

The nutritional reflex : influencing gut barrier function and inflammation

Citation for published version (APA):

Luyer, M. D. P. (2006). *The nutritional reflex : influencing gut barrier function and inflammation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Wolf Legal Publishers. <https://doi.org/10.26481/dis.20060127ml>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060127ml](https://doi.org/10.26481/dis.20060127ml)

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 9

Summary & Discussion

Summary and discussion

The inflammatory response is a crucial part of a widespread host response to attack, clear and kill invading microorganisms. Although a strong protective immunity is essential to fence off possible threats, the powerful inflammatory cascade has to be carefully managed and restrained to prevent dysregulation and an exaggerated inflammatory response to relatively harmless stimuli. Especially in the gastrointestinal tract, hyperactivation of inflammatory cells to commensal bacteria or dietary antigens needs to be avoided, since this can cause an unwanted systemic inflammatory response and breakdown of intestinal barrier integrity leading to potentially fatal inflammatory disorders such as sepsis. Patients undergoing major surgery are at risk for development of such inflammatory complications, which form a major cause of postoperative morbidity and mortality. There is an increasing insight in the complex orchestrated inflammatory response to microbial components and the mechanisms that regulate this response. It seems that hypoperfusion of the splanchnic area leading to inflammation and loss of intestinal barrier integrity is an important causative factor. Furthermore, a second event, such as microbial infection, systemic hypotension or another stressor may dysregulate the inflammatory response leading to excessive release of proinflammatory mediators. This is also known as the two-hit phenomenon^{1,2}. Despite increasing insight and ongoing research, identification of patients at risk for development of inflammatory syndromes such as the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or sepsis remains difficult and therapeutic options for these patients are limited.

In this thesis we investigate the role of bacterial DNA in a model of hemorrhagic shock and study two therapeutic interventions that reduce inflammation and preserve gut barrier function.

Hemorrhagic shock causes a systemic inflammatory response, gut barrier loss and spread of bacteria and endotoxin to the systemic circulation and distant organs. This resembles the clinical situation of patients undergoing major surgery in which the splanchnic area is often subject to ischemia due to blood loss during surgery. Although the physiological response to hypoperfusion of the gut (inflammation and gut barrier failure) may be important to trigger the immune system and counter invading microorganisms; a vicious circle of ongoing activation of the inflammatory response and translocation of bacterial toxins needs to be avoided.

In Chapter 2 we investigate the effect of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) on gut barrier function and inflammation following hemorrhagic shock. Bacterial DNA and CpG-ODN are proven immunostimulatory agents that initiate signal transduction via TLR9 leading to a Th1 type immune response with release of proinflammatory cytokines such as IFN- γ ^{3,4}. The capacity of CpG-ODN to augment a for the host essential inflammatory is shown to enhance vaccination efficacy and improve chemotherapy for treatment of cancerous disease^{5,6}. However, augmentation of the immune response may be detrimental for patients undergoing major surgery for treatment of cancerous disease and potentially lead to polymicrobial sepsis.

We show that exposure to oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) before hemorrhagic shock, strongly enhances release of proinflammatory cytokines and results in a defective anti-inflammatory response. In line, permeability for HRP and translocation of bacteria and endotoxin are increased. In this study, we demonstrate that these effects are mediated by IFN- γ probably by priming inflammatory cells via upregulation of TLR4; the augmented inflammatory response was accompanied by an increase in TLR4 expression in the liver. To measure the value of this enhanced TLR4 expression, we investigated whether upregulation of TLR4 expression also caused an increased transcription. In vitro studies showed in peritoneal macrophages that the enhanced expression of TLR4 induced by exposure to CpG-ODN lead to an enhanced translocation of NF- κ B to the nucleus. The IFN- γ dependent upregulation of TLR4 may partly explain the exacerbated inflammatory response and enhanced loss of intestinal barrier integrity in CpG-ODN exposed rats, since endotoxin is pivotal in initiation of the inflammatory response following hemorrhagic shock⁷. These data are in line with earlier findings from our group in which we show that TLR4 expression in renal epithelial cells is modulated by IFN- γ ⁸⁻¹⁰. Bacterial DNA or CpG-ODN may be a double-edged sword that in addition to the beneficial immunostimulatory property in vaccination, allergy and cancer sensitizes the host to intestinal injury by aggravating the inflammatory cascade. CpG-ODN may also exacerbate existing, hidden low-grade inflammatory processes in the gut by sensitizing immune cells via IFN- γ leading to impairment of the intestinal barrier.

