

Mind the gap : experimental studies on splanchnic hypoperfusion and gastrointestinal integrity loss in man

Citation for published version (APA):

van Wijck, K. (2013). *Mind the gap : experimental studies on splanchnic hypoperfusion and gastrointestinal integrity loss in man*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2013

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.

CHAPTER 12

Summary



Gastrointestinal (GI) integrity is essential to preserve the two key functions of the gut, i.e. the absorption of dietary nutrients and water and the maintenance of an effective barrier against harmful luminal compounds. **Chapter 1** outlines the anatomy and regulation of the GI epithelial barrier, including a brief overview of situations associated with GI barrier dysfunction. The anatomical architecture of the epithelial barrier mainly builds on small intestinal epithelial cells and junctional complexes between these cells. Rapid renewal of the epithelium along the small intestinal crypt-villus axis contributes to the remarkable ability of the intestinal epithelium to adapt to physiological and pathophysiological stimuli such as non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) consumption and strenuous physical exercise (**chapter 2**).

Intestinal epithelial integrity loss can be established by detection of components of the epithelial barrier in blood or urine, detection of circulating (anti)bacterial products or by permeability analysis. **Part II** of this thesis focused on markers for enterocyte injury and permeability analysis. Enterocyte injury was measured by detection of fatty acid binding proteins (FABP). Data of previous human studies revealed that intestinal (I)-FABP and liver (L)-FABP are expressed in the mucosa of the small intestine, especially the jejunum, while ileal-bile acid binding protein (I-BABP) is specifically expressed in the ileum. Additionally, it was shown that especially the mature enterocytes at the top of the intestinal villi contain I-FABP. Since these proteins are rapidly released upon cellular injury, they are established as useful, early markers of intestinal integrity loss. The use of I-FABP, L-FABP and I-BABP for diagnosis of intestinal ischemia with ischemia-induced intestinal injury was studied in **chapter 3** of this thesis. All three markers were found to be increased in urine of patients with intestinal ischemia compared to patients with other final diagnoses, and plasma I-FABP and L-FABP levels were also higher in case of intestinal ischemia. Detection of these proteins above their cut-off point increased post-test probability for intestinal ischemia, strongly suggesting that detection of I-FABP, L-FABP and I-BABP can improve early diagnosis of intestinal ischemia.

Permeability analysis is an additional, more functional measure of GI epithelial barrier integrity. Detection of orally ingested permeability probes with different molecular weights in urine or plasma reflects the permeability of the GI mucosa. Many permeability tests are available, but currently no consensus exists. An important aim of this thesis was to compare probe excretion and accuracy of different permeability tests and to determine whether one of the tested assays could be recommended above the others. **Chapter 4** describes the comparison of two permeability tests in a randomized controlled trial: The first is based on the urinary excretion of three differently sized polyethylene glycol (PEG) probes, while the dual sugar test uses 5 g of lactulose and 0.5 g of rhamnose to evaluate small intestinal permeability. Healthy individuals received two oral doses of NSAID indomethacin, a drug known to increase GI permeability. Loss of barrier integrity was confirmed by significantly increased plasma I-FABP levels in the indomethacin-challenged state compared to placebo. Urinary excretion of PEG and sugars increased after indomethacin. Urinary excretion data and diagnostic accuracy of the tests showed

