

University of Groningen

Essential fatty acid deficiency and the small intestine

Lukovac, Sabina

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:

2010

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

Citation for published version (APA):

Lukovac, S. (2010). *Essential fatty acid deficiency and the small intestine*. s.n.

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).

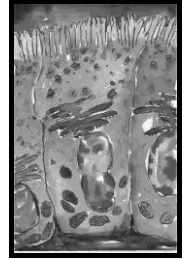
The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

APPENDICES



S. Lukovac

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Essentiële vetzuren, linolzuur (C18:2 ω -6, LA) and α -linoleen zuur (C18:3 ω -3, ALA), zijn heel belangrijk voor verscheidene biologische functies in mens en dier. Essentiële vetzuren kunnen niet in het lichaam zelf worden gemaakt en moeten dus door middel van voeding opgenomen worden. Een tekort aan essentiële vetzuren kan verstoringen veroorzaken in de ontwikkeling van de hersenen en het immuunsysteem, maar ook in de celmembranen van verscheidene weefsels, waaronder die van de hersenen, nieren, lever, huid en retina. Essentiële vetzuur deficiëntie (EVZD) is een aandoening waarbij er een tekort aan essentiële vetzuren is. Deze aandoening kenmerkt zich door een verstoring van de cognitieve en motorieke functies, groeistoornis, droge huid, haarverlies en functionele afname van organen zoals het hart en de lever. EVZD kan het resultaat zijn van een te lage voedingsinname van essentiële vetzuren, maar ook van een verlaagde opname of een verhoogd metabolisme van essentiële vetzuren. Vooral kinderen met ernstige leverziekten die lijden aan cholestase (verminderde galuitscheiding vanuit de lever naar de darm) kunnen EVZD ontwikkelen. Als gevolg van de EVZD ontwikkelen deze patiënten ernstige malabsorptie van nutriënten. Dit leidt tot een zeer slechte voedingsstatus en daarmee samenhangend een zeer slechte prognose voor deze patiënten. Om de voedingsstatus van kinderen met cholestase en EVZD te verbeteren is het van belang de functie van de dunne darm, het orgaan waar het grootste deel van de opname van voeding plaatsvindt, te onderzoeken.

Eerdere studies naar EVZD hebben zich vooral gericht op de consequenties voor de werking van de lever, de hersenen en het hart. Over de effecten van de EVZD op de dunne darm functie en fysiologie is niet veel bekend. Om de voedingsstatus van patiënten met cholestase en EVZD te verbeteren is het onderzoek naar de effecten van deze aandoening op de dunne darm functie essentieel. Studies in proefdieren met EVZD hebben in het verleden laten zien dat EVZD leidt tot een verslechterde opname van vetten in de dunne darm. Naar een verklaring voor de verslechtering van deze opname werd tot op heden geen onderzoek verricht.

Het doel van dit proefschrift was om de effecten van EVZD op de functie van de dunne darm in kaart te brengen door middel van studies in een muismodel voor EVZD. Dit model werd eerder ontwikkeld in ons laboratorium. Verder hebben wij voor de gedetailleerde bestudering van darmcellen een celkweekmodel ontwikkeld. In deze modellen zijn de opname en vertering van cholesterol en koolhydraten bestudeerd. Absorptiestudies hebben wij kunnen uitvoeren met behulp van de "stabiele isotopen techniek". Deze methode, in ons laboratorium ontwikkeld, wordt toegepast om de verschillende stappen van de genoemde metabole processen nauwgezet te kunnen meten. Een groot voordeel van deze techniek is dat er maar relatief kleine bloedvolumes nodig zijn voor de uiteindelijke meting. Daarom is deze elegante techniek ook toepasbaar in mensen, inclusief kleine kinderen. Dit is een belangrijk aspect met het oog op vervolgstudies in jonge patiënten met cholestase en EVZD.

Verstoorde lactosevertering en veranderingen in het cholesterol metabolisme bij essentiële vetzuurdeficiëntie

Studies hebben aangetoond dat EVZD in zowel rat- als muismodellen leidt tot een

verstoorde opname van vet. Effecten van EVZD op de opname van andere nutriënten in deze diersmodellen werd echter niet onderzocht. In onze hypothese stellen wij dat EVZD de functie van de dunne darm verstoort. Indien dit waar is, dan zou niet alleen de opname van vetten, maar ook de opname van andere voedingsstoffen verstoord moeten zijn. Functieverlies tijdens EVZD met betrekking tot de opname van meerdere soorten nutriënten, kan belangrijke consequenties hebben voor de voedingsamenstelling bij deze aandoening.