In order to prevent development of gut barrier failure we first studied the effect of probiotic therapy prior to hemorrhagic shock. Probiotics have been investigated intensively in inflammatory bowel disease (IBD) and pouchitis in which is shown that such a therapy has a beneficial effect on gut barrier integrity and can ameliorate inflammatory responses¹¹⁻¹⁴. Given these modulatory effects on intestinal microflora and the systemic inflammatory response, we hypothesized that probiotic therapy would be beneficial in preservation of gut barrier integrity following systemic hypotension. In Chapter 3 we show that two different *Lactobacillus* strains (*L. rhamnosus* LMG P-22799 and *L. fermentum* NumRes2) are able to effectively reduce pathogen adhesion in vitro. Interestingly, these two probiotic strains had distinctive, different effects on intestinal barrier integrity loss following hemorrhagic shock. Whereas *L. rhamnosus* LMG P-22799 reduced gut barrier integrity loss caused by systemic hypoperfusion, *L. fermentum* NumRes2 had no substantial effect and even resulted in increased translocation of *Lactobacillus* spp. Besides the capability of probiotic bacteria to prevent pathogen adhesion, probiotic DNA has been shown to play a crucial role in the observed protection of probiotic therapy in experimental colitis via a Toll-like receptor 9 signaling pathway¹⁵. However, we did not observe any difference on endotoxin induced inflammation in RAW 264.7 cells between bacterial DNA isolated from *L. rhamnosus* LMG P-22799 and *L. fermentum* NumRes2. The optimal dosage of DNA preparations of both strains to inhibit endotoxin induced inflammation is probably different; we administered a single (commonly accepted) dose of both strains that may have been optimal for the *L. rhamnosus* strain, whereas this dose may not have been favorable for the *L. fermentum* strain. A difference in effect on the inflammatory response in combination with potent pathogen exclusion properties of both strains may have been the cause for the differences in effect of both strains on bacterial translocation following hemorrhagic shock. Although further studies are necessary to identify the exact mode(s) of action of probiotics, these data indicate that certain probiotic strains may be useful in a clinical setting to preserve gut barrier integrity following severe blood loss. However, potential useful

probiotic strains need to be thoroughly screened before applying such therapies in various disease states since the risk of translocation of these bacteria forms a serious barrier to use such therapies in a clinical setting.

Besides manipulation of inflammation and gut barrier function via probiotics, several physiological mechanisms exist to oppose release of bacterial toxins or reduce release of inflammatory mediators. Manipulation of these intrinsic defence mechanisms such as the complement system, the coagulation cascade, the central nervous system and lipoproteins may offer a therapeutic option. Based on previous work from our lab and other groups we focused on the endotoxin-neutralizing capacity of lipoproteins to reduce inflammation and prevent gut barrier failure. Lipoproteins have the capacity to bind and neutralize bacterial toxins via lipopolysaccharide binding protein (LBP) and apolipoproteins^{16, 17}. Triacylglycerol-rich lipoproteins such as VLDL and chylomicrons are potent inhibitors of endotoxin activity^{18, 19}. Furthermore, preincubation of endotoxin with triacylglycerol-rich lipoproteins or repeated intravenous infusions with chylomicrons protect animals against endotoxin-induced death^{18, 20}. Already in the early 1980's high-density lipoproteins (HDL) were identified to bind and inactivate endotoxin. Later was found that hypertriglyceridemia as a result of *de novo* synthesis in the liver is part of the early response to low-dose endotoxin²¹⁻²³. This endotoxin-mediated increase in circulating triacylglycerol-rich lipoproteins is considered to have a protective function. From all lipoprotein classes, triacylglycerol-rich lipoproteins have been shown to be very potent inhibitors of the bioactivity of endotoxin and protect animals against endotoxin induced lethality^{20, 24, 25}. Theoretically, elevation of these triacylglycerol-rich lipoproteins would thus increase the host's natural defence against bacterial toxins, thereby reducing risk of hyperactivation of inflammatory cells by release of bacterial products. Elevation of chylomicrons, which are postprandially formed in the gut following a high-fat meal, would enforce the ability to scavenge microbial toxins both at the source (the intestine) and in the circulation.

In Chapter 4 and 5 we show that administration of enteral nutrition containing high amounts of lipids strongly reduces translocation of endotoxin and inhibits release of IL-6 and TNF- α compared with an isocalorical, isonitrogenous low-fat diet. Furthermore, the shock-induced increase of intestinal permeability for horseradish peroxidase (HRP) was reduced by high-fat nutrition and bacterial translocation to distant organs decreased. In line, loss of cellular integrity in the intestine due to systemic hypoperfusion, measured by ZO-1 expression, was prevented. These data are the first to show that a simple nutritional intervention using high amounts of dietary fat reduces the inflammatory response and preserves gut barrier function following systemic hypotension. The protective effect of high-fat enteral nutrition on gut barrier function are best attributed to the decreased inflammatory response and the reduced levels of circulating endotoxin, since both endotoxin and primarily TNF- α have been shown to impair intestinal barrier function^{7, 26-31}.

Given the fact that high-fat nutrition exerts an inhibitory effect on release of proinflammatory mediators, endotoxemia and bacterial translocation it is to be expected that end-organ damage associated with hemorrhagic shock is reduced. In Chapter 6 we investigated whether the effects of high-fat supplementation were related to reduced hepatocellular injury and an altered hepatic stress protein response. During injury, cells may exhibit autoprotective

responses, and increase expression of stress proteins. Reduction of these stress proteins such as heat shock protein (HSP) 70 and Heme oxygenase 1 (HO-1) would suggest decreased cellular damage. In line with the effects on inflammation and gut barrier function, administration of high-fat enteral nutrition significantly reduced hepatocellular damage following hemorrhagic shock. This was evidenced by reduced levels of HSP70 and HO-1 and less disruption of cytoarchitecture in the liver. The lack of mitochondrial DNA damage found in the high-fat fed animals suggests that the mechanism of protection in these animals was due to an inhibition of stress stimuli such as inflammatory cytokines upon the tissue rather than the induction of a protective intracellular response.

