

University of Groningen

Gaining insight into the determinants of mortality in hospitalized severely malnourished children

Versloot, Chris

DOI:

[10.33612/diss.193369178](https://doi.org/10.33612/diss.193369178)

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:

2022

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

Citation for published version (APA):

Versloot, C. (2022). *Gaining insight into the determinants of mortality in hospitalized severely malnourished children: a translational and intestine focused approach*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.193369178>

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

Summary

Samenvatting

Dankwoord

List of publications

Curriculum vitae

Summary

Severe childhood malnutrition is amongst one of the most challenging global health problems. It remains a major cause of morbidity and mortality in children under the age of five. Substantial progress has been made in the therapeutic management and survival of severely malnourished children. However, considerable disparities in survival continue to exist between severely malnourished children with and without medical complications. While community-based programmes have transformed outcomes for children with uncomplicated severe malnutrition, severely malnourished children with complications still face high mortality rates during treatment in hospital. In African hospitals mortality ranges between 23 and 46%. Even after discharge, the prognosis is poor with reported mortality rates as high as 42% in the subsequent year.

Many severely malnourished children suffer from diarrhoea during hospital admission, which increases their risk of death substantially. Studies have revealed that intestinal structure and function are seriously disrupted in severely malnourished children, which is known as malnutrition enteropathy. Accumulating evidence suggests that this enteropathy may persist despite treatment, which could contribute to poor clinical outcomes in hospital. The continuation of diarrhoea and outstandingly high mortality rates during admission, as well as high mortality rates after discharge, suggest that current treatment algorithms may not fully address the changes in the intestine of these severely ill children. Moreover, limited characterization of these potentially persistent intestinal changes and limited insights into their underlying mechanisms hamper our ability to provide the optimal treatment needed for survival and recovery.

Therefore, the aims of this thesis were 1) to study factors that may contribute to diarrhoea and poor clinical outcomes in severely malnourished children in hospital, and 2) to establish and characterize preclinical models for the intestine in severe malnutrition; and 3) to investigate potential mechanisms involved in disrupted small intestinal homeostasis in preclinical models of severe malnutrition.

The thesis consist of three parts: clinical studies, preclinical studies and future perspectives. In the first part of this thesis, I investigated the role of different nutritional, microbial and inflammatory factors in diarrhoeal disease and poor clinical outcomes during admission in severely malnourished children. In the second part, I established and characterized a mouse model and intestinal organoid model of malnutrition enteropathy. In these preclinical models, I investigated whether dysregulation of mTORC1, autophagy and mitochondrial homeostasis was involved in malnutrition enteropathy. Furthermore,

I tested a potential therapeutic intervention for malnutrition enteropathy. The third part of this thesis provides a general discussion of this thesis' findings and focuses on future perspectives.

Part I - Clinical studies

As severely malnourished children with complications still have a high risk of death during in hospital treatment, I aimed to improve our knowledge of factors that are linked to these poor clinical outcomes as this may inform new or improved therapeutic interventions.

In **chapter 3**, we found that upon hospital admission the presence of diarrhoea, increased intestinal and systemic inflammation, and low faecal short-chain fatty acids (SCFAs) were significantly linked to mortality. Systemic inflammation and low faecal SCFAs were directly associated with death, whereas diarrhoea and intestinal inflammation may be linked to mortality through systemic inflammation. These combined results point to the possibility of microbial translocation across an impaired intestinal barrier as a cause of clinical deterioration and death. Gained insight into the interplay of these risk factors for death informs us of severely malnourished children that are at risk of dying and highlights an important role for the intestine in inpatient mortality.

Diarrhoea was one of the factors that contributed to poor clinical outcomes in hospital (**chapter 3**), which is in line with previous reports. We investigated if 1) the rehabilitation diets could cause osmotic diarrhoea and if 2) persistent or novel intestinal pathogens could explain diarrhoea during hospital admission.

Carbohydrate malabsorption is prevalent in severe malnutrition. Nevertheless, the provided diets during hospitalization (F-75, F-100 and RUTF) contain a large amount of carbohydrates. In **chapter 2**, we tested the hypothesis that the carbohydrate content of these rehabilitation diets exceeds the intestinal carbohydrate absorptive capacity leading to osmotic diarrhoea. We did not detect differences in diarrhoea when comparing transition phase diets with different carbohydrate content, but acidic stool was present during hospital admission in all groups suggesting carbohydrate malabsorption. The findings emphasize that we are unaware of the absorptive capacity of the malnourished intestine and to what extent the intestinal condition and absorptive capacity improve during inpatient treatment.

Next, we aimed to improve our understanding of the contribution of intestinal pathogens to diarrhoea in severely malnourished children during hospitalization. In **chapter 4**, we

reported that many intestinal pathogens were cleared while the children received broad-spectrum antibiotics, but the decrease in detected pathogens did not lead to a reduction in diarrhoea prevalence during admission. Notably, 55% of the children still harboured at least one pathogen before being discharged back to the community. The pathogens *Giardia lamblia* and *Shigella* spp. were most likely to persist. The continuance of *Giardia lamblia* could indicate suboptimal use of antiparasitic drugs (e.g. metronidazole) that are currently only prescribed when the malnourished child has persistent or worsening diarrhoea. It is important to realize that the persistence of pathogens can lead to an intestinal infection after discharge. This could contribute to the ongoing high risk of mortality and relapse that has been reported in children recovering from severe malnutrition. We further found that persistent intestinal infections may be associated with prolonged intestinal inflammation as demonstrated by high faecal calprotectin after clinical stabilization.

