

The gut in control of health and disease

Citation for published version (APA):

van der Beek, C. M. (2017). *The gut in control of health and disease: unraveling the role of short-chain fatty acids in human metabolism*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20171004cvdb>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171004cvdb](https://doi.org/10.26481/dis.20171004cvdb)

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

In the last decade, it has become clear that gut microbiota play a prominent role in human colonic health and metabolism. Human gut microbiota have the ability to ferment otherwise indigestible dietary fibers into short-chain fatty acids (SCFAs), mostly acetate, propionate, and butyrate. These SCFAs have been suggested to contribute to the beneficial effects of fiber intake on colonic health as well as metabolic health. SCFAs influence several metabolic pathways, such as energy regulation, glucose homeostasis, lipid metabolism, and inflammation. Nonetheless, human evidence concerning the metabolic effects of SCFAs is scarce. The studies described in this thesis investigate the metabolic role of SCFAs and dietary fibers in overweight and obese human subjects, and advance our knowledge on SCFA receptors, and SCFA functioning and handling in the gut.

Chapter 2 describes a study in which the metabolic effects of colonic acetate infusions in overweight to obese men was investigated. Six subjects underwent two experimental periods: one with distal and one with proximal colonic acetate infusions. A feeding catheter was endoscopically positioned at the beginning of each period and remained in the colon for three consecutive days, enabling colonic acetate or placebo infusion during fasting conditions and after an oral glucose load. We demonstrated that distal colonic acetate infusion substantially increased fasting fat oxidation by ~25%. Moreover, distal colonic acetate infusions increased fasting plasma concentrations of the satiety hormone peptide YY (PYY). In addition, distal colonic acetate administration tended to increase fasting circulating acetate concentrations and to decrease concentrations of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , but these effects were not significant. In contrast, proximal acetate administration did not affect human metabolism. These observations suggest that modulating colonic acetate in the distal part of the colon may be an important nutritional or therapeutic target to beneficially influence human metabolism.

Several studies have found that the ingestion of dietary fibers, i.e. prebiotics, has important metabolic effects. However, no studies have investigated if prebiotic-derived SCFAs contribute to the effects of prebiotics on human metabolism. **Chapter 3** describes the acute metabolic effects of the prebiotic inulin. Stable isotope tracer methodology was used to study if these effects could be attributed to SCFA formation in overweight to obese subjects. In a crossover design, 14 healthy, overweight men consumed a high-fat milkshake containing either 24 g inulin, of which 0.5 g was U- ^{13}C -labeled inulin, or 24 g of the placebo maltodextrin. We found that the fermentable inulin increased early postprandial fat oxidation and reduced the early postprandial decrease in free fatty acid (FFA) concentrations when compared with the digestible placebo maltodextrin. Moreover, inulin ingestion resulted in lower postprandial glucose and insulin concentrations compared with maltodextrin. Importantly, we found that the ingestion of inulin but not maltodextrin

increased plasma acetate concentrations. Tracer methodology revealed that inulin was fermented into all three SCFAs, as indicated by the appearance of ^{13}C -acetate, ^{13}C -butyrate, and ^{13}C -propionate in feces and blood.

To investigate whether the acute metabolic effects translate into long-term clinical effects, a twelve-week randomized controlled trial was conducted in prediabetic subjects which assessed metabolic effects as well as effects of prebiotic supplementation on gut microbiota in **Chapter 4**. Forty-four prediabetic men and women were randomly assigned to ingest either 15 g of the prebiotic galacto-oligosaccharides (GOS) or an isocaloric placebo daily for twelve weeks. This study demonstrated that 12 weeks of GOS supplementation markedly increased the abundance of fecal *Bifidobacterium spp.* Surprisingly, this specific bifidogenic effect did not translate into alterations in fecal or plasma SCFA concentrations, systemic concentrations of gut-derived hormones, or systemic inflammatory markers. In addition, no significant changes in peripheral and adipose tissue insulin sensitivity, body composition, energy and substrate metabolism, and circulating metabolites were observed.