Alltogether, these findings suggest that neutralization of endotoxin via triacylglycerol-rich lipoproteins plays a role in the protective effect of high-fat enteral nutrition. This is supported by the significant negative correlation between circulating triacylglycerol and both total bacterial translocation and circulating endotoxin levels in all hemorrhagic shock rats.

However, these data do not correlate with the effect of triacylglycerol-rich lipoproteins on endotoxin responsiveness in humans in which is shown that hypertriglyceridemia does not inhibit the host response to endotoxin³². This may be explained by difference in kinetics of binding between endotoxin and lipoproteins and endotoxin and inflammatory cells may be of influence since preincubation of endotoxin with triacylglycerol-rich lipoproteins attenuates inflammation³³. In our model of hemorrhagic shock endotoxin gradually translocates from the gut lumen into the systemic circulation, resembling the clinical situation. In this setting, exposure of endotoxin to triacylglycerol-rich lipoproteins leading to neutralization may precede the exposure to inflammatory cells.

To investigate involvement of triacylglycerol-rich lipoproteins in the underlying mechanism of protection of high-fat enteral nutrition, a combined model of hemorrhagic shock and bile duct ligation was used. Bile duct obstruction causes malabsorption of fat leading to decreased formation of chylomicrons and other classes of lipoproteins. Theoretically, decreased levels of triacylglycerol-rich lipoproteins in these animals would diminish endotoxin-neutralizing capacity leading to a loss of protection of enteral high fat. Indeed, the level of circulating triacylglycerol-rich lipoproteins following a fat-rich enteral diet was reduced by 80% in bile duct ligated rats (Chapter 7). Remarkably, enteral administration of high-fat nutrition in this setting still reduced the inflammatory response following hemorrhagic shock, reduced intestinal permeability for HRP and bacterial translocation and preserved cellular integrity in the intestine. It is possible that the slightly enhanced circulating triacylglycerol levels that were detectable in bile duct ligated rats fed with high-fat nutrition may have been sufficient to provide protection after hemorrhagic shock. However, in our previous studies, such levels of circulating triacylglycerol found in rats fed with the low-fat enteral diet did not confer protection (Chapter 4-6). Based on these data, we concluded that triacylglycerol-rich lipoproteins may not be essentially involved in the observed protection, but may be rather an epiphenomenon of lipid nutrition. Although the mechanism of protection was as yet unresolved, this study clearly indicated that patients with biliary obstruction and systemic hypotension, that have a strongly increased risk of septic complications would benefit of such a nutritional intervention.

Besides elevation of triacylglycerol-lipoproteins, another potent and specific response is triggered by high amounts of dietary lipids. The neuro-endocrine hormone cholecystinin

(CCK) is released, leading to gallbladder contraction and satiety via activation of the autonomic nervous system. The role of CCK in regulating food uptake and satiety via the autonomic nervous system has been studied intensively. Recently a novel characteristic of the autonomic nervous system was identified by the group of Tracey et al³⁴. Besides the renowned regulation of metabolism, the parasympathetic nervous system also inhibits macrophage activation via the vagus nerve through binding of acetylcholine to α -7 nicotinic receptors located on macrophages³⁵. Central or peripheral stimulation of this so-called 'cholinergic anti-inflammatory pathway' via a mechanical or pharmacological route reduces plasma TNF- α in endotoxic shock and blunts nuclear factor- κ B activation after hemorrhagic shock via efferent vagal nerve fibres³⁶⁻³⁹. This prompted us to investigate involvement of the autonomic nervous system in the protection provided by high-fat enteral nutrition. In Chapter 8 we studied the role of the autonomic nervous system in the protective effect of high-fat enteral nutrition. This study shows that bilateral vagotomy abrogated the high-fat induced inhibition of the inflammatory response and gut barrier loss. In accordance, circulating endotoxin levels, permeability of ileum segments for HRP and bacterial translocation to distant organs were reduced as well. These results suggest a pivotal role of the autonomic nervous system in the mechanism of protection of high-fat enteral nutrition. Subsequently, we show that the autonomic nervous system is activated by the high percentage of dietary fat via CCK-receptors. Finally, we demonstrate that stimulation of the autonomic nervous system by high-fat enteral nutrition via the neuro-endocrine hormone CCK inhibits the inflammatory response via the anti-inflammatory efferent vagal pathway (Chapter 8). These findings reveal a novel nutritional and neuro-immunological pathway providing a physiological basis for the since long studied close interaction between nutrition and the immune response. It was previously unrecognized that nutrition-induced neuro-endocrine signals are involved in inhibitory effects on the inflammatory response. From a teleological point of view it is functional that a state of immune-hyporesponsiveness is created during feeding. In this way an unwanted response to temporally present high amounts of dietary antigens, biological toxins and destructive endogenous lysozymes in the gut lumen is prevented, gut barrier function is preserved and homeostasis maintained. We propose that this neural feedback-loop activated by enteral nutrition is an important player in the thus far largely unexplained state of hyporesponsiveness of the immune system in the intestinal tract to dietary antigens and bacterial toxins.

