

Obesity and pulmonary host defense

Citation for published version (APA):

Ubags, N. D. J. (2016). *Obesity and pulmonary host defense*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160324nu>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160324nu](https://doi.org/10.26481/dis.20160324nu)

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

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



SUMMARY

Obesity is a rapidly expanding epidemic globally, and is associated with dysregulation of the innate immune response. Multiple organ systems are affected by obesity, including the respiratory system. Pulmonary host defense is crucial in the fight against invading pathogens in numerous respiratory diseases, including respiratory infections and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Conflicting evidence exist on the effect of obesity on susceptibility to and outcome of both respiratory infections and ARDS. This thesis sheds light on the mechanisms underlying the altered pulmonary innate immune and host defense in obesity.

In **Chapter 1** we provide a critical review of the current literature regarding the key players in this thesis: obesity and host defense. Hereby looking into which parts of obesity and its associated comorbidities may be involved in the alterations of the pulmonary innate immune response and consequently host defense. Neutrophils and macrophage play major roles in host defense and previous studies indicated that obese subjects with ARDS had lower levels of several pro-inflammatory cytokines, suggesting that the inflammatory response may be altered in patients with ARDS and a high Body Mass Index (BMI). The aims and outline of this thesis was described in **Chapter 2**. In **Chapter 3** the effects of obesity on pulmonary innate immune response and subsequently neutrophil behavior in pulmonary host defense were examined. We demonstrated that obesity attenuates the inflammatory response in an inhaled lipopolysaccharide (LPS) model of murine Acute Lung Injury (ALI), which led to a reduction in both pulmonary neutrophilia and injury in two different mouse models of obesity. In addition, the early pulmonary cytokine response was found to be normal and circulating neutrophil levels were increased in obese mice. The witnessed attenuation of pulmonary neutrophilia in the obese mice was shown to be due, in part, to obesity-associated abnormalities in CXCR2 signaling with associated defects in neutrophil chemotaxis. Altogether, these data suggest that neutrophil dysfunction plays a prominent role in the complex, multifactorial process underlying the obesity-associated attenuation of lung injury.

To further extend these findings on the effects of obesity on neutrophil function and its role in respiratory diseases, it was hypothesized that obesity-associated impairment of neutrophil function contributes to the increased risk for respiratory infection, yet that significant differences may exist between commonly used mouse models of obesity. The four murine models of obesity used in this study were: diet-induced obese mice (DIO), db/db mice (ObRb deficient), CPE^{fat/fat} mice (mutation in carboxypeptidase E) and ob/ob mice (leptin-deficient). As described in **Chapter 4**, this study revealed that there is an obesity-associated defect in host defense to bacterial pneumonia in mice. However, the course and severity of the infection, as well as the underlying mechanisms may be dependent on the obese mouse model used. Neutrophil function, which is shown to be crucial in pulmonary host defense, was found to be defective in obese animals. The impaired cytokines transcription, cell survival, downstream signaling response as well as neutrophil chemoattractant response may all contribute to the observed impairment in

pulmonary host defense. However, the extent to which pulmonary host defense is impaired and neutrophil function is defective depends on the obese mouse model used. In conclusion, the diet-induced obesity model was found to mimic the human situation the best, since obesity is induced by a high fat diet in this model and factors associated with the metabolic syndrome were moderately elevated, as described in this Chapter.

Given the fact that obesity is associated with increased development for ARDS, yet is also associated with rapid attenuation of the inflammatory response and improved outcomes in both patients and animal models (**Chapter 3**), the possible mechanisms controlling this paradoxical 'shift' in the inflammatory environment of the lung following injury were examined in **Chapter 5**. Alveolar macrophage numbers are increased and showed baseline activation in uninjured diet-induced obese mice. Furthermore, increased lipid deposition was observed in alveolar macrophages from obese mice at baseline, which may, in part, explain the baseline activation. Whereas a more pro-inflammatory alveolar macrophage phenotype was observed at baseline in obese mice, this phenotype appeared to shift towards a more anti-inflammatory state after established lung injury, suggesting that obesity modulates the alveolar macrophage response in murine ARDS. Taken together, these results suggested that the phenotype 'shift' observed in alveolar macrophages from obese mice may underlie the paradoxical effects seen in obese ARDS, where there is an increased susceptibility, yet an improved outcome.