The combined clinical findings (**chapter 2-4**) support a growing body of evidence that suggests an important role for the intestine in mortality in severe malnutrition. Loss of intestinal integrity in malnutrition enteropathy could contribute to death through microbial translocation leading to systemic inflammation and sepsis. Our understanding of mechanisms leading to disrupted intestinal epithelial integrity is limited since studying underlying mechanisms in severely malnourished children is challenging given the vulnerability of this population. Limited preclinical models have been developed to generate a better understanding of severe malnutrition and its pathophysiology, but the evaluation of intestinal changes in these models is only fragmentary (**chapter 1**). This hampers a more in depth understanding of underlying mechanisms and testing of potential therapeutic interventions. Thus, malnutrition models are needed that comprehensively characterizes intestinal changes both in structure and function.

Part II - Preclinical studies

Chapter 5 presents a novel mouse model of malnutrition enteropathy in which structural and functional intestinal changes were extensively characterized. We showed that feeding mice a low- protein diet (LPD) leads to features of malnutrition enteropathy including reduced villous height, barrier dysfunction and lactose malabsorption. Intestinal dysfunction in LPD-fed mice was accompanied by signs of reduced autophagy and increased mTORC1 activity, which was the opposite of what might be expected under nutrient-deficient conditions. In addition, LPD-fed mice mitochondria were

decreased in number and were morphologically different. We further demonstrated that administration of rapamycin, a mTORC1 inhibitor, to LPD-fed mice prevented a decline in both intestinal functions and that functional improvement coincided with decreased mTORC1 activity as well as improved mitochondrial homeostasis. These findings suggest that interventions targeting mTOR can potentially improve intestinal function in severely malnourished children.

In vitro models may be more suitable for a more in-depth analysis of organelle dynamics and the testing of potential interventions in a high-throughput manner.

In **chapter 6**, I developed and characterized a translational organoid model of severe malnutrition of the intestine. In collaboration with a fellow PhD student, this model was also established for the liver since both intestinal and hepatic dysfunction have negative impacts on the survival of severely malnourished children in hospital. We show that amino-acid deprivation in organoids recapitulates organ-specific manifestations of severe malnutrition such as hepatic steatosis and intestinal barrier dysfunction. We further demonstrate that functional changes were accompanied by reduced mitochondrial and peroxisomal proteins, which could mostly be restored by the re-supplementation of amino acids or pharmacological interventions with rapamycin or fenofibrate. Restoration of protein levels aligned with signs of improved peroxisomal fatty acid oxidation in hepatic organoids and increased tight junction protein claudin-3 in intestinal organoids. These two organoids model can be used to gain mechanistic insights and to test potential treatments for intestinal and hepatic dysfunction in severe malnutrition. In line with the malnutrition mouse model, rapamycin had beneficial effects on mitochondria and potentially also on intestinal barrier function.

Part III - Future perspectives

Chapter 7 focuses on the identified risk factors for inpatient mortality, addresses underlying mechanisms and emphasizes the consequences of both for intestinal health. Furthermore, it reviews the potential role of dysregulated mTOR, autophagy and mitochondrial homeostasis in malnutrition enteropathy, discusses underlying mechanisms and highlights the implications of dysregulation for intestinal regeneration. Finally, the finding from the (pre)clinical studies are translated into potential future therapies for severely malnourished children. One therapeutic approach could be to increase faecal SCFAs, as low faecal SCFAs were directly associated with death. Another approach could be to improve intestinal barrier function, as barrier dysfunction likely

plays an important part in systemic inflammation, which was directly associated with death. The discovered dysregulated mTORC1 and mitochondrial homeostasis in preclinical models serve as two important potential therapeutic targets to improve the intestinal barrier.

In conclusion, the translational approach used in this thesis provides important insights into intestinal dysfunction in severely malnourished children. The clinical studies underscored that intestinal dysfunction likely persists during inpatient treatment. Mechanistic studies into the intestinal dysfunction in a mouse model and intestinal organoids revealed that dysregulation of mTOR, autophagy and mitochondria may be involved in malnutrition enteropathy. Connecting the models to acquire mechanistic insights into malnutrition enteropathy in a more efficient and targeted way will improve the discovery-to-intervention pipeline and could lead to novel treatments to reduce mortality.

Samenvatting

Ernstige ondervoeding bij kinderen in ontwikkelingslanden is één van de grootste uitdagingen in de zorg wereldwijd. Ernstige ondervoeding is een belangrijke oorzaak van ziekte bij en sterfte van kinderen onder de leeftijd van vijf jaar. De afgelopen jaren is aanzienlijke vooruitgang geboekt in de behandeling en daarmee de overlevingskansen van ernstig ondervoede kinderen. Echter blijven grote verschillen bestaan in overleving tussen ernstig ondervoede kinderen met en zonder medische complicaties. Kinderen met ongecompliceerde ernstige ondervoeding worden behandeld in centra buiten het ziekenhuis en hebben een goede prognose. Kinderen met gecompliceerde ernstige ondervoeding worden behandeld in het ziekenhuis. In deze laatste groep overlijden kinderen vaak alsnog, nadat ze zijn opgenomen en gespecialiseerde voeding en antibiotica toegediend krijgen volgens de richtlijnen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO). In Afrikaanse ziekenhuizen variëren de sterftecijfers tussen de 23 en 46%. Zelfs na ontslag uit het ziekenhuis is de prognose van deze kinderen slecht met sterftecijfers, die oplopen tot 42% in het opvolgende jaar.