Based on our findings, high-fat enteral nutrition is potentially therapeutic in various inflammatory disorders such as sepsis, ileus and inflammatory bowel disease (IBD) characterized by an inflammatory response in which TNF- α is prominent and intestinal barrier function is impaired. In light of this, a fasted state could be a risk factor for developing a potentially lethal inflammatory response after trauma or injury.

In summary, we show that hemorrhagic shock in rats is accompanied with release of proinflammatory mediators, increased intestinal permeability, endotoxin and bacterial translocation and loss of intestinal integrity. We showed that exposure to CpG-ODN prior to hemorrhagic shock causes a two-hit phenomenon leading to an augmented proinflammatory response, a defective anti-inflammatory response and deterioration of shock-induced gut barrier loss. It is to be expected that in this model of combined exposure to CpG-ODN and hemorrhagic shock end-organ damage such as in the liver is enhanced. Certain probiotic strains can inhibit this shock-induced increase in intestinal permeability. However, the underlying

mode of action is unclear and there was an undesirable side-effect of enhanced translocation of *Lactobacillus* spp. Potential useful probiotic strains need to be thoroughly studied using in vitro and in vivo approaches to select suitable strains before applying such therapies in various disease states to prevent unwanted side-effects. We demonstrate in a series of experiments that high-fat enteral nutrition strongly reduces inflammation and preserves gut barrier function following hemorrhagic shock and delineate the underlying mechanism. The mechanism of protection of high-fat enteral nutrition reveals a new neuro-immunological pathway in which ingestion of high amounts of dietary lipids stimulates the autonomic nervous system via the vagus nerve, thereby inhibiting the inflammatory response via nicotinic receptors. Identification of this nutritional and neurogenic feedback mechanism provides a novel insight in the since long studied close interaction between nutrition and the immune system and presents a physiological basis for the cholinergic anti-inflammatory pathway. Understanding this mechanism, the use of nutrition in patients at risk for inflammatory complications such as patients undergoing major surgery becomes pivotal.

Nederlandse samenvatting

Een ontstekingsreactie is onderdeel van de afweer van het lichaam tegen micro-organismen en weefselschade. Deze reactie moet enerzijds sterk genoeg zijn om de schadelijke effecten van dit soort bedreigingen te voorkomen, anderzijds is een overmatige reactie op relatief ongevaarlijke stimuli ongewenst en schadelijk. Voornamelijk in de darm moet een te hevige ontstekingsreactie op de aanwezige bacteriën en eventuele schade worden voorkomen, omdat ten gevolge hiervan ernstige darmschade kan ontstaan. Die schade kan resulteren in een vicieuze cirkel waarin ontstekingscellen voortdurend worden geactiveerd door bacteriële producten vanuit de darm.

Chirurgische patiënten, die een grote operatie moeten ondergaan, hebben een verhoogd risico op algemene ontstekingsyndromen zoals bloedvergiftiging, ook wel sepsis genoemd. Hoewel de exacte ontstaanswijze van deze ziektebeelden nog onduidelijk is, neemt inzicht in de complex georganiseerde ontstekingsreactie die hieraan ten grondslag ligt toe. Door een verminderde doorbloeding van de darm zoals die voorkomt na grote operaties of ernstig bloedverlies, komen ontstekingsfactoren vrij waardoor er verlies optreedt van darmwand integriteit. Wanneer deze ontstekingsreactie heel hevig en ongecontroleerd verloopt kan dit leiden tot ziektebeelden zoals sepsis. De ontstekingsreactie kan heviger verlopen door meerdere oorzaken, bijvoorbeeld doordat het individu wordt blootgesteld aan opeenvolgende operaties, andere letsels of infectie. Dit wordt ook wel het "two-hit" fenomeen genoemd. Er is veel onderzoek verricht naar de ontstaanswijze en behandeling van het ziektebeeld sepsis. Daardoor is weliswaar het inzicht in dit ziektebeeld toegenomen, echter het is in de klinische praktijk nog steeds heel moeilijk om patiënten die een hoog risico hebben op sepsis vooraf te identificeren. Daarnaast zijn de behandelingsmogelijkheden voor patiënten met sepsis, of andere soortgelijke ontstekingsyndromen, nog steeds beperkt.

In dit proefschrift zijn twee mogelijke therapieën bestudeerd in een model van verbloedings (hemorragische) shock. Tevens hebben we onderzocht wat het effect is van een tweede letsel (blootstelling aan bacterieel DNA) in het gebruikte diemodel.

