

Gut liver axis in liver cirrhosis

Citation for published version (APA):

Pijls, K. E. (2016). *Gut liver axis in liver cirrhosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20161209kp>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20161209kp](https://doi.org/10.26481/dis.20161209kp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

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

[Link to publication](#)

General rights

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

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

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

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

This thesis focused on two aspects of liver cirrhosis: the role of the intestine in the pathophysiology and non-invasive diagnostics. Previous studies indicate that the intestine is an important co-factor in the pathophysiology of chronic liver diseases, cirrhosis and cirrhosis-related complications, *e.g.* by means of bacterial translocation. In this thesis, we aimed to investigate the role of the intestine in patients with compensated cirrhosis, *i.e.* without complications, paying attention to both the small and large intestine, with specific emphasis on epithelial barrier function.

In the search for non-invasive tests, we addressed the role of breath analyses for diagnosis of chronic liver diseases, especially cirrhosis at an early stage, as this is important to prevent progression towards end stage, complicated, liver disease.

The role of the intestine

Chapter 2 provides an overview of the current evidence of intestinal epithelial barrier dysfunction in human chronic liver diseases and cirrhosis. Dysfunction of the intestinal epithelial barrier has been found in patients with chronic liver diseases, but the evidence is more convincing in patients with cirrhosis, especially in those with complications. However, these studies have mainly investigated small and whole intestinal permeability by measuring the excretion of orally administered test markers in mixed groups of patients with compensated and/or decompensated cirrhosis. Information on the large intestine and compensated cirrhotic patients as well as on tight junction (TJ) structure is scarce. The barrier dysfunction can result from the effects of etiological factors for cirrhosis, such as alcohol consumption or high fat intake (obesity). On the other hand, cirrhosis itself is suggested to lead to barrier dysfunction via the effects of portal hypertension, the probably altered intestinal microbiota, inflammation and oxidative stress, each of which have been discussed in this chapter.

In *Chapter 3*, paracellular permeability of both the small and large intestine is investigated in patients with compensated cirrhosis and compared to age, gender and BMI-matched healthy controls, as increased permeability might be a risk factor for the development of complications. Intestinal permeability was assessed by a validated multi-sugar test as well as by the expression of key TJ genes and proteins in duodenal and sigmoid biopsies. Interestingly, we found an increased permeability of the large intestine in compensated cirrhotic patients, which warrants further investigation. Gastroduodenal and small intestinal permeability were not altered. However, in a subgroup of alcohol-related cirrhotic patients, small intestinal permeability was found to be increased, confirming the pronounced and disruptive effects of alcohol and its oxidative metabolites on the epithelial barrier.

On the other hand, we found only mild and very limited alterations regarding the expression of TJ genes and proteins in duodenal and sigmoid biopsies of cirrhotic patients. These findings did not support the observed functional permeability changes *in vivo*, suggesting that the relation between functional and structural changes of the epithelial barrier needs further clarification.

In the following chapter, we were interested to find evidence whether intestinal oxidative stress occurs in cirrhosis. Therefore, in the study described in *Chapter 4*, parameters of oxidative stress were measured in both duodenal and sigmoid mucosa of compensated cirrhotic patients and healthy controls. Only gene transcription of glutathione synthetase and reductase were found to be different between both groups. No alterations were observed for other genes related to oxidative stress, nor for glutathione, glutathione disulphide, glutathione/disulphide ratio or intestinal myeloperoxidase and fecal calprotectin concentrations. These findings indicate that intestinal oxidative stress is not a major mechanism contributing to the epithelial barrier dysfunction observed in patients with compensated cirrhosis.