Tijdens ziekenhuisopname hebben ernstig ondervoede kinderen vaak last van diarree en dit vergroot het risico op overlijden aanzienlijk. Studies hebben aangetoond dat de structuur en de functie van de darm ernstig veranderd is in ernstig ondervoede kinderen. Deze veranderingen in de darm worden aangeduid met de term “malnutrition enteropathy”. Er worden steeds meer data gepubliceerd waaruit blijkt dat de veranderingen in de darm waarschijnlijk blijven bestaan tijdens behandeling in het ziekenhuis. Dit zou één van de oorzaken kunnen zijn van de slechte behandelresultaten en prognose van ernstig ondervoede kinderen in het ziekenhuis. De huidige behandeling lijkt niet toereikend en/of geschikt te zijn voor de veranderingen in darm van deze ernstig zieke kinderen. Dit blijkt met name uit het optreden of voortzetten van diarree en de uitermate hoge sterftecijfers zowel tijdens als na ziekenhuisopname. Daarnaast zorgen de beperkte kennis van de darmveranderingen en het beperkte inzicht in de onderliggende mechanismen ervoor dat men deze kinderen niet de optimale behandeling kan aanbieden, hetgeen nodig is voor overleving en herstel.

Daarom waren de doelen van dit proefschrift als volgt: 1) het bestuderen van factoren die mogelijk bijdragen aan diarree en andere slechte klinische uitkomsten van ernstig ondervoede kinderen in het ziekenhuis, en 2) het ontwikkelen en karakteriseren van preklinische darmmodellen voor ernstige ondervoeding, en 3) het onderzoeken van mechanismen die mogelijk betrokken zijn bij de verstoorde structuur en functie van de

darm, gebruikmakend van de preklinische modellen.

Het proefschrift bestaat uit drie delen: klinische studies, preklinische studies en toekomstperspectieven. In het eerste deel heb ik de invloed van verschillende factoren (voeding, ziekteverwekkers en ontsteking/inflammatie) op diarree en de slechte klinische uitkomsten tijdens ziekenhuisopname onderzocht. In het tweede deel heb ik een muismodel en een model met minidarmen/darm organoïden opgezet voor *malnutrition enteropathy*. Met behulp van deze modellen heb ik onderzocht of ontregeling van mTORC1, autofagie en mitochondriën mogelijk betrokken zijn bij de darmveranderingen tijdens ernstige ondervoeding. Daarnaast heb ik met deze modellen een mogelijke behandeling getest voor *malnutrition enteropathy*. Het derde deel geeft een overzicht van de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift en beschrijft de toekomstperspectieven.

Deel I - Klinische studies

Ernstig ondervoede kinderen met medische complicaties lopen nog altijd een hoog risico om te overlijden in het ziekenhuis tijdens de behandeling. Daarom heb ik geprobeerd om beter inzicht te krijgen in de factoren die verbonden zijn aan deze slechte klinische uitkomsten. Deze kennis kan richting geven aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen en/of het verbeteren van bestaande behandelingen.

In **hoofdstuk 3** hebben wij ontdekt dat diarree, darm- en systemische inflammatie, en verlaagde korte-keten vetzuren in de ontlasting een duidelijk relatie hebben met sterfte tijdens ziekenhuisopname. Systemische inflammatie en verlaagde korte-keten vetzuren bleken direct geassocieerd te zijn met overlijden, terwijl diarree en darminflammatie waarschijnlijk verbonden zijn aan sterfte via systemische inflammatie. Deze bevindingen duiden erop dat een mogelijke oorzaak van klinische verslechtering en sterfte is dat bacteriën de minder goed functionerende darmbarrière kunnen passeren (microbiële translocatie). Het verbeterde inzicht in het samenspel tussen deze risicofactoren heeft ervoor gezorgd dat wij beter weten welke kinderen een verhoogd risico lopen om te overlijden. Tevens duidt dit op een belangrijke rol voor de darm in sterfte tijdens ziekenhuisopname.

Diarree is één van de factoren die verbonden is aan de slechte klinische uitkomsten in het ziekenhuis (**hoofdstuk 3**), hetgeen ook in andere publicaties is beschreven. Wij hebben onderzocht of 1) gespecialiseerde voeding als onderdeel van de behandeling kan leiden tot osmotische diarree, en 2) nieuwe of inadequaate behandelde ziekteverwekkers de diarree tijdens ziekenhuisopname kunnen verklaren.

