

# Intestinal development and inflammation : role of polyamines and nitric oxide

## Citation for published version (APA):

ter Steege, J. C. A. (1998). *Intestinal development and inflammation : role of polyamines and nitric oxide*. Febodruk b.v. <https://doi.org/10.26481/dis.19981023js>

## Document status and date:

Published: 01/01/1998

## DOI:

[10.26481/dis.19981023js](https://doi.org/10.26481/dis.19981023js)

## 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.

## SUMMARY

The first section of Chapter 1 is focused on polyamines and their synthesis in general. Polyamines are organic amines with an aliphatic carbon chain. These cellular compounds are involved in a wide variety of cellular processes and are essential for cell proliferation, however, the actual function of these amines is still unclear. The second section deals with the important role of polyamines in the maturation of the intestinal mucosa and immune system after birth. Inhibition of polyamine synthesis in neonatal rodents prevents morphological and biochemical maturation of the small intestine, indicating that polyamine biosynthesis is essential for normal intestinal development after birth.

The notion that polyamines are essential for maintenance of intestinal integrity is derived from studies in which inhibition of intestinal polyamine synthesis was shown to induce villus atrophy. Moreover, enhanced intestinal polyamine concentrations have been shown to stimulate intestinal repair. Interestingly polyamines are derived from L-arginine, which is also the precursor for the potent pro-inflammatory mediator NO. Therefore the third section of Chapter 1 describes the role of NO in intestinal integrity and inflammation. In contrast to polyamines, enhanced NO production is involved in the increase in intestinal permeability as observed during inflammation. The role both polyamines and NO in intestinal inflammation as observed in coeliac disease and sepsis is discussed.

At the end of the introduction the role of polyamines in the immune system is depicted. On the one hand, polyamines are essential for proliferating cells and consequently for cell activation and proliferation in response to mitogenous stimuli. On the other hand high concentrations of polyamines as detected in tumor and foetal tissue, are thought to be involved in the absence of an immune response to these tissues. In line with this inhibition of polyamine synthesis in tumor bearing mice has been shown to enhance immune activity against the tumor activity, further supporting an immunosuppressive role for these aliphatic cations *in vivo*. In addition, the role of polyamine oxidase activity in relation with this immunosuppressive actions of polyamines is discussed.

In Chapter 2 the normal phenotypic development of intraepithelial lymphocytes (IEL) and lamina propria (LPL) after birth in mice is described. Whereas the number of LPL increase before day 15, the number of IEL expands after day 15. Around weaning (day 20) both IEL and LPL differentiate to a mature pattern of cellular membrane antigen expression. Further, the increase in the number of thymus independent IEL expressing TCR $\gamma\delta$  takes place before that of the thymus dependent TCR $\alpha\beta^+$  IEL. The increase in latter cell population is triggered by the change of food around weaning. In conclusion, the mouse mucosal immune system develops during the first 3 weeks of neonatal life leading to the formation of a more mature immune system at weaning.

In Chapter 3 it is demonstrated that exogenous polyamines are involved in the development of the mucosal immune system, next to the biochemical development of the enterocytes. Oral spermine administration to mice at day 12 after birth induces an increase in the number of IEL expressing TCR $\alpha\beta$ , CD4 and CD5, the phenotype of thymus dependent IEL, whereas the phenotype of the LPL is unaffected. Since the effect of spermine on IEL coincides with a biochemical maturation of the enterocytes, it is suggested that IEL development might be mediated by enterocytic maturation.

In Chapter 4 the development of an ELISA for determination of protein associated nitrotyrosine in plasma samples is described. NO reacts with superoxide to yield the strong oxidant peroxynitrite. Nitrotyrosine is the stable endproduct from the reaction of peroxynitrite and tyrosine residues. Plasma (serum) levels of NO-oxidation products (NO $_x$ ) nitrate and nitrite are used as indicators for enhanced NO production. However, plasma NO $_x$  levels have, in contrast to plasma proteins, a very short half life. Further NO-induced cytotoxicity is mediated through peroxynitrite and not NO $_x$ . Therefore, protein-associated nitrotyrosine levels might be a more stable marker for NO-mediated cytotoxic effects than NO $_x$  levels. In this chapter it is, further, demonstrated that the concentrations of nitrotyrosine and NO $_x$  are enhanced in plasma of children with active coeliac disease. Both plasma levels of nitrotyrosine and NO $_x$  decrease when the children are on a gluten free diet suggesting a relation between intestinal inflammation and enhanced plasma levels of nitrotyrosine and NO $_x$ .