Alterations in the intestinal microbiota can also affect the epithelial barrier, both directly and indirectly. Recent studies have mainly investigated the fecal microbiota of cirrhotic patients, while information on the microbiota of the intestinal mucosa is very limited. In *Chapter 5*, the fecal and mucosa-associated microbiota is investigated in a heterogeneous group of patients with (de)compensated cirrhosis and compared with healthy controls using a validated 16S-23S interspacer (IS) region-based profiling method. The results showed differences in fecal and duodenal microbiota composition between compensated cirrhotic patients and healthy controls, as shown by an increased fecal and duodenal Firmicutes to Bacteroidetes (F/B) ratio in these patients, and alterations in richness and diversity of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes. Furthermore, an altered microbiota composition was also found in duodenal biopsies, as well as possible associations with the lactulose/rhamnose ratio indicating small intestinal permeability. No alterations were observed in the microbiota composition of the sigmoid. The observed differences in fecal microbiota were more pronounced with progression of liver cirrhosis, *i.e.* in patients with decompensated cirrhosis. Furthermore, patients with (de)compensated cirrhosis were found to cluster separately from healthy controls and showed distinct clusters based on the Child-Pugh classification, showing potential of the intestinal microbiota as marker to monitor disease progression.

Overall, the above findings, using IS-profiling which is easy to implement in clinical practice, confirm the recently reported presence of microbial perturbations in compensated cirrhotic patients. This may contribute to the observed increased permeability, but may also affect host function, *e.g.* via its metabolic activity and/or effects on the immune system.

To further unravel the pathophysiology of the intestinal involvement in chronic liver diseases, in particular of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), we conducted an animal study and compared two mouse models with diet-induced NAFLD. The results, described in *Chapter 6*, confirmed the presence of hepatic steatosis in wild type *C57Bl/6J* (WT) mice and early steatohepatitis in low density lipoprotein knock-out (*Ldlr*^{-/-}) mice after a 3-week period of high-fat and high-cholesterol feeding. However, no major differences were found regarding epithelial barrier function and oxidative stress in ileum and sigmoid mucosa between both mouse models. Duodenal smooth muscle contractility was also not found to be different. These results suggest that the intestine does not play a major role in the onset of hepatic inflammation in these NAFLD mouse models investigated.

Non-invasive diagnostics

In *Chapters 7* and *8*, we addressed the role of breath analyses as non-invasive alternatives to liver biopsy for diagnosis of chronic liver diseases, especially cirrhosis at an early stage.

In *Chapter 7*, we appraised the value of breath tests using ¹³C-labeled probe drugs for the evaluation of metabolic liver function and discussed the role of cytochrome P450 enzymes in the metabolism of the different probe drugs, with particular emphasis on aminopyrine. Although, the perfect probe drug is not yet available, ¹³C₂-aminopyrine and ¹³C-methacetin can play a role in evaluating the capacity of the microsomal liver function and may be useful in the follow-up of patients with chronic liver diseases. Furthermore, CYP2C19 is an important enzyme in the *N*-demethylation of aminopyrine and polymorphisms in this gene can influence breath test values. Together with other potential confounding factors, such as concomitant drug use, this should be kept in mind when interpreting the ¹³C₂-aminopyrine breath test in clinical practice.

In addition to breath tests using ¹³C-labeled probe drugs, analysis of volatile organic compounds (VOCs) in exhaled air has been suggested useful for the diagnosis of several diseases, including intestinal and liver diseases. In *Chapter 8*, we aimed to investigate whether VOCs can predict the presence of cirrhosis within a heterogeneous group of chronic liver disease patients and to compare this with a panel of routine serological markers. We demonstrated that a combination of routine serological markers, *i.e.* GGT, ALT, bilirubin, albumin, and thrombocytes, can discriminate cirrhotic patients from patients with chronic liver diseases with a sensitivity of 71% and a specificity of 84%. However, an exhaled profile of 11 VOCs was found to predict the presence of compensated cirrhosis with a sensitivity of 83%, and a specificity of 87%. The combination of both did not further improve the diagnostic accuracy. Exhaled VOCs appear to be a promising non-invasive biomarker for cirrhosis that may reflect

metabolic liver function and may help to reduce liver biopsies. Nevertheless, these findings should be further validated in larger cohorts with well-diagnosed patients.