Verminderde opname van koolhydraten door de darm is een bekend probleem in ernstig ondervoede kinderen. Desondanks bevatten de verschillende soorten voeding in het hervoedingsprogramma (F-75, F-100 en RUTF) grote hoeveelheden koolhydraten. In **hoofdstuk 2** hebben wij onderzocht of de hoeveelheid koolhydraten in de voeding van ernstig ondervoede kinderen mogelijk groter was dan het vermogen van de darm om dit op te nemen, hetgeen zou leiden tot osmotische diarree. Wij vergeleken drie verschillende therapeutische diëten, die gebruikt worden in het hervoedingsprogramma, met elk een andere hoeveelheid koolhydraten. Er werd geen verschil in het voorkomen van diarree gevonden, maar wij hebben wel vastgesteld dat in alle groepen de zuurgraad van de ontlasting laag is ($\text{pH} \leq 5.5$). Dit zou kunnen wijzen op verminderde opname van koolhydraten. De bevindingen laten zien dat wij onvoldoende weten van het vermogen van de ondervoede darm om koolhydraten op te nemen. Daarnaast weten wij onvoldoende in welke mate de conditie en daarmee de opnamecapaciteit van de darm verbetert tijdens behandeling in het ziekenhuis.

Vervolgens hebben wij onderzocht of ziekteverwekkers in de darm een belangrijke bijdrage leveren aan diarree in ernstig ondervoede kinderen tijdens ziekenhuisopname. In **hoofdstuk 4** beschrijven wij dat de meeste ziekteverwekkers in de darm verdwijnen tijdens behandeling met breedspectrum antibiotica. Echter droeg 55% van de kinderen nog minstens één ziekteverwekker bij zich ten tijde van ontslag uit het ziekenhuis. De ziekteverwekkers *Giardia lamblia* en *Shigella* spp. zetten zich vaak voort. Het voortzetten van *Giardia lamblia* zou kunnen komen door suboptimaal gebruik van anti-parasitaire medicatie, die op dit moment alleen wordt voorgeschreven in geval van aanhoudende of toenemende diarree. Het is belangrijk om te bedenken dat de ziekteverwekkers die nog aanwezig zijn bij ontslag kunnen leiden tot een darminfectie. Dit zou kunnen bijdragen aan het hoge risico op overlijden of heropname van kinderen die herstellende zijn van ernstige ondervoeding. Tot slot hebben wij gevonden dat de aanwezigheid van ziekteverwekkers geassocieerd is met aanhoudende darminflammatie.

De bevindingen in **hoofdstuk 2-4** ondersteunen groeiend bewijs dat aantoonbaar dat de darm een belangrijke rol speelt in sterfte in ernstige ondervoeding. Verminderde functie van de darmbarrière in *malnutrition enteropathy* zou kunnen bijdragen aan sterfte door microbiële translocatie, hetgeen leidt tot systemische inflammatie en sepsis. De kennis van mechanismen die de verstoorde darmbarrière veroorzaken is beperkt. Enerzijds vanwege de kwetsbaarheid van deze populatie en anderzijds vanwege de beperkte beschikbaarheid van niet-invasieve technieken om naar de darmfunctie te kijken. Er zijn beperkte preklinische modellen ontwikkeld om ernstige ondervoeding en de

pathofysiologie bij ernstig ondervoede kinderen beter te begrijpen, maar de evaluatie van de veranderingen in de darm in deze modellen is zeer onvolledig (**hoofdstuk 1**). Daarom is het noodzakelijk om preklinische modellen te ontwikkelen, die de structurele en functionele veranderingen in de darm bij ernstige ondervoeding beschrijven.

Deel II - Preklinische modellen

In **hoofdstuk 5** wordt een nieuwe muismodel (*in vivo*) gepresenteerd voor *malnutrition enteropathy*. De veranderingen in de structuur en functie van de darm zijn uitgebreid geanalyseerd en beschreven. Wij hebben aangetoond dat kenmerken van *malnutrition enteropathy* gereproduceerd kunnen worden in muizen die een laag-eiwit dieet krijgen. Veranderingen bestaan onder andere uit een afname van villus hoogte, een afname van de darmbarrière functie en verminderde opname van lactose. Darmdysfunctie in deze ondervoede muizen ging gepaard met aanwijzingen van verminderde autofagie en toename van mTORC1 activiteit. Beide observaties zijn het tegenovergestelde van wat verwacht zou worden in deze situatie met weinig voedingsstoffen. Daarnaast waren er minder mitochondriën in de darm van ondervoede muizen en was de morfologie van mitochondriën veranderd. Verder hebben wij laten zien dat toediening van rapamycin, een mTORC1 remmer, aan ondervoede muizen een afname in darmfunctie kan voorkomen. Dit gaat gepaard met afname in mTORC1 activiteit en verbetering in aantal en morfologie van mitochondriën. De bevindingen die in dit hoofdstuk worden gepresenteerd laten zien dat behandelingen gericht op mTOR de darmfunctie in ernstig ondervoede kinderen mogelijk zou kunnen verbeteren.

In vitro modellen zijn voor bepaalde doeleinden beter geschikt dan *in vivo* modellen, zoals voor diepgaande analyse van veranderingen in organellen. Daarnaast kunnen potentiële behandelingen op een efficiënte manier getest worden met behulp van *in vitro* modellen.