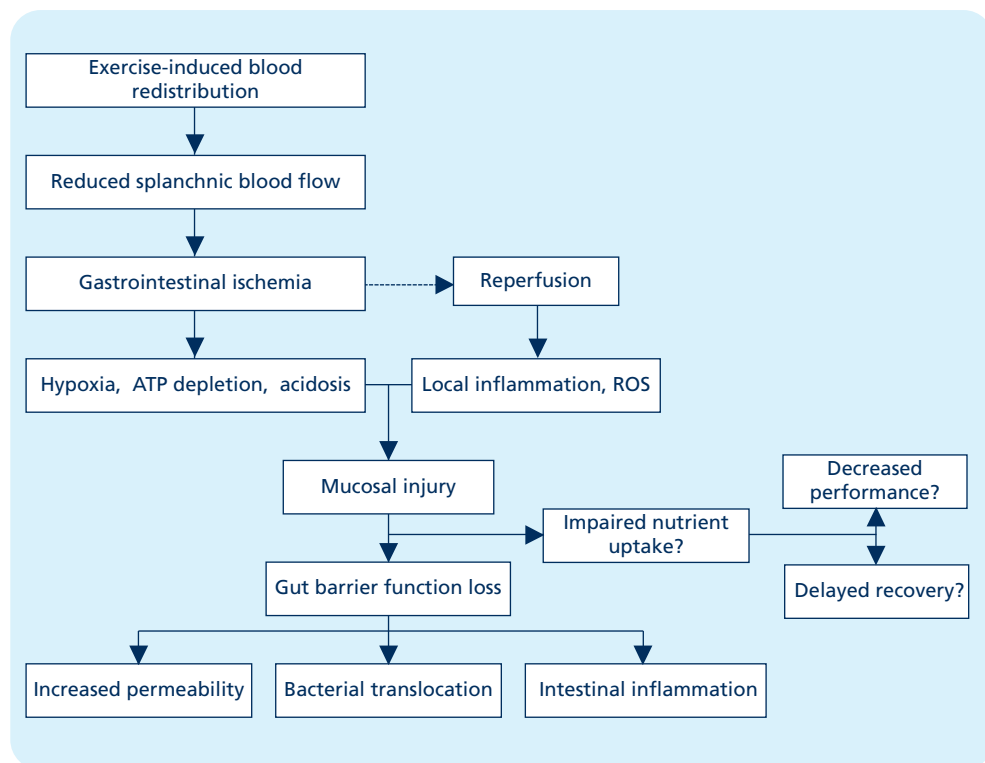


Figure 1: Schematic overview of the processes proposed to play a role in the development of exercise-induced gastrointestinal injury

Strenuous physical exercise leads to redistribution of blood, shunting blood away from the splanchnic area, thereby significantly reducing splanchnic blood flow. The ensuing ischemia leads to tissue hypoxia, local depletion of adenosinetriphosphate (ATP), and acidosis. After exercise, when splanchnic circulation is restored, reperfusion injury may develop, characterized by local inflammation and formation of reactive oxygen species (ROS). Both ischemia and reperfusion sequelae lead to mucosal damage and gut wall integrity loss, which is accompanied by increased permeability, bacterial translocation and intestinal inflammation.

It remains to be clarified whether the exercise-induced mucosal injury impairs nutrient uptake, potentially decreasing athletic performance and delaying post-exercise recovery.

high similarity for detection of indomethacin-induced increases in gastrointestinal permeability. These tests do not allow site-specific GI permeability analysis and require the oral intake of relatively large probe doses, thereby possibly affecting epithelial homeostasis. A novel multi-sugar test was developed to allow site-specific assessment in a more physiological setting, i.e. with a reduced oral probe load. In **chapter 5** and **6**, the improved analytical work-up and validation of this multi-sugar test are reported. The multi-sugar assay contains sucrose for gastroduodenal permeability, lactulose and rhamnose to reflect small intestinal permeability, and sucralose and erythritol for large intestinal permeability. Probes were first separated using liquid chromatography (LC), after which mass spectrometry (MS) was used for final detection. This LC-MS approach resulted in a considerably decreased limit of detection, allowing a 5-fold reduction of

the oral lactulose dose. The novel multi-sugar test was tested against the classical dual sugar test in a randomized crossover study in **chapter 6**. Urinary sucrose excretion and the sucrose/rhamnose ratio increased after indomethacin intake compared to placebo, suggesting increased gastroduodenal permeability determined by the multi-sugar test. Increased small intestinal permeability was detected by both tests after indomethacin intake, as reflected by elevated lactulose/rhamnose (L/R) ratios compared to placebo. However, individual probe analysis suggested that the high lactulose dose of the dual sugar test decreases monosaccharide permeability. Large intestinal permeability was unchanged after indomethacin. Altogether, the multi-sugar test was found to provide a physiological test condition for site-specific whole-gut permeability analysis. While clinical validation studies are essential to determine the usefulness of the multi-sugar test in different patient groups, the comparative studies described in this thesis improved our knowledge of GI permeability analysis in man.

Part III of this thesis focused on exercise-induced splanchnic hypoperfusion and GI integrity loss, and a comprehensive overview of these phenomena was given in **chapter 2** of this thesis, summarized in *Figure 1*.