In *Chapter 9*, we discussed the major findings of this thesis and proposed future research topics. Overall, this thesis emphasizes that the intestine, *i.e.* epithelial barrier and microbiota composition, is involved in compensated liver cirrhosis, and thereby may be a risk factor for development of complications. In addition, exhaled VOCs appear to be a promising non-invasive alternative to liver biopsy for diagnosing cirrhosis at an early stage.

Samenvatting

Samenvatting

In dit proefschrift hebben we gekeken naar de rol van de darm in de pathofysiologie van levercirrose en naar non-invasieve markers om levercirrose te diagnosticeren. Op basis van voorgaande studies zijn er aanwijzingen dat de darm via bacteriële translocatie een belangrijke cofactor is in de pathofysiologie van chronische leverziekten, cirrose en complicaties van cirrose. In dit proefschrift hebben we de rol van de darm in patiënten met levercirrose zonder complicaties onderzocht. Daarbij hebben we aandacht besteed aan zowel de dunne als de dikke darm en de nadruk gelegd op de epitheliale barrièrefunctie.

In de zoektocht naar niet-invasieve testen hebben we gekeken naar de rol van adem analyses in de diagnose van chronische leverziekten en cirrose (zonder complicaties). Dit is belangrijk om progressie van chronische leverziekten met de ontwikkeling van complicaties te voorkomen.

De rol van de darm

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van het huidige bewijs voor een verstoring van de epitheliale barrière van de darm in chronische leverziekten en cirrose. Diverse studies tonen een verstoring van de intestinale permeabiliteit in patiënten met chronische leverziekten die het meest duidelijk is in patiënten met cirrose en vooral in patiënten met complicaties. Deze studies hebben echter voornamelijk de permeabiliteit van de dunne en de gehele darm onderzocht door de excretie van oraal toegediende test markers te meten in gemengde groepen patiënten met gecompenseerde en/of gedecompenseerde cirrose. Er zijn echter nauwelijks gegevens over de dikke darm, over patiënten met gecompenseerde levercirrose en over de structuur en expressie van de 'tight junction' eiwitten. Verstoring van de barrière kan het resultaat zijn van de effecten van etiologische factoren van cirrose zoals alcohol of een hoge consumptie van vetten (obesitas). Echter, cirrose kan ook zelf leiden tot een verstoring van de barrière via de effecten van portale hypertensie, de veranderde intestinale microbiota, aanwezigheid van ontsteking en oxidatieve stress.

Aangezien een verhoogde darm permeabiliteit een risicofactor zou kunnen zijn voor de ontwikkeling van complicaties in patiënten met levercirrose, is in hoofdstuk 3 de paracellulaire permeabiliteit van zowel de dunne als de dikke darm in patiënten met gecompenseerde levercirrose onderzocht en vergeleken met gezonde controles die waren gematcht voor leeftijd, geslacht en BMI. De intestinale permeabiliteit werd bepaald met behulp van een gevalideerde 'multi-sugar' test en middels het analyseren van de expressie van belangrijke 'tight junction' genen en eiwitten in duodenum en sigmoid bipten. We vonden een verhoogde permeabiliteit van de dikke darm in gecompenseerde levercirrose patiënten. Deze nieuwe bevinding heeft verder

onderzoek. De gastroduodenale en dunne darm permeabiliteit waren niet verschillend ten opzichte van de controlepersonen. De dunne darm permeabiliteit was echter wel verhoogd in een subgroep van patiënten met alcohol gerelateerde levercirrose en dit bevestigt de schadelijke effecten van alcohol en zijn oxidatieve metabolieten op de epitheliale barrière.

Met betrekking tot de expressie van tight junction genen en eiwitten in duodenum en sigmoid biopten van cirrose patiënten, werden slechts beperkte en kleine veranderingen gevonden. Deze waren niet geheel in lijn met de *in vivo* geobserveerde functionele veranderingen in de permeabiliteit en dit suggereert dat er behoefte is aan verder onderzoek naar de relatie tussen functionele en structurele veranderingen in de epitheliale barrière.

