembraan structuren aan die cristae genoemd worden. Hier wordt energie in de vorm van ATP geproduceerd.

### De rol van mitochondriën bij COPD

Mitochondriën spelen een belangrijke rol in ziekten die geassocieerd worden met oxidatieve stress, waaronder COPD. Dit komt omdat mitochondriën tijdens de energieproductie een bijproduct in de vorm van vrije radicalen aanmaken. Deze vrije radicalen zorgen voor oxidatieve stress in de cel, maar worden normaliter geneutraliseerd door zeer gespecialiseerde enzymen met antioxidant werking, zoals Superoxide Dismutase, Glutathion en Catalase. Uiteindelijk zetten deze enzymen de agressieve radicalen om in water ( $H_2O$ ) en zuurstof ( $O_2$ ). Het lijkt er op dat dit proces bij COPD patiënten niet meer in balans is, omdat er in verhoogde mate oxidatieve stress aanwezig is. Dit kan komen doordat de mitochondriën teveel vrije radicalen produceren als het gevolg van het roken (sigarettenrook bevat ook veel vrije radicalen die vervolgens de mitochondriën), of dat de mitochondriën mogelijk te weinig (actieve) enzymen hebben die deze radicalen neutraliseren, of een combinatie hiervan. Door langdurige blootstelling aan oxidatieve stress treedt er in de cel schade op. Deze door oxidatieve stress geïnduceerde schade is het grootst op de plek waar vrije zuurstofradicalen geproduceerd worden, en dat is in de mitochondriën zelf. Uiteindelijk leidt dit theoretisch tot een zodanige schade aan de mitochondriën, dat deze zelf extra vrije radicalen gaan produceren en/of helemaal niet meer werken. Dit noemen wij een mitochondriale disfunctie.

In ons onderzoek veronderstellen wij dat de schadelijke effecten van sigarettenrook-geïnduceerde oxidatieve stress een negatieve invloed hebben op de mitochondriale functie in luchtwegepitheelcellen, en dat COPD patiënten hiervoor gevoeliger zijn dan rokers die geen COPD ontwikkelen. Ook vermoeden wij dat een mitochondriale disfunctie bijdraagt aan het ontstaan en verergeren van de chronische ontsteking bij COPD en dat luchtwegepitheelcellen met slecht werkende mitochondriën minder goed kunnen herstellen na beschadigende stimuli in het algemeen en roken in het bijzonder. Bovendien verwachten wij dat oxidatieve stress en mitochondriale disfunctie tot GC-ongevoeligheid leiden van luchtwegepitheelcellen.

Om aan te tonen of langdurige blootstelling aan sigarettenrook invloed heeft op de werking van mitochondriën hebben we ons in **hoofdstuk 2** gericht op de effecten hiervan in menselijke (humane) luchtwegepitheelcellen. In het bijzonder hebben we gekeken naar de mitochondriale vorm en functie in de humane luchtweg/bronchiale epitheelcellijn, welke 6 maanden lang was bloot gesteld aan sigarettenrookextract. Daarnaast hebben we onderzocht of en hoe de mitochondriale vorm en functie is veranderd in bronchiale epitheelcellen van COPD patiënten ten opzichte van niet-rokende en rokende individuen zonder COPD. In zowel de bronchiaal epitheel cellijn als in de luchtwegepitheelcellen van COPD patiënten, konden we duidelijke afwijkingen in mitochondriale vorm en functie waarnemen. Zo waren in de langdurig aan sigarettenrookextract blootgestelde luchtwegepitheelcellen meer vertakte mitochondriën aanwezig en minder cristae zichtbaar in vergelijking tot epitheelcellen die even lang werden gekweekt, maar niet aan rook werden blootgesteld. Vertakking van mitochondriën duidt vaak op veroudering van mitochondriën en minder cristae betekent minder oppervlak voor het produceren van energie (ATP). Soortgelijke afwijkingen vonden we ook in mitochondriën van COPD patiënten ten opzichte van mitochondriën in gekweekt luchtwegepitheel van gezonde personen en rokers zonder COPD. In de langdurig aan sigarettenrook blootgestelde luchtwegepitheelcellen ging dit gepaard met de productie van verschillende ontstekingsbevorderende cytokines zoals CXCL8, IL-1 $\beta$  en IL-6, die onder meer neutrofielen kunnen aantrekken. Ook zagen we dat belangrijke mitochondriale stress-markers, zoals PINK1, meer tot expressie kwamen in luchtweg epitheelcellen van COPD patiënten. Samenvattend bevestigen de bevindingen van dit hoofdstuk de hypothese dat sigarettenrook schadelijk is voor de mitochondriale functie, dat dit met name in luchtwegepitheel van COPD patiënten voor mitochondriële afwijkingen zorgt en dat mitochondriale disfunctie gepaard gaat met de productie van ontstekingsfactoren.

