
PULMO *Script*

Officieel orgaan van de NVALT

Jaargang 17, nummer 3, september 2007



In dit nummer:

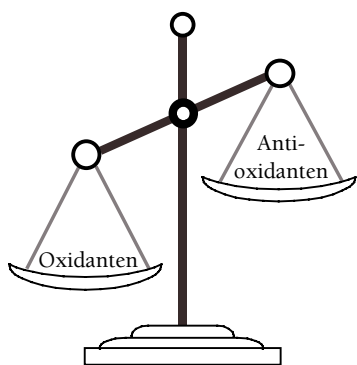
- **Jaarverslag 2006**
- **Reglement Kwaliteitsvisitatie**
- **Pulmopen: Hoe gaan we door?**

Health effects of quercetin: from mechanism to nutraceutical

Agnes Boot promoveerde op 21 december aan de Universiteit van Maastricht en is parttime werkzaam aan de de Universiteit Maastricht en parttime werkzaam aan de IUF in Dusseldorf

Inleiding

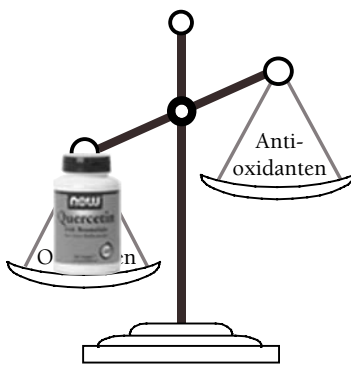
Aërobe levensvormen zijn geassocieerd met de vorming van reactieve zuurstof species (RZS) die schade kunnen berokkenen aan macromolekulen zoals vetten, eiwitten, DNA en RNA. Gelukkig beschikt het menselijk lichaam over een uitgebreid verdedigingsmechanisme tegen RZS-geïnduceerde schade. Dit verdedigingsmechanisme bestaat uit zogenaamde antioxidanten, ofwel moleculen die RZS en andere vrije radicalen kunnen neutraliseren. Om maximale bescherming te kunnen bieden werken anti-alsgevolg van of een te grote RZS productie of een afname van geschikte antioxidanten resulteert in een situatie die ook wel oxidatieve stress genoemd wordt. Oxidatieve stress kan daarom ook wel gedefinieerd worden als een disbalans tussen de productie van en de bescherming tegen RZS (Figuur 1).



Figuur 1: oxidatieve stress

Oxidatieve stress speelt een belangrijke rol in de fysiologie van verschillende chronische, ontstekingsgerelateerde ziektebeelden zoals sarcoidose. Behandeling met exogene antioxidanten zou dan ook raadzaam kunnen zijn om niet alleen deze optreedende oxidatieve stress, maar

hopelijk ook de bijbehorende symptomen van de diverse ziektebeelden te kunnen verminderen (Figuur 2). Dergelijke antioxidant therapie zou met name interessant zijn omdat de huidige behandeling van deze ziektebeelden met bijvoorbeeld glucocorticoiden soms niet volledig effectief blijkt te zijn. Een geschikte kandidaat voor antioxidant therapie zou de flavonoid quercetine, die bekend staat om zijn uitstekende antioxidatieve eigenschappen, kunnen zijn.



Figuur 2: effect van antioxidant therapie

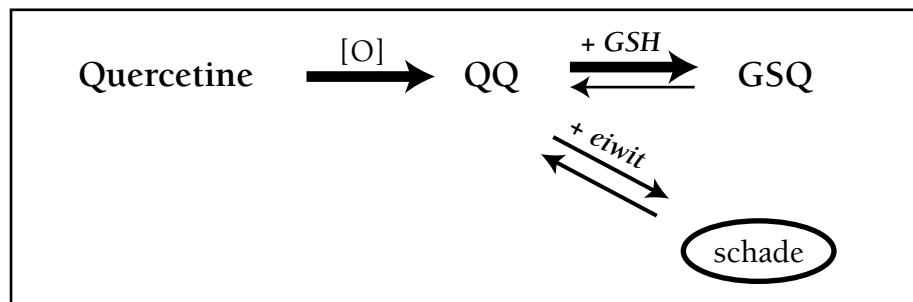
Belangrijkste *in vitro* bevindingen

Allereerst hebben we in diverse *in vitro*

studies aangetoond dat catechol-bevattende antioxidanten zoals quercetine inderdaad uitstekend in staat zijn om RZS en andere vrije radicalen weg te vangen en op deze manier bescherming te bieden tegen oxidatieve schade aan bijvoorbeeld vetten, ook wel lipide peroxidatie genoemd. Tijdens het uitvoeren van deze antioxidant activiteit worden er echter diverse catechol oxidatieproducten gevormd, zoals bijvoorbeeld semiquinone radicalen en quinonen.

