

# Immune control by the autonomic nervous system: Towards clinical implementation of enriched enteral nutrition

Citation for published version (APA):

de Haan, J. J. (2012). *Immune control by the autonomic nervous system: Towards clinical implementation of enriched enteral nutrition*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20121122jh>

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## DOI:

[10.26481/dis.20121122jh](https://doi.org/10.26481/dis.20121122jh)

## 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.

## **Samenvatting**

---

Verschillende barrières beschermen het lichaam tegen het binnendringen van pathogenen. Een beschadiging van deze barrières leidt tot een reactie van het immuunsysteem. Deze reactie wordt niet alleen worden veroorzaakt door binnendringende pathogenen, maar kan ook worden opgeroepen door lichaamseigen stoffen die bijvoorbeeld vrijkomen bij weefselschade. Een adequate en proportionele immuunrespons leidt tot neutralisatie van ziekteverwekkers en herstel van de geleden schade. Echter, vooral traumapatiënten, patiënten die een grote operatie krijgen of patiënten die een zware chemokuur ondergaan lopen risico op het ontwikkelen van excessieve ontstekingsreacties. Dergelijke buitensporige reacties van het immuunsysteem worden gedefinieerd als sepsis en sepsis-achtige syndromen. Hoewel de behandeling van sepsis in de laatste jaren is verbeterd, blijven de morbiditeit en mortaliteit van patiënten met deze ziektebeelden zeer hoog. Er bestaat daarom een grote behoefte aan nieuwe methoden om de immuunreactie onder controle te houden, zodat sepsis kan worden voorkomen of beter kan worden behandeld.

Een veelbelovende manier om de ontstekingsreactie te beïnvloeden is stimulering van het autonome zenuwstelsel, en in het bijzonder het parasympatisch zenuwstelsel. De ontstekingsremmende impulsen van het parasympatisch zenuwstelsel, die vooral via de nervus vagus worden voortgeleid, werden voor het eerst door dr. Tracey en collega's beschreven. In septische proefdieren toonden zij aan dat zowel elektrische prikkeling van de nervus vagus als farmacologische stimulering van nicotinerge acetylcholine (nACh) receptoren de afgifte van ontstekingsstoffen (bijvoorbeeld cytokines) remt. Ook leiden deze interventies tot minder orgaanschade en minder sterfte. Onze onderzoeksgroep liet eerder in een diermodel zien dat lipiderijke voeding via stimulatie van de nervus vagus de ontstekingsreactie remt en schade aan de darm en lever vermindert. Bij gezonde mensen zouden deze dempende effecten van enterale voeding een onnodige ontstekingsreactie kunnen voorkomen. Inname van voeding leidt namelijk tot een beperkte blootstelling van de darmwand aan micro-organismen en antigenen die doorgaans geen sterke afweerreactie vereist. Bij patiënten bij wie de ontstekingsreactie te hevig is, zou activatie van deze ontstekingsremmende neuro-immuun-as door specifieke voeding kunnen bijdragen aan de behandeling. De in dit proefschrift beschreven studies kunnen worden beschouwd als stappen op de weg naar klinische toepassing van stimulering van het parasympatische zenuwstelsel door middel van enterale voeding.

Het eerste doel van dit proefschrift is het verder ontrafelen van het mechanisme dat aan de ontstekingsremmende werking van lipiderijke voeding ten grondslag ligt. Het tweede doel is de werkzaamheid van stimulatie van het autonome zenuwstelsel door voeding te onderzoeken. Hiervoor gebruiken we verschillende diermodellen voor belangrijke ziektebeelden in chirurgische en intensive care patiënten. Het derde doel is het vertalen van deze experimentele bevindingen naar de mens. Voor het eerst wordt

---

aangetoond dat kortdurende interventie met verrijkte enterale voeding een acute ontstekingsrespons bij de mens remt.