We hebben ons gericht op de opname van twee belangrijke koolhydraten, namelijk de monosaccharide glucose en de disaccharide lactose. Laatste bestaat uit twee componenten, namelijk uit glucose en galactose. Lactose moet gesplitst worden door middel van het enzym lactase, voordat het kan worden opgenomen door de dunne darmcel.

In ons muismodel hebben we de stabiele isotopen techniek toegepast waarmee we de opname van de koolhydraten gemeten hebben na toediening van stabiel gelabelde varianten van glucose en lactose (**hoofdstuk 2**). In deze studie laten wij zien dat in het muismodel voor EVZD de glucose opname niet is verstoord, terwijl er wel sprake is van vertraagde lactosedigestie. Deze observatie ging gepaard met verlaagde activiteit van het enzym lactase in de dunne darm. Dit suggereert een verminderde splitsing van dit molecuul. Biochemische analyses hebben laten zien dat verminderde enzymactiviteit van lactase sterk gepaard ging met verlaagde LA concentraties in de dunne darm. Verdere studies zullen nodig zijn om te verifiëren of de lactose vertering ook verstoord is in cholestatische patiënten. Deze studies zijn van belang om de opnamecapaciteit van mono- en disacchariden in deze patiënten te bepalen om hierdoor de voedingsstatus te kunnen optimaliseren.

Een ander belangrijke component in het dieet is cholesterol. Cholesterol kan naast opname via dieet ook vanuit de lever in gal naar de dunne darm uitgescheiden worden. In **hoofdstuk 3** hebben we het cholesterolmetabolisme in muizen met EVZD bestudeerd. Verder hebben wij in dit hoofdstuk de transcriptionele regulatie van genen, betrokken bij de lipide metabolisme in de dunne darm, op mRNA niveau bestudeerd met behulp van de zogenaamde “microarray” analyse.

Cholesteroluitscheiding in feces van muizen met EVZD was 57% hoger dan in gezonde muizen. Dit suggereerde verminderde opname van cholesterol tijdens EVZD. Deze resultaten werden ondersteund door verlaagde markers voor cholesterolopname, zoals in plasma gemeten. Daarnaast was er een significant verlaagde expressie van het cholesterol transportmolecuul NPC1L1. Echter de concentratie van cholesterol in darmmucosa bleef onveranderd in de muizen met EVZD. Dit leidde tot de hypothese dat er een compensatie mechanisme aanwezig zou moeten zijn dat ervoor zorgt dat de cholesterol concentraties op peil blijven. Dit zou bijvoorbeeld kunnen door een toename in de cholesterol synthese. Onze *microarray* analyse bevestigde deze hypothese; de mRNA expressie van alle genen waarvan het bekend is dat ze betrokken zijn bij de cholesterol synthese was significant verhoogd in muizen met EVZD. Tevens bleek ook het mRNA van genen die betrokken zijn bij de synthese van triglyceriden en vetzuren verhoogd te zijn in het jejunum van muizen met EVZD. De toename in mRNA ging gepaard met een verhoogde triglyceride en oleaat concentratie in het mucosa van het jejunum. De geïnduceerde cholesterol- en vetsynthese worden sterk gereguleerd door

de transcriptiefactoren SREBP1c en SREBP2. Inderdaad bleek uit onze studies ook dat de expressie van deze transcriptiefactoren significant verhoogd te zijn tijdens EVZD in jejunum. Dit werd gevolgd door de verhoging van de genen betrokken bij de cholesterol- en vetsynthese. Verder hebben wij aangetoond met behulp van de microarray analyse dat ook genen gerelateerd aan het proteasoom een verhoogde expressie hadden tijdens EVZD. Het proteasoom reguleert de aanwezigheid van eiwitten in de cellen door deze, indien nodig, af te breken. De transcriptionele veranderingen in de proteasoomgenen zouden een oorzaak kunnen zijn van de geobserveerde verhoging in genexpressie en de toename in lipide concentraties in jejunum. In het licht dat cholesterol van belang is voor het behoud van de functie en morfologie van celmembranen zijn vervolgstudies naar de effecten van EVZD op het celmembraan van belang. Hierin zou ook onderzocht moeten worden of de compensatoire inductie van cholesterol synthese tijdens EVZD afdoende is om de functie van de celmembranen te waarborgen.