The observation that distal but not proximal acetate supplementation affected human metabolism (chapter 2) might suggest a differential expression pattern of the SCFA receptors. Therefore, mRNA expression of GPR41, GPR43, and GPR109a as well as expression of the satiety hormones PYY and proglucagon, as a precursor for GLP-1, was investigated throughout the human ileum and colon in **Chapter 5**. Intestinal biopsies were obtained from 16 healthy subjects undergoing colonoscopy. We observed that expression of GPR41, GPR43, and GPR109a, as well as PYY and proglucagon was highest in the ileum compared with the colon. In addition, GPR41 expression was higher in the proximal compared with distal colon. This seems contradictory to the results observed in chapter 2, as we only found metabolic effects after distal acetate infusion, while SCFA receptor expression appeared to be lower in that part of the gut. This can be explained by the fact that SCFA receptor activation is not the only mechanism by which SCFAs influence metabolism and that receptor expression can be stimulated by ingesting dietary fibers. The result of this study suggests that future studies specifically aiming at stimulating SCFA receptors should make use of easily fermentable fibers that increase SCFA production in the ileum and proximal colon.

In contrast to acetate and propionate, which are thought to have metabolic effects mostly on peripheral tissues such as muscle and adipose tissue, butyrate is considered most important for maintaining and improving colonic health, primarily by acting as an energy source for colonocytes. As high systemic concentrations of butyrate can cause side effects such as hypokalemia and nausea, the inter-organ trafficking of a butyrate enema was investigated in **Chapter 6** in a surgical setting. Twelve patients undergoing upper abdominal surgery were included in this randomized controlled trial. During surgery, one group received a butyrate enema and the other group a placebo enema. Plasma samples

were taken from the radial artery, hepatic vein, and portal vein, thereby providing the opportunity to analyze SCFA concentrations and calculate fluxes over the portal-drained viscera, liver, and splanchnic area. We showed an increased release of butyrate from the gut shortly after rectal butyrate administration combined with an increased butyrate uptake by the liver. As a result, there was no splanchnic release of butyrate in these subjects, suggesting that the liver is capable of metabolizing rectally administered butyrate to prevent release into the systemic circulation.

Chapter 7 reviews the effects of SCFA enemas in colonic diseases, i.e. colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *In vitro* and *ex vivo* studies show that SCFAs have anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects, play an important role in maintaining metabolic homeostasis in colonocytes, and protect colonocytes from external harm. Animal studies have found substantial positive effects of SCFAs or dietary fiber intake on colonic disease, but convincing human evidence is lacking. The limited number of human intervention studies published to date show little or no favorable effects of SCFA treatment over placebo. Therefore, we suggest follow-up research should focus on using combination therapies of SCFAs with anti-inflammatory drugs, prebiotics, or probiotics in the case of colonic inflammation. In addition, the use of 'prodrugs', a biologically inactive compound that can be metabolized in the body to produce SCFAs could be useful for anti-carcinogenic therapy. Moreover, direct administration of SCFAs via surgical sutures could improve mucosal healing after colonic surgery.

In **Chapter 8**, the main findings of this thesis are described and integrated. Moreover, new insights and future perspectives based on these findings are discussed. In summary, actions and interventions that result in an increase in colonic and plasma SCFA concentrations could be used as a strategy not only to prevent and/or treat obesity and obesity-related insulin resistance, but also to positively affect colonic metabolic health. Although *in vitro* and animal studies show convincing effects of SCFAs on metabolism, these results can only be confirmed to a limited extent in human subjects so far, and thus more clinical research is needed to investigate these effects in humans. A patient-specific treatment, driven by a specific microbial response, may be an important future perspective in this case.

