



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulation of airway epithelial cell function by vitamin D in COPD

Schrumpf, J.A.

Citation

Schrumpf, J. A. (2021, May 20). *Modulation of airway epithelial cell function by vitamin D in COPD*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3166308>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3166308>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/3166308> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schrumpf, J.A.

Title: Modulation of airway epithelial cell function by vitamin D in COPD

Issue date: 2021-05-20

Addendum

Nederlandse Samenvatting

Dutch summary

Introductie

Vitamine D

Vitamine D staat van oudsher bekend om zijn regulerende rol bij de opname van kalk (calcium) en fosfaat in de darmen en draagt op die manier bij aan het behoud van sterke botten. Vitamine D wordt onder invloed van zonlicht (UV-B straling) in de huid aangemaakt of wordt uit ons voedsel opgenomen. Helaas is de zon in gebieden met hogere breedtegraden, waarin ook Nederland ligt, niet het hele jaar (november – maart) sterk genoeg om ons lichaam van voldoende vitamine D te voorzien. Mede daardoor hebben veel mensen in deze gebieden last van een vitamine D tekort. Daarnaast komt een vitamine D tekort veel voor bij mensen met een donkere huidskleur, die niet veel buiten komen of die in gebieden wonen met veel smog. Een vitamine D tekort werd in het verleden geassocieerd met botafwijkingen zoals rachitis, totdat geleidelijk aan duidelijk werd dat ook meerdere andere aandoeningen geassocieerd zijn met een tekort aan vitamine D, waaronder kanker, diabetes type 2, cardiovasculaire aandoeningen, ziekte van Alzheimer, multiple sclerose, chronische darm ontstekingen, psoriasis en chronische long aandoeningen zoals astma en chronisch obstructieve longziekte (COPD).

Het vitamine D dat in de huid wordt aangemaakt of uit voeding wordt verkregen, is nog niet biologisch actief. Eerst wordt deze inactieve vorm van vitamine D in de lever door de enzymen CYP2R1 en CYP27A1 in 25-hydroxy-vitamine D (25(OH)D; ook wel calcidiol of calcifidiol genoemd) omgezet. 25(OH)D is de meest voorkomende vorm van vitamine D in het bloed en een maat voor vitamine D status in het lichaam. In de nieren wordt vervolgens het nog inactieve 25(OH)D door het enzym CYP27B1 omgezet in zijn actieve vorm: 1,25 dihydroxy-vitamine D (1,25(OH)₂D; ook wel calcitriol genoemd). Recente onderzoeken hebben echter aangetoond dat ook andere weefsels en celtypen zoals luchtwegepitheelcellen, huidcellen, darmcellen en immuuncellen deze enzymen kunnen aanmaken en dus lokaal calcidiol kunnen omzetten naar de actieve vorm van vitamine D. Als reactie op de aanmaak van actief vitamine D, wordt CYP24A1 aangemaakt in cellen die door 1,25(OH)₂D zijn geactiveerd via de vitamine D receptor (VDR). CYP24A1 breekt zowel actief 1,25(OH)₂D als inactief 25(OH)D af. Dit “feedback” mechanisme zorgt voor een bescherming tegen te hoge waarden van actief vitamine D, wat bijvoorbeeld tot te

hoge calcium waarden in het bloed zou kunnen leiden en schadelijk is voor organen en botten.