Kennis van de mechanismen die de ontstekingsremmende werking van lipiderijke voeding verklaren is noodzakelijk om een optimale klinische behandeling te ontwikkelen en gezondheidsrisico's te beperken. In het eerste deel van dit proefschrift wordt onderzocht op welke manier voeding het centraal zenuwstelsel aanzet tot remming van de ontstekingsreactie. In eerdere studies bleek de communicatie tussen enterale voedingsstoffen en het brein te verlopen zowel via sensorische zenuwen als via de bloedbaan. Om de route te achterhalen waarlangs het ontstekingsremmende signaal wordt overgebracht, worden de sensorische zenuwen op cervicaal niveau uitgeschakeld door middel van capsaïcine. Wanneer de signaaloverdracht via afferente vagusbundels op deze wijze wordt onderbroken, is lipiderijke voeding niet langer in staat om de ontstekingsreactie te dempen (**hoofdstuk 2**). Vervolgens wordt ingegaan op de activatie van de zenuwuiteinden in de darmwand. In eerdere studies werd aangetoond dat cholecystokinine (CCK) receptoren een essentiële schakel vormen in de ontstekingsremmende werking van lipiderijke voeding. CCK-receptoren komen onder meer voor op de perifere uiteinden van de afferente nervus vagus. Met behulp van specifieke antagonistinnen stellen we vast dat perifeer gelegen CCK-1 receptoren een cruciale schakel vormen in de gunstige effecten van lipiderijke voeding. In overeenstemming hiermee leidt toediening van een vorm van CCK die specifiek aan perifeer gelegen CCK-1 receptoren bindt, in gevaste dieren tot een zelfde mate van ontstekingsremming als lipiderijke voeding. Concluderend toont deze studie een voorheen onbekende darm-hersen-immuun reflex aan, berustend op activatie van perifeer gelegen CCK-1 receptoren en aanvoerende takken van de nervus vagus door nutriënten in het darmlumen.

In het tweede deel van dit proefschrift wordt de aantasting van de darmwand in de vroege fase van een systemische ontstekingsrespons bestudeerd, en de effecten van lipiderijke voeding hierop. Verschillende experimentele en klinische studies wijzen op een belangrijke rol van de darm in de ontwikkeling en ontsporing van de systemische ontstekingsreactie. Met behulp van de in het bloed gemeten biomarker I-FABP werd door dr. Derikx en collega's aangetoond dat schade aan enterocyten (darmepitheelcellen) plaatsvindt zowel in een vroeg stadium van sepsis als kort na niet-abdominale chirurgie. De mate van enterocytische schade bleek samen te hangen met de prognose van deze patiënten en het ontstaan van complicaties. Een belangrijke patiëntengroep met een sterk verhoogd risico op het ontstaan van sepsis zijn mensen met een groot fysiek trauma. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe met behulp van I-FABP is vastgesteld dat enterocytische schade na trauma al detecteerbaar is op het moment

dat patiënten arriveren op de spoedeisende hulp. De mate van vroege enterocytschade is gerelateerd aan de omvang van het trauma, alsook aan de hoogte van ontstekingsparameters IL-6, CRP en procalcitonine, gemeten in de dagen na het trauma. Deze bevindingen impliceren dat vroege aantasting van de darmwand als een aangrijpingspunt kan worden beschouwd voor ontstekingsremmende interventies in traumapatiënten.

De veranderingen in de darmwand kort na activatie van het afweersysteem worden nader bestudeerd in een diermodel van hemorrhagische shock. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven dat afbraak van de actinefilamenten die de enterocyt structuur geven al een kwartier na shock plaatsvindt. De verstoring van de celstructuur wordt gevolgd door afbraak van de 'tight junctions' die de enterocyten onderling verbinden. Deze structurele veranderingen gaan gepaard met een toename van de permeabiliteit van de darmwand en het ontstaan van een lokale ontstekingsrespons. Deze processen in de darmwand gaan vooraf aan het verschijnen van ontstekingsstoffen in de circulatie. Vervolgens worden de effecten van lipiderijke voeding op de vroege aantasting van de darmwand bestudeerd. In **hoofdstuk 5** wordt beschreven dat toediening van lipiderijke voeding de doorlaatbaarheid van de darmwand beperkt. Verder leidt voedingsinterventie tot een afname van enterocytschade en minder ontsteking van de darmwand. Blokkade van de CCK-receptoren, die een cruciale rol spelen in de activatie van de nervus vagus, neemt de effecten van voeding weg. Concluderend tonen deze data aan dat lipiderijke voeding vroege aantasting van de darmwand voorkomt via activatie van de vagale reflex.