In **hoofdstuk 6** heb ik een darm organoïden model (*in vitro*) ontwikkeld en gekarakteriseerd voor ernstige ondervoeding. In samenwerking met een andere promovendus hebben wij dit model ook opgezet voor de lever (lever organoïden), omdat zowel darm- als leverdysfunctie de overleving van ernstig ondervoede kinderen in het ziekenhuis negatief beïnvloedt. Wij hebben laten zien dat aminozuur starvatie in darm- en lever organoïden leidt tot orgaan specifieke kenmerken van ernstige ondervoeding, zoals leververvetting en een verminderde barrièrefunctie. Verder beschrijven wij dat de functionele veranderingen gepaard gaan met een afname in mitochondriële en peroxisomale eiwitten. Dit kon grotendeels worden hersteld als aminozuren werden

geherintroduceerd of als de organoïden werden behandeld met rapamycin of fenofibraat. Het herstel van de mitochondriële en peroxisomale eiwitten ging gepaard met tekenen van verbeterde vetzuuroxidatie in peroxisomen in lever organoïden en toename van tight-junction eiwit claudin-3 in darm organoïden. Deze twee organoïden modellen kunnen worden gebruikt om mechanistisch inzicht te verkrijgen in darm- en leverdysfunctie bij ernstige ondervoeding en om mogelijke behandelingen daarvoor te testen. Behandeling met rapamycin had, evenals in het muismodel, een gunstig effect op mitochondriën en mogelijk ook op de barrièrefunctie.

Deel III - Toekomstperspectieven

Hoofdstuk 7 gaat in op de gevonden risicofactoren voor sterfte in het ziekenhuis, beschrijft mogelijke onderliggende mechanismen en bespreekt de gevolgen van zowel de risicofactoren als de mechanismen voor de gezondheid van de darm. Daarnaast wordt de mogelijke betrokkenheid van verstoorde mTORC1, autofagie en mitochondriën in *malnutrition enteropathy*, potentiële onderliggende mechanismen en de gevolgen van deze verstoringen voor het herstel van de darm besproken. Tot slot worden de bevindingen van de (pre)klinische studies vertaald naar mogelijke toekomstige behandelingen voor darmdysfunctie bij ernstig ondervoede kinderen. Eén van die mogelijke behandelingen is het verhogen van de korte-keten vetzuren, omdat lage waardes hiervan direct gerelateerd blijken te zijn aan sterfte in ernstig ondervoede kinderen. Een andere aanpak zou het verbeteren van de darmbarrière kunnen zijn, omdat dit waarschijnlijk een belangrijk aandeel heeft in het optreden van systemische inflammatie. Systemische inflammatie is op zijn beurt weer verbonden met sterfte. De verstoringen in mTORC1 en mitochondriën in de preklinische modellen vormen twee belangrijke aangrijpingspunten om de barrièrefunctie te verbeteren.

Concluderend heeft de translationele aanpak in dit proefschrift tot belangrijke inzichten geleid op het gebied van darmdysfunctie in ernstig ondervoede kinderen. De klinische studies hebben laten zien dat darmdysfunctie zich waarschijnlijk voortzet tijdens behandeling in het ziekenhuis. Mechanistische studies in het muismodel en het darm organoïden model hebben laten zien dat ontregeling van mTOR, autofagie en mitochondriën mogelijk betrokken zijn bij *malnutrition enteropathy*. Door gebruik te maken van de drie modellen - klinische studies, muismodel en darm organoïden model - kan het proces van wetenschappelijk inzicht naar nieuwe behandelingen versneld worden, waardoor de overlevingskansen van ernstig ondervoede kinderen in het ziekenhuis kunnen verbeteren.

Dankwoord

Do not go where the path may lead,
go instead where there is no path and leave a trail
– Ralph Waldo Emerson

When I was studying Medicine at Leiden University I could have never foreseen the impact of my scientific internship at Sickkids on the continuation of my studies. The potential impact of research in the field of severe malnutrition and the challenges in basic science led me to pursue this line of research. I transferred to the University of Groningen, where I was able to combine my master's degree with my PhD. I chose to follow the road less traveled but did not regret it for a single minute. I managed to leave a new 'trail' for the malnutrition research and a starting point for future researchers. However, I could never have managed to do this on my own. Thus, I would like to thank everyone who supported me during the last years!

First, I would like to thank **my supervisors** Prof. dr. B.M. Bakker and Dr. R.H.J. Bandsma. Beste **Barbara**, het is alweer 6 jaar geleden dat ik onderdeel werd van jouw onderzoeksgroep en de nauwe samenwerking met Robert begon. Ik vond onze samenwerking heel fijn. Ik waardeer je kritische blik, waarin je altijd een goede balans weet te vinden tussen streven naar het maximale en aangeven wanneer iets genoeg is. Ook was je betrouwbaarheid en hulp in de laatste fase onmisbaar voor het afronden van mijn proefschrift. Bedankt voor alles wat jij mij hebt geleerd, voor het vertrouwen waarmee jij mij de preklinische modellen liet opzetten in het lab en vooral ook je verhelderende kijk op heel veel zaken! Beste **Robert**, toen ik in 2013 in de trein naar Groningen zat om jou voor het eerst te ontmoeten en te bespreken of ik mijn wetenschapsstage in Toronto zou kunnen doen, had ik nooit kunnen bedenken dat dit zou leiden tot dit proefschrift. Jij leerde mij: '*Science is cool*' en bent dat de afgelopen jaren blijven uitstralen. Ik bewonder wat jij de afgelopen jaren hebt opgebouwd en ben blij dat ik daar mijn steentje aan heb kunnen bijdragen. In de preklinische studies was jouw kennis en vooral ook je klinische blik onmisbaar. Bedankt voor je enthousiaste begeleiding, alles wat jij mij hebt geleerd en voor alle kansen die jij mij hebt gegeven!