SAMENVATTING

Het afgelopen decennium is duidelijk geworden dat darmbacteriën een prominente rol spelen in darmgezondheid en stofwisseling van de mens. Darmbacteriën hebben het vermogen om onverteerbare voedingsvezels te fermenteren in zogenaamde korte-ketenvetzuren, met name acetaat (azijnzuur), propionaat (propionzuur) en butyraat (boterzuur). Deze korte-ketenvetzuren dragen mogelijk bij aan de gunstige effecten van vezelinname op zowel de gezondheid van de darm als de stofwisseling in het menselijke lichaam, oftewel het humane metabolisme. Korte-ketenvetzuren hebben invloed op verschillende processen in het lichaam, zoals energieregulatie, suikerhuishouding en vetmetabolisme, en kunnen de mate van ontsteking verminderen. Wetenschappelijk bewijs voor de metabole effecten van korte-ketenvetzuren in mensen is echter schaars. In dit proefschrift is een aantal studies beschreven waarin de effecten van korte-ketenvetzuren en voedingsvezels op het metabolisme van personen met overgewicht en obesitas bestudeerd werden. Verder werd onderzoek gedaan naar de mogelijke effecten van korte-ketenvetzuren op darmniveau en werden betrokken receptoren in kaart gebracht in de humane darm.

Hoofdstuk 2 beschrijft een studie waarin de metabole effecten van infusie van het korte-ketenvetzuur acetaat in de darm van overgewichtige mensen onderzocht werd. Zes mannen met overgewicht of obesitas ondergingen twee experimentele perioden: één waarbij acetaat werd geïnfundeed in het distale deel van het colon (dicht bij rectum en anus) en één waarbij acetaat werd geïnfundeed in het proximale deel van het colon (dicht bij de dunne darm). Aan het begin van elke periode werd endoscopisch een darmkatheter ingebracht, die gedurende drie opeenvolgende testdagen in de dikke darm bleef. Via de darmkatheter werd acetaat of een niet-werkzame placebo geïnfundeed in één van de locaties in de dikke darm. Het onderzoek toonde aan dat acetaatinfusie in het distale deel van het colon de vetverbranding (vetoxidatie) met ongeveer 25% liet toenemen. Bovendien verhoogde acetaatinfusie in het distale deel van het colon de concentraties van het verzadigingshormoon peptide YY (PYY) in de circulatie in gevaste toestand. Daarnaast had de toediening van acetaat in het distale deel van het colon de neiging om de acetaatconcentraties in het bloed te verhogen en de concentraties van de ontstekingsparameter TNF- α te verlagen, doch deze effecten waren niet significant. Acetaattoediening in het proximale deel van het colon had geen invloed op het humane metabolisme. Deze bevindingen suggereren dat verhoging van het korte-ketenvetzuur acetaat in het distale deel van de dikke darm een goede strategie kan zijn om de menselijke stofwisseling te verbeteren.

Onderzoek heeft aangetoond dat inname van voedingsvezels, ook wel prebiotica genoemd, het humane metabolisme kan beïnvloeden. Het is echter niet bekend of korte-ketenvetzuren hierbij een rol spelen. In **Hoofdstuk 3** worden de acute effecten van het prebioticum inuline op de stofwisseling in proefpersonen met overgewicht of obesitas

