

University of Groningen

## Essential fatty acid absorption and metabolism in hepatic disorders

Werner, Anniek

**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:*

2005

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

*Citation for published version (APA):*

Werner, A. (2005). *Essential fatty acid absorption and metabolism in hepatic disorders*. 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.

## SAMENVATTING

In dit proefschrift is de rol onderzocht van fosfolipiden (PL) bij absorptie en metabolisme van essentiële vetzuren (EFA), onder fysiologische condities en bij leveraandoeningen. EFA kunnen niet door het lichaam zelf gesynthetiseerd worden, maar EFA, en hun lange-keten meervoudig onverzadigde metabolieten (LCPUFA) van de omega-3 of omega-6 serie, zijn wel onmisbaar voor normale functie en ontwikkeling van het lichaam. EFA deficiëntie is geassocieerd met malabsorptie van voedingsvet, groeiretardatie, steatose en stoornissen in de neurologische ontwikkeling, maar deze symptomen zijn specifiek worden vaak pas duidelijk na een langdurige subklinische fase. Kinderen hebben meestal een beperkte EFA voorraad in vetweefsel, en een hoge EFA behoefte tijdens de groei, waardoor ze bijzonder afhankelijk zijn van adequate inname en absorptie van EFA via de voeding. EFA zijn in voeding vooral aanwezig in de vorm van triglyceriden (TG), die slecht geabsorbeerd worden bij aandoeningen waarbij lipolyse of solubilizatie van voedingsvet gestoord is, zoals bij cystic fibrosis (CF) of cholestase. EFA kunnen ook in de voeding aanwezig zijn in de vorm van fosfolipiden (PL). PL zijn polairder, dus minder afhankelijk van de aanwezigheid van gal voor solubilizatie in het waterige darmlumen, en ze worden gedeeltelijk intact geabsorbeerd door de darm, zonder lipolyse<sup>(6; 22)</sup>. PL kunnen hierdoor makkelijker uit de darm worden opgenomen tijdens beperkte lipolyse of galsecretie, en er zijn aanwijzingen dat PL na absorptie een bijzonder hoge biologische beschikbaarheid hebben voor het lichaam<sup>(8; 10; 11)</sup>.

Ons doel was de effecten van EFA deficiëntie op darm- en leverfuncties te specificeren, en een effectief oraal supplement te ontwikkelen om EFA deficiëntie te voorkomen of te genezen bij patiënten met risico op EFA deficiëntie, zoals bij cystic fibrosis en cholestase.

### **Vetmalabsorptie in EFA-deficiënte muizen wordt niet veroorzaakt door verminderde galsecretie**

Galzouten en galfosfolipiden maken absorptie van voedingsvet mogelijk door intraluminaire vet solubilizatie en door het leveren van oppervlaktemateriaal voor chylomicronen (CM). In ratmodellen voor EFA deficiëntie bleek lipolyse van voedingsvet ongestoord te zijn, maar was galsecretie verminderd<sup>(17; 20)</sup>. In hoofdstuk 2 hebben wij echter aangetoond dat in EFA deficiënte muizen de galsecretie juist sterk is toegenomen, waardoor een tekort aan gal als oorzaak van vetmalabsorptie bij EFA deficiëntie kan worden uitgesloten. Om de rol van galfosfolipiden voor vetopname nader te specificeren, hebben we de effecten van EFA deficiëntie vergeleken in

normale muizen en in genetisch gemodificeerde muizen die fosfolipid-vrije gal uitscheiden (*Mdr2*<sup>-/-</sup> muizen). Als veranderingen in vetzuursamenstelling van gal-fosfolipiden betrokken zouden zijn bij EFA deficiëntie-geïnduceerde vetmalabsorptie, dan zou vetabsorptie in *Mdr2*<sup>-/-</sup> muizen niet veranderen tijdens EFA deficiëntie. Echter, vetopname en galsecretie waren net zo aangedaan door EFA deficiëntie in *Mdr2*<sup>-/-</sup> als in controlemuizen. Dit impliceert dat vetmalabsorptie bij EFA deficiëntie niet veroorzaakt wordt door verminderde galsecretie, maar waarschijnlijk gerelateerd is aan stoornissen in de intracellulaire fase van vetabsorptie in enterocyten, mogelijk door te lage EFA concentraties in plasma- en microsomale membranen.