Lieve **paranimfen**, ik ben heel blij dat jullie aan mijn zijde zullen staan tijdens mijn verdediging!

Lieve **Willemijn**, ik had nooit gedacht dat ik bij de cursus proefdierkunde één van mijn beste vriendinnen zou tegenkomen. Ik vind het heel fijn om alle uitdagingen van het MD/PhD traject en ons enthousiasme over het onderzoek met jou te kunnen delen. Samen ergens wat drinken of het eten in een nieuw restaurant ontdekken, en daarna vaak nog een extra rondje wandelen omdat we nog niet waren uitgepraat. Ik ben heel blij met jou als vriendin!

Dear **José**, I am very grateful that we got to work so closely together on our organoids paper. I couldn't have wished for a better 'partner in crime' for the potential Nature paper. Your enthusiasm, the many coffee breaks, drinks and dinners during late nights in the lab made all the work more fun. I feel lucky to consider you as one of my best friends!

Doing my PhD in the lab of Barbara Bakker and Robert Bandsma has been an amazing experience. A special thanks goes to **Bernard**, we started at the same time and were inseparable in the lab during our first year. Thanks for all the laughs, IJwitjes, the good talks, but above all, I am grateful that we have become such good friends! **Melany**, I will miss the diet coke breaks, our laughs in the lab and all the other fun times! I am glad to have a Chilean best friend! **Albert**, I couldn't have managed to do the animal experiments and many other things in the lab without you. 'Een beetje van dit en een beetje van dat' definitely needed your guidance. **Karen**, thank you for your help with the WBs and for all the times we got to enjoy good food and nice drinks especially when paired with a good 'borrelplankje'. **Miriam**, thank you for supporting José and me with the organoid work, especially with the microscope that seemed to have a mind of its own. **Dirk-Jan**, thank you for sharing your knowledge with me and providing me with your valuable input for all of my research projects. I would also like to thank **Emmalie**, **Marcel**, **Christoff** and **Ligia** for your input during group meetings and for all the fun times!

I would also like to thank all the members of **Robert Bandsma's lab (Bandsmatiks)** for your collaboration, for your input during group meetings and for the fun times during visits to Toronto such as Axe Throwing. I would like to thank several members in particular. **Matilda**, as the first two PhD students of Robert we stuck together in Groningen. I feel lucky that we got along very well, could share the experiences we had in the lab, and could talk about literally anything. I also really enjoyed the fun times outside of work. I hope that we stay in touch! **Cino**, I am really happy with you as collaborator on the 'intestine project'. I am glad that you will continue with the intestinal organoids; they will be in good hands! **Lijun**, thank you for your help with the rapamycin project. **Céline**, thank you for all your help with statistics. Your enthusiasm and explanations made statistics more fun and clear! **Suzanna Attia**, thank you for the nice collaboration

for our paper and the good talks. **Peter Kim**, although not officially part of the Robert's lab, I would like to thank you for all your valuable input on the organoids project. Your enthusiasm and ideas are inspiring.

Beste **Wieger**, de samenwerking met jou heb ik altijd als heel prettig ervaren. Ik vond het bijzonder om samen met jou in Malawi rond te lopen en te werken op de ondervoedingsafdeling (MOYO ward), waar jij zoveel voor hebt gedaan. De snelcursus Chichewa, die jij mij gaf tijdens onze vlucht, kwam goed van pas, en daarom wil ik voor alles wat jij voor mij hebt gedaan zeggen: Zikomo!

I would also like to thank all members of the **lab of Metabolic signaling** as you were a great help and great company during the first year of my PhD. **Prof. dr. K. Thedieck, dear Kathrin**, I would like to thank you for your interest in my research and your valuable input when your research group was still based in Groningen, but also after the move to Innsbruck when preparing the rapamycin manuscript. **Patricia, Alex, Marti and Ulrike** thank you for assisting me in learning to understand the mTOR pathway, for helping me with lab stuff and for all the fun coffee moments or drinks after work!

I also would like to thank all the members of the **Department of Pediatrics at the UMCG**, who helped me finish my thesis by providing me with their knowledge and expertise. Special thanks to **Niels, Marieke, Theo van Dijk and Rick Havinga**: without your help I would never have managed to start and finish the nutrient absorption experiments! **Mirjam Koster**, thank you for your help with histology for the mouse and organoids studies, but also for the really nice little coffee breaks. **Joram**, I really enjoyed our coffee breaks and drinks after works during which we could share our enthusiasm about so many things but especially the organoid work! **Hilde, Paula** and **Evelien** thanks for the work you have done behind the scenes to allow me to do research!

I would also like to express my gratitude to **all patients and their guardians** for participation in the clinical trial presented in this thesis. I would also like to recognize the invaluable contribution of the **mice** in the preclinical studies, which will hopefully aid in saving the lives of many severely malnourished children.