In het volgende hoofdstuk waren we geïnteresseerd of er aanwijzingen zijn voor het bestaan van intestinale oxidatieve stress in cirrose. Zodoende zijn in hoofdstuk 4 parameters van oxidatieve stress gemeten in duodenum en sigmoid mucosa van patiënten met gecompenseerde levercirrose en gezonde controles. Alleen de gen-transcriptie van glutathion synthetase en reductase waren verschillend tussen beide groepen. Er werden geen veranderingen gevonden in andere genen gerelateerd aan oxidatieve stress, en ook niet in glutathion, glutathion disulphide, glutathion/disulphide ratio, of intestinale myeloperoxidase en calprotectine concentraties. Deze bevindingen wijzen erop dat intestinale oxidatieve stress geen belangrijk mechanisme lijkt te zijn voor de verstoorde darmbarrière die we zagen bij patiënten met gecompenseerde levercirrose.

Behalve ontsteking en oxidatieve stress, zouden veranderingen in de intestinale microbiota ook van invloed kunnen zijn op de epitheliale barrièrefunctie, zowel door directe als indirecte effecten (via bacteriële metabolieten). Recente studies hebben voornamelijk de fecale microbiota onderzocht in patiënten met levercirrose. Er is tot op heden heel weinig informatie over de microbiota in de intestinale mucosa. In hoofdstuk 5 is daarom de fecale en de mucosa-geassocieerde microbiota onderzocht in een heterogene groep van patiënten met gecompenseerde en gedecompenseerde cirrose en vergeleken met gezonde controles. Hierbij werd gebruik gemaakt van de gevalideerde '16S-23S interspacer (IS) region-based profiling' methode. De resultaten toonden verschillen in de compositie van de fecale en duodenale microbiota tussen gecompenseerde cirrose patiënten en gezonde controles: een verhoogde verhouding van Firmicutes ten opzichte van Bacteroidetes, en veranderingen in 'richness' en diversiteit van de phyla Firmicutes en Bacteroidetes werden gevonden. Daarnaast vonden we ook een verhoogde verhouding van Firmicutes ten opzichte van Bacteroidetes en een verhoogde 'richness' van de phyla Firmicutes in duodenum biopten van gecompenseerde cirrose patiënten in vergelijking met gezonde controles, en mogelijke associaties met de lactulose/rhamnose ratio als indicator voor dunne darm permeabiliteit. Er werden geen veranderingen getoond in de microbiota

compositie van het sigmoid. De geobserveerde verschillen in de fecale microbiota waren meer uitgesproken naarmate de ziekte vorderde, dat wil zeggen in patiënten met gedecompenseerde cirrose. Verder vonden we dat patiënten met ge(de)compenseerde cirrose apart clusterden van gezonde controles en verschillende clusters toonden gebaseerd op de Child-Pugh classificatie voor de ziekte-ernst. Deze resultaten tonen de potentie van de intestinale microbiota als marker om progressie van ziekte te monitoren.

De bovenstaande bevindingen die gedaan zijn met behulp van IS-profiling, hetgeen makkelijk implementeerbaar is in de klinische praktijk, bevestigen de recent gerapporteerde aanwezigheid van microbiële verstoringen in patiënten met gecompenseerde levercirrose. Deze verstoringen zouden kunnen bijdragen aan de geobserveerde verhoogde permeabiliteit, maar zouden ook effect kunnen hebben op de gastheer via bijvoorbeeld de metabole activiteit en/of de effecten op het immuun systeem.

Om de betrokkenheid van de darm verder uit te zoeken in chronische leverziekten en in het bijzonder in niet-alcoholische vette leverziekte (NAFLD), hebben we een dierstudie opgezet en twee muismodellen met voeding-geïnduceerde NAFLD vergeleken. De resultaten, die beschreven zijn in hoofdstuk 6, bevestigden de aanwezigheid van lever steatose in “wild type *C57Bl/6J*” (WT) muizen en vroege steatohepatitis in de “low density lipoproteïn knock-out” (*Ldlr*^{-/-}) muizen na een vet en cholesterolrijke voeding van drie weken. Er werden echter geen grote verschillen gevonden tussen beide muismodellen voor wat betreft de epitheliale barrière functie en oxidatieve stress in ileum en sigmoid mucosa. Er was ook geen verschil in de contractiliteit van glad spierweefsel van het duodenum. Deze resultaten wijzen erop dat de darm geen grote rol speelt in het ontstaan van lever-inflammatie in de onderzochte NAFLD muismodellen.