### **EFA deficiëntie in muizen leidt tot steatose en secretie van grote VLDL deeltjes**

Naast vetmalabsorptie en hypersecretie van gal is EFA deficiëntie in muizen geassocieerd met hypotriglyceridemie en steatose. In hoofdstuk 3 onderzochten we of gestoorde VLDL secretie bijdraagt aan deze metabole consequenties van EFA deficiëntie in muizen. Zowel *in vivo* als *in vitro* bleken lever triglyceride (TG) concentraties verhoogd, maar was de hepatische VLDL-TG secretie kwantitatief normaal, hoewel de uitgescheiden VLDL deeltjes opmerkelijk groot waren.

EFA onderdrukken lipogenese in de lever via down-regulatie van SREBP1c, dus kan synthese van niet-essentiële vetzuren toenemen tijdens EFA deficiëntie. De stapeling van lever-TG door deze toegenomen synthese, bij gelijkblijvende VLDL-TG secretie, zou versterkt kunnen worden door toegenomen VLDL klaring. Expressie van genen die VLDL katabolisme stimuleren (apoA-V, apoC-II) was inderdaad verhoogd, en hoewel plasma- en leverlipase concentraties (HL en LPL) normaal waren in EFA-deficiënte muizen, kunnen grotere VLDL deeltjes gevoeliger zijn voor snelle klaring. Net zoals EFA het functioneren van celmembraan-PL beïnvloeden, kunnen ze de PL laag die lipoproteïnen omhullen beïnvloeden. Zowel deeltjesgrootte (oppervlaktekromming) als lage EFA concentraties kunnen de VLDL structuur veranderen, resulterend in betere toegankelijkheid voor lipasen of affiniteit voor apoCII of apoAV. We concluderen dat steatose en hypotriglyceridemie in EFA-deficiënte muizen waarschijnlijk een resultante is van toegenomen hepatische TG synthese, onveranderde VLDL-TG secretie en productie van grote VLDL deeltjes die sneller geklaard worden. De effecten van EFA deficiëntie op VLDL grootte worden wellicht bepaald door de beschikbaarheid van PL voor lipoproteïnevorming. De toegenomen secretie van PL in gal door EFA-deficiënte muizen zou de beschikbaarheid van PL in de lever voor VLDL vorming kunnen verlagen, waardoor grotere lipoproteïnen geproduceerd worden.

## Chylomicron grootte in lymfe is omgekeerd evenredig met gal-PL secretie in muizen

We hebben de hypothese dat PL-beschikbaarheid de grootte van lipoproteïnen bepaalt getest in hoofdstuk 4, door te onderzoeken of de grootte van intestinale lipoproteïnen ook omgekeerd evenredig is met PL beschikbaarheid. Omdat gal-PL secretie afwezig is in *Mdr2*<sup>-/-</sup> muizen, maar juist sterk verhoogd in EFA-deficiënte muizen, hebben we chylomicron (CM) grootte in lymfe gemeten in deze twee muismodellen, d.m.v. canulatie van de mesenterische lymfevaten. CM waren aanzienlijk groter in muizen zonder gal-PL secretie (*Mdr2*<sup>-/-</sup> muizen), terwijl hypersecretie van gal-PL in de darm (EFAD muizen) secretie van kleine CM in lymfe induceerde. Deze bevindingen bevestigen onze hypothese dat PL beschikbaarheid een cruciale determinant is van intestinale lipoproteïne grootte. Aangezien EFA deficiënte muizen grotere hepatische VLDL deeltjes produceren dan EFA sufficiënte muizen, is secretie van kleine lipoproteïnedeeftjes echter geen intrinsiek maar een orgaanspecifiek effect van EFA deficiëntie. Net als bij VLDL deeltjes kan veranderde grootte en vetzuursamenstelling van CM het intravasculaire metabolisme veranderen<sup>(13)</sup>. Grotere CM worden misschien trager in de lymfe uitgescheiden, maar worden vervolgens wellicht zeer efficiënt gemetaboliseerd, aangezien grote CM een grotere affiniteit hebben voor lipasen en sneller geklaard worden dan kleine CM. Ook worden EFA-rijke CM sneller geklaard dan EFA-arme. Dit zou voor een deel het fenomeen kunnen verklaren dat, hoewel post-prandiale verschijning in plasma van voedingsvet vertraagd is in zowel EFA-deficiënte als in gal-PL-deficiënte (*Mdr2*<sup>-/-</sup>) muizen, alleen EFA-deficiënte muizen werkelijk vetmalabsorptie hebben. Dit ondersteunt het concept dat PL in het darmlumen niet zozeer cruciaal zijn voor quantitative opname van vet uit voeding, maar des te meer voor abortiesnelheid en het daaropvolgende metabolisme van voedingsvet.