Het belangrijkste oxidatieproduct van quercetine is een ortho-quinone, weergegeven als QQ. QQ heeft vier tautomeren, te weten het ortho-quinone en drie quinone-methides. De reactie van QQ met twee van de meest belangrijke en veelvoorkomende antioxidanten, namelijk vitamine C and GSH, is nader onderzocht. Hierbij is gebleken dat vitamine C in staat is om QQ te recyclen tot zijn moederstof quercetine, terwijl de reactie van GSH met QQ juist leidt tot de vorming van 2 nieuwe producten, zogeheten glutathionyl adducten (GSQ). QQ reageert vele malen sneller met GSH dan met vitamine C. In afwezigheid van GSH zal QQ reageren met andere thiole, bijvoorbeeld van eiwitten, en ook deze reactie kan niet voorkomen worden door vitamine C.

Samengevat kan uit de *in vitro* data geconcludeerd worden dat GSH de belangrijkste reactant van QQ is (Figuur 3). Deze reactie zorgt voor de vorming van een adduct tussen QQ en GSH, ook wel GSQ



Figuur 3: de *in vitro* data laten zien dat GSH de belangrijkste reactant is van QQ

genoemd. GSQ is niet stabiel; het dissocieert snel tot GSH en QQ met een halfwaardetijd van 2 minuten. Deze resultaten indiceren dat, zolang de GSH concentratie hoog is, QQ gevangen zal worden in GSQ. Op deze manier beschermt GSH tegen QQ. Bij lage GSH concentraties zal het gedissocieerde QQ echter reageren met andere thiolgroepen, zoals bijvoorbeeld eiwit sulfhydryl groepen.

Om deze gevoelige balans tussen de beschermende effecten van quercetine en de mogelijk toxische effecten van zijn oxidatieproducten beter te kunnen definiëren, is het effect van dit flavonoid bestudeerd in een systeem dat dichterbij de *in vivo* situatie staat, te weten long epitheel cellen van een rat (RLE cellen). Quercetine was in staat om deze RLE cellen effectief te beschermen tegen RZS-geïnduceerde DNA schade, maar deze bescherming ging gepaard met een verhoging van markers van celtoxiciteit en celfunctie verlies. Oftewel, zelfs in levende longcellen is quercetine in staat om de ene vorm van toxiciteit uit te wisselen voor een andere, een fenomeen dat als de quercetine paradox wordt geïntroduceerd in het huidige proefschrift. Als gevolg van deze paradox wordt dan ook gesuggereerd dat tijdens het gebruik van antioxidant suppletie er rekening gehouden moet worden met de mogelijke toxiciteit van metabolieten, die gevormd kunnen worden tijdens de eigenlijke antioxidant activiteit van stoffen die vrije radicalen invangen zoals quercetine.

Belangrijkste *in vivo* bevindingen

Aangezien RZS en ontsteking geassocieerd zijn wordt regelmatig gesuggereerd

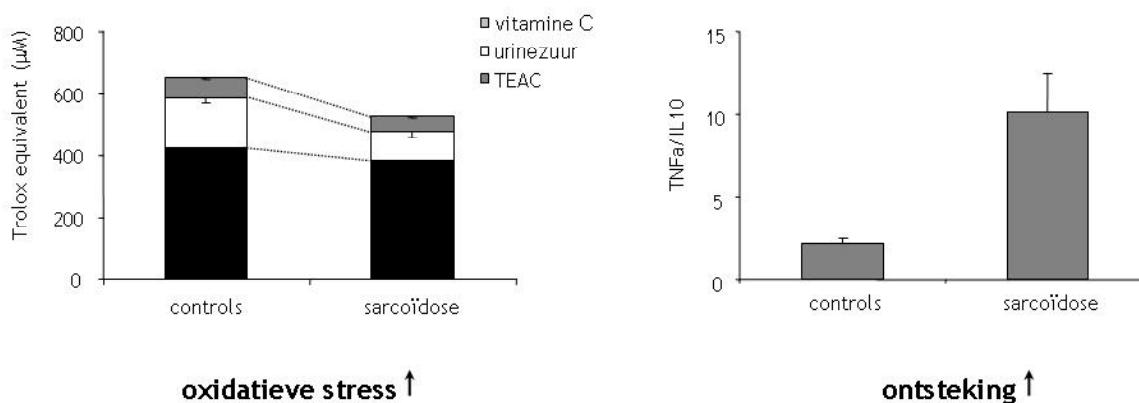
dat een antioxidant zoals quercetine, middels het invangen van RZS, ook in het bezit zou zijn van ontstekingsremmende eigenschappen. Daarom zijn allereerst de ontstekingsremmende effecten van fysiologisch haalbare quercetine concentraties onderzocht. Deze experimenten zijn uitgevoerd in het bloed van gezonde vrijwilligers om de *in vivo* situatie zoveel mogelijk na te bootsen. In deze experimenten is de cytokine productie opgewekt middels *ex vivo* toediening van lipopolysaccharide (LPS), een fysiologisch relevante stimulator van diverse immuuncellen zoals monocytten, neutrofielen en B lymfocyten. De resultaten laten zien dat quercetine in staat was om dosis-afhankelijk de *ex vivo* LPS-geïnduceerde productie van tumor necrosis factor α (TNF α), een belangrijke mediator van ontsteking, te remmen. Dit anti-TNF α effect van quercetine trad al op bij de fysiologisch bereikbare concentratie van 1 μ M. De *ex vivo* LPS-geïnduceerde interleukin (IL)-10 productie werd niet beïnvloed door quercetine.