Obesity is associated with adipokine dysregulation and consequently a leptin-resistant state. The adipokine leptin, also known as the satiety hormone, is a critical mediator of the balance between food intake and energy expenditure and plays an important role in several physiological processes and has implications in the pathogenesis of disease. **Chapter 6** provides a state-of-the-art overview on leptin and its functional role on the different resident cell types of the lung in health as well as in the context of respiratory diseases. Leptin was shown to be upregulated in the lung following injury and to exert diverse effects on leukocytes, influencing both chemotaxis and survival, which are the two key processes involved in the development of pulmonary neutrophilia in ALI. Therefore, the role of leptin on the development of pulmonary neutrophilia in infection and ALI was examined in **Chapter 7**. Pulmonary leptin levels were shown to be upregulated in both humans and mice following bacterial- and viral- induced pneumonia and ALI. Moreover, leptin was found to enhance pulmonary neutrophilia through, in part, leptin's action as a neutrophil chemoattractant as well as its effects on neutrophil survival, and intact leptin signaling was shown to be critical in pulmonary host defense.

Conditions associated with high circulating leptin levels (as observed in obesity) have been associated with an increased risk to develop pneumonia. In **Chapter 8** a translational approach was used to investigate whether obesity-associated hyperleptinemia could be linked to the impaired response to pulmonary pathogens and increased susceptibility to infections. Plasma leptin levels were shown to be positively correlated with the risk for respiratory infection independent of BMI in healthy subjects. In addition, in patient with severe pneumonia resulting in ARDS, plasma leptin levels

were positively correlated with subsequent mortality. Similar results were found in a murine model of diet-induced obesity with pneumonia, in which plasma leptin levels were associated with pneumonia severity. To further determine whether the associations between plasma leptin levels and pneumonia severity in the obese mice were due to leptin itself or other obesity-related factors, a mouse model of lean experimentally-induced hyperleptinemia was tested. The previous obtained results were confirmed in this model. Taken together, these studies showed that the observed effects of obesity on respiratory infection are attributable to increased systemic leptin levels independent of other metabolic and mechanical factors.

The insights resulting from the original research data described in this thesis (**Chapter 2-8**) were critically evaluated and integrated with current knowledge in **Chapter 9**, in order to provide exciting future perspectives. This chapter discussed the interplay of obesity and pulmonary host defense and focused on 1) the role metabolic variables and how they may contribute to the existence of the “obesity paradox” described in respiratory infections and ARDS, and 2) the importance of leptin and, in particular, balanced leptin levels, in pulmonary host defense. Furthermore, this chapter provides ample novel ideas and/or approaches to support the search for the impact of obesity and leptin dysregulation on respiratory diseases. It can be concluded that better insight into the pathogenesis of both respiratory infection and ARDS in obese subjects may direct future treatment strategies and may avoid progression of the disease to a more severe state and eventually decrease mortality.



SAMENVATTING

De longen dragen zorg voor de verdeling van zuurstof door het lichaam via het bloed. De long is dus één van de belangrijkste orgaansystemen van het lichaam. Behalve de afgifte van zuurstof aan het bloed hebben de longen nog meerdere belangrijke functies. De longen vormen ook een belangrijke barrière in het tegenhouden van schadelijke organismen of stoffen die het lichaam via inademing kunnen binnendringen. De afweerrespons van de long is dus cruciaal in het gevecht tegen ziekteverwekkers die bijvoorbeeld een longinfectie kunnen veroorzaken of kunnen leiden tot het ontstaan van longschade. Indien de afweerrespons van de long niet goed werkt kan een longinfectie in het ergste geval leiden tot het ontstaan van Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). ARDS kan ontstaan ten gevolge van een longinfectie als ook door een ziekte elders in het lichaam. ARDS wordt gekenmerkt door een hevige ontstekingsreactie waardoor vocht, eiwitten en ontstekingscellen uit de bloedvaten treden en in het longweefsel terecht komen.