## Geen stoornissen in EFA metabolisme in 2 muismodellen voor CF

Bijvelds<sup>(6)</sup> beschreef dat in muismodellen voor cystic fibrosis (CF), *cftr*<sup>-/-</sup> of CFTR knockout-muizen een aanzienlijke vetmalabsorptie hebben, wat kan resulteren in EFA deficiëntie. Tekorten aan EFA of hun lange-keten metabolieten (LCPUFA) worden inderdaad nog steeds beschreven in CF patiënten, ondanks de huidige hypercalorische voeding en pancreasenzym substitutie. Er is gesuggereerd dat verminderde functie van het CFTR eiwit direct de synthese van LCPUFA verstoort, waarbij pro-inflammatoire n-6 concentraties verhoogd, en anti-inflammatoire n-3 LCPUFA concentraties verlaagd zouden zijn in de typisch in CF aangedane organen, wat een primaire bijdrage zou leveren aan de symptomen van CF. Suppletie met n-3 LCPUFA, maar niet met de voorloper ALA, zou bepaalde symptomen van CF

verbeteren. Om vast te stellen of specifieke EFA- of LCPUFA-suppletie geïndiceerd is in CF, hebben we vetzuurprofielen geanalyseerd in organen van 2 muismodellen voor CF; met en zonder vetmalabsorptie. In beide CF modellen hebben we aangetoond dat vetzuurprofielen in organen van CF muizen vrijwel identiek waren aan die in niet-aangedane dieren van dezelfde sexe uit hetzelfde nest. *In vivo* conversie van <sup>13</sup>C-EFA in AA en DHA was ongestoord in CF muizen vergeleken met controles uit hetzelfde nest, wat impliceert dat gestoorde LCPUFA synthese geen intrinsiek kenmerk is van het CF fenotype, en dat vetmalabsorptie geen grote invloed heeft op EFA status in CF muizen.

In de afgelopen jaren is een grote verscheidenheid aan CF muismodellen ontwikkeld, die net als CF patiënten onderling fenotypisch enorm van elkaar verschillen. Behalve aan de specifieke CFTR mutatie en aan omgevingsfactoren, is de fenotypische variabiliteit in CF gerelateerd aan onafhankelijk overervende zogenaamde 'ziekte-modulerende' genen, die coderen voor eiwitten die (gedeeltelijk) kunnen compenseren voor de effecten van CFTR dysfunctie. We hebben aangetoond dat voeding en leeftijd, maar voornamelijk genetische achtergrond en allesoverheersende determinant zijn van EFA status in CF muizen. In de studies waarin gesuggereerd werd dat LCPUFA synthese door CFTR gereguleerd wordt, en zo CF symptomen beïnvloedt, zijn de CF muizen vergeleken met controle muizen van een geheel andere muizenstam. Voor elke zinnige vergelijking van EFA status tussen CF muismodellen, en zeker voor extrapolatie van bevindingen naar de humane situatie, moet de vergelijkbaarheid van de genetische achtergrond van de muismodellen grondig gecontroleerd worden, en is het gebruik van controlemuizen uit hetzelfde nest een absolute vereiste.

We concluderen dat CFTR dysfunctie LCPUFA synthese niet verstoort, en dat suboptimale vetzuurprofielen in CF waarschijnlijk een secundair gevolg zijn van chronische ontsteking of inadequate voeding. Voor CF patiënten zouden deze conclusies impliceren dat een adequate EFA intake afdoende het ontstaan van EFA of LCPUFA deficiëntie zou moeten kunnen voorkomen. Aangezien vetmalabsorptie geen duidelijk effect had op EFA status in CF muizen, en specifieke EFA suppletie dus niet geïndiceerd lijkt bij deze aandoening, hebben wij ons voor verdere studies naar geschikte EFA suppletie strategieën geconcentreerd op patiënten met cholestatische leveraandoeningen.