Het *in vitro* anti-TNF α effect van quercetine liet een grote afhankelijkheid zien ten opzichte van de hoeveelheid TNF α geïnduceerd door LPS; hoe hoger het LPS-geïnduceerde TNF α niveau, des te hoger het remmende effect van quercetine op dit cytokine niveau. Deze bevinding impliceert dat het ontstekingsremmende effect van quercetine toeneemt met de mate van optredende ontsteking.

De *ex vivo* ontstekingsremmende effecten van het flavonoid zijn vervolgens nader bestudeerd middels een quercetine suppletie studie van vier weken in gezonde vrijwilligers, waarin gebruik

werd gemaakt van een quercetine-rijke fruitdrank (97 mg quercetine/dag). Deze suppletie verhoogde zowel de quercetine plasmaconcentratie als de totale plasma antioxidant capaciteit in de gezonde vrijwilligers, maar had geen effect op de basale (*in vivo*) of LPS-geïnduceerde (*ex vivo*) TNF α niveaus. Dit gebrek aan effect is waarschijnlijk te verklaren door de lage cytokine en hoge antioxidant niveaus van de gezonde vrijwilligers op het beginpunt (baseline), die aangeven dat er geen ontsteking of oxidatieve stress aanwezig is. Dit betekent dat quercetine suppletie niet nodig is bij deze vrijwilligers omdat er simpelweg geen schade aanwezig is die verminderd moet worden.

Om na te gaan of sarcoidose patiënten geschiktere kandidaten voor quercetine suppletie zijn dan gezonde vrijwilligers, is de antioxidant- en ontstekingsstatus van deze patiënten bepaald. Het bloed van sarcoidose patiënten vertoonde niet alleen een verlaagde totale plasma antioxidant capaciteit, maar ook verlaagde niveaus van de afzonderlijke endogene antioxidanten GSH, vitamine C en urinezuur. Bovendien waren de niveaus van de ontstekingsbevorderende cytokines TNF α en IL-8 verhoogd in het bloed van sarcoidose patiënten (Figuur 4). Het niveau van de ontstekingsremmende cytokine IL-10 was niet afwijkend in de sarcoidose patiënten ten opzichte van gezonde controles. Deze gevonden cytokine niveaus leidden ertoe dat de ratio's van de ontstekingsbevorderende versus -remmende cytokines TNF α /IL-10 en IL-8/IL-10, regelmatig gebruikte parameters van ontsteking, ook significant verhoogd waren in sarcoidose.



Figuur 4: In sarcoidose zijn markers van oxidatieve stress en ontsteking verhoogd

De *in vitro* ontstekingsremmende effecten van quercetine bleken bovendien veel sterker te zijn in het LPS-behandelde bloed van sarcoidose patiënten dan in dat van gezonde controles. Aangezien de LPS-geïnduceerde cytokine levels ook significant hoger waren in het bloed van deze patiënten, bevestigt deze bevinding het eerder verkregen *in vitro* resultaat dat het ontstekingsremmende effect van quercetine toeneemt met de mate van de optredende ontsteking.

