

# Prenatal stress and the fetal gut

## Citation for published version (APA):

Nikiforou, M. (2016). *Prenatal stress and the fetal gut: potential interventions to prevent adverse outcomes*. CPI - Wöhrmann Print Service. <https://doi.org/10.26481/dis.20161220mn>

## Document status and date:

Published: 01/01/2016

## DOI:

[10.26481/dis.20161220mn](https://doi.org/10.26481/dis.20161220mn)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 7

## Summary - Samenvatting



## Summary

Chorioamnionitis and fetal hypoxia-ischemia (HI) are two antenatal pathological conditions which are associated with increased risk of postnatal intestinal morbidity. Inflammation is considered as an essential component in the induction of organ injury after chorioamnionitis and fetal HI. Therefore, the studies described in this dissertation aimed to provide insight in the inflammatory responses and subsequent developmental processes in the fetal gut induced by chorioamnionitis or fetal HI. In addition, we focused on exploring potential therapeutic interventions *in utero* to prevent intestinal inflammation and injury associated with these two pathological conditions. For these purposes, we used the well characterized translational ovine models as the development of the fetal ovine intestine is comparable to human.

In **Chapter 2**, the relative contribution of selective IL-1 $\alpha$  exposure to fetal mucosal surfaces (i.e. lung, gut and chorioamnion/skin) in the induction of intestinal inflammation and injury were investigated. Previous studies in an ovine model of chorioamnionitis have shown that inhibition of IL-1 signaling largely prevents chorioamnionitis-induced gut inflammation and damage. Nevertheless, the impact of IL-1 $\alpha$ -driven immune activation of the gut or extraintestinal tissues on the outcome of the fetal intestine has not been investigated. For this purpose, IL-1 $\alpha$  was selectively infused to different isolated fetal compartments (gut, lung and chorioamnion/skin) and intestinal histological changes were assessed. Our findings showed that intestinal inflammation was provoked by both direct IL-1 $\alpha$  exposure to the intestinal mucosa and indirect IL-1 $\alpha$ -mediated immune responses driven by the lung and chorioamnion/skin. In addition, mucosal damage and altered maturation of the fetal gut were exclusively provoked by direct IL-1 $\alpha$  exposure. These results suggest that the local IL-1 $\alpha$ -driven intestinal inflammatory response is fundamentally involved in the pathological features of the fetal gut in the context of chorioamnionitis. Since inflammatory changes in the fetal intestine can also be induced upon IL-1 $\alpha$  exposure of the fetal lung and chorioamnion/skin, future therapeutic strategies should focus on targeting both

intestinal and extraintestinal immune responses to reduce gut morbidity after chorioamnionitis.

In **Chapter 3**, the potential therapeutic value of intestinal regulatory T (Treg) cell expansion with the cytokine IL-2 in the context of experimental chorioamnionitis was evaluated. Treg cells are crucial mediators of immune homeostasis in different organs including the intestine. Previous studies have shown that chorioamnionitis decreased the Treg/T effector (Teff) cell balance in the gut, which was accompanied by intestinal inflammation and mucosal injury. Therefore, in chapter 3 it was hypothesized that preferential expansion of Treg cells in the fetal gut by prophylactic IL-2 treatment would prevent the fetus from adverse intestinal outcomes in the course of chorioamnionitis. To test this hypothesis, fetal sheep were intra-amniotically exposed to lipopolysaccharide, with or without prophylactic intravenous IL-2 treatment. We found that systemic IL-2 administration resulted in an improved Treg/Teff cell ratio in the fetal gut. Importantly, when animals received prophylactic IL-2 treatment, chorioamnionitis-induced intestinal inflammation and mucosal damage were prevented. These findings indicate that boosting fetal Treg cells could be beneficial in case of chorioamnionitis-related intestinal complications.

In **Chapter 4**, the pathological intestinal changes as a consequence of *Candida albicans* (*C.albicans*)-mediated chorioamnionitis were studied. Although chorioamnionitis is commonly caused by bacterial infection of the amniotic cavity, fungi including *C.albicans* are also linked with intrauterine infection. In chapter 4 we also evaluated whether the antifungal drug fluconazole protected the fetal gut after *C.albicans*-induced chorioamnionitis. To address these issues, intra-amniotic (IA) injections with *C.albicans* were given to pregnant sheep before preterm delivery. In addition, *in utero* fluconazole treatment was given 2 days after the IA *C.albicans* infection. We found that IA *C.albicans* infection caused intestinal colonization and mucosal invasion with concomitant epithelial damage and inflammation of the fetal gut. Although fluconazole treatment decreased intestinal *C.albicans* colonization and mucosal injury, anti-fungal treatment did not attenuate intestinal inflammation. These

data imply that although in utero fluconazole treatment may be a therapeutic strategy in case of *C.albicans*-mediated chorioamnionitis, more comprehensive treatment strategies which can completely prevent *C.albicans*-induced intestinal inflammation and injury should be investigated.