Vitamine D en het luchtwegepitheel

In de luchtwegen is vitamine D een belangrijke factor in de homeostase van het luchtwegepitheel en heeft invloed op zowel het aangeboren als het adaptieve of verworven immuunsysteem. Het luchtwegepitheel is onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en fungeert als de frontlinie van de afweer van de longen. Het luchtwegepitheel vormt een fysieke barrière tegen een invasie van pathogenen en inademing van schadelijke deeltjes en gassen afkomstig van sigarettenrook of luchtverontreiniging. Het luchtwegepitheel bestaat uit verschillende celtypen, zoals gobletcellen (slijmbekercellen), trilhaarcellen, clubcellen en basale cellen, die allemaal een unieke rol spelen in het in stand houden van deze barrière. De gobletcellen produceren slijm, die een gelvormige bekleding vormen, dat over de trilharen heen wordt getransporteerd. Onderweg vangt het slijm pathogenen en andere schadelijke deeltjes op, om deze vervolgens door de bewegende trilharen uit de luchtwegen naar de keel te transporteren. Wanneer pathogenen alsnog door de slijmlaag doordringen dan is het lastig om door de epitheliale laag te kunnen, omdat deze cellen sterk aan elkaar verankerd zitten door de aanwezigheid van “tight-“ en “adherens junctions”. Naast deze fysieke barrière, beschermt het epitheel zich ook tegen pathogenen door de uitscheiding van ontstekings- en andere afweermediatoren. Deze ontstekingsmediatoren trekken vervolgens immuuncellen aan en activeren deze om mee te helpen met het klaren van de infectie. Verder scheidt het luchtwegepitheel verschillende afweermediatoren zoals o.a. antimicrobiële peptiden en eiwitten (AMPs) uit. AMPs zijn een natuurlijke vorm van antibiotica en doden virussen, bacteriën en schimmels, maar moduleren ook de immunrespons en kunnen eventuele weefselschade helpen herstellen. Clubcellen kenmerken zich door het produceren van het CC16 eiwit dat een ontstekingsremmende werking heeft en verder kunnen deze cellen ook bepaalde giftige stoffen neutraliseren. De basale cellen zijn de voorlopercellen van het luchtweg epitheel en spelen een belangrijke rol in het herstel van het epitheel na beschadiging. Deze cellen kunnen zich na beschadiging gaan delen om de wond te sluiten om vervolgens zichzelf te transformeren (differentiëren) tot nieuwe goblet-, trilhaar- en clubcellen. Omgevingsfactoren zoals langdurige blootstelling aan luchtvervuiling of sigarettenrook, maar ook genetische mutaties kunnen een negatieve invloed

hebben op beschermende epitheelcelfuncties. Dit kan de vatbaarheid voor infecties vergroten en uiteindelijk leiden tot chronische ontsteking en schade die niet meer volledig hersteld kan worden. Bovendien hebben onderzoeken aangetoond dat het luchtwegepitheel van patiënten met chronisch ontstoken luchtwegen verschilt van dat van gezonde mensen, en tekenen vertoont van een afwijkend herstellend vermogen. Deze bevindingen suggereren dat het luchtwegepitheel een centrale rol speelt in het ontstaan en verloop van chronisch inflammatoire longziekten zoals astma en COPD. Verschillende onderzoeken hebben aangetoond dat vitamine D het luchtwegepitheel zou kunnen beschermen tegen luchtweginfecties en schade, door o.a. de epitheliale barrière te versterken, de aanmaak van AMPs (hCAP18/LL-37) te stimuleren en excessieve ontsteking te dempen. Of vitamine D ook zo beschermend is in chronisch ontstoken longweefsel, zoals bij patiënten met chronische longaandoeningen zoals COPD, moet echter nog worden uitgezocht.

COPD

COPD is een progressieve longziekte die wordt gekenmerkt door een chronische obstructie van de luchtwegen en afbraak van de longblaasjes die de normale ademhaling verstoort, hetgeen niet volledig omkeerbaar is. De belangrijkste oorzaak van COPD is langdurige blootstelling aan schadelijke deeltjes en gassen, door bijvoorbeeld het roken van sigaretten, maar ook door luchtvervuiling, wat leidt tot een abnormale ontstekingsreactie in de longen. Daarnaast dragen ook andere factoren, zoals genetische aanleg, abnormale longontwikkeling en veroudering, bij aan de ontwikkeling van COPD. COPD is een belangrijke oorzaak van chronische morbiditeit en is momenteel de derde doodsoorzaak ter wereld. Helaas is er nog geen medicijn dat genezing mogelijk maakt en zijn de huidige behandelingen voornamelijk gericht op het remmen van de ontsteking en het verlichten van benauwdheidsklachten. Een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in COPD zijn longaanvallen oftewel exacerbaties. Dit zijn episodes van acute verergering van symptomen (benauwdheid, slijmproductie, hoesten), die aanvullende therapie en mogelijk ziekenhuisopname vereisen. Exacerbaties versnellen de progressie van de ziekte en vormen een aanzienlijke belasting voor gezondheidszorgsystemen wereldwijd, omdat deze patiënten vaak met benauwdheidsklachten in het ziekenhuis terecht komen. Exacerbaties worden voornamelijk veroorzaakt door respiratoire virale en bacteriële infecties, maar ook