beschreven. Hierbij werd gebruik gemaakt van stabiele-isotopen-tracermethodologie om te onderzoeken of deze effecten kunnen worden toegeschreven aan de vorming van korte-ketenvetzuren. Veertien gezonde mannen met overgewicht consumeerden een milkshake met daarin 24 gram inuline, waarvan 0,5 gram U-¹³C-gelabeld inuline, of 24 gram van de placebo maltodextrine. Het ¹³C-label maakt het mogelijk om inuline in het lichaam te traceren. Bij fermentatie van inuline wordt het label overgedragen aan de korte-ketenvetzuren, waardoor vastgesteld kan worden of korte-ketenvetzuren gevormd worden uit inuline en in welke verhouding. Deze studie toonde aan dat, gedurende de eerste uren na inname, het fermenteerbare voedingsvezel inuline resulteerde in een verhoging van de vetoxidatie en een verminderde verlaging van de vrije vetzuurconcentraties in vergelijking met het verteerbare placebo maltodextrine. Bovendien veroorzaakte inuline-inname een verminderde postprandiale stijging in glucose- en insulineconcentraties in vergelijking met maltodextrine. Verder resulteerde inuline-inname in verhoogde acetaatconcentraties en verminderde vrije vetzuurconcentraties in de late postprandiale periode vergeleken met maltodextrine. Tracermethodologie toonde aan dat inuline gefermenteerd werd in alle drie de korte-ketenvetzuren, aangezien ¹³C-acetaat, ¹³C-butyraat en ¹³C-propionaat detecteerbaar waren in zowel ontlasting als bloed.

Om te onderzoeken of de acute metabole effecten vertaald kunnen worden naar gunstige langere termijn effecten, werd een studie uitgevoerd waarbij proefpersonen met een voorstadium van diabetes (prediabetes) het prebioticum galacto-oligosacchariden (GOS) hebben ingenomen gedurende een periode van 12 weken (**Hoofdstuk 4**). Vierenveertig mannen en vrouwen met prediabetes werden willekeurig toegewezen aan een groep die gedurende 12 weken dagelijks 15 gram GOS of een placebo met dezelfde calorische waarde consumeerde. Deze studie toonde aan dat 12 weken GOS-suppletie de bacteriesamenstelling in de darm aanzienlijk veranderde, met een verhoging van de *Bifidobacterium spp.* Dit bifidogeen effect vertaalde zich echter niet in veranderingen in korte-ketenvetzuurconcentraties in zowel ontlasting als bloed, noch leidde dit tot veranderingen in systemische concentraties van verzadigingshormonen en ontstekingsmarkers. Bovendien werden de insulinegevoeligheid, lichaamssamenstelling, het energie- en substraatmetabolisme en circulerende metabolieten niet significant beïnvloed door de vezelinname.

De bevinding dat acetaatinfusie in het distale maar niet in het proximale deel van het colon het humane metabolisme beïnvloedde, heeft ertoe geleid dat het expressiepatroon van de korte-ketenvetzuurreceptoren GPR41, GPR43 en GPR109a alsook van PYY en proglucagon, als voorganger van GLP-1, in verschillende locaties in de dunne en dikke darm nader onderzocht werd (**Hoofdstuk 5**). Darmbiopten werden verkregen van 16 gezonde proefpersonen die een reguliere colonoscopie ondergingen. We toonden aan dat de expressie van GPR41, GPR43 en GPR109a en de expressie van PYY en proglucagon hoger was in het ileum in vergelijking met de dikke darm. Bovendien was de expressie van GPR41 hoger in het proximale in vergelijking met het distale deel van het colon. Dit lijkt

in tegenspraak te zijn met de uitkomsten van hoofdstuk 2, waarbij alleen distale infusie zorgde voor metabole effecten. Er zijn echter meerdere oorzaken die deze discrepantie kunnen verklaren. Mogelijk is activatie van de korte-ketenvetzuurreceptor niet de enige manier waarop korte-ketenvetzuren het metabolisme kunnen beïnvloeden. Daarnaast is het ook mogelijk dat receptorexpressie kan worden beïnvloed door de inname van voedingsvezels. Deze studie suggereert dat men gebruik zou moeten maken van makkelijk te fermenteren voedingsvezels, leidend tot een verhoging van korteketenvetzuren in het ileum en proximale colon, indien men effecten wil bekomen middels stimulering van de onderzochte receptoren.