In **Chapter 5**, the pathological changes that occur in the fetal gut after global HI were examined. Similar to chorioamnionitis, global fetal HI is associated with detrimental postnatal intestinal outcomes, with inflammation being a key component involved in the underlying pathology. Since mesenchymal stem cells (MSCs) have been previously used to prevent HI-induced intestinal damage of the adult intestine, we administered MSCs as a potential approach to attenuate the adverse effects on the fetal intestine as a consequence of global HI. To address our aims, fetal sheep were subjected to umbilical cord occlusion (UCO), with or without intravenous MSC treatment. Global HI induced by UCO, resulted in intestinal inflammation, muscle thickening, distortion of enteric glial cells and altered neurotransmission. A single dose of intravenous MSC treatment at 1 hour after UCO did not ameliorate these HI-induced adverse intestinal consequences. Since the chosen MSC treatment regimen failed to ameliorate these detrimental intestinal effects, future research is needed to reveal a comprehensive cell-based therapy to protect the fetal gut after global HI.

In conclusion, in this dissertation evidence is provided that chorioamnionitis and global fetal HI induce intestinal inflammation which was associated with epithelial injury and impaired development of the gut and enteric nervous system (ENS). Although in this dissertation the postnatal consequences of these prenatal events were not explored, the reported pathological changes in the fetal gut are linked with neonatal pathologies including necrotizing enterocolitis (NEC). In addition, this thesis tested novel strategies for protecting the fetal gut against the detrimental intestinal consequences associated with antenatal inflammation and global HI. The findings obtained during this PhD contribute to the development of more comprehensive therapeutic strategies to treat and/or prevent gut-related complications following chorioamnionitis and fetal HI.

## Samenvatting

Vruchtwater infectie (Chorioamnionitis) en zuurstof tekort (hypoxie-ischemie, HI) rondom de geboorte) zijn twee pathologische condities die geassocieerd zijn met een verhoogd risico op darm ziekten. Bij beide aandoeningen speelt ontsteking een essentiële rol in het veroorzaken van orgaanschade. De studies beschreven in dit proefschrift hebben als doel inzicht te verkrijgen in de inflammatoire en ontwikkelingsreacties van de foetale darm na chorioamnionitis of HI. Daarnaast focust het onderzoek in dit proefschrift op het ontwikkelen van nieuwe therapieën rondom de zwangerschap om deze inflammatie/ontsteking en schade in de darm te voorkomen. Voor dit onderzoek hebben we gebruik gemaakt van een goed gekarakteriseerd translationeel schapenmodel omdat de ontwikkeling van de foetale darm van het schaap zeer vergelijkbaar is met die van de mens.

In **hoofdstuk 2**, hebben wij de relatieve bijdrage van selectieve IL-1 $\alpha$  blootstelling aan verschillende mucosale foetale weefsels (long, darm en chorionamnion/huid) in relatie tot de inductie van intestinale inflammatie en schade bestudeerd. Eerder onderzoek heeft laten zien dat het remmen van IL-1 grotendeels de nadelige veranderingen in de darm als gevolg van chorioamnionitis voorkomt. Echter, de gevolgen van IL-1 $\alpha$ -gemedieerde immuun-activatie van mucosale organen, waaronder de darm, long en huid, voor van de foetale darm was nog nooit eerder onderzocht. Om dit te onderzoeken hebben we verschillende mucosale oppervlakten selectief blootgesteld aan IL-1 $\alpha$  en veranderingen in de darm histologisch geëvalueerd. Onze bevindingen tonen aan dat zowel directe IL-1 $\alpha$  blootstelling, als ook indirecte IL-1 $\alpha$  blootstelling via de long en chorionamnion/huid, inflammatie in de darm induceert. Echter, mucosale schade en een verstoorde ontwikkeling van de foetale darm werd alleen waargenomen na directe IL-1 $\alpha$  blootstelling. Deze resultaten suggereren dat de lokale IL-1 $\alpha$  gemedieerde inflammatoire respons fundamenteel betrokken is bij de pathologische veranderingen in de foetale darm in het kader van chorioamnionitis. Gezien het feit dat ontsteking in de foetale darm ook geïnduceerd kan worden via IL-

I $\alpha$  blootstelling aan de long en chorioamnion/huid zullen toekomstige therapeutische strategieën zich moeten richten op zowel de intestinale als extra-intestinale immuun reacties om darm-gerelateerde morbiditeit na chorioamnionitis te voorkomen.