Furthermore I would like to thank **all co-authors** for your collaboration and valuable contribution to the papers presented in this thesis, the **members of the reading committee: Prof. dr. E.M. van der Beek, Prof. dr. M. Boele van Hensbroek** en **Prof. dr. K.N. Faber**, bedankt dat jullie de tijd hebben genomen om mijn proefschrift te lezen en te beoordelen, **the members of the PhD committee: Prof. dr. J.W. Jonker, Prof. dr. F.**

Kuipers, Dr. ir. M.H. Oosterveer en **Dr. P.F. van Rheenen**, bedankt voor jullie interesse in mijn onderzoek en voor jullie waardevolle input op de verschillende proeven, and **all collaborators**, including **Tjasso Blokzijl, Jeroen Kuipers, Klaas Sjollema** en **dr. Ben Giepmans** from the UMCG Microscopy and Imaging Center (UMIC), the employees of the animal facility (CDP) in Groningen and **Prof. dr. S.C.D. van Ijzendoorn**.

Ten slotte aan mijn (schoon-)familie en vriendinnen, ontzettend bedankt voor alle steun en vooral ook voor de leuke momenten van ontspanning en afleiding!

Lieve **Bernadette**, in Toronto ontdekten wij samen dat onderzoek doen wel heel erg leuk is. We raakten niet uitgepraat over onze hele verschillende onderzoeken, maar konden elkaar toch goed helpen. Ook in een later stadium van onze PhD's vond ik dit heel waardevol! Verder heb ik genoten van onze vele koffietjes (o.a. bij Stefano), wandeltochten door Toronto, hondeslede tocht en kano trip, en onze avonturen daarna in Nederland. Op naar het volgende avontuur!

Lieve **Micky**, ik ben heel blij dat wij in het eerste jaar Geneeskunde bevriend zijn geraakt en daarna zoveel leuke dingen hebben gedaan. Ik vind het heel bijzonder dat ik in Toronto mijn werk in het lab aan je kon laten zien! Je hebt een nuchtere en ontspannen kijk op veel dingen, waardoor sommige dingen in mijn onderzoek veel minder groot bleken dan ze eerst leken. Bedankt voor alle genietmomentjes. Ik hoop dat er nog vele volgen.

Lieve **Debbie en Marjon**, we leerden elkaar kennen toen wij samen héél veel samples moesten opwerken in het UMCG. Tijdens de vele vroege ochtenden in het UMCG was het nooit saai. Altijd volle kracht vooruit en na afloop genieten van een goede kop koffie met wat lekkers. Gelukkig was er ook veel tijd voor gezelligheid met drankjes bij Barrel, en DOT, etentjes bij de Markies en samen over onderzoeks- en coschapavonturen praten. Bedankt voor alles!

Lieve **Rixt en Mariska**, Bedankt voor alle leuke momenten in Groningen tijdens de coschappen en vooral ook daarbuiten! Ik ben blij dat we elkaar nu nog op de hoogte houden en samen kunnen genieten van een kopje koffie of borrel!

Lieve **Lotte**, ik ben blij met jou als vriendin. Lekker samen hockeyen, een tijdje samen in één huis wonen, genieten van lekker eten of van een fijne wandeling. Ik hoop dat wij elkaar straks ook nog vaak blijven zien!

Dear **Charlotte**, we first met each other in Malawi where we had some great adventures in Majete and on Mulanje mountain. I would like to thank you for taking the time to

read and check the introduction of this thesis! I hope that we will continue to share our passion for research and that we can meet up soon for a new adventure!

Lieve **Jeroen**, jij bent al vanaf het begin betrokken bij mijn promotieonderzoek. De mooie afbeeldingen, die jij maakte voor mijn toelatingspresentatie, zorgde ervoor dat ik mijn verhaal beter kon vertellen. Ik heb bewondering voor alle mooie afbeeldingen die je voor mij hebt gemaakt en voor wat je hebt opgebouwd met HAUSofWAUS. Bedankt dat jij in hele drukke periodes toch altijd tijd voor mij wist vrij te maken!

Lieve **Anne-Loes**, wat ben ik blij dat jij de omslag van mijn proefschrift en de tussenpagina's hebt willen maken. Ik heb enorm veel bewondering voor het feit dat jij met jouw creativiteit mijn 'theoretische' ideeën wist te realiseren. Ik had niet durven dromen dat de omslag en de tussenbladen van dit proefschrift zo mooi zouden worden!

Lieve **Oma**, de liefde voor de zorg en voor het op onderzoek uitgaan werd door u van jongs af aan gestimuleerd. Ik waardeer uw niet aflatende interesse voor mijn Geneeskunde studie en vooral ook het onderzoek enorm. Ik hoop deze passie de komende jaren met u te blijven delen.

Lieve **Loes**, als 'kleine grote zus' heb jij een heel belangrijke rol gespeeld de afgelopen jaren. Zo was je er altijd om van gedachten te wisselen, mijn tekst te controleren of gewoon even lekker te kletsen. Ook liet jij mij altijd weer inzien dat er meer is dan alleen werk. Ik geniet van de kleine en grote avonturen samen met jou en hoop dat er nog veel zullen volgen. Ik ben trots op jou!

Lieve **Mam en lieve Pap**, het is niet eenvoudig om onder woorden te brengen hoeveel jullie voor mij betekenen en hoe dankbaar ik jullie ben. Jullie onvoorwaardelijke steun en betrokkenheid hebben ervoor gezorgd dat ik het avontuur van promotieonderzoek doen in Groningen heb durven en kunnen aangaan. Jullie wilden altijd veel weten over het onderzoek, zorgden dat het fijn 'thuiskomen' was in Schiedam en maakten het mogelijk om als gezin met elkaar de wereld te ontdekken. Bedankt dat jullie er altijd voor mij zijn!