### **Orale behandeling van EFA deficiëntie met TG of PL bij cholestase**

EFA deficiëntie komt veel voor bij cholestatische aandoeningen, als gevolg van malabsorptie van EFA uit de voeding, waarin EFA vooral aanwezig zijn geësterificeerd tot hydrofobe TG moleculen. De amfifiele PL moleculen zijn beter oplosbaar dan TG in

het waterige darmlumen, en worden gemakkelijker geabsorbeerd tijdens gal deficiëntie. PL worden ofwel als intacte moleculen geabsorbeerd, of na vertering tot lyso-PL. In hoofdstuk 5 hebben we aangetoond dat in EFA-deficiënte muizen met acute cholestase, orale EFA suppletie als TG of als PL even effectief kon voorkomen dat EFA concentraties in erythrocyten daalden. Echter, voor hersen- en leverweefsel waren orale PL duidelijk superieur aan TG voor het verhogen van EFA en LCPUFA concentraties. Daarnaast verhinderde orale suppletie met PL gewichtsverlies tijdens EFA deficiëntie en cholestase, en suppletie met TG niet, wat het concept ondersteunt dat enterale PL een positief effect hebben op vetabsorptie tijdens tekort aan gal in de darm.

In hoofdstuk 6 hebben we de effectiviteit van orale EFA suppletie als PL of TG vergeleken voor de behandeling van EFA deficiëntie bij kinderen met chronische cholestase, die frequent een suboptimale EFA status hebben<sup>(16)</sup>. EFA-suppletie als TG of PL gedurende drie maanden voorkwam verslechtering van linolzuur (C18:2n-6), mead acid (C20:3n-9) en de som van n-6 vetzuren in rode bloedcellen (RBC) zoals die te zien was bij niet-gesuppleerde kinderen. En hoewel we geen directe verschillen konden aantonen van TG- of PL-suppletie bij groepsgewijze vergelijking van EFA in RBC, resulteerde PL-suppletie duidelijk in een positieve maandelijkse toename van linolzuur in RBC, en TG-suppletie niet.

Opmerkelijk genoeg was in cholestatistische muizen het verschil in effect tussen TG en PL suppletie niet meetbaar in RBC, maar wel heel duidelijk in de doelwitorganen van EFA, lever en hersenen.

Aansluitend bij Korotkova en Rioux trekken wij het paradigma in twijfel dat RBC vetzuurprofielen een accurate weerspiegeling zijn van EFA status in het lichaam. Door hun lange halfwaardetijd, en hun korte-termijn onafhankelijkheid van post-prandiale voedingsvetconcentraties in plasma, zijn RBC inderdaad een stabiel en toegankelijk compartiment voor analyse van EFA status. Maar vermoedelijk vindt er specifieke kanalisatie plaats van EFA of LCPUFA naar doelwitorganen als brein, lever en darm, ten koste van minder cruciale weefsels als RBC. Behalve internationale consensus t.a.v. gevalideerde referentiewaarden die biochemische EFA-deficiëntie definiëren, zou het zeer nuttig zijn om sensitieve functionele tests te ontwikkelen ter beoordeling van deficiëntie, sufficiëntie en inname-behoefte van EFA en LCPUFA in patiënten en in diermodellen<sup>(7; 21)</sup>.

Het mechanisme dat de opvallend efficiënte opname van EFA of LCPUFA door de hersenen reguleert is nog onbekend. In beperkte mate kunnen vetvoorraden in het lichaam de hersenen van EFA voorzien<sup>(9)</sup>, en hoewel astrocyten AA en DHA kunnen

synthetiseren uit EFA, is plasma de belangrijkste bron van LCPUFA voor het brein. In plasma zijn LCPUFA aanwezig als acyl-esters in lipoproteïnen, als vrije vetzuren gebonden aan albumine en als lyso-PL. Die laatste vorm wordt preferentieel in de hersenen geïncorporeerd<sup>(4; 18; 19)</sup>. PL uit voeding worden uit de darm opgenomen als intacte moleculen en als lyso-PL. Daarnaast kunnen orale PL een bron zijn van plasma (lyso)-PL als componenten van HDL-deeltjes, die ontstaan uit overtollig oppervlaktemateriaal van chylomicronen (CM). Wellicht worden CM oppervlakte-PL preferentieel gedirigeerd naar HDL voor transport naar het brein, voordat uitwisseling met andere lipoproteïnen of RBC plaatsvindt<sup>(6; 15; 22)</sup>. Zowel in de vorm van albuminegebonden lyso-PL als in de vorm van HDL-PL, vormen orale PL een goed toegankelijke bron van LCPUFA voor de hersenen, wat het concept ondersteunt dat enteraal opgenomen PL een grote biologische beschikbaarheid hebben voor het lichaam.