door blootstelling aan luchtverontreiniging. Zoals eerder al besproken, verhoogt de verstoorde epitheliale afweer in de luchtwegen van COPD patiënten de kans op infecties, en daarbij dus ook de kans op COPD exacerbaties. Bovendien hebben meerdere studies nu aangetoond dat COPD patiënten over het algemeen lagere vitamine D waarden hebben ten opzichte van gezonde personen, en COPD patiënten met lagere vitamine D waarden hebben vaker en meer ernstigere exacerbaties. Het bestuderen van het beschermende effect van vitamine D op de barrière functie van het luchtwegepitheel en bij exacerbaties in COPD patiënten zou daarom aanvullend inzicht kunnen verschaffen in het belang van monitoren van de vitamine D status en vitamine D suppletie van COPD patiënten met een vitamine D tekort.

Doel proefschrift

Het doel van dit proefschrift is om het effect van ontsteking op de beschermende effecten van vitamine D bij chronische luchtwegaandoeningen te onderzoeken, met name bij COPD. In de experimentele studies die in dit proefschrift worden beschreven, worden de effecten van vitamine D (inactief 25(OH)D en actief 1,25(OH)₂D) en ontsteking bestudeerd met behulp van celkweek modellen van primaire bronchiale epitheelcellen (afkomstig uit de grotere luchtwegen van de long). In deze modellen worden de effecten bestudeerd van ontsteking en van toxische- en microbiële blootstellingen zoals sigarettenrook (**Hoofdstuk 2**), cytokinen (**Hoofdstuk 3 en 4**), bacteriën (**Hoofdstuk 4**) en virussen (**Hoofdstuk 5**) op afweermechanismen van het luchtwegepitheel, zoals de expressie van het AMPs.

Resultaten

Effecten van sigarettenrook en TGF- β 1 op afweermechanismen van het luchtwegepitheel

Bacteriële en virale infecties zijn belangrijke veroorzakers van COPD exacerbaties en het luchtwegepitheel speelt een centrale rol bij het orkestreren van afweermechanismen tegen de pathogenen die deze infecties veroorzaken. Eerdere studies hebben echter aangetoond dat de barrièrefunctie van het luchtwegepitheel bij COPD patiënten bepaalde defecten vertoont, zoals een verlaagde doordringbaarheid van de epitheliale cellaag, verhoogde slijmproductie en een afname van de trilhaarfunctie. Als gevolg van deze defecten hoopt het slijm zich op in de luchtwegen en is de gevoeligheid voor bacteriële en virale infecties groter, wat de kans op exacerbaties en verdere ziekte progressie doet toenemen. Een belangrijke oorzaak van het ontstaan van deze defecten is het roken van sigaretten en vaak ziet men dat ook “gezonde” rokers in het algemeen vatbaarder zijn voor luchtweginfecties.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we daarom in een celkweekmodel hoe sigarettenrook de afweermechanismen van het luchtwegepitheel beïnvloedt. In de studie die in dit hoofdstuk wordt beschreven, hebben we luchtwegepitheelcellen dagelijks blootgesteld aan sigarettenrook tijdens de uitrijping (differentiatie) van basale cellen naar gespecialiseerde club-, goblet- of trilhaarepitheel cellen. We ontdekten dat blootstelling aan sigarettenrook de uitrijping van basale epitheliale cellen naar gespecialiseerde club-, goblet- en trilhaarepitheelcellen afremt. Hierdoor werd ook de productie van bepaalde afweermediatoren zoals AMPs, die met name door gespecialiseerde club- en gobletcellen worden aangemaakt, sterk gereduceerd. Als gevolg van de afgenomen specialistische cel populaties, was ook de afweer tegen bepaalde pathogene bacteriën lager. Dit geeft aan dat blootstelling aan sigarettenrook een duidelijke impact kan hebben op antibacteriële afweermechanismen van het luchtwegepitheel door de uitrijping van het epitheel te onderdrukken. Via welke mechanismen sigarettenrook de uitrijping van het luchtwegepitheel beïnvloedt is vooralsnog niet bekend.