In short, heavy physical exercise leads to redistribution of the GI blood flow in favor of active muscle, heart and skin, thereby significantly reducing perfusion in the splanchnic area. This phenomenon was studied and described in **chapter 7** using gastric air tonometry. During one hour of intensive cycling, splanchnic hypoperfusion rapidly developed and continued to exist in the post-exercise recovery period. Intestinal ischemia leads to cellular hypoxia, energy depletion and tissue acidosis, ultimately leading to small intestinal injury, reflected by significantly elevated plasma I-FABP levels. The latter significantly correlated with loss of GI barrier integrity, reflected by increased plasma L/R ratios. Additionally, intestinal damage may impair nutrient uptake, which may in turn affect physical performance and post-exercise recovery. In **chapter 8**, this hypothesis was studied. In line with the results in **chapter 7**, exercise induced small intestinal injury in healthy young men, and this intestinal injury correlated negatively with *in vivo* rates of protein digestion and absorption, when proteins are consumed directly post-exercise. These data imply that exercise attenuates protein digestion and absorption kinetics during acute post-exercise recovery compared to resting conditions due to enterocyte damage. These findings suggest an additional challenge for professional athletes and patients with chronic diseases, since especially these populations benefit from nutritional stimulation of early and complete recovery after physical exertion. While from chapter 7 and 8 it is clear that exercise itself induces significant small intestinal injury and compromises GI functioning, the intake of the NSAID ibuprofen prior to exercise was found to significantly worsen exercise-induced intestinal injury and increase GI permeability (**chapter 9**). These data are important, since many athletes use NSAIDs on a regular basis to prevent anticipated pain without being aware of the adverse effects of these drugs. Our findings in combination with the alarming indications that NSAIDs may induce cardiac

events strongly discourage the use of NSAIDs, especially for non-existing pain. In **chapter 10**, oral supplementation of L-citrulline prior to exercise was shown to improve splanchnic perfusion during exercise in healthy athletes compared to placebo amino acid L-alanine. Consequently, enterocyte damage was attenuated during exercise in case of pre-exercise L-citrulline supplementation, while parameters of cardiac function and performance did not change. These results suggest L-citrulline administration to be a promising therapy for improvement of splanchnic blood flow in case of hypoperfusion.

CHAPTER 13

Nederlandse samenvatting



Een intacte darmbarrière is van essentieel belang om de twee belangrijkste functies van de darm te behouden. Deze functies zijn (1) opname van voedingsstoffen en water en (2) preventie van het binnendringen van potentieel schadelijke stoffen die zich in het darmkanaal bevinden, zoals bacteriële producten en verteringssappen. **Hoofdstuk 1** schetst de anatomie en de regulatie van de darmbarrière, inclusief een kort overzicht van enkele situaties waarin sprake is van darmbarrièreverlies. Belangrijke onderdelen van de darmbarrière zijn de darmepitheelcellen en de verbindende complexen tussen deze cellen. Het darmepitheel wordt volledig vernieuwt in 3-4 dagen. Deze snelle vernieuwing draagt bij aan het opmerkelijke vermogen van de darm om zich aan te passen aan veranderende omstandigheden, zoals het gebruik van ‘non-steroid anti-inflammatory drugs’ (NSAIDs) en zware fysieke inspanning (**hoofdstuk 2**).

Darmbarrièreverlies kan worden vastgesteld door het detecteren van componenten van deze barrière in bloed of urine, door detectie van (anti)bacteriële producten in de bloedbaan, of door analyse van de doorlaatbaarheid van de darmwand, ook wel darmpermeabiliteit genoemd.

Deel II van dit proefschrift richt zich op markers voor darmcelschade en op het testen van de darmpermeabiliteit. Darmcelschade werd gemeten middels ‘intestinal’ en ‘liver fatty acid binding proteins’ (I-FABP en L-FABP, respectievelijk), en ‘ileal bile acid binding protein’ (I-BABP), kleine eiwitten die zich bevinden in het epitheel van de dunne darm. Eerdere studies toonden aan dat met name de volgroeide darmcellen op de toppen van de darmvilli deze eiwitten bevatten, en dat deze snel worden afgegeven wanneer darmcelschade optreedt. Hierdoor zijn deze specifieke eiwitten goed bruikbaar als vroege herkenners van darmcelschade. Het gebruik van I-FABP, L-FABP en I-BABP voor de diagnose van darmischemie en door ischemie ontstane darmschade werd bestudeerd in **hoofdstuk 3** van dit proefschrift. Darmischemie is een aandoening waarbij er geen of te weinig bloed naar de darm gaat, waardoor darmschade optreedt. Alle drie de markers bleken verhoogd aanwezig te zijn in de urine van patiënten met darmischemie, vergeleken met patiënten met andere diagnoses. Daarnaast waren de bloedwaarden voor I-FABP en L-FABP ook hoger in geval van darmischemie. Wanneer de bloed- of urinewaarden van deze eiwitten boven hun drempelwaarde uitstegen, bleek er sprake te zijn van een verhoogde kans op darmischemie bij deze patiënten. Deze bevindingen suggereren dat de detectie van I-FABP, L-FABP en I-BABP kan bijdragen aan het vroeg vaststellen van darmischemie in patiënten.