Niet-invasieve diagnostiek

In hoofdstuk 7 en 8 hebben we gekeken naar de rol van adem analyses als niet-invasieve alternatieven van een leverbiopsie voor de diagnose van chronische leverziekten en voornamelijk van cirrose in een vroeg stadium (zonder complicaties).

In hoofdstuk 7 hebben we een overzicht gegeven van de waarde van ademtesten die gebruik maken van ¹³C-gelabelde test drugs voor de evaluatie van de metabole leverfunctie. Daarnaast hebben we de rol van cytochroom P450 enzymen in het metabolisme van verschillende test drugs bediscussieerd en speciale aandacht geschonken aan aminopyrine. Ondanks dat de perfecte test drug nog niet beschikbaar is, kunnen ¹³C-aminopyrine en ¹³C-methacetine een rol spelen in de evaluatie van de capaciteit van de microsomale leverfunctie en bruikbaar zijn in het monitoren van patiënten met chronische leverziekten. Daarnaast is CYP2C19 een belangrijk enzym in

de *N*-demethylatie van aminopyrine en polymorfismen in dit gen kunnen de uitslag van ademtesten beïnvloeden. Hier dient samen met andere mogelijke variabelen zoals gelijktijdig gebruik van geneesmiddelen rekening mee te worden gehouden bij de interpretatie van de ¹³C-aminopyrine ademtest in de klinische praktijk.

Naast deze ademtesten die gebruik maken van ¹³C-gelabelde test drugs, zijn er aanwijzingen dat de analyse van zogenaamde volatile organic compounds (VOCs) in uitademingslucht bruikbaar is voor de diagnose van verschillende ziektes waaronder darm- en leverziekten. In hoofdstuk 8 hebben we daarom getracht te onderzoeken of VOCs in de uitgeademde lucht, de aanwezigheid van cirrose binnen een heterogene groep van patiënten met chronische leverziekten kunnen voorspellen. Daarnaast is dit vergeleken met een panel van serologische markers die in de dagelijkse praktijk worden gebruikt. We hebben aangetoond dat een combinatie van serologische markers bestaande uit γ -GT, ALAT, bilirubine, albumine en trombocyten, patiënten met cirrose kan onderscheiden van patiënten met chronische leverziekten met een sensitiviteit van 71% en een specificiteit van 84%. Een profiel van 11 VOCs in de uitademingslucht voorspelde de aanwezigheid van gecompenseerde levercirrose echter met een sensitiviteit van 83% en een specificiteit van 87%. De diagnostische nauwkeurigheid verbeterde niet door beide benaderingen te combineren. Uitgeademde VOCs lijken een veelbelovend niet-invasieve marker voor cirrose, die de metabole lever functie kan reflecteren en het aantal leverbiopsies kan doen verminderen. Deze bevindingen moeten echter wel nog gevalideerd worden in grotere cohorten met goed gediagnosticeerde patiënten.

In hoofdstuk 9 zijn de voornaamste bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd en zijn voorstellen gedaan voor toekomstige onderzoeken. Over het algemeen geeft dit proefschrift duidelijke aanwijzingen dat de darm, en dan met name de epitheliale barrière en de microbiota, veranderd zijn in gecompenseerde levercirrose, en zodoende een risicofactor kunnen zijn voor de ontwikkeling van complicaties. Daarnaast lijken uitgeademde VOCs een veelbelovend niet-invasief alternatief te zijn voor leverbiopsie om cirrose in een vroeg stadium te kunnen diagnosticeren.