Uiteraard is hersen- en leverweefsel in humane studies ethisch gezien niet beschikbaar voor analyse van vetzuurprofielen. Maar de gunstige effecten van PL suppletie op de hersenen en de lever in cholestatische muizen, en de iets betere effecten van PL suppletie op RBC EFA in cholestatische kinderen, vormen wellicht toch een argument om EFA suppletie in de vorm van PL te prefereren boven TG voor preventie of behandeling van EFA deficiëntie in kinderen met cholestase.

## CONCLUSIES

Voorafgaand aan de in dit proefschrift beschreven studies, was uit de literatuur bekend dat EFA deficiëntie belangrijke consequenties heeft voor vetabsorptie en -metabolisme.

Aangetoond was dat EFA deficiëntie:

- galsecretie in ratten verlaagt;
- intraluminale lipolyse en enterocyt opname van voedingsvet niet beïnvloedt;
- linolzuur en arachidonzuur concentraties in intestinale membranen verlaagt;
- stapeling van vet in enterocyten veroorzaakt na orale toediening hiervan;
- vetmetabolisme na absorptie (bv. plasma lipid concentraties, lipoproteïne samenstelling en activiteit van lipolytische enzymen) beïnvloedt.

Echter, de specifieke rol van EFA deficiëntie in de verschillende fasen van vetabsorptie was niet goed begrepen. In dit proefschrift is aangetoond dat vetmalabsorptie tijdens EFA deficiëntie niet veroorzaakt wordt door verminderde galsecretie of door verlaagde EFA concentraties in galfosfolipiden. Op basis van de geobserveerde effecten van EFA deficiëntie op lipoproteïnevorming vermoeden wij dat EFA

deficiëntie-geïnduceerde vetmalabsorptie het gevolg is van EFA tekorten in membraanfosfolipiden, waardoor lipoproteïnemetabolisme gestoord is in lever en darm. In beide organen is tijdens EFA deficiëntie de secretiestap van het lipide-transport aangedaan; in beide organen is lipoproteïne grootte veranderd en treedt vetstapeling op. PL synthese en incorporatie in membranen gaat onverminderd door bij een tekort aan EFA, waarbij essentiële vetzuren vervangen worden door beschikbare n-9, n-7 of verzadigde vetzuren. De mechanismen die bepalen welk type vetzuur wordt geïncorporeerd in PL, of welk type PL wordt ingebouwd in lipoproteïne- of celmembranen zijn nog niet duidelijk.

Er zijn sterke aanwijzingen dat de chemische structuur van voedingsvet, TG of PL, relatief goed bewaard blijft bij intestinale vertering en absorptie. Deze aanwijzingen, samen met onze resultaten t.a.v. specifieke kanalisatie van EFA-PL naar lever en brein, suggereren dat aparte intracellulaire vetzuur-pools bestaan. Het zou interessant zijn om de mechanismen te achterhalen die het sorteren en dirigeren van verschillende vetzuur- en PL-types naar verschillende compartimenten in enterocyten of hepatocyten reguleren, en de daaropvolgende kanalisatie naar specifieke doelorganen. Zowel endotheel-lipase activiteit van de bloed-hersen-barriere als SRB1-gemedieerde opname van HDL-PL EFA door capillaire endotheelcellen zou een rol kunnen spelen bij de specifieke opname van EFA door het brein. In cholestatische muizen hebben de preferentiële opname van voedings-EFA in de vorm van PL door het brein duidelijk kunnen aantonen, waardoor deze vorm van EFA suppletie wellicht ook aan te bevelen is bij kinderen met chronische leverziekten. Voor toekomstige studies zou het fysiologisch en therapeutisch interessant zijn om de mechanismen die ten grondslag liggen aan de specifieke opname van EFA en LCPUFA door de hersenen, en de kanalisatie van enterale fosfolipid-EFA naar lever en brein op te helderen.