

Short chain fatty acids and colonic health

Citation for published version (APA):

Hamer, H. M. H. (2009). *Short chain fatty acids and colonic health*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090911hh>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090911hh](https://doi.org/10.26481/dis.20090911hh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

Short chain fatty acids (SCFA) are end-products of luminal microbial fermentation of predominantly non-digestible dietary carbohydrates. SCFA with different carbon chain lengths (acetate (C2), propionate (C3), butyrate (C4), valerate (C5) and caproate (C6)) are produced in varying amounts depending on the diet and the composition of the intestinal microbiota. In contrast to potentially toxic metabolites that are formed through fermentation of proteins, SCFA are proposed to beneficially affect colonic health. Therefore, food manufacturers are interested in the development of non-digestible carbohydrates as ingredients for novel functional foods. Especially butyrate has become of major interest as it is the main energy source for colonocytes. In **chapter 2** the current knowledge on the effects of butyrate on colonic health has been reviewed. From this review it can be concluded that butyrate can affect colonic health by reducing inflammation and carcinogenesis, decreasing oxidative stress, and improving the colonic defence barrier. However, these previous studies have mainly investigated the effects of butyrate in animal and *in vitro* models. Only limited numbers of human studies have been performed, which have all been carried out in patients with active intestinal inflammation and mainly focus on clinical parameters. Overall, these studies suggest that luminal administration of butyrate results in an amelioration of the symptoms and inflammation in active UC patients.

So far no studies have investigated the local effects of SCFA in the healthy or mildly disturbed colon, while healthy subjects or individuals with chronic mild intestinal complaints comprise an important target group for functional foods.

Although several *in vitro* studies have investigated the effects of butyrate on colonic homeostasis, the effects of other SCFA with different chain lengths have been studied less extensively. In addition, effects are hard to compare as they involve separate studies and/or different models. Therefore, the aim of the study described in **chapter 3** was to compare the effects of C2 to C6 SCFA on parameters of inflammation, antioxidant capacity and epithelial integrity in one study using a co-culture model of human epithelial cells (Caco-2) and human whole blood cultures. The results of this *in vitro* study showed that butyrate inhibits the release of several pro-inflammatory cytokines, improves of the trans-epithelial resistance and increases the concentration of the antioxidant glutathione. Remarkably, such effects were also observed for valerate, propionate and caproate with a rank order of potency being butyrate >> valerate > propionate > caproate.

In **chapter 4** the effect of butyrate, being the most potent SCFA, was investigated in 16 healthy volunteers in a randomised placebo controlled cross-over study. The intervention with daily butyrate enemas (60 mL, 100 mM) for 14 days resulted in significantly increased colonic concentrations of the antioxidant glutathione as was also observed in the *in vitro* study. Furthermore, the colonic concentration of uric acid decreased, indicating that the intervention with butyrate decreased oxidative

stress in healthy volunteers. In the following study, the effects of butyrate enemas (60 mL, 100 mM) for 20 days on inflammation and oxidative stress were evaluated in patients with low-grade colonic inflammation using a randomised placebo controlled parallel design. For this study 36 patients with ulcerative colitis (UC) in clinical remission were included. The results, described in **chapter 5**, confirmed the presence of a low-grade inflammation and oxidative stress in these UC patients in clinical remission as indicated by significantly increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12, IFN- γ), faecal calprotectin and oxidised glutathione, and significantly decreased levels of reduced glutathione, antioxidant enzyme activity and total antioxidant capacity in colonic biopsies compared to healthy controls. However, the butyrate intervention only resulted in a slight increase of the IL-10/IL-12 ratio and the chemokine CCL5. Overall, no evident anti-inflammatory effect of this butyrate treatment was observed in these patients. Also no effects on colonic glutathione levels were found, but the effects of butyrate enemas on total colonic glutathione appeared to be inversely related to the level of inflammation at the start of the study. This may indicate that the effective dose of butyrate to decrease inflammation and oxidative stress depends on the level of colonic inflammation.

Besides inflammation and oxidative stress, several studies have proposed a beneficial role for butyrate in the maintenance of the colonic mucus layer. The colonic mucus layer is the first line of defence to the external environment and protects the mucosa against mechanical stress and chemical or microbiological aggressors. Since the mucus layer is impaired during intestinal disease and it can be affected by the diet, it is interesting to evaluate the composition of the colonic mucus layer in relation to colonic health. However, as mucus samples are difficult to collect, it is complex to study the human colonic mucus layer *in vivo*. In **chapter 6** a standardised *in vivo* sampling technique to obtain human colonic mucus under physiological conditions during an endoscopic procedure using protected cytology brushes is described. The obtained colonic mucus samples were used for analysis of the concentrations of mucins, sialic acid residues and secretory IgA. Furthermore, using SELDI-TOF-MS, low molecular weight proteins in the mucus samples were profiled to identify (unknown) proteins present in these samples. Sampling and analysis of colonic mucus was feasible using these brushes and revealed subject specific protein profiles. However, this sampling technique was not sensitive enough to evaluate the rather subtle changes that can be induced by the butyrate intervention, due to a relatively large variance between triplicate samples of one subject. To evaluate the effects of the butyrate intervention in healthy volunteers and UC patients in clinical remission other mucus related parameters were studied in colonic mucosal biopsies and faecal samples obtained during both intervention studies. These parameters include RT-PCR and immunohistochemical analysis of MUC2 and TFF3, the distribution of sialomucins and sulphomucins, total mucin excretion and secretory IgA concentrations in

faeces. The results that are described in **chapter 7** revealed no significant effects of butyrate on the determined mucus-related parameters analysed.