In **hoofdstuk 3**, hebben we in het kader van chorioamnionitis, de therapeutische potentie van het verhogen van het aantal regulatoire T (Treg) cellen door IL-2 in de foetale darm bestudeerd. Treg cellen zijn belangrijk in het reguleren van immuun homeostase in verschillende organen waaronder de darm. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat chorioamnionitis de Treg/T effector (Teff) cel balans in de darm verlaagde, hetgeen gepaard ging met darmontsteking en darmschade. In dit hoofdstuk hebben we onderzocht of verhoging van de Treg/Teff cel balans door het profylactisch toedienen van IL-2 de chorioamnionitis-geïnduceerde pathologische veranderingen in de foetale darm kan voorkomen. In dit onderzoek werd IL-2 (of een zoutoplossing voor controle dieren) intraveneus toegediend aan foetale schapen. Vervolgens werd een intra-uteriene ontstekingsreactie opgewekt door lipopolysaccharide aan het vruchtwater toe te dienen. Intraveneuze IL-2 toediening resulteerde conform onze hypothese in een verbeterde Treg/Teff cel ratio in de foetale darm. De toename van deze Treg/Teff cel ratio ging gepaard met een remming van de ontstekingsreactie in de darm en het remmen/voorkomen van darm schade in chorioamnionitis dieren. Deze bevindingen tonen aan dat het boosten van de foetale Treg cellen therapeutisch zeer interessant is in het kader van chorioamnionitis-geïnduceerde darmziekten.

In **hoofdstuk 4**, hebben we de veranderingen in de foetale darm als gevolg van *C.albicans*-geïnduceerde chorioamnionitis bestudeerd. Hoewel chorioamnionitis meestal veroorzaakt wordt door een bacteriële infectie van de amnionholte, worden schimmels zoals *C.albicans* ook geassocieerd met intra-uteriene infecties. Ook hebben we onderzocht of het gebruik van het antimycotisch middel Fluconazol de foetale darm beschermt na *C.albicans*-geïnduceerde chorioamnionitis. Hiervoor hebben zwangere schapen intra-amniotische injecties met *C.albicans* gekregen in de aan of afwezigheid van een eenmalige intra-amniotische Fluconazol injectie. Een intra-amniotische *C.albicans* infectie resulteerde in kolonisatie van deze schimmel in de darm die gepaard



ging met mucosale invasie door *C.albicans* met epitheliale schade en ontsteking. Dit onderzoek toont aan dat fluconazol behandeling de *C.albicans* kolonisatie en mucosale schade verminderde, maar intestinale schade werd niet voorkomen. Deze data impliceert dat hoewel *in utero* fluconazol behandeling een goede behandeling is in het geval van *C.albicans*-gemedieerde chorioamnionitis. Uitgebreider onderzoek nodig is naar behandelingen die ook de *C.albicans*-geïnduceerde inflammatie en schade van de foetale darm voorkomt.

In **hoofdstuk 5**, hebben we de pathologische veranderingen die optreden in de foetale darm na globale HI onderzocht. HI wordt net als chorioamnionitis geassocieerd met schadelijke postnatale intestinale gevolgen en ook hier is inflammatie essentieel in de onderliggende pathologische veranderingen. Gelet op het feit dat mesenchymale stam cellen (MSCs) de HI-geïnduceerde darmschade van de volwassen darm voorkomen, hebben we MSCs als mogelijke behandelingsregime gekozen om de nadelige gevolgen van globale HI op de foetale darm te voorkomen. In dit onderzoek werden foetale schapen blootgesteld aan een tijdelijke navelstrengcompressie en werden de dieren al dan niet behandeld door een intraveneuze toediening van MSCs. Globale HI veroorzaakt door navelstrengcompressie veroorzaakt intestinale inflammatie, verdikking van de spierlagen in de darm, verstoring van enterale gliale cellen en veranderingen in neurotransmissie. Een eenmalige intraveneuze gift van MSCs 1 uur na navelstrengcompressie had geen effect op deze HI-geïnduceerde nadelige intestinale gevolgen. Gelet op het gebrek aan farmacologische effecten van de MSC behandeling in dit model is er verder onderzoek naar nieuwe (cell-based) behandelingen om de foetale darm te beschermen na globale HI.

Samengevat, in dit proefschrift wordt bewijs geleverd dat chorioamnionitis en globale foetale HI intestinale inflammatie veroorzaken, welke geassocieerd is met epitheliale schade en een verstoorde ontwikkeling van de darm. Hoewel in dit proefschrift de postnatale gevolgen van deze prenatale gebeurtenissen niet werden onderzocht, worden de gerapporteerde pathologische veranderingen in de foetale darm geassocieerd met neonatale aandoeningen zoals necrotiserende enterocolitis (NEC).

Daarnaast worden nieuwe behandelingsstrategieën getest die de foetale darm beschermen tegen de schadelijke gevolgen ten gevolge van antenatale inflammatie of globale HI. De bevindingen verkregen gedurende dit promotietraject dragen bij aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingsstrategieën voor het behandelen en/of voorkomen van darm-gerelateerde complicaties na chorioamnionitis en/of foetale HI.