De *in vivo* anti-oxidatieve en ontstekingsremmende effecten van quercetine in mensen die lijden aan zowel oxidatieve stress als ontsteking zijn onderzocht in een dubbelblinde quercetine suppletie studie (4x500 mg oraal binnen 24 uur) die is uitgevoerd met twee groepen niet-rokende, niet-behandelde sarcoidose patiënten. Deze quercetine suppletie verhoogde de antioxidant bescherming, zoals afgeleid kan worden uit de waargenomen verhoging in zowel de quercetine plasmaconcentratie als de totale plasma antioxidant capaciteit. Bovendien resulteerde de quercetine suppletie in een afname van malondialdehyde (MDA), een marker van oxidatieve schade aan vetten. Deze laatste bevinding suggereert dat het versterken van het endogene antioxidant netwerk middels quercetine suppletie inderdaad resulteert in meer bescherming tegen oxidatieve schade, veroorzaakt door reactieve species zoals

RZS. Tenslotte zorgde de quercetine suppletie ook voor een verlaging van zowel de basale (*in vivo*) als de LPS-geïnduceerde (*ex vivo*) ratio's van de ontstekingsbevorderende versus -remmende cytokines TNF α /IL-10 en IL-8/IL-10 (Figuur 5).

Een interessant gegeven is dat zowel de anti-oxidatieve als de ontstekingsremmende effecten van quercetine beduidend sterker leken te zijn wanneer het niveau van respectievelijk de oxidatieve stress of de ontsteking hoger was op het beginpunt (baseline). Deze waargenomen correlatie suggereert dat positieve effecten van antioxidant suppletie inderdaad met name verwacht kunnen worden in mensen met verhoogde oxidatieve stress, zoals bijvoorbeeld patiënten die lijden aan een ziekte waarvan de pathologie geassocieerd is met dit proces. Bovendien ondersteunt deze bevinding de hypothese dat gezonde mensen zonder oxidatieve stress minder baat zullen hebben bij antioxidant suppletie.

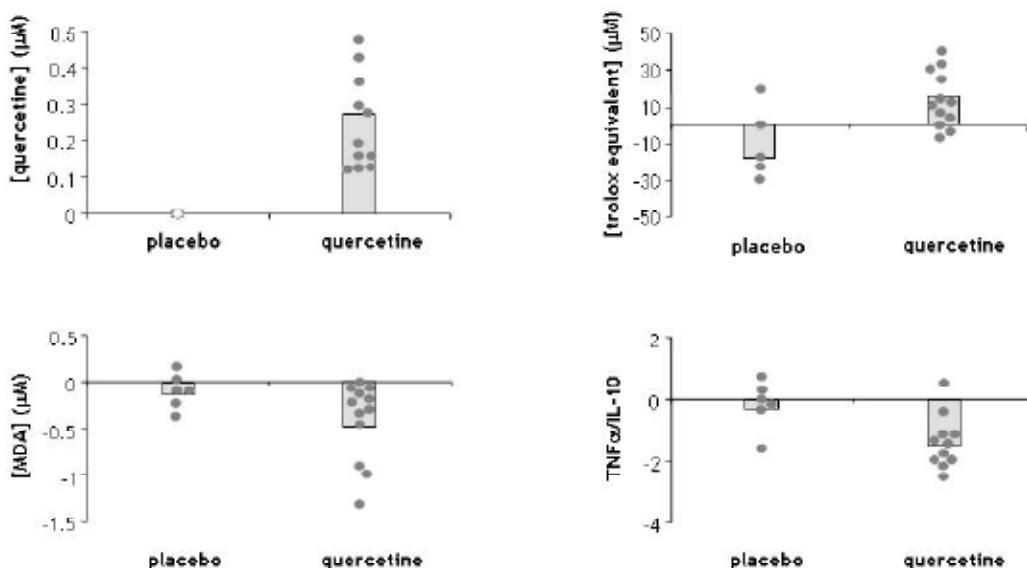
Interessant genoeg had de quercetine suppletie in beide klinische studies geen invloed op de endogene GSH niveaus. Deze bevinding impliceert slechts een beperkt effect van mogelijke thiolreactieve oxidatieproducten in de gebruikte doseringschema's van beide studies, een gegeven dat reeds voorspeld had kunnen worden op basis van de relatief lage quercetine

plasmaconcentraties die in beide studies bereikt zijn (respectievelijk 0.05 en 0.27 mM) in vergelijking met de hoge cellulaire GSH concentraties (1 tot 10 mM). Klaarblijkelijk zal quercetine suppletie alleen tot QQ-geïnduceerde toxiciteit leiden als, ten gevolge van verhoogde oxidatieve stress, substantiële hoeveelheden QQ gevormd zullen worden en zullen accumuleren terwijl de GSH niveaus aanzienlijk verlaagd zijn. Met andere woorden, QQ-geïnduceerde toxiciteit als gevolg van quercetine suppletie zal met name verwacht worden als gedurende een langere periode relatief hoge doses toegediend zullen worden aan mensen die lijden aan ernstige oxidatieve stress.