Permeabiliteitstesten zijn een andere manier om informatie te krijgen over de darmbarrière. De proefpersoon of patiënt drinkt een oplossing met teststoffen van verschillende grootte, waarna de concentraties van deze stoffen in bloed of urine bepaald wordt als weerspiegeling van de doorlaatbaarheid van de darmwand. Er zijn veel verschillende tests beschikbaar, maar er is geen consensus over welke test gebruikt moet worden. Een belangrijk doel van dit proefschrift was om de uitkomsten en de nauwkeurigheid van de verschillende permeabiliteitstesten te vergelijken en om te bepalen of een van de onderzochte tests kon worden aanbevolen boven de anderen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de vergelijking van twee permeabiliteitstesten, elk bestaande uit verschillende teststoffen: De eerste bestaat uit drie verschillende polyethyleenglycol-polymeren

(PEG); de andere, klassieke test bestaat uit 5 g lactulose en 0,5 g rhamnose, allebei suikers. Voor het onderzoek ontvingen de proefpersonen tweemaal indometacine, een NSAID waarvan bekend is dat het de doorlaatbaarheid van de darmwand tijdelijk verhoogt. Dit laatste werd bevestigd door een evidente stijging van I-FABP na inname van indomethacine in vergelijking met placebo. PEG en suikerwaarden in urine namen beiden toe na inname van indomethacine. Beide testen bleken veel gelijkenis te vertonen, zowel in de testuitkomsten als in de diagnostische nauwkeurigheid van de testen voor de detectie van door indomethacine veroorzaakte toegenomen darmpermeabiliteit. Helaas kan de permeabiliteit van specifieke delen van de darm niet bepaald worden met deze testen. Bovendien dient de proefpersoon relatief grote hoeveelheden van de teststof in te nemen, waardoor mogelijk het natuurlijk evenwicht in de darm verstoord wordt. Zodoende werd er een nieuwe multi-suikertest ontwikkeld om wel specifieke informatie te kunnen verkrijgen en waarbij kleinere hoeveelheden teststof ingenomen hoeft te worden.

In **hoofdstuk 5 en 6** van dit proefschrift werden de verbeterde detectiemethode en de validatie van deze multi-suikertest beschreven. De multi-suikertest bevat sucrose voor bepaling van de permeabiliteit van de maag en twaalfvingerige darm, lactulose en rhamnose voor de dunne darmpermeabiliteit, en sucralose en erytritol voor de dikke darmpermeabiliteit. Voor detectie van de suikers wordt er eerst gebruik gemaakt van vloeistofchromatografie (LC), waarna middels massaspectrometrie (MS) de suikergehaltes in bloed en urine worden bepaald. Deze LC-MS aanpak verlaagde de minimale detectiegrens aanzienlijk, waardoor het mogelijk werd om lagere suikerconcentraties accuraat te meten en bovendien een 5-voudige reductie van de in te nemen dosis lactulose mogelijk was. De nieuwe multi-suikertest werd getoetst aan de klassieke suikertest in een gerandomiseerde cross-over studie beschreven in **hoofdstuk 6**. Zowel sucrose als de sucrose/rhamnose ratio in urine steeg na inname van indomethacine in vergelijking met de placebo, wat erop wijst dat er sprake was van een verhoogde gastroduodenale permeabiliteit na indomethacine inname, gemeten middels de multi-suikertest. Verhoogde dunne darmpermeabiliteit werd gevonden na indomethacine inname met beide tests, zoals weerspiegeld door hogere lactulose/rhamnose (L/R) ratio's, vergeleken met placebo. Echter, de resultaten suggereerden ook dat de hoge dosis lactulose in de klassieke suikertest ervoor zorgt dat er minder rhamnose wordt uitgescheiden, wat betekent dat de testsubstanties zelf de resultaten kunnen beïnvloeden. Concluderend gaven de studieresultaten aan dat de multi-suikertest een geschikte en vooral betrouwbare test is om de permeabiliteit van het gehele maag-darmstelsel te beoordelen. Hoewel klinische validatiestudies essentieel zijn om het nut van de multi-suikertest in verschillende patiëntengroepen te bepalen, zijn de studies beschreven in dit proefschrift belangrijk omdat zij onze kennis van de darmpermeabiliteitsanalyses in de mens vergroten.