Acetaat en propionaat hebben met name metabole effecten op perifere weefsels zoals spieren en vetweefsel, terwijl butyraat een belangrijke rol speelt bij de gezondheid van de darm. Butyraat dient als energiebron voor darmcellen. Echter, hoge systemische concentraties van butyraat kunnen bijwerkingen veroorzaken, zoals hypokaliëmie en misselijkheid. In **Hoofdstuk 6** werd onderzocht in welke mate dat toediening van butyraat via een klysma in een chirurgische setting tot een verhoging van circulerende butyraatconcentraties leidde. Twaalf patiënten die een grote buikoperatie ondergingen, kregen tijdens de operatie een butyraat of placebo klysma. Bloedmonsters werden afgenomen uit een polslagader (arteria radialis), de leverader en de poortader. Korte-ketenvetzuurconcentraties werden bepaald welke ons in staat stelden fluxen te berekenen. Deze fluxen dienen als kwantitatieve maat voor opname of afgifte van korte-ketenvetzuren door de darm, lever en het splanchnische gebied (maag, twaalfvingerige darm, dunne en dikke darm, galwegen, lever, alvleesklier en milt). Direct na rectale butyraattoediening was een verhoogde afgifte van butyraat door de darm zichtbaar in combinatie met een verhoogde butyraatopname door de lever. Als gevolg was er geen splanchnische afgifte van butyraat waarneembaar, wat suggereert dat de lever in staat is om het rectaal toegediende butyraat op te nemen waardoor het butyraat niet in het bloed terecht komt.

Hoofdstuk 7 beschrijft een overzicht van de literatuur over de effecten van korte-ketenvetzuurklysma's op darmziekten, darmkanker en het genezingsproces na darmchirurgie. Celstudies hebben aangetoond dat korte-ketenvetzuren een anti-inflammatoir en anti-carcinogeen effect hebben, een belangrijke rol spelen bij het behoud van metabole homeostase in dikkedarmcellen (colonocyten) en deze cellen beschermen tegen externe schade. Dierstudies hebben positieve effecten van korte-ketenvetzuren en voedingsvezels op de gezondheid van de dikke darm aangetoond. Er is echter weinig bekend over de effecten van korte-ketenvetzuurklysma's in de mens. Een beperkt aantal studies onderzocht het effect van korte-ketenvetzuurtoediening bij chronische darmontsteking, darmkanker en het genezingsproces na darmchirurgie in de mens. Deze studies laten weinig of geen gunstige effecten zien van deze behandeling ten opzichte van placebo. Daarom stellen we voor om vervolgonderzoek te richten op het gebruik van combinatie therapieën waarbij toediening van korte-ketenvetzuren wordt gecombineerd met het

gebruik van ontstekingsremmende geneesmiddelen, prebiotica of probiotica in het geval van inflammatoire darmziekten. Het gebruik van zogenaamde 'prodrugs' die door omzetting in het lichaam korte-ketenvetzuren vrijgeven kan toegepast worden in de bestrijding van darmkanker en hechtingen die speciaal gecoat zijn met het korte-ketenvetzuur butyraat kunnen de mucosale genezing na de darmchirurgie te verbeteren.

In **Hoofdstuk 8** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd, alsook nieuwe inzichten en toekomstperspectieven. Samenvattend kunnen interventies die leiden tot een toename van korte-ketenvetzuurconcentraties in het colon en plasma mogelijk gebruikt worden als een strategie om obesitas en insulineresistentie te voorkomen en/of te behandelen, maar ook om de gezondheid van de darm op een positieve manier te beïnvloeden. Hoewel *in vitro* en dierstudies overtuigende effecten van korte-ketenvetzuren op metabolisme aantonen, kunnen deze resultaten tot nog toe slechts in beperkt mate in mensen worden bevestigd. Er is dus meer klinisch onderzoek nodig om de effecten bij mensen diepgaander te onderzoeken. Een patiënt-specifieke behandeling, werkend vanuit een specifieke samenstelling en functie van de darmbacteriën, kan daarbij een belangrijk toekomstperspectief zijn.