Als model voor een grote operatie is een experimenteel model van hemorragische shock gekozen. Hemorragische shock veroorzaakt een verminderde doorbloeding van de organen in de buik, m.n. de darm. Dit leidt tot een meetbare lokale en systemische ontstekingsreactie, een verhoogde permeabiliteit van de darm en verspreiding van bacteriën en bacteriële toxinen via de bloedbaan en lymfe naar organen. Dit is vergelijkbaar met de situatie zoals die wordt gezien bij patiënten die een grote operatie hebben ondergaan. Ook hier ontstaat een algemene ontstekingsreactie en soms verlies van darmwand integriteit door een verminderde doorbloeding (hypoperfusie) van de darmen.

De lichaamseigen reactie op verminderde doorbloeding van de darm (het vrijkomen van ontstekingsfactoren en verlies van darmwand integriteit) is nodig om de afweer te activeren, zodat mogelijk binnendringende micro-organismen kunnen worden gestopt. Echter, de ontstekingsreactie zou beperkt moeten blijven zodat verspreiding van bacteriën, bacteriële gifstoffen en ontstekingsfactoren door het lichaam wordt voorkomen.

In Hoofdstuk 2 is een studie beschreven waarin ratten worden blootgesteld aan kleine stukjes DNA (oligonucleotiden), voorafgaand aan hemorragische shock. Deze kleine stukjes DNA stimuleren het immuunsysteem en lijken op bacterieel DNA aangezien ze zogenoemde CpG motieven bezitten (CpG-ODN). Dit immuunstimulerende effect van bacterieel DNA is sinds

enkele jaren bekend en wordt gestuurd via een specifieke herkenningsplaats (receptor) op ontstekingscellen, Toll-like receptor 9 (TLR9) genoemd. Het activeren van ontstekingscellen door bacterieel DNA leidt tot een bepaald type ontstekingsreactie (Th1) waarbij o.a. de ontstekingsfactor interferon (IFN)- γ vrijkomt. De eigenschap van bacterieel DNA om het afweersysteem te stimuleren verhoogd de efficiëntie van vaccinaties en versterkt het effect van chemotherapie bij kanker. Echter, voor patiënten die een grote operatie ondergaan is extra activatie van het afweersysteem niet wenselijk, aangezien dit kan leiden tot ziektebeelden zoals sepsis.

De resultaten uit deze studie tonen aan dat blootstelling van ratten aan CpG-ODN voorafgaand aan hemorragische shock de ontstekingsreactie versterkt en de natuurlijke ontstekingsremmende factoren (zoals interleukine (IL)-10) vermindert in het bloed. Bovendien verslechtert de door shock aangetaste darmbarrière functie nog verder. Verder laten de experimenten zien dat de effecten van bacterieel DNA worden veroorzaakt door het vrijkomen van de ontstekingsfactor (cytokine) IFN- γ . Dit cytokine is verantwoordelijk voor een verhoogde aanwezigheid van Toll-like receptor 4 (TLR4), op de buitenkant van cellen in de lever. TLR4 is de herkenningsplaats voor endotoxine, het belangrijkste bestanddeel van Gram-negatieve bacteriën. De verhoogde expressie van TLR4 zou een verklaring kunnen zijn voor de versterkte ontstekingsreactie en toegenomen weefselschade gezien bij ratten die blootgesteld werden aan CpG-ODN voorafgaand aan hemorragische shock. Er wordt namelijk gedacht wordt dat endotoxine voor een belangrijk deel verantwoordelijk is voor de ontstekingsreactie en weefselschade na hemorragische shock door activatie van ontstekingscellen via TLR4.

Om te onderzoeken of de verhoogde aanwezigheid van TLR4 ook van belang is, is het experiment in vitro nagebootst met behulp van ontstekingscellen (macrofagen). Deze experimenten laten zien dat ook in vitro de aanwezigheid van TLR4 op macrofagen wordt verhoogd en dat deze verhoogde expressie leidt tot een toegenomen productie van ontstekingsfactoren in deze cellen. Deze toegenomen productie binnen de cel is aangetoond door een verhoogde translocatie van nuclear factor (NF)- κ B naar de kern. De toegenomen aanwezigheid van TLR4 op ontstekingscellen leidt theoretisch tot een versterkte reactie op endotoxine. Dit zou deels een verklaring kunnen zijn voor de versterkte ontstekingsreactie die werd gezien na blootstelling aan bacterieel DNA in het hemorragische shock model.

Het effect van bacterieel DNA op de afweer lijkt tweeledig te zijn. Enerzijds heeft versterking van de immuunrespons door bacterieel DNA een gunstig effect bij vaccinatie en chemotherapie, terwijl deze versterkte reactie anderzijds leidt tot meer darmschade en meer ontsteking na hemorragische shock.