Deel III van dit proefschrift heeft betrekking op de verminderde doorbloeding van het maag-darmstelsel en de daaropvolgende darmbarrièreverlies die optreden tijdens intensieve lichamelijke inspanning. Een uitgebreid overzicht van deze fenomenen werd gegeven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift. Kort samengevat leidt zware lichamelijke inspanning tot een herverdeling

van de bloedvoorziening. Het maagdarmsstelsel wordt tijdelijk minder goed doorbloed, zodat de actieve spieren, het hart en de huid meer bloed kunnen ontvangen. De kritieke vermindering van de doorbloeding van het maagdarmsstelsel wordt hypoperfusie genoemd, en is onderzocht in de studie beschreven in **hoofdstuk 7**. Gedurende een uur intensief fietsen, ontwikkelde de hypoperfusie in het maagdarmsstelsel zich snel, en bleef bestaan in de herstelperiode na het sporten. Hypoperfusie kan leiden tot een tekort aan zuurstof en energie in de darmcellen, waardoor verzuring van het weefsel en uiteindelijk dunne darmschade ontstaan, weerspiegeld door verhoogde I-FABP-waarden in het bloed. Deze darmschade gaf aanzet tot darmbarrièreverlies, weerspiegeld door verhoogde L/R ratio's ten opzichte van rust. Darmschade kan de opname van voedingsstoffen bemoeilijken, waardoor mogelijk ook de fysieke prestaties en hersteltijd na het sporten negatief beïnvloed worden.

In **hoofdstuk 8** werd deze hypothese onderzocht. In lijn met **hoofdstuk 7**, leidde intensieve inspanning tot darmschade bij gezonde jonge mannen, en deze darmschade had een negatief effect op de vertering en absorptie van eiwitten die de atleten innamen direct na de fysieke inspanning. Met andere woorden, inspanning vermindert de verterings- en absorptiecapaciteit voor eiwit in de herstelperiode na inspanning vergeleken met rust. Deze bevindingen suggereren een extra uitdaging voor professionele atleten en patiënten met chronische ziekten, omdat vooral bij deze mensen voeding een belangrijk middel is om het herstel na de fysieke inspanning te bevorderen.

Uit **hoofdstuk 7 en 8** is reeds gebleken dat inspanning dunne darmschade en verminderde darmfunctie veroorzaakt.

De resultaten in **hoofdstuk 9** lieten zien dat de inname van de NSAID ibuprofen vóór inspanning deze darmschade en darmbarrièreverlies aanzienlijk verergert. Deze gegevens zijn van belang, omdat veel atleten regelmatig NSAIDs gebruiken in de hoop geanticiperde pijn te voorkomen, zonder dat daar bewijs voor is en zonder zich bewust te zijn van de nadelige effecten van deze geneesmiddelen. Onze bevindingen in combinatie met de alarmerende aanwijzingen dat NSAID's hartproblemen kunnen veroorzaken, ontraden het gebruik van NSAID's sterk, indien hier geen medisch aanwijzing voor is.

Ten slotte trachten we in de crossover studie beschreven in **hoofdstuk 10** middels een specifieke voedingsinterventie voorafgaand aan de inspanning de doorbloeding van het maagdarmsstelsel tijdens en na inspanning te verbeteren en de inspannings-gerelateerde darmschade te reduceren of zelfs te voorkomen. Inderdaad toonden de resultaten van deze studie aan dat hypoperfusie tijdens inspanning kon worden voorkomen door voorafgaand aan de inspanning L-citrulline te consumeren, terwijl inname van placebo aminozuur L-alanine dit effect niet had. Het behoud van de circulatie in het maagdarmsstelsel tijdens inspanning zorgde ervoor dat ook de integriteit van het darmepitheel minder verstoord was, terwijl de parameters van de hartfunctie en de inspanningsprestatie niet verslechterden. Deze studieresultaten suggereren dat L-citrulline inname een veelbelovend middel is voor verbetering van de circulatie in geval van hypoperfusie van het maagdarmsstelsel.