Lieve **Michiel**, wij leerden elkaar kennen tijdens mijn wetenschapsstage in Toronto, dus je was er vanaf het begin van mijn MD/PhD avontuur bij. Dat was maar goed ook, want je was onmisbaar bij het afronden van mijn proefschrift. Jouw eindeloze energie, enthousiasme en interesse in mijn onderzoek zorgde ervoor dat ik het onderzoek ook in de laatste fase leuk bleef vinden. Bedankt voor alles en nog veel meer! Ik heb enorm veel zin om samen ons volgende avontuur aan te gaan!

List of publications

Daniel AI, Kvissberg MEA, Senga E, **Versloot CJ**, Harawa PP, Voskuil W, Wishart D, Mandal R, Bandsma R, Bourdon C. Urinary Organic Acids Increase After Clinical Stabilization of Hospitalized Children With Severe Acute Malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin*. 2019;40(4):532-43.

Bandsma RHJ, Voskuil W, Chimwezi E, Fegan G, Briend A, Thitiri J, Ngari M, Mwalekwa L, Bandika V, Ali R, Hamid F, Owor B, Mturi N, Potani I, Allubha B, Muller Kobold AC, Bartels RH, **Versloot CJ**, Feenstra M, van den Brink DA, van Rheenen PF, Kerac M, Bourdon C, Berkley JA. A reduced-carbohydrate and lactose-free formulation for stabilization among hospitalized children with severe acute malnutrition: A double-blind, randomized controlled trial. *PLoS Medicine*. 2019;16(2):e1002747

Versloot CJ, Attia S, Bourdon C, Richardson SE, Potani I, Bandsma RHJ, Voskuil W. Intestinal pathogen clearance in Malawian children with severe acute malnutrition is unrelated to inpatient morbidity. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2018;24:109-113.

Versloot CJ, Voskuil W, van Vliet SJ, van den Heuvel M, Carter JC, Phiri A, Kerac M, Heikens GT, van Rheenen PF, Bandsma RHJ. Effectiveness of three commonly used transition phase diets in the inpatient management of children with severe acute malnutrition: a randomized controlled trial in Malawi. *BMC Pediatrics*. 2017;17(1):112.

Di Giovanni V, Bourdon C, Wang DX, Seshadri S, Senga E, **Versloot CJ**, Voskuil W, Semba RD, Trehan I, Moaddel R, Ordiz MI, Zhang L, Parkinson J, Manary MJ, Bandsma RH. Metabolomic changes in serum of children with different clinical diagnoses of malnutrition. *Journal of Nutrition*. 2016;146(12): 2436-44.

Zhang L, Voskuil W, Mouzaki M, Groen AK, Alexander J, Bourdon C, Wang A, **Versloot CJ**, Di Giovanni V, Wanders RJ, Bandsma R. Impaired bile acid homeostasis in children with severe acute malnutrition. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0155143.

Attia S, **Versloot CJ**, Voskuil W, van Vliet SJ, di Giovanni V, Zhang L, Richardson S, Bourdon C, Netea MG, Berkley JA, van Rheenen PF, Bandsma RH. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2016;104(5):1441-49

Curriculum vitae

Chris Versloot was born on September 21, 1992 in Schiedam. After completing her secondary education at Stedelijk Gymnasium Schiedam in 2010, Chris started studying Medicine at Leiden University. She successfully finished her bachelor's degree in 2013. In preparation of her scientific internship, she was taught laboratory skills in the Department of Internal Medicine/Thrombosis and Hemostasis at Leiden University Medical Center (LUMC) under the supervision of Dr. B.J.M. van Vlijmen. In June 2014, Chris moved to Canada to start her scientific internship. Through her work in the research group of Dr. Robert Bandsma in the Hospital for Sick Children/Sickkids in Toronto (Canada), she was able to further develop her scientific skills. Her enthusiasm lies in the intersection of basic science and the potential impact of research in the field of severe malnutrition, leading her to pursue this line of research. Chris arranged a transfer to the University of Groningen where she successfully applied to the MD/PhD program of the Junior Scientific Masterclass at the University Medical Center Groningen (UMCG). This enabled her to combine her clinical internships with a PhD degree. She started her PhD studies in the laboratory of Pediatrics in the UMCG under supervision of Prof. Dr. B.M. Bakker and Sickkids under supervision of Dr. Robert Bandsma. For her research, Chris spent several weeks in the Pediatrics Department in Queen Elizabeth Central Hospital in Blantyre, Malawi. The studies presented in this thesis are the result of a close collaboration between Groningen, Toronto and Blantyre. Chris also participated in the PhD curriculum of TULIPS Child Health (Training Upcoming Leaders in Pediatric Science). After completing her clinical internships at the Treant Scheper Hospital in Emmen and her differentiation internships in Pediatrics in the Nij Smellinghe Hospital in Drachten as well as Pediatric Surgery in the UMCG in Groningen, Chris obtained her medical degree in November 2019. As of October 2021, she started her clinical career as pediatric resident not in training (ANIOS) in Reinier de Graaf Gasthuis, The Netherlands.