Wanneer de darmpariëte wordt aangetast, behoren mestcellen tot de eerste cellen van het afweersysteem die immuno-actieve mediators uitscheiden. Verschillende recente studies tonen aan dat mestcellen een belangrijk onderdeel vormen van de immunologische barrière tussen de darminhoud en het lichaam. De reactiviteit van mucosale mestcellen wordt nader bestudeerd in het endotoxine model, een veel gebruikt model voor de systemische ontstekingsreactie die tijdens de vroege fase van sepsis optreedt (**hoofdstuk 6**). Toediening van een bolus endotoxine, een component van de celwand van Gramnegatieve bacteriën, roept een respons van het afweersysteem op. Behandeling met histamine receptor-1 blokker en mestcelstabilisator ketotifen leidt tot lagere concentraties ontstekingsstoffen in de circulatie en behoud van de darmpariëte. Hiermee wordt het belang van mestcelactivatie in het ontstaan van ontsteking en aantasting van darmintegriteit bevestigd. Lipiderijke voeding voorafgaand aan de gift endotoxine remt de mestcelactivatie. Blokkade van zowel CCK-1 receptoren als nACh receptoren neemt de remmende effecten van voeding op mestcelactivatie weg, wat een cruciale rol van de CCK-1 receptor-afhankelijke vagale reflex aantoont. Deze bevindingen worden ondersteund door in vitro experimenten waarin een dosisafhankelijke mestcelremming wordt aangetoond

---

door nicotine en acetylcholine (agonisten van de nACh receptor). Concluderend blijkt uit deze experimenten dat remming van mucosale mestcellen een aangrijpingspunt is voor de door enterale voeding geactiveerde vagale reflex.

In het derde deel van dit proefschrift wordt de werkzaamheid van verrijkte voeding onderzocht in verschillende situaties waarin een ontregelde afweerreactie centraal staat. Al eerder werden patiënten met een ernstig trauma genoemd als een patiëntengroep bij wie een sterke activatie van het immuunsysteem optreedt. Logischerwijs kan bij deze patiënten de behandeling pas worden gestart op het moment dat er al weefselschade is en de ontstekingsrespons zich reeds ontwikkelt. Om deze situatie na te bootsen wordt in het hemorrhagische shockmodel pas gestart met voeding op het moment dat shock-gerelateerde ontsteking en weefselschade al aanwezig zijn (**hoofdstuk 7**). Lipiderijke voeding toegediend na shock resulteert in een vermindering van de ontstekingsrespons en behoud van de darmwand in vergelijking met gevaste dieren. Het feit dat blokkers van de CCK-receptor het beschermende effect van voeding na shock wegnemen wijst erop dat stimulatie van de CCK receptor afhankelijke vagale reflex ook in deze situatie cruciaal is.

Afbraak van erythrocyten, oftewel hemolyse, is een fenomeen dat frequent wordt waargenomen bij verschillende groepen (cardio)chirurgische patiënten en patiënten op de intensive care. Recente studies leggen een verband tussen massale hemolyse, het optreden van circulatieproblemen en een verslechterde orgaanfunctie. Tijdens hemolyse komen grote hoeveelheden hemoglobine vrij, dat een onomkeerbare reactie met stikstofmonoxide aangaat. De tekorten aan stikstofmonoxide die vervolgens ontstaan worden verondersteld een belangrijk deel van de circulatieproblemen te verklaren. Stikstofmonoxide zorgt namelijk voor relaxatie van glad spierweefsel. Het is bekend dat de gevoeligheid voor stikstofmonoxide-onafhankelijke vaatverwijders tijdens hemolyse juist toeneemt. Aangezien acetylcholine, een neurotransmitter die vrijkomt door stimulatie van de nervus vagus, als een krachtige en stikstofmonoxide-onafhankelijke vaatverwijder functioneert, veronderstelden wij dat lipiderijke voeding via het vrijkomen van acetylcholine de schadelijke gevolgen van acute hemolyse zou kunnen beperken. Het effect van lipiderijke voeding wordt onderzocht in een diermodel waarin hemolyse wordt nagebootst door infusie van gelyseerde erythrocyten (**hoofdstuk 8**). Conform de hypothese leidt interventie met enterale voeding via activatie van CCK-1 receptoren en nACh receptoren tot een sterke vermindering van orgaanschade en afname van de systemische ontstekingsreactie. Bovendien wordt met behulp van microsferen (fluorescente bolletjes) aangetoond dat lipiderijke voeding de microcirculatie in de nier, darm en lever verbetert. Deze data impliceren dat stimulatie van de vagale reflex door middel van voeding kan bijdragen aan het voorkomen van complicaties van acute hemolyse.

