

Short chain fatty acids and colonic health

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor
aan de Universiteit Maastricht,
op gezag van de Rector Magnificus,
Prof. Mr. G.P.M.F. Mols
volgens het besluit van het College van Decanen
in het openbaar te verdedigen
op vrijdag 11 september 2009 om 12:00 uur

door

Henrike Maria Hamer

geboren te Delft op 13 mei 1981

Promotor:

Prof. dr. R-J M. Brummer

Copromotor:

Dr. D.M.A.E. Jonkers

Dr. F.J. Troost

Beoordelingscommissie:

Prof. dr. R.W. Stockbrügger

Dr. F. Brouns

Prof. dr. F. Kuypers (RUG, Groningen, the Netherlands)

Prof. dr. W. Saris

Prof. dr. K. Verbeke (KU Leuven, Belgium)

Samenvatting

Korte keten vetzuren (KKVZ) zijn eindproducten van bacteriële fermentatie van met name onverteerbare koolhydraten in de dikke darm. Afhankelijk van de samenstelling van het dieet en micro-organismen in de dikke darm worden KKVZ met koolstof (C) ketens van verschillende lengtes geproduceerd (acetaat (C2), propionaat (C3), butyraat (C4), valeraat (C5) en caproaat (C6). In tegenstelling tot de potentieel toxische metabolieten van eiwit fermentatie, wordt verondersteld dat KKVZ gunstige effecten hebben op de gezondheid van de dikke darm. Daarom zijn levensmiddelen fabrikanten geïnteresseerd in het ontwikkelen van koolhydraten die niet verteerd worden in de dunne darm, maar wel gefermenteerd worden in de dikke darm als ingrediënten voor nieuwe functionele voeding. Er is met name veel interesse in het verhogen van de concentratie van butyraat in de dikke darm omdat het de belangrijkste energie bron is voor de epitheelcellen. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige kennis over de effecten van butyraat op de gezondheid van de dikke darm. Uit dit overzicht kan geconcludeerd worden dat butyraat de gezondheid van de dikke darm bevordert door de ontsteking en oxidatieve stress te verlagen, het proces van carcinogenese te vertragen en de barrière functie van de dikke darm te versterken. Deze effecten zijn echter met name aangetoond met behulp van diermodellen en *in vitro* onderzoeken. Slechts weinig studies hebben de gezondheidsbevorderende effecten van butyraat en andere KKVZ onderzocht in mensen. De humane studies naar de effecten van KKVZ die uitgevoerd zijn betreffen alleen studies in patiënten met actieve ontsteking van de dikke darm en bekijken met name het effect op klinische parameters. Tot op heden zijn er geen studies waarin de directe effecten van KKVZ zijn onderzocht in gezonde vrijwilligers en patiënten met slechts een milde ontsteking van de dikke darm, terwijl de gezonde mensen en mensen met milde darmklachten de grootste doelgroep vormen voor het nuttigen van de nieuwe functionele voeding.

Verschillende *in vitro* onderzoeken hebben de effecten van butyraat op de gezondheid van de dikke darm onderzocht, maar van de effecten van de andere KKVZ is nog weinig bekend. Tevens zijn de effecten moeilijk te vergelijken omdat ze in verschillende modellen zijn onderzocht. Daarom was de doelstelling van het onderzoek dat beschreven is in **hoofdstuk 3**, het vergelijken van de effecten van de KKVZ met verschillende lengtes variërend tussen 2 en 6 koolstof atomen op ontsteking, antioxidant capaciteit en epitheliale integriteit in één studie, waarbij gebruik werd gemaakt van een co-cultuur model van een humane epitheliale cel lijn (Caco-2) en een medium met humaan vol bloed. De resultaten van dit *in vitro* onderzoek laten zien dat butyraat de meest potente effecten heeft op de remming van pro-inflammatoire cytokines, verbetering van de transepitheliale resistentie en de toename van het antioxidant glutation. Deze effecten werden ook waargenomen voor valeraat, propionaat en caproaat, maar niet voor acetaat. De grootte van de effecten was als volgt: butyraat >> valeraat > propionaat > caproaat.