Een aanwijzing voor de betrokkenheid van TGF- β 1 als een mogelijk mechanisme voor het remmende effect van sigarettenrook op de uitrijping van het luchtwegepitheel wordt gegeven in **Hoofdstuk 3**. TGF- β 1 is een cytokine dat o.a.

geassocieerd is met fibrose en is ook in verhoogde mate aanwezig in de luchtwegen van zowel astma als COPD patiënten. Studies in gekweekt luchtwegepitheel hebben tevens laten zien dat de aanmaak van TGF- β 1 verhoogd kan worden door blootstelling aan sigarettenrook. In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat TGF- β 1 vergelijkbare effecten heeft op de uitrijping en de afweermechanismen van het luchtwegepitheel als sigarettenrook. Korte blootstellingen aan TGF- β 1 bleken al voldoende te zijn om niet alleen de aantallen gespecialiseerde club- en gobletcellen te verlagen, maar ook de aanmaak van AMPs en andere afweermoleculen.

Effecten van TGF- β 1 op vitamine D-afhankelijke afweermechanismen van het luchtwegepitheel

Eerdere studies hebben aangetoond dat vitamine D effecten van TGF- β 1, zoals inductie van fibrose, zou kunnen tegengaan. Om te onderzoeken of vitamine D ook de nadelige effecten van TGF- β 1 op zowel uitrijping als aanmaak van afweermoleculen kan tegengaan, hebben we in **Hoofdstuk 3** luchtwegepitheel blootgesteld aan zowel vitamine D als TGF- β 1. Helaas kon vitamine D deze nadelige effecten van TGF- β 1 op het luchtwegepitheel niet tegengaan. Verder laten we zien dat TGF- β 1 de beschermende effecten van vitamine D op het luchtweg epitheel afremt, zoals de inductie van het AMP hCAP18/LL-37. Een verklaring hiervoor kan gevonden worden in de observatie dat TGF- β 1 de productie van CYP24A1, het enzym dat vitamine D afbreekt, in het luchtwegepitheel sterk verhoogt. Kort samengevat hebben we in dit hoofdstuk laten zien dat TGF- β 1 erg nadelig is voor zowel de vitamine D-afhankelijke als vitamine D-onafhankelijke afweermechanismen van het luchtwegepitheel.

Effecten van ontstekingsmoleculen op vitamine D-metabolisme en vitamine D-afhankelijke afweermechanismen van het luchtwegepitheel

Naast blootstellingen aan sigarettenrook en TGF- β 1, zijn de luchtwegen van COPD en astma patiënten in een chronische staat van ontsteking. Dat betekent dat het luchtwegepitheel dus constant wordt blootgesteld aan ontstekingsmoleculen, zoals TNF- α , IL-1 β en IL-17A, die vrijkomen uit o.a. immuuncellen. In **Hoofdstuk 4** wilden we daarom de effecten onderzoeken van deze ontstekingsmoleculen op de werking en de omzetting van vitamine D in het luchtwegepitheel.