In Hoofdstuk 3 wordt een experiment beschreven waarin is bestudeerd of een therapie met probiotica gedurende zeven dagen hemorragische shock geïnduceerd darmbarrière falen kan voorkomen en ontsteking kan verminderen. Probiotica worden sinds langere tijd bestudeerd in modellen waarbij de dikke darm is ontstoken (colitis). De resultaten uit deze studies laten zien dat probiotische therapie een gunstig effect heeft op darmbarrière functie en ontstekingsprocessen kan reduceren. Op basis van deze bevindingen is de hypothese ontwikkeld dat probiotische therapie voorafgaand aan hemorragische shock een gunstig effect zal hebben. In Hoofdstuk 3 wordt beschreven dat twee verschillende *Lactobacillus* stammen (*L. rhamnosus* LMG P-22799 en *L. fermentum* NumRes2) in staat zijn om adhesie van pathogenen aan darmcellen in vitro in gelijke mate te verminderen. Echter, de effecten van deze twee probiotische stammen in

het hemorragische shock model zijn geheel verschillend. Toediening van *L. rhamnosus* LMG P-22799 verminderde het verlies van darmwand integriteit veroorzaakt door de shock, terwijl *L. fermentum* NumRes2 hierop geen substantieel effect had en zelfs leidde tot een toegenomen translocatie van *Lactobacillus* spp. Een mogelijke verklaring voor de gevonden effecten is de eigenschap van probiotica om adhesie van pathogene bacteriën te remmen. Recent is echter aangetoond in modellen van colitis, dat DNA van dergelijke gunstige micro-organismen een belangrijke rol speelt via activatie van Toll-like receptor 9. Vervolgens is onderzocht of DNA, geïsoleerd uit de gebruikte *Lactobacillus* stammen, een effect zou hebben op endotoxine-geïnduceerde ontsteking. Er werden geen verschillen gevonden tussen DNA preparaten van beide micro-organismen op het vrijkomen van de ontstekingsfactor tumor necrosis factor alpha (TNF- α) na stimulatie van macrofagen met endotoxine. Het is mogelijk dat verschillen in dosis-effect relaties tussen de gebruikte stammen, de oorzaak is dat er geen duidelijk meetbare verschillen waren. De precieze oorzaak voor de gevonden verschillen tussen beide probiotische bacteriën is echter niet duidelijk en meer onderzoek is nodig om het werkingsmechanisme(n) van probiotica te ontrafelen. De resultaten laten zien dat probiotische stammen die klinisch gebruikt gaan worden zeer grondig moeten worden getest omdat het risico op translocatie van *Lactobacillus* spp moet worden vermeden.

Naast manipulatie van de ontstekingsreactie en darmbarrière-functie door probiotica, zijn er een aantal fysiologische afweermechanismen die bacteriële invasie voorkomen en ontsteking verminderen. Manipulatie van deze intrinsieke afweermechanismen zoals het complement systeem, de stollingscascade, het centrale zenuwstelsel en vorming van vettransportdeeltjes (lipoproteïnen) zou mogelijk therapeutisch kunnen zijn. Eerdere studies hebben aangetoond dat lipoproteïnen endotoxine kunnen neutraliseren, waardoor de ontstekingsreactie wordt verminderd en darmbarrièrefunctie behouden blijft. Lipoproteïnen kunnen endotoxine neutraliseren via het lipopolysaccharide bindings-eiwit (LBP) en dragereiwitten in de buitenmembraan (apolipoproteïnen). Met name de triacylglycerol-rijke lipoproteïnen zoals very-low density lipoproteïnen (VLDL) en chylomicronen remmen de activiteit van endotoxine en beschermen dieren tegen endotoxine geïnduceerde dood. Al in de jaren tachtig werd gevonden dat high-density lipoproteïnen (HDL) endotoxine kunnen binden en inactiveren. Later werd ontdekt dat verhoging van de hoeveelheid triacylglycerol-rijke lipoproteïnen ten gevolge van nieuw-vorming in de lever, onderdeel is van de vroege reactie op endotoxine. Dit mechanisme werd gezien als beschermend in ziektebeelden zoals sepsis. Triacylglycerol-rijke lipoproteïnen zijn de meest krachtige remmers van de (bio)activiteit van endotoxine. Theoretisch zou verhoging van deze lipoproteïnen de natuurlijke bescherming van het individu tegen bacteriële toxinen verhogen, waardoor het risico op overactivatie van ontstekingscellen wordt voorkomen. In dit kader leidt een toename van chylomicronen, die in de darm worden gevormd na een vetrijke maaltijd, tot een verhoging van de capaciteit om microbiële toxinen te neutraliseren zowel in de bloedbaan als lokaal in de darm.

Hoofdstuk 4 en 5 tonen aan dat toediening van een vetrijke enterale voeding in een model van hemorragische shock de translocatie van bacteriën en endotoxine vermindert en het vrijkomen van de ontstekingsfactoren IL-6 en TNF- α reduceert. Bovendien wordt de shock-geïnduceerde verhoogde intestinale permeabiliteit voor grote moleculen, zoals mierikswortel (horseradish) peroxidase (HRP) verminderd en is er minder verlies van integriteit van de darm. De integriteit van de darmwand is gemeten door bepaling van het zonula occludens 1 (ZO-1)

eiwit in dunne en dikke darm. Het ZO-1 eiwit is een belangrijk onderdeel van de opbouw en integriteit van een cel.

De gegevens uit deze studies zijn de eerste die laten zien dat een eenvoudige interventie met een vetrijke voeding de ontstekingsreactie en darmbarrière-falen na hemorragische shock verminderen. Het beschermende effect van vetrijke voeding op darmbarrière-functie kan het best toegeschreven worden aan een verminderde ontstekingsreactie, omdat eerder is bewezen dat zowel endotoxine, als TNF- α leiden tot darmbarrière-falen.