Omdat butyraat de meest potente effecten leek te hebben, zijn in **hoofdstuk 4** de effecten van butyraat op de gezondheid van de dikke darm onderzocht in 16 gezonde vrijwilligers in een studie met een gerandomiseerd placebo gecontroleerd cross-over design. De interventie, die bestond uit dagelijks een butyraat klysma (60 mL, 100 mM) gedurende 14 dagen, resulteerde in een significante stijging van de concentratie van het antioxidant glutation in het weefsel van de dikke darm. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de resultaten van de *in vitro* studie beschreven in **hoofdstuk 3**. Daarnaast werd ook een daling in de concentratie urinezuur gemeten. Deze resultaten lijken te wijzen op een daling van de oxidatieve stress als gevolg van de toediening van butyraat. In een volgende studie werden de effecten van een dagelijks butyraat klysma (60 mL, 100 mM) gedurende 20 dagen op ontsteking en oxidatieve stress geëvalueerd in patiënten met een laaggradige ontsteking van de dikke darm. Voor deze studie met een gerandomiseerd placebo gecontroleerd parallel design, werden 36 patiënten met colitis ulcerosa in klinische remissie geïncludeerd. De resultaten van deze studie die zijn beschreven **hoofdstuk 5**, bevestigen de aanwezigheid van een laaggradige ontsteking en een lichte verhoging van oxidatieve stress in deze patiënten. Ten opzichte van waardes gemeten in

gezonde vrijwilligers werden in biopsies van de dikke darm van deze patiënten significant hogere concentraties pro-inflammatoire cytokines (IL-1 β , IL-12, IFN- γ), geoxideerd glutation en calprotectine gemeten. Tevens waren de hoeveelheden van het gereduceerd glutation, antioxidant enzymen en de totale antioxidant capaciteit in biopsies van de dikke darm juist verlaagd in de patiënten ten opzichte van gezonde controles. De interventie met butyraat resulteerde slechts in een lichte verhoging van de IL-10/IL-12 ratio en het chemokine CCL5. Over het algemeen werden er geen grote effecten van de interventie met butyraat op ontsteking of oxidatieve stress geobserveerd in de patiënten met colitis ulcerosa in remissie. Echter, uit de resultaten kon wel opgemaakt worden dat het effect van butyraat op totaal glutation omgekeerd gecorreleerd was aan de mate van ontsteking. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de effectieve dosis van butyraat afhangt van de mate van ontsteking van de darm.

Verscheidende studies met cellijnen en diermodellen hebben aangetoond dat butyraat ook een effect kan hebben op de vorming van de slijmlaag, oftewel de mucuslaag, die op de cellen van de darmwand ligt. Deze mucuslaag is erg belangrijk omdat dit een beschermlaag vormt tegen mogelijke schadelijke stoffen in de darmholte. Het bestuderen van de mucuslaag is zeer interessant, maar het wordt bemoeilijkt door het feit dat het lastig is om *in vivo* monsters van deze humane mucuslaag te nemen. In **Hoofdstuk 6** wordt een gestandaardiseerde techniek beschreven om met kleine cytologie borsteltjes, monsters te nemen van de mucuslaag onder fysiologische omstandigheden gedurende een endoscopie. In deze monsters konden verschillende analyses worden gedaan, zoals het bepalen van de hoeveelheid mucines, sialzuur residuen en secretair IgA. Daarnaast konden met behulp van SELDI-TOF-MS, persoon specifieke eiwit profielen van de mucus monsters worden verkregen. Deze techniek om monsters te verkrijgen was echter niet sensitief genoeg om de subtiele effecten van de interventie met butyraat te onderzoeken. Om de effecten van butyraat op de mucuslaag in gezonde vrijwilligers en patiënten met colitis ulcerosa in remissie te onderzoeken werden vervolgens andere parameters in mucosale biopsies van de dikke darm (expressie van MUC2 en TFF3 en verdeling van sialo- en sulfomucines) en ontlasting bestudeerd (totale mucine secretie en secretair IgA concentraties). De resultaten die beschreven staan in **hoofdstuk 7**, toonden echter geen significante effecten van butyraat op de gemeten mucus gerelateerde parameters.

In conclusie, de verschillende studies beschreven in dit proefschrift ondersteunen de hypothese dat toevoeging van onverteerbare, fermenteerbare koolhydraten die leiden tot een verhoging van de KKVZ concentratie in de dikke darm aan de voeding bij kan dragen aan een verbetering van de darmgezondheid. Met name butyraat blijkt een belangrijke metaboliet te zijn dat de ontsteking in de dikke darm kan verlagen en de barriere functie van de darm kan versterken, zoals geobserveerd werd in een *in vitro* model, en de antioxidantcapaciteit kan verhogen, zoals geobserveerd werd in een interventie studie in gezonde vrijwilligers. Echter meer onderzoek is nodig om de optimale KKVZ concentratie gedurende gezondheid en ziekte te bepalen.