Luchtwegeepitheelcellen werden eerst twee weken lang blootgesteld aan ontstekingsbevorderende mediators zoals TNF- α , IL-1 β en IL-17A, en vervolgens behandeld met inactief vitamine D (25(OH)D) of actief vitamine D (1,25(OH) $_2$ D). We vonden dat blootstelling aan ontstekingsbevorderende mediators, net als TGF- β 1, de aanmaak van het enzym CYP24A1 verhoogt. Dit kan de afbraak van vitamine D verder verhogen met als gevolg dat het vermogen van vitamine D om de aanmaak van het AMP hCAP18/LL-37 te stimuleren in het luchtwegeepitheel sterk wordt verlaagd. Vervolgens hebben we ook m.b.v. een “killing assay” laten zien dat als gevolg van blootstellingen aan ontstekingsbevorderende mediators ook de vitamine D-afhankelijke antimicrobiële activiteit tegen een bekend luchtwegpathogeen, het niet-typeerbare *Haemophilus influenzae* (NTHi), was verminderd.

Effecten van type 2 ontsteking op de omzetting van vitamine D

In tegenstelling tot de bevindingen in hoofdstukken 3 en 4, waarin we aantoonde dat TGF- β 1 en ontstekingsbevorderende mediators de beschermende effecten van vitamine D nadelig beïnvloedden, laten we in **Hoofdstuk 5** laten zien dat de aanwezigheid van een ander type ontsteking in feite het tegenovergestelde doet. Dit type ontsteking, ook wel bekend als type 2 ontsteking, kenmerkt zich door verhoogde waarden van eiwitten afkomstig van een specifieke groep van T cellen, de T-helpercel 2 (Th2), namelijk de cytokinen IL-4 en IL-13. Dit is typerend voor patiënten met allergisch astma, maar daarnaast kunnen ook COPD patiënten verhoogde IL-4 en IL-13 waarden hebben. We toonden in dit hoofdstuk aan dat blootstelling van luchtwegeepitheelcellen aan de Th2 cytokinen IL-13 en IL-4, de aanmaak van het enzym CYP27B1 verhoogt. CYP27B1 bevordert de omzetting van het circulerende, maar nog inactieve vitamine D (25(OH)D) naar het actieve vitamine D (1,25(OH) $_2$ D). Door deze hogere expressie van CYP27B1 was dus het vermogen van het inactieve vitamine D om de aanmaak van hCAP18/LL-37 in het luchtwegeepitheel te induceren juist toegenomen.

Dempende effecten van vitamine D op virus-afhankelijke ontstekingsreacties in het luchtwegepitheel

COPD exacerbaties worden voornamelijk veroorzaakt door respiratoire virale infecties, bacteriële (secundaire) infecties en blootstelling aan luchtverontreiniging. Wanneer het luchtwegepitheel wordt geïnfecteerd, herkennen de receptoren van het luchtwegepitheel bepaalde pathogeen-karakteristieke moleculen, en scheidt het luchtwegepitheel vervolgens als reactie diverse ontstekings- en afweermediatoren uit. Deze mediators kunnen enerzijds pathogenen uitschakelen (AMPs, interferonen en vrije zuurstofradicalen) of anderzijds het herstel bevorderen (groeifactoren) of immuuncellen aantrekken vanuit de bloedbaan (cytokinen en chemokinen) om de infectie te helpen klaren. Als gevolg van zowel de infectie zelf en de immuunrespons als reactie op de infectie ontstaat schade aan de longen, die niet altijd meer voldoende kan worden hersteld. Om de gevolgen en de ernst van de exacerbaties in deze patiënten te verlagen, zijn er strategieën nodig die zowel de afweer tegen infecties verhogen en tegelijk de schadelijke immuunreactie dempen. We onderzochten daarom in **Hoofdstuk 5** of vitamine D in het luchtwegepitheel in staat is om, naast het bevorderen van afweer tegen infecties, ook de ontsteking ten gevolge van een virusinfectie kan dempen. We hebben in dit hoofdstuk laten zien dat behandeling van gekweekt luchtwegepitheel met actief vitamine D een door Poly[I:C] (synthetisch dubbelstrengs RNA, wat een virusinfectie nabootst) getriggerde uitscheiding van ontstekingsbevorderende cytokinen en chemokinen kan remmen. Mogelijk remt vitamine D hierdoor ook de influx van immuuncellen, wat de schade na een virale infectie of exacerbatie kan beperken.