Sepsis is een veel voorkomende excessieve reactie van het lichaam op een bacteriële infectie. In **hoofdstuk 9** worden de effecten van nervus vagusstimulatie met enterale voeding in het endotoxinemodel beschreven. Zowel lipiderijke voeding als controlevoeding remmen dosisafhankelijk de afgifte van cytokines. Lipiderijke voeding vermindert de ontstekingsreactie in lagere doseringen dan de controlevoeding, wat aangeeft dat het ontstekingsremmende effect van voeding kan worden vergroot door toevoeging van specifieke voedingsstoffen. Ook de mate van enterocytshade en ontsteking in de lever en milt zijn verminderd in dieren die lipiderijke voeding krijgen. De betrokkenheid van de nervus vagus wordt aangetoond door middel van blokkers van CCK receptoren en nACh receptoren. Bovendien leidt lipiderijke voeding tot een toegenomen activiteit van mechanosensitieve zenuwen na rek van de darmwand. Overigens resulteert het oprekken van de maag op zichzelf niet in een significante remming van de ontstekingsrespons, wat er op wijst dat de aanwezigheid van voedingsstoffen essentieel is.

De effecten van lipiderijke voeding op sepsis worden verder onderzocht in een model voor polymicrobiële sepsis waarbij de blinde darm wordt afgebonden en geperforeerd (CLP; cecal ligation and puncture). Ook in dit sepsismodel leidt voedingsinterventie tot een afname van de acute ontstekingsrespons (**hoofdstuk 10**). Een belangrijk kenmerk van het CLP-model is de ontwikkeling van een immuunsuppressieve periode na de initiële hyperinflammatoire fase. In de kliniek wordt de periode waarin het afweersysteem minder responsief is gekenmerkt door het optreden van opportunistische infecties die moeilijk te behandelen zijn. De verminderde reactiviteit van het immuunsysteem op deze secundaire infecties is gecorreleerd met de mate van ontsteking in de vroege fase van sepsis. Daarom wordt vermindering van de acute ontstekingsrespons als een potentieel aangrijpingspunt beschouwd om de daarop volgende non-responsiviteit van het immuunsysteem te verminderen. Na het induceren van een secundaire luchtweginfectie met *Pseudomonas aeruginosa* vier dagen na CLP is de hoeveelheid bacteriën in de long hoger in vergelijking met een controle operatie (niet leidend tot sepsis). Dit geeft een toestand van immunosuppressie tijdens sepsis weer. In dieren die lipiderijke voeding krijgen toegediend, is de kolonisatie in de long echter niet verschillend tussen septische en niet-septische dieren. Het behoud van de afweerrespons gaat gepaard met een toename van de inflammatoire markers IL-12 en IFN- $\gamma$  en een afname van immunosuppressor IL-10. Hiermee wordt aangetoond dat lipiderijke voeding niet alleen de acute ontstekingsrespons remt, maar ook een verzachtende werking uitoefent op de daarop volgende immunosuppressieve fase.

De dierexperimentele studies laten samen een breed beschermend effect van lipiderijke voeding zien en verschaffen bovendien inzicht in de onderliggende vagale



---

reflex. Op grond van deze kennis zijn de eerste humane studies met verrijkte voeding uitgevoerd. Eerst wordt gezocht naar een optimale voedingscompositie (**hoofdstuk 11**). Een veelgebruikte klinische voeding met een hoge lipidenfractie (Diasip<sup>®</sup>) wordt vergeleken met een klinische voeding met een laag lipidengehalte (Respifor<sup>®</sup>). Omdat CCK concentraties in de darmwand niet op een non-invasieve manier gemeten kunnen worden in de mens, worden de CCK spiegels in het bloed bepaald voor en na voeding. Hieruit blijken geen verschillen tussen beide voedingen. Dit is een opvallende bevinding, aangezien de samenstelling van deze klinische voedingen vergelijkbaar is met de lipiderijke en controlevoeding die in de dierexperimentele studies werden toegepast. Uit de literatuur blijkt dat vooral vetzuren met koolstofketens van meer dan twaalf koolstofatomen en gehydrolyseerde eiwitten leiden tot afgifte van CCK. Op basis van deze gegevens werd een speciale eiwit- en lipiderijke voeding ontwikkeld gericht op maximale CCK afgifte. Echter ook deze voeding resulteert niet in hogere CCK-spiegels in het bloed in vergelijking met isocalorische controlevoeding. Deze gegevens wijzen erop dat de serumconcentraties van CCK geen goede maat zijn om een voeding gericht op optimale nervus vagusstimulatie te selecteren. Het gebrek aan onderscheidingsvermogen tussen beide voedingen kan liggen in het feit dat systemische spiegels een overmaat betekenen van lokaal CCK in de darmwand en de mate van nervus vagus-activatie dus niet goed representeren.