Verhoogde reabsorptie en aanmaak van galzouten bij essentiële vetzuurdeficiëntie

De studies in het muismodel voor EVZD hebben aangetoond dat de verstoringen in de darm vooral plaatsvinden op het niveau van het jejunum. Om uit te zoeken of EVZD ook tot verstoringen in andere delen van de dunne darm leidt, hebben we in ons muismodel ook de galzoutreabsorptie bestudeerd. Galzoutreabsorptie vindt namelijk voornamelijk plaats in het terminale ileum, het meest distale deel van de dunne darm. De galzoutsynthese in de lever wordt geblokkeerd als er voldoende galzouten in de darm worden opgenomen, om de totale galzoutconcentraties in het organisme constant te houden. Hiernaast is een additioneel mechanisme, gereguleerd door het eiwit Fgf15 in de muis, aanwezig dat zorgt voor de negatieve inhibitie van galzoutsynthese vanuit het ileum. Dit mechanisme houdt in dat hoe meer galzouten er in de darm aanwezig zijn, hoe meer Fgf15 door de darm wordt uitgescheiden naar de bloedbaan. Fgf15 wordt dan naar de lever getransporteerd om het signaal af te geven dat er minder galzouten aangemaakt moeten worden door de lever.

De stabiel gelabelde experimenten met het galzout cholaat ($^2\text{H}_4$ -cholaat) stelden ons in staat om verschillende parameters van de enterohepatische circulatie van galzouten kwantitatief *in vivo* te bepalen. Uit de resultaten beschreven in **hoofdstuk 4** bleek dat de verhoogde galzoutsecretie uit de lever naar de darm gepaard ging met een verhoogde galzoutsynthese, ondanks een verhoogde galzoutopname in de dunne darm. Dit duidt op de afwezigheid van de normale terugkoppeling van galzoutsynthese in de dunne darm. Onze data werden verder bevestigd door de verlaagde expressie van Fgf15 in de terminale ileum. Effecten van EVZD op de dunne darm expressie van genen betrokken bij het galzoutmetabolisme zijn ook in celkweek modellen bevestigd.

Deze data laten zien dat naast lactose- en lipidemetabolisme ook het galzoutmetabolisme verstoord is tijdens de EVZD. Het laat ook zien dat niet alleen het jejunum, maar ook de functie van het ileum verstoord is in muizen met EVZD. De bevinding dat deze muizen, ondanks hun verhoogde darmopname van galzouten, vet malabsorptie vertonen hebben wij nog niet kunnen verklaren.

Effecten van de EVZD in een *in vitro* model

Om de effecten van de EVZD in de cel te kunnen bestuderen, hebben wij een model

ontwikkeld waarbij er gebruik werd gemaakt van de Caco-2 cellijn (**hoofdstuk 5**). Voor dit doeleinde hebben wij de Caco-2 cellen gebruikt die afkomstig zijn van de humane dikke darm kankercellen. Deze cellen kunnen lang kunstmatig in kweek gehouden worden. Caco-2 cellen hechten aan het kweekoppervlak en differentiëren in verloop van tijd richting dunne darm epitheel cellen. Het dunne darm fenotype van deze cellijn kenmerkt zich door de expressie van de zogenaamde *brush border* membraan enzymen. Deze enzymen komen tot expressie in het apicale membraan van enterocyten en hebben een essentiële rol in de opname van koolhydraten.

Onze experimenten in de EVZD-Caco-2 cellen laten zien dat EVZD sterk de expressie van de belangrijke *brush border* enzymen reduceert. Verder beïnvloedt de EVZD de permeabiliteit van de membranen van de cellen. Linolzuur (LA) is een belangrijk component van deze membranen en in een poging om de effecten veroorzaakt door de EVZD op de membranen te reduceren, hebben we aan EVZD-Caco-2 cellen het essentieel vetzuur LA toegediend. Echter, de toediening van LA leidde niet tot een significante afname in de effecten veroorzaakt door de EVZD.