Studie naar de effecten van vitamine D-suppletie op exacerbaties in COPD patiënten

Eerdere gerandomiseerde klinische studies (randomized controlled trials; RCTs) in een populatie van zowel vitamine D- sufficiënte en deficiënte patiënten laten zien dat vitamine D suppletie de incidentie van acute luchtweginfecties alleen verlaagt bij patiënten met een vitamine D deficiëntie. Deze bevindingen suggereren dat vitamine D suppletie nuttig kan zijn om ook het aantal exacerbaties in COPD patiënten te verlagen, omdat dit frequent veroorzaakt wordt door zowel virale als bacteriële infecties. Om te beoordelen of suppletie van vitamine D inderdaad het aantal exacerbaties bij COPD kan verminderen bij juist de COPD patiënten, die

vitamine D deficiënt zijn, is een multicenter RCT ontworpen. In deze studie worden de effecten van vitamine D suppletie onderzocht in een studiepopulatie die, in tegenstelling tot eerdere RCT's, bestaat uit vitamine D-deficiënte patiënten (serum [25(OH)D] 15 - 50 nmol/L). De opzet, het protocol en de uitleesparameters van de studie worden beschreven in **Hoofdstuk 6**. Ten slotte hebben we in **Hoofdstuk 7** de huidige kennis over de effecten van o.a. COPD-gerelateerde factoren, zoals ontsteking en blootstelling aan schadelijke deeltjes en gassen (zoals aanwezig in sigarettenrook en luchtvervuiling) op de lokale werking van vitamine D in de luchtwegen gebundeld. Verder wordt in dit hoofdstuk dieper ingegaan op de mogelijke gevolgen van een beperkte beschikbaarheid of activatie van (lokaal) vitamine D in de longen en laat dit hoofdstuk zien dat dit mogelijk consequenties kan hebben op het gebied van gevoeligheid voor infecties, ontstekingen en exacerbaties.

Discussie

Van veel factoren die bijdragen aan de ontwikkeling en verergering van COPD, zoals chronische blootstelling aan sigarettenrook of luchtvervuiling en aanwezigheid van ontstekingsmediatoren (zuurstofradicalen, proteolytische enzymen, cytokinen en chemokinen), is bekend dat ze de epitheliale barrière kunnen verzwakken. Verder kan mede door het chronische karakter van deze blootstellingen ook de schade niet meer volledig worden hersteld. Het versterken van zowel de epitheliale afweer als het vermogen tot herstel van de epitheliale barrière kan daarom een goede strategie zijn om de achteruitgang in het ziektebeloop te stoppen. Ten eerste kan er verder onderzoek worden gedaan naar precieze defecten in de functie van het luchtwegepitheel bij COPD, en met name in de voorlopercellen, zodat deze defecten in de toekomst gerepareerd kunnen worden met medicijnen die daarop aangrijpen. Ten tweede kan verder onderzoek zich richten op een aanpak die het lokale milieu in de longen verbetert m.b.v. micronutriënten zoals vitamine D, zodat het luchtwegepitheel beter beschermd is tegen epitheliale schade als gevolg van ontsteking en infecties.

In de studies die in dit proefschrift worden gepresenteerd, hebben we echter aangetoond dat bepaalde luchtwegontstekingsmediatoren mogelijk het vitamine D

metabolisme zouden kunnen verstoren door de expressie van CYP24A1 te bevorderen, waardoor het vitamine D wordt afgebroken. Daarom moeten toekomstige studies naar COPD, en ook naar andere chronische ontstekingsziekten die verband houden met vitamine D tekort, worden ontworpen met meer aandacht voor het verhogen van lokale waarden van actief vitamine D door bijvoorbeeld de verhoogde expressie van CYP24A1 te verlagen. Een effectieve remming van ontsteking kan hier een belangrijke bijdrage aan leveren. Tot slot zullen deze nieuwe inzichten mogelijke nieuwe strategieën opleveren om de lokale activiteit van vitamine D te verbeteren om zo COPD patiënten beter te beschermen tegen luchtweginfecties en exacerbaties.