Nadere experimenten tonen aan dat ophoging van de voedingsdoseringen niet tot hogere CCK-pieken in het plasma leidt, maar wel tot een langer aanhoudende stijging van de CCK-waarden. Dit fenomeen kan worden verklaard door de vertraagde maaglediging na een grotere hoeveelheid voeding, wat resulteert in verlengde blootstelling van de darmwand aan de voedingsstoffen. Met het oog op klinische toepassing zou voeding, om een aanhoudende afgifte van CCK te bewerkstelligen, ofwel als een bolus in de maag, ofwel continu voorbij de pylorus toegediend moeten worden. Een tweede marker die wordt verondersteld het ontstekingsremmende effect van voeding weer te geven is de variabiliteit van de hartslag (heart rate variability). Uit verschillen tussen de hartslag-intervallen kan de mate van sympatische en parasympatische activiteit worden afgeleid. Echter de variabiliteit van de hartslag blijkt niet te verschillen tussen vrijwilligers die 200 ml Diasip<sup>®</sup> of Respifor<sup>®</sup> drinken (**hoofdstuk 12**). Mogelijk komen de zenuwbanen die het hart beïnvloeden niet overeen met de nervus vagus-vezels die de ontstekingsrespons remmen. Deze gedachte wordt ook verwoord in een reactie van onze onderzoeksgroep op een studie van dr. Thayer, die een verband aantoonde tussen de hoogte van ontstekingsmarkers en de variabiliteit van de hartslag in een cohort met overwegend gezonde mensen (**hoofdstuk 13**).

Eerder werd in muizen aangetoond dat lipiderijke voeding een endotoxine-gemedieerde ontstekingsrespons remt (**hoofdstuk 9**). Wij beschrijven in **hoofdstuk 14** een proof-of-principle studie naar het effect van eiwit- en lipiderijke voeding op een endotoxine-gemedieerde ontstekingsrespons in de mens. Bij gezonde vrijwilligers resulteert een bolus endotoxine in ziekteverschijnselen en stijging van ontstekingswaarden in het bloed. Om aspiratie te voorkomen wordt de voeding via een nasojejunaal sonde toegediend. Verrijkte voeding leidt tot een significante afname van pro-inflammatoire markers TNF $\alpha$ , IL-6 en IL-1RA en een toename van anti-inflammatoire marker IL-10 in vergelijking met zowel controlepersonen die geen voeding krijgen als personen die de controlevoeding ontvangen. Daarmee is dit de eerste studie die een beschermend effect van kortdurende toediening van eiwit- en lipiderijke voeding laat zien tijdens een acute ontsteking in de mens. Toekomstige studies dienen vast te stellen in hoeverre de vagale ontstekingsremmende reflex deze effecten verklaart.

Samenvattend verschaft dit proefschrift inzicht in het mechanisme dat aan de ontstekingsremmende werking van lipiderijke voeding ten grondslag ligt, wordt een breed beschermend effect aangetoond in verschillende modellen voor belangrijke ziektebeelden in chirurgische en intensive care patiënten en wordt tenslotte een vertaalslag van deze bevindingen naar de mens gemaakt. Stimulatie van het autonome zenuwstelsel door enterale voeding sluit goed aan bij de recent aangepaste richtlijnen rondom het voeden van patiënten perioperatief en op de intensive care. In deze richtlijnen wordt aanbevolen om periodes van vasten te reduceren en voeding zo mogelijk enteraal toe te dienen. Wat toekomstige humane studies betreft die zich richten op stimulatie van de vagale reflex, is het van groot belang om te vermelden dat er tot dusver geen bijwerkingen of gezondheidsrisico's naar voren zijn gekomen. Het voeden per duodenumsonde, zoals in deze studie werd uitgevoerd, wordt wereldwijd als een veilige wijze van voedseltoediening beschouwd, ook in hemodynamisch instabiele patiënten. Complicaties van duodenaal voeden worden alleen beschreven in patiënten met een pre-existent aangetaste darm die langdurig werden gevoed. De volgende stap richting klinische toepassing van stimulatie van het autonoom zenuwstelsel door middel van voeding is een studie waarin de specifiek de veiligheid van voedingsinterventie wordt onderzocht en de mate waarin voeding wordt verdragen. Hieruit zal blijken of vervolgstudies uitgevoerd kunnen worden naar de effectiviteit van voedingsinterventies die door modulatie van de ontstekingsrespons het klinisch herstel gunstig beïnvloeden. Aangezien voeding voorafgaand aan de ontsteking tot sterkere bescherming leidt ten opzichte van voeding gestart tijdens een al bestaande ontsteking, vormen patiënten die electieve chirurgie ondergaan een geschikte populatie voor verdere studies.

---