Obesitas dat gekenmerkt wordt door een Body Mass Index (BMI) van meer dan 30 kg/m^2 wordt gezien als een steeds verder uitbreidende epidemie. Obesitas is meer dan alleen overgewicht. Het gaat ook vaak gepaard met een hoge bloeddruk, slechte cholesterol waarden in het bloed en een verstoorde suikerspiegel. Samen worden deze kenmerken ook wel het metabool syndroom genoemd. Obesitas wordt ook wel geassocieerd met een ontregelde afweerrespons van het lichaam. Verschillende orgaan systemen kunnen beïnvloed worden door obesitas, waaronder de longen. Momenteel bestaan er tegenstrijdige bewijzen over het effect van obesitas op het ontstaan en verloop van zowel longinfecties als ook ARDS. In dit proefschrift worden de mechanismen onderliggend aan de verandering in de afweerrespons van de long, die gezien worden in obesitas, uitgediept en beschreven.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht weergegeven van de belangrijkste literatuur die op dit moment voorhanden is over de twee belangrijkste elementen van dit proefschrift: obesitas en de afweerrespons van de long. Hierbij is er gekeken naar welke factoren die gepaard gaan met obesitas van invloed kunnen zijn op de veranderingen van de afweerrespons in de long. Neutrofielen en macrofagen zijn twee soorten ontstekingscellen die een belangrijke rol spelen in de afweer reactie van de longen. In voorgaande studies is er aangetoond dat in obese patiënten met ARDS de gehalten van verscheidene ontstekingsbevorderende stoffen lager zijn. Dit suggereert dat de ontstekingsreactie in het bloed van patiënten met een hoog BMI veranderd kan zijn. De doelstelling en hypothese van het onderzoek uitgevoerd in dit proefschrift is beschreven in **Hoofdstuk 2**. In **Hoofdstuk 3** zijn de effecten van obesitas op de afweerrespons van de long onderzocht, en meer specifiek is er gekeken naar het effect van obesitas op het gedrag en de functie van neutrofielen en hoe zij bijdragen aan de afweer van de long. Wij hebben aangetoond dat obesitas de ontstekingsreactie in de long vermindert na blootstelling aan een onderdeel van gram-negatieve bacteriën, lipopolysaccharide (LPS) genaamd, door inhalatie, en dat dit resulteerde in een verlaging van het aantal neutrofielen in de long in twee verschillende muismodellen van obesitas. LPS

blootstelling wordt gebruikt als een model van acute longschade, ook wel gezien als een milder stadium van ARDS. Verder werd er gevonden dat de waarden van ontstekingsstoffen in de longen van obese muizen normaal waren, maar dat het aantal neutrofielen in het bloed van obese muizen verhoogd was in vergelijking met de aantallen in muizen met een normaal gewicht. De verminderde aantallen neutrofielen in de long van obese muizen na opwekken van acute longschade valt gedeeltelijk te wijten aan obesitas-geassocieerde abnormaliteiten in de CXCR2 signalering van neutrofielen die vervolgens defecten in neutrofiel migratie kunnen veroorzaken. Deze gegevens samen suggereren dat disfunctie van neutrofielen een belangrijke rol speelt in het complexe en multifactoriële proces dat ten grondslag ligt aan de obesitas-geassocieerde vermindering van acute longschade.

Om de bevindingen van de effecten van obesitas op de neutrofiel functie en de rol hiervan in longziekten verder uit te diepen, was de hypothese van de volgende studie dat de obesitas-geassocieerde verminderde neutrofiel functie bij kan dragen aan het verhoogde risico op long infecties. Tevens is er onderzocht of er verschillen bestaan tussen de verscheidene veelgebruikte muis modellen van obesitas, te weten: dieet-geïnduceerde obese muizen (DIO), db/db muizen (deficiëntie in ObRb), CPE^{fat/fat} muizen (mutatie in carboxypeptidase E) en ob/ob muizen (leptine deficiënt). Zoals in **Hoofdstuk 4** beschreven wordt, laat deze studie zien dat er een obesitas-geassocieerd defect is in de afweerrespons van de long na het veroorzaken van een bacteriële infectie in deze muizen. Het is gebleken dat het verloop en de ernst van de infectie, alsook de onderliggende mechanismen, afhankelijk zijn van welk muismodel van obesitas er gebruikt werd. Een gedegen functie van de neutrofielen is cruciaal in de afweerrespons van de long, en in deze studie werd er aangetoond dat deze functie verminderd is in obese muizen. De verminderde capaciteit van de neutrofiel om te migreren naar de plaats van infectie, alsook de verminderde afgifte van ontstekingsstoffen die het immuunsysteem verder activeren, de verandering in levensduur en signaleringsrespons dragen allen bij aan de vermindering van de afweerrespons in de long zoals deze gezien werd in obesitas. De mate waarin deze vermindering van de pulmonale afweerrespons en neutrofiel functie wordt waargenomen lijkt sterk afhankelijk te zijn van het obese muismodel dat gebruikt werd en dit kan te maken hebben met de variabele mate waarin factoren gerelateerd aan het metabool syndroom veranderd zijn. Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat het muismodel, waarin obesitas geïnduceerd wordt door middel van een hoog vet dieet, de humane situatie het beste weergeeft.