In conclusion, the studies described in this thesis support the rationale for the addition of non-digestible fermentable dietary fibres to dietary products in order to increase colonic SCFA concentrations and thereby improve host health. Especially butyrate has shown to be an important metabolite that can decrease colonic inflammation, improve intestinal barrier function and reduce oxidative stress as observed in an *in vitro* model. Although not as prominent results were found *in vivo*, butyrate can improve the antioxidant defence capacity in healthy humans. However, the optimal SCFA concentration in health and disease remains to be determined. In addition, large prospective human intervention trials with long-term fermentable dietary fibre supplementation are needed to evaluate whether increased colonic SCFA levels are causatively related to improvements of functional parameters, such as colonic permeability and symptom scores.

Samenvatting

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 afkomstig 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 het colon als ingrediënten voor nieuwe functionele voeding. Er is met name veel interesse in het verhogen van de concentratie van butyraat in het colon omdat het de belangrijkste energiebron is voor de epitheelcellen. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige kennis over de effecten van butyraat op de gezondheid van het colon. Uit dit overzicht kan geconcludeerd worden dat butyraat de gezondheid van het colon bevordert door de ontsteking en oxidatieve stress te verlagen, carcinogenese te remmen en de barrière functie van het colon 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 met patiënten met actieve ontsteking van de dikke darm en bekijken met name het effect op klinische parameters. Over het algemeen tonen deze studies aan dat rectale toediening van KKVZ en/of butyraat symptoom scores en ontstekingswaarden kan verlagen in patiënten met actieve colitis ulcerosa. 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 het colon, terwijl deze mensen een belangrijke doelgroep vormen voor het nuttigen van de nieuwe functionele voedingsproducten.

Diverse *in vitro* onderzoeken hebben de effecten van butyraat op de gezondheid van het colon onderzocht, maar de mogelijke effecten van de andere KKVZ zijn nauwelijks bestudeerd. Daarnaast zijn de effecten moeilijk te vergelijken omdat ze in verschillende studies en met behulp van verschillende modellen zijn onderzocht. Daarom had het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 3**, de doelstelling om de effecten van de KKVZ met verschillende lengtes, variërend tussen 2 en 6 koolstof atomen, in één studie te vergelijken met betrekking tot parameters voor ontsteking, de antioxidant capaciteit en epitheliale integriteit. Hierbij werd gebruik gemaakt van een 'co-culture' model van een humane epitheliale cel lijn (Caco-2) en humaan volbloed. 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 sterkste effecten had, zijn in **hoofdstuk 4** de effecten van butyraat op de gezondheid van het colon onderzocht in 16 gezonde vrijwilligers in een gerandomiseerde placebo gecontroleerde cross-over studie. De interventie, die bestond uit dagelijks een butyraat klysma (60 mL, 100 mM) gedurende 14 dagen, toonde 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 vermindering 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 geïnccludeerd. De resultaten van deze studie die zijn beschreven in **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 biopten van het colon 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 biopten van het colon 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 correleerde met de mate van ontsteking. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de effectieve dosis van butyraat mogelijk afhangt van de mate van ontsteking van de darm.

Verschillende studies met cellijnen en diermodellen hebben aangetoond dat butyraat ook een effect kan hebben op de mucuslaag, die op de epitheelcellen van de darmwand ligt. Deze mucuslaag vormt een belangrijke beschermlaag tegen mechanische stress en chemische of microbiologische stressoren die aanwezig zijn in het darmlumen. Het bestuderen van de mucuslaag is zeer interessant, maar het wordt bemoeilijkt door het verkrijgen van monsters van deze humane mucuslaag *in vivo*. In **hoofdstuk 6** wordt een gestandaardiseerde techniek beschreven om met een cytologie borsteltje, gedurende een endoscopie, monsters te nemen van de mucuslaag onder fysiologische omstandigheden. In deze

monsters konden verschillende analyses worden gedaan, zoals het bepalen van de hoeveelheid mucines, sialzuur residuen en secretoir 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 aan te tonen. Om de effecten van butyraat op de mucuslaag in gezonde vrijwilligers en patiënten met colitis ulcerosa in remissie te onderzoeken werden vervolgens andere parameters geanalyseerd: expressie van MUC2 en TFF3 en verdeling van sialo- en sulfomucines in colonbiopten, en totale mucine secretie en secretoir IgA concentraties in faeces. De resultaten die beschreven staan in **hoofdstuk 7**, toonden echter geen significante effecten van butyraat op de gemeten mucus gerelateerde parameters.

Concluderend kan worden vastgesteld dat de verschillende studies beschreven in dit proefschrift de hypothese ondersteunen die stelt dat toevoeging van onverteerbare, fermenteerbare koolhydraten die leiden tot een verhoging van de KKVZ concentratie in de dikke darm aan de voeding kan bijdragen aan een verbetering van de darmgezondheid. Met name butyraat blijkt een belangrijke metaboliet te zijn dat ontsteking en oxidatieve stress in de dikke darm kan verlagen en de barrière functie van de darm kan versterken, zoals geobserveerd werd in een *in vitro* model. Ondanks dat de resultaten van de *in vivo* studies niet even prominent waren, werd een toename van de antioxidant capaciteit geobserveerd na toediening van butyraat in gezonde vrijwilligers. Echter meer onderzoek is nodig om de optimale KKVZ concentratie gedurende gezondheid en ziekte te bepalen. Daarnaast zijn er grotere prospectieve lange termijn humane interventie studies met fermenteerbare koolhydraten nodig om te evalueren of een verhoging van KKVZ causaal gerelateerd is met een verbetering van functionele parameters als permeabiliteit van de darm en symptoom scores.