Glycogen Synthase Kinase (GSK3) $\beta$  is een eiwit dat veelal in het cytosol van de cel is gelokaliseerd maar daarnaast ook in de mitochondriën voorkomt, waar het een zeer hoge activiteit laat zien en belangrijke processen reguleert. GSK3 $\beta$  is een eiwit dat reageert op signalering van oxidatieve stress. Het speelt een rol bij verschillende ontstekingsziekten en in eerder onderzoek T-cellen is gevonden dat het mogelijk ook een rol speelt bij GC on gevoeligheid. Oxidatieve stress remt de activiteit van GSK3 $\beta$  en stimuleert de glycolyse, een proces dat energie genereert uit het omzetten van glucose, ten



koste van mitochondriale ATP productie via OXPHOS. In **hoofdstuk 3** hebben we de mechanismen voor sigarettenrook geïnduceerde GC-ongevoeligheid cellen van het aangeboren immuunsysteem van COPD patiënten bestudeerd en gekeken of GSK3 $\beta$  hierbij betrokken is. GSK3 $\beta$  bleek verhoogd inactief in de macrofagen en epitheelcellen van COPD patiënten vergeleken met gezonde personen en rokers zonder COPD (zowel in het longweefsel als in gekweekte cellen). In macrofaag- en epitheelcellijnen toonden wij aan dat (sigarettenrook geïnduceerde) oxidatieve stress deze inactiviteit konden veroorzaken. Verder vonden wij dat het (farmacologisch) blokkeren van de werking van GSK3 $\beta$  in zowel epitheelcellen als macrofagen voor een sterk verminderde gevoeligheid voor GC bleek te zorgen. Hiermee hebben wij laten zien dat het inactiveren van het eiwit GSK3 $\beta$  door sigarettenrook in cellen van COPD patiënten mogelijk kan bijdragen aan de ontwikkelingen van GC-ongevoelige ontsteking bij COPD.

Omdat uit hoofdstuk 2 is gebleken dat er na langdurige blootstelling van epitheel aan sigarettenrook afwijkingen in de mitochondriën optreden, waren we benieuwd of een mitochondriale disfunctie ontstekingsreacties en GC on gevoeligheid kan veroorzaken. Daarnaast wilden we bestuderen of verlies van mitochondriale functie gevolgen heeft voor de herstelreactie van het epitheel als gevolg van het aanbrengen van schade. We hebben dit in **hoofdstuk 4** van dit proefschrift onderzocht door gebruik te maken van een longepitheel cellijn waarin geen mitochondriaal DNA (mtDNA) meer aanwezig is, met andere woorden, de mitochondriën zijn disfunctioneel. De vindingen in dit hoofdstuk laten zien dat een mitochondriale disfunctie een verhoging van meerdere ontstekingsbevorderende cytokines, zoals CXCL8, CCL20 en IL-6, tot gevolg heeft en dat GC minder effectief in het remmen van deze factoren in cellen met een mitochondriale disfunctie vergeleken met gezonde cellen. Ook zien we een minder goed herstel na het aanbrengen van epitheliale schade wanneer de mitochondriën disfunctioneel zijn. Samenvattend toont dit aan dat goed functionerende mitochondriën belangrijk zijn bij schadeherstel. Verder kan de mitochondriale disfunctie die we aantreffen in epitheelcellen van COPD patiënten bijdragen aan de ontstekingsbevorderende activiteit en de verminderde gevoeligheid voor GC.