Obesitas is geassocieerd met een verhoogd risico voor het ontwikkelen van ARDS, maar is aan de andere kant ook geassocieerd met een snelle resolutie van de ontstekingsreactie en verbeterde prognose in zowel ARDS patiënten alsook in muismodellen met ARDS (**Hoofdstuk 3**). De mechanismen die ten grondslag liggen aan deze tegenstrijdige verandering in de pulmonale ontstekingsreactie ten gevolge van acute longschade werden onderzocht in **Hoofdstuk 5**. Het aantal macrofagen in de longen van obese muizen was verhoogd en deze macrofagen lieten ook een

ontstekingsbevorderend karakter zien. Verder bleken er ook vetdruppels aanwezig in de macrofagen van obese muizen, waarmee het ontstekingsbevorderende karakter gedeeltelijk verklaard kan worden. Na het induceren van acute longschade in deze muizen bleken de macrofagen een meer ontstekingsremmend karakter te hebben. Dit suggereert dat obesitas het macrofaag karakter in de long kan veranderen gedurende het verloop van de ontwikkeling van acuut longschade in deze muizen. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk laten zien dat er een verandering plaatsvindt in het karakter van de macrofagen in de longen van obese muizen, en deze kunnen ten grondslag liggen aan de tegenstrijdige resultaten die gezien worden in obese patiënten met ARDS, welke een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van ARDS maar waarbij het verloop en de prognose van de ziekte verbeterd is.

Obesitas gaat gepaard met een ontregeling van adipokine gehaltenes in het bloed. Eén van de meest bekende adipokines is leptine, ook wel bekend als verzadigingshormoon. Leptine speelt een belangrijke rol bij het reguleren van voedsel inname alsook verscheidene fysiologische processen. In **Hoofdstuk 6** wordt een overzicht van de recente literatuur weergegeven waarin de rol van leptine op de verschillende cel types die de long bevat uitgediept in de context van zowel de gezonde situatie alsook in longziekten. Het is aangetoond dat leptine gehaltenes in de long kunnen stijgen na het ontstaan van longschade, en verder kan leptine immuun cellen, zoals neutrofielen, beïnvloeden. De rol van leptine op het ontwikkelen van een neutrofiel ophoping in de long gedurende een longinfectie en acute longschade werd onderzocht in **Hoofdstuk 7**. Leptine gehaltenes in de long waren verhoogd in zowel humaan alsook muizen longweefsel na een bacteriële of virale longinfectie. Verder werd er aangetoond dat leptine het aantal neutrofielen in de long kan verhogen. Dit wordt mede veroorzaakt doordat leptine migratie van neutrofielen naar de long stimuleert, maar ook doordat leptine ervoor zorgt dat de neutrofielen in de long een langere levensduur hebben.

Er zijn verschillende condities (obesitas, maar ook zwangerschap, nierfalen en diabetes) waarbij we hoge leptine gehaltenes in het bloed (hyperleptinemie) zien, welke geassocieerd zijn met een verhoogd risico voor het ontwikkelen van longinfecties. In **Hoofdstuk 8** is er gebruik gemaakt van een translationele studie opzet om de relatie tussen obesitas-geassocieerde hyperleptinemie en de verminderde afweerrespons in de long te onderzoeken. Leptine gehaltenes in het bloed correleren positief met het risico voor het ontwikkelen van een longinfectie, ongeacht het BMI en factoren van het metabool syndroom in gezonde mensen. Verder correleerde leptine in het bloed ook positief met mortaliteit in patiënt met een ernstige longinfectie die tot ARDS was overgegaan. Vergelijkbare resultaten werden gevonden in een muismodel waarin obesitas geïnduceerd wordt door middel van een hoog vet dieet met een longinfectie. Om de effecten van verhoogde leptine gehaltenes in bloed te kunnen testen zonder de invloed van een obese omgeving, is er een uniek muis model van experimenteel geïnduceerde hyperleptinemie ontwikkeld. Hierin zijn de humane bevindingen bevestigd. Deze studies laten dus zien dat de effecten die obesitas lijkt te hebben op longinfecties,

gedeeltelijk, gedreven worden door verhoogde systemische leptine gehalten onafhankelijk van andere factoren van het metabool syndroom.

De kennis opgedaan uit de studies in dit proefschrift (**Hoofdstuk 2-8**), zijn kritisch geëvalueerd en geïntegreerd met de huidige kennis in de literatuur in **Hoofdstuk 9**. Verder zijn er ook aanbevelingen gedaan voor vervolgonderzoek. De actie van obesitas op de pulmonale afweerrespons wordt hier beschreven met een focus op 1) de rol van metabole variabelen en hoe deze kunnen bijdragen aan het bestaan van de obesitas paradox zoals beschreven voor longinfecties en ARDS, en 2) het belang van leptine, en meer specifiek de balans van leptine gehalten, in de pulmonale afweerrespons. Dit hoofdstuk bevat ook nieuwe ideeën en technieken om het onderzoek naar obesitas en dysregulatie van leptine op longziekten te kunnen blijven onderzoeken. Het is dus cruciaal om vernieuwde en verbeterde inzichten te krijgen in het ziektebeeld van zowel longinfecties alsook ARDS in obese patiënten. Dit kan richting geven aan nieuwe behandelmethoden en daarmee verergering van de ziekte en uiteindelijk mortaliteit verlagen.