Op basis van de gevonden gunstige effecten van vetrijke voeding op het vrijkomen van ontstekingsfactoren, endotoxemie en bacteriële translocatie valt te verwachten dat orgaanschade geassocieerd met hemorragische shock ook wordt verminderd. In Hoofdstuk 6 is het effect onderzocht van vetrijke enterale voeding op leverschade na hemorragische shock. Als maat voor leverschade zijn een aantal stress-eiwitten bepaald. Tijdens stress, zoals tijdens een grote operatie, reageren cellen met een zelfbeschermingsmechanisme dat o.a. leidt tot verhoogde aanwezigheid van de stress-eiwitten heat shock protein (HSP) 70 en heme-oxygenase 1 (HO-1). Overeenkomstig met de effecten van vetrijke enterale voeding op de ontstekingsreactie en darmbarrière-functie, werd er minder leverschade gezien na hemorragische shock in deze groep ratten. De door shock geïnduceerde toename in concentratie van HSP70 en HO-1 was gereduceerd, er was minder microscopische cel-schade van de lever en bijna geen mitochondriële DNA schade.

De resultaten uit deze studies tonen aan dat een korte interventie met vetrijke voeding de ontstekingsreactie na hemorragische shock vermindert, darmbarrière integriteit behoudt en leverschade vermindert. De significante negatieve correlatie tussen concentraties van triglyceriden in het bloed en de mate van bacteriële en endotoxine translocatie die bestaat (Hoofdstuk 4), doet vermoeden dat neutralisatie van endotoxine door triacylglycerol-rijke lipoproteïnen een rol speelt in de beschermende werking van vetrijke enterale voeding.

Deze gegevens komen niet overeen met studies in mensen, waarbij is gevonden dat een verhoogde concentratie triacylglycerol in bloed de ontstekingsreactie op endotoxine niet remt. Echter, wanneer endotoxine tevoren wordt geïncubeerd met triacylglycerol-rijke lipoproteïnen wordt de ontstekingsreactie op endotoxine wel geremd. Deels kan dit verklaard worden door de snelle binding van endotoxine met ontstekingscellen ten opzichte van de langzame binding van endotoxine met lipoproteïnen. In het model van hemorragische shock wordt aangenomen dat er sprake is van een geleidelijke translocatie van endotoxine vanuit het darmlumen zoals waarschijnlijk ook gebeurt na grote operaties. Het is voorstelbaar dat in de situatie van hemorragische shock, lipoproteïnen die vanuit de darm gevormd worden na een vetrijke maaltijd, endotoxine neutraliseren voordat deze in contact komt met ontstekingscellen.

Om te onderzoeken of triacylglycerol-rijke lipoproteïnen werkelijk betrokken zijn bij het mechanisme onderliggend aan de beschermende werking van vetrijke voeding, is gebruik gemaakt van een gecombineerd model van hemorragische shock en galwegobstructie. Galwegobstructie leidt tot een verminderde opname van vet en een daling van de hoeveelheid gevormde chylomicronen, omdat gal nodig is voor de vet vertering in de darm. In theorie zouden deze verminderde spiegels van triacylglycerol-rijke lipoproteïnen ook zorgen voor een verminderde capaciteit om endotoxine te neutraliseren en zodoende leiden tot een verlies van bescherming van vetrijke voeding.

Zoals verwacht was de hoeveelheid circulerende triacylglycerol-rijke lipoproteïnen sterk verminderd (80%) in de groep vetrijke gevoede ratten met galwegobstructie ten opzichte van de controle groep (Hoofdstuk 7). Echter, in ratten met galwegobstructie verminderde vetrijke voeding wel de ontstekingsreactie na hemorrhagische shock en zorgde ook voor behoud van de darmbarrièrefunctie. Het is natuurlijk mogelijk dat de licht verhoogde triacylglycerol-rijke lipoproteïnen in de met vetrijke gevoede galwegobstructie ratten voldoende waren om endotoxine te neutraliseren. Echter vergelijkbare spiegels van deze lipoproteïnen in dieren die vetarme voeding kregen bleken eerder niet beschermend te zijn (hoofdstuk 4-6). Op basis van deze data hebben wij geconcludeerd dat triacylglycerol-rijke lipoproteïnen waarschijnlijk niet in belangrijke mate betrokken zijn bij de beschermende werking van vetrijke voeding. Hoewel het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de bescherming van vetrijke voeding tot nog toe onopgehelderd was, bleek uit deze studie dat vetrijke voeding mogelijk ook gunstig kan zijn voor patiënten met een gestoorde galafvoer, die een bekend verhoogd risico hebben op infectieuze complicaties.