Conclusie

De flavonoid quercetine is een uitstekende antioxidant die tevens ontstekingsremmende capaciteiten bezit. De anti-oxidatieve eigenschappen van quercetine kunnen afgeleid worden uit het feit dat het flavonoid zowel *in vitro* als *in vivo* bescherming biedt tegen RZS-geïnduceerde oxidatieve schade aan vetten. De ontstekingsremmende capaciteiten van het flavonoid worden zowel *in vitro* als *in vivo* aangetoond door zijn remmende effect op twee markers van ontsteking, te weten TNF α /IL-10 en IL-8/IL-10.

Een interessant gegeven is dat zowel de anti-oxidatieve als de ontstekingsremmende effecten van quercetine bedui-



Figuur5: Quercetine suppletie verlaagt markers van oxidatieve stress en ontsteking in sarcoidose

dend sterker blijken te zijn als de basale niveaus van respectievelijk de aanwezige oxidatieve stress of ontsteking hoog zijn. Deze bevinding suggereert dat het gebruik van quercetine suppletie met name vruchtbaar zal zijn bij mensen die lijden aan een ziektebeeld dat geassocieerd is met beide processen zoals bijvoorbeeld sarcoidose.

Tijdens het invangen van vrije radicalen wordt quercetine geoxideerd en ontstaan er mogelijk toxische oxidatieproducten. Het meest belangrijke oxidatieproduct van quercetine is het ortho-quinone, weergegeven als QQ. QQ is uitermate thiol reactief en kan door haar reactie met eiwit thiolen leiden tot functieverlies van verscheidene belangrijke enzymen. Vandaar dat er tijdens *in vivo* quercetine suppletie aandacht besteed moet worden aan de mogelijke toxiciteit van zijn metaboliëten. Tijdens onze twee suppletie studies zijn er geen tekenen van toxiciteit waargenomen. Bij een chronische aandoening zoals sarcoidose zal suppletie echter over een veel langere periode moeten plaatsvinden. De veiligheid, verdraagzaamheid en effectiviteit van quercetine gebruik op de lange termijn moeten daarom nog nader worden vastgesteld.

Implicaties en verder onderzoek

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift suggereert duidelijk dat *in vivo* quercetine suppletie anti-oxidatieve en ontstekingsremmende effecten kan hebben in mensen die lijden aan een aandoening die geassocieerd wordt met beide processen zoals bijvoorbeeld sarcoidose. Echter, er is slechts een relatief klein aantal patiënten geïncludeerd in onze studie en de uitgevoerde metingen behelzen alleen biomarkers van oxidatieve stress en ontsteking. Bovendien is het nog steeds onzeker of deze anti-oxidatieve en ontstekingsremmende effecten van het flavonoid uiteindelijk ook zullen leiden tot een afname van de klinische symptomen, zoals een aangetaste longfunctie en verlaagde energieniveaus. Daarnaast zijn er tot op de dag van vandaag nog geen data beschikbaar omtrent de veiligheid van het lange termijn gebruik van hoge doseringen antioxidanten zoals quercetine, terwijl bij een chronische ziekte als sarcoidose een dergelijk gebruik wel verwacht kan worden. Vandaar dat een grotere quercetine suppletie studie uitgevoerd zou moeten worden bij sarcoidose patiënten om (i) onze resultaten te bevestigen, (ii) het effect van quercetine

op diverse klinische parameters van sarcoidose te meten en (iii) de veiligheid van een dergelijke suppletie in kaart te brengen.

Tenslotte dient ook opgemerkt te worden dat sarcoidose een multi-systemische aandoening is die zich kan manifesteren door het hele lichaam en daarbij diverse cascades kan beïnvloeden. Het is daarom ook niet verwonderlijk dat de huidige behandeling van sarcoidose met alleen ontstekingsremmende middelen, zoals bijvoorbeeld glucocorticoiden, niet volledig effectief blijkt te zijn. Betere resultaten zijn daarentegen te verwachten van een multi-factoriële behandeling die de diverse aspecten van sarcoidose zou kunnen aanpakken. Quercetine bevat naast de hierboven beschreven anti-oxidatieve en ontstekingsremmende eigenschappen ook anti-fibrotische, anti-coagulatieve en anti-proliferatieve capaciteiten. Een interessant gegeven is dat dergelijke activiteiten ook geassocieerd zijn met een effectieve behandeling van sarcoidose. Met andere woorden, quercetine is wellicht zelfs een geschiktere kandidaat voor de behandeling van sarcoidose dan op basis van de resultaten gepresenteerd in dit proefschrift al verwacht zou kunnen worden.