COPD wordt gekenmerkt door een chronische ontsteking en lipiden kunnen hieraan mogelijk een belangrijke bijdrage leveren, omdat lipiden kunnen dienen als signaalmoleculen die een inflammatie kunnen starten. De mitochondriale afwijking die we in COPD epitheel hebben gevonden, kunnen ook van invloed zijn op de expressie van lipiden aangezien de mitochondriën de vetstofwisseling reguleren in de cel. Daarom vroegen wij ons af of er veranderingen optreden in het lipiden profiel van patiënten met COPD. In **hoofdstuk 5** onderzochten we het potentieel om lipidomics, een techniek die het mogelijk maakt om expressie van specifieke lipiden componenten te herkennen, te gebruiken om sigarettenrook-geïnduceerde en/of ziekte-gerelateerde veranderingen in het sputum van COPD-patiënten te herkennen. Het lipidenprofiel van sputum hebben we vergeleken met dat van rokers zonder COPD en niet-rokers. We hebben meer dan 200 specifieke lipidenmarkers kunnen detecteren

in sputum van rokende COPD patiënten t.o.v. rokers zonder COPD. Stoppen met roken reduceerde de expressie van slechts 26 van deze lipiden, wat aangeeft dat de veranderingen in lipidenprofiel van COPD patiënten grotendeels persistent zijn. 20 (glyco)sphingolipiden componenten waren verhoogd in rokers zonder COPD in vergelijking met niet-rokers, wat het effect van sigarettenrook weergeeft. Al deze lipiden behoren tot de sphingolipiden en zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor het induceren van een ontstekingsreactie, aangezien deze groep lipiden sterk wordt geassocieerd met het veroorzaken van ontsteking. De 13 hoogst tot expressie gebrachte lipiden in rokers met COPD, lieten een correlatie zien met betrekking tot een minder goede longfunctie. Deze resultaten suggereren een belangrijke rol voor veranderingen in sphingolipiden expressie bij het ontstaan van COPD. Tevens zouden sphingolipiden in de toekomst misschien gebruikt kunnen worden als bio-marker voor COPD.

Omdat het nog niet duidelijk is waardoor deze veranderingen in het sputum van COPD patiënten veroorzaakt werden, en of dit kan komen door de blootstelling van epitheel aan sigarettenrook, hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of langdurig aan sigarettenrook blootgestelde luchtwegepitheel (zie hoofdstuk 2) soortgelijke veranderingen laat zien in lipide-profiel. Hier bleek dat dezelfde lipiden van de sphingolipiden cascade als gevonden in het sputum van COPD patiënten veranderd tot expressie kwamen in aan sigarettenrook blootgestelde luchtwegepitheel cellen. 13 lipiden waren gestegen in expressie, maar er waren ook 13 lipiden gedaald in expressie wat mogelijk een rol in lipidensignalering betekend. Verder was de RNA expressie van `sphingomyelin synthase 2` en `fatty acid synthase`, enzymen die betrokken zijn bij de expressie van sphingolipiden, flink gereduceerd in de langdurig aan sigarettenrook blootgestelde longepitheel cellen. Dit betekent dat deze verlaging verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de rook-geïnduceerde verschuiving in lipiden expressie. Deze resultaten geven duidelijk weer dat het lipiden profiel in epitheelcellen verandert onder invloed van sigarettenrook.

## Conclusie

Samengevat wijzen onze resultaten er op dat een mitochondriële disfunctie betrokken is bij de toegenomen ontstekingsbevorderende activiteit, verminderd schade herstel en de GC ongevoeligheid van het longepitheel bij COPD. De mitochondriale functie wordt beïnvloed door sigarettenrook geïnduceerde oxidatieve stress en deze waargenomen afwijkingen in mitochondriale functie in epitheelcellen van COPD patiënten bleken gepaard te gaan met verminderde activiteit van GSK3 $\beta$ , wat verantwoordelijk kan zijn voor de GC ongevoeligheid. Ook reguleert GSK3 $\beta$  belangrijke mitochondriale processen waar inactiviteit van GSK3 $\beta$  mogelijk verantwoordelijk is voor de geobserveerde mitochondriale veranderingen in COPD patiënten. Verder laten we zien dat de relatief nieuwe techniek, lipidomics, geschikt is voor diagnostische doeleinden in het sputum van COPD patiënten. Verandering in lipiden profiel kan een verandering in de vetstofwisseling aanduiden wat een proces is dat door mitochondriën gereguleerd word. Onze resultaten geven aan dat het van belang is de rol van mitochondriale functie en het eiwit GSK3 $\beta$  bij het ontstaan COPD verder te

onderzoeken, onder meer door de mitochondriale functie te remmen of de functie van GSK3 $\beta$  uit te schakelen in proefdiermodellen van COPD. Daarnaast bieden de resultaten nieuwe openingen voor behandelmogelijkheden gericht op mitochondriale bescherming en reactiveren van GSK3 $\beta$ , wat zou kunnen leiden tot verhoogde GC gevoeligheid. Verder biedt de lipidomics techniek mogelijkheden voor betere diagnose van COPD.