Naast verhoogde spiegels van triacylglycerol-rijke lipoproteïnen brengt vetrijke voeding ook andere specifieke fysiologische processen teweeg. Vetrijke voeding leidt o.a. tot het vrijkomen van het neuro-endocriene hormoon cholecystokine (CCK) uit darmcellen na een vetrijke maaltijd. CCK stimuleert het samentrekken van de galblaas en activeert het autonome zenuwstelsel en doet een gevoel van verzadiging ontstaan. De rol van CCK in het proces van voedselinname en verzadiging wordt gereguleerd via het autonome zenuwstelsel en is uitvoerig bestudeerd. Recent is een geheel nieuwe functie van het autonome zenuwstelsel ontdekt. Stimulatie van zenuwbanen van de nervus vagus vanuit de hersenen naar de organen, de zogenaamde efferente zenuwbanen, leidt namelijk tot een remming van de ontstekingsreactie op endotoxine via specifieke herkenningsplaatsen op ontstekingscellen (α -7 nicotine receptoren). Dit wordt ook wel het cholinerge anti-inflammatoire mechanisme genoemd. Vanuit de gestimuleerde zenuwcellen is er een verhoogde afgifte van acetylcholine. Dit acetylcholine bindt aan de α -7 nicotine receptor op macrofagen, waardoor in de cel de productie van TNF- α wordt geremd via signaaleiwitten zoals STAT3 en SOCS-3. Op basis van deze nieuw beschreven functie van het autonome zenuwstelsel hebben wij vervolgens onderzocht of hiermee de beschermende werking van vetrijke voeding op de ontstekingsreactie en darmbarrièrefunctie kan worden verklaard. In Hoofdstuk 8 is het effect bestudeerd van dubbelzijdige doorsnijding van de nervus vagus in het model van hemorrhagische shock. Deze studie toont aan dat doorsnijding van de vagus in vetrijke gevoede ratten het remmende effect van vetrijke voeding op het vrijkomen van TNF- α en IL-6 volledig voorkomt, terwijl ook het positieve effect op darmbarrièrefunctie teniet wordt gedaan. Deze resultaten tonen aan dat het autonome zenuwstelsel betrokken is bij het beschermende effect van vetrijke voeding op de ontstekingsreactie en darmbarrièrefunctie. In een volgend experiment is aangetoond dat vetrijke voeding niet meer beschermend werkt bij medicamenteuze blokkade van receptoren voor het hormoon CCK. Dit suggereert dat vetrijke voeding het autonome zenuwstelsel activeert via CCK-receptoren. Tenslotte is aangetoond dat het remmende effect van vetrijke voeding op de ontstekingsreactie toegeschreven kan worden aan activatie van het cholinerge anti-inflammatoire mechanisme.

Deze bevindingen laten een nieuw, tot nog toe onbeschreven mechanisme zien dat een fysiologische basis vormt voor de bekende relatie tussen voeding en de afweer. Het was eerder niet bekend dat voedings-geïnduceerde signalen via het autonome zenuwstelsel betrokken

zijn bij de remmende werking van voeding op de ontstekingsreactie. Evolutionair gezien heeft een dergelijk mechanisme een duidelijke functie. Een heftige afweerreactie op (tijdelijk) aanwezige toxische stoffen in voeding of op endogene lysozymen die vrijkomen na een vetrijke voeding moet namelijk worden vermeden. Bovendien kan dit mechanisme een rol spelen in de tot nu toe nog onbegrepen hoge drempel tot activatie van het immuunsysteem in de darm op voedselantigenen en bacteriële toxinen. Op basis van deze bevindingen kan worden geconcludeerd dat vetrijke voeding preventief kan werken voor ontstekingsyndromen zoals sepsis in (chirurgische) patiënten die een groot risico hierop hebben. Tevens impliceren deze bevindingen dat het nuchter houden van chirurgische patiënten het risico op een versterkte ontstekingsreactie na een grote operatie verhoogt.

Concluderend heeft het onderzoek aangetoond dat blootstelling aan bacterieel DNA leidt tot een versterkte ontstekingsreactie en meer verlies van darmbarrière functie na hemorragische shock. Dit effect wordt veroorzaakt door IFN- γ en is geassocieerd met een verhoogde expressie van TLR4 in de lever. Ten tweede is aangetoond dat toediening van bepaalde probiotica voorafgaand aan shock de darmbarrière functie behoudt. Dit effect is echter stam-specifiek en het onderliggende werkingsmechanisme is nog niet duidelijk. Vanwege de verhoogde kans op translocatie van *Lactobacillus* spp moeten probiotische stammen zorgvuldig worden getest alvorens deze in een klinische setting te gebruiken.

Tenslotte hebben we in een aantal studies laten zien dat vetrijke voeding de ontstekingsreactie na hemorragische shock sterk remt, darmbarrière functie behoudt en leverschade vermindert. Dit gunstige effect van vetrijke voeding kan niet worden toegeschreven aan verhoogde spiegels van triacylglycerol rijke lipoproteïnen. Het blijkt dat inname van vet leidt tot activatie van het autonome zenuwstelsel via afgifte van cholecystokine, waardoor het cholinerge anti-inflammatoire mechanisme wordt geactiveerd. Deze bevindingen onthullen een nieuw neuro-immunologisch voedingsmechanisme, waarin specifieke voedselcomponenten in staat zijn de immuunrespons te beïnvloeden via het autonome zenuwstelsel.