Verdere studies zijn nodig om uit te zoeken of LA in een andere dosis en langdurige behandeling met LA de functie van de EVZD-darmcellen kan herstellen. In deze studies zou het ook raadzaam zijn om het effect van LA in combinatie met het andere essentiële vetzuur α -linoleen zuur (ALA) te bestuderen. Het zou kunnen zijn dat het combineren van essentiële vetzuren leidt tot een synergistische afname van de effecten van EVZD. Dit *in vitro* model zal verder kunnen bijdragen aan de uitvoering van meer gedetailleerde studies naar achterliggende, cellulaire mechanismen van de EVZD in de dunne darm enterocyten.

Gelucire® 44/14 kan de vetabsorptie verhogen in ratten met verstoorde lipolyse

Essentiële vetzuur deficiëntie, in combinatie met cholestase of *cystic fibrosis* (CF, taaislijmziekte), gaat bijna altijd gepaard met verminderde vetopname. Behalve het herstellen van de dunne darm functie, kan de toediening van stoffen die de vetabsorptie verbeteren een uitkomst zijn. Een mogelijk geschikte kandidaat is Gelucire® 44/14 dat toegediend wordt om de opname van verschillende, moeilijk oplosbare, medicijnen te bevorderen. In **hoofdstuk 6** beschrijven wij een studie in ratten waarin we het effect van Gelucire® 44/14 testen op twee verschillende stadia van vetopname. Vetopname wordt in vier verschillende stappen onderverdeeld. Eerst vindt de emulsificatie plaats waarbij vet verdeeld wordt in vetdruppels die zo beter toegankelijk worden voor de enzymen. Deze enzymen zorgen vervolgens dat de tweede stap, de lipolyse van vet, wordt uitgevoerd waarbij vetten gesplitst worden in vetzuren. Deze vetzuren vormen dan samen met galzouten en andere lipiden de zogenaamde micellen. Dit proces wordt de solubilizatie genoemd en zorgt ervoor dat vetten beter opgenomen kunnen worden door de dunne darm. De laatste stap van de vetopname is het transport over het apicale membraan van de enterocyten en de uitscheiding in het bloed. Wij hebben Gelucire® 44/14 getest in ratten met een verstoorde lipolyse (model voor de patiënten met CF) en een verminderde solubilizatie (model voor patiënten met cholestatische leverziekten). We laten zien dat Gelucire® 44/14 de vetopname in ratten met verminderde lipolyse bevordert doordat het de opname van verzadigde vetzuren stimuleert. Echter, Gelucire® 44/14 heeft geen significant invloed op de vetopname in ratten met een verstoorde solubilizatie. De

volgende stap in deze studies zal het testen van Gelucire®44/14 in specifieke muismodellen voor CF zijn, om zodoende de data verkregen in ratten te valideren.

CONCLUSIE EN TOEPASSINGEN

Studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat EVZD gepaard gaat met een aantal functionele veranderingen van de dunne darm. In het bijzonder, zijn de lipide en lactose absorptie verstoord tijdens de EVZD in muizen. Verder gaat EVZD in muizen gepaard met een verhoogde galzoutabsorptie in de dunne darm. Echter, deze is onvoldoende om de verstoorde vetopname tijdens EVZD volledig te herstellen. Dit suggereert dat de defecten veroorzaakt door de EVZD niet zozeer in het darmlumen plaatsvinden, maar voornamelijk in de enterocyten. Dat de effecten van EVZD gecompliceerd zijn wordt duidelijk gemaakt doordat het simpelweg toedienen van het essentiële vetzuur LA niet voldoende is om de effecten van EVDZ tegen te gaan.

Het behoud en herstel van de voedingsstatus van kinderen met cholestase en EVZD is essentieel. Dit is zeker het geval naarmate het aantal patiënten op de wachtlijsten voor de levertransplantatie stijgt. Om de voedingsstatus van deze groep patiënten beter te bestuderen en uiteindelijk te verbeteren is het van belang om de studies beschreven in dit proefschrift uit te breiden met patiëntenstudies. Een belangrijke onderzoeksmethode hierbij kan de stabiele isotopen techniek zijn. Deze techniek kan de absorptie van verschillende voedingsstoffen helpen monitoren, zonder schadelijke gevolgen voor de patiënt. Deze studies kunnen een belangrijke bijdrage leveren voor de ontwikkeling van rationele voedingstherapieën voor kinderen en andere patiënten met EVZD.