In Chapter 5 the role for NO in the pathophysiology of intestinal inflammation as observed in patients with active coeliac disease patients is further supported by immunohistochemical staining of intestinal biopsy tissue for iNOS and nitrotyrosine. Inducible NOS expression, clearly present in the crypt epithelium, coincides with nitrotyrosine staining, indicating formation of peroxynitrite resulting in nitration of cellular proteins. In addition, the number of intestinal macrophages is also enhanced, particularly the number of tissue infiltrating macrophages, which in contrast to intestinal macrophages express CD14. The observed colocalization of iNOS and CD14 expression suggests a role for these tissue infiltrating macrophages in the pathophysiology of coeliac disease.

In Chapter 6 the role of endogenous TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 in LPS-induced NO release *in vivo* is evaluated in a experimental murine sepsis model. While blocking either TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  has no effect on LPS-induced serum NO-oxidation levels, blocking both pro-inflammatory mediators almost completely inhibits LPS-induced NO release, indicating that NO is induced by at least two pathways one through TNF- $\alpha$  and one through IFN- $\gamma$ . Interestingly, while IL-10 decreases LPS-induced NO release by inhibition of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production, our results with combined treatment of anti-IL-10 with anti-TNF- $\alpha$  or anti-IFN- $\gamma$  suggest the presence of an

IL-10 induced factor which is, in addition to TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , involved in the upregulation of NO release after LPS challenge.

In Chapter 7 it is demonstrated that the small intestine, lung and heart are the major organs involved in enhanced NO production in mice after LPS challenge *in vivo*. In addition it is shown that iNOS expression in these organs is regulated by TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10. Whereas the presence of either TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  is essential for iNOS expression in these organs after LPS challenge, IL-10 is involved in the downregulation of iNOS expression through inhibition of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  synthesis. In contrast, however, our results obtained with combined treatment of anti-IL-10 with anti-TNF- $\alpha$  or anti-IFN- $\gamma$  might indicate a possible role for IL-10, or an IL-10 induced factor, in the upregulation of iNOS expression in these organs after LPS challenge.

In Chapter 8 the effects of the polyamines, cadaverine, putrescine, spermidine and spermine on cytokine release of stimulated human PBMCs and purified monocytes are studied *in vitro*. Polyamines themselves appear not to exert any effect on the basal as well as on PHA- or LPS-induced cytokine release of these cells. In contrast, in the presence of polyamine oxidase activity, spermine and spermidine are oxidized into products which exert pro-inflammatory actions, i.e. enhance cytokine release, when present in low concentrations and inhibit release of pro-inflammatory as well as anti-inflammatory cytokines, when present in higher concentrations. Inhibition of cytokine release coincides with a decrease in cell viability suggesting that these polyamine oxidation products are cytotoxic for human PBMCs and monocytes.

In Chapter 9 evidence is provided indicating that exogenous polyamines inhibit LPS-induced NO production *in vitro* as well as *in vivo*. Inhibition of LPS-induced NO release by spermine in the murine macrophage cell line, RAW264.7 is not mediated by a decrease in TNF- $\alpha$  production. In addition, oral spermine administration suppresses intestinal iNOS expression, nitrotyrosine formation and the number of infiltrating macrophages and neutrophils in this organ after LPS challenge, suggesting a role for exogenous polyamines in inhibition of intestinal damage. Moreover, oral spermine administration also inhibits the increase in serum levels NO<sub>x</sub> and the pro-inflammatory mediators IFN- $\gamma$  and enhances serum levels of the anti-inflammatory mediator IL-10, indicating a immunosuppressive role for intraluminally derived polyamines. In line with the results obtained *in vitro*, serum levels of TNF- $\alpha$  are unaffected after oral spermine administration. We hypothesize that oral polyamine administration might have therapeutic perspectives in several disorders characterized by systemic or intestinal inflammation.

In Chapter 10 we conclude that polyamines play an important role in the development of the intestinal immune system after birth. In addition, we suggest that polyamines

and NO are involved in the physiological and inflammatory immune responses and in the non-specific host defence. Polyamines and NO both exert pro-inflammatory actions as well as anti-inflammatory actions, dependent on their concentration and localization. Although polyamines and NO have the same precursor, the regulation of their synthesis is a complex system that is controlled by a multitude of regulatory cytokines. In short, while the results from our studies provide further support for a central role for NO in the physiological and inflammatory immune response, the most prominent finding of this thesis is that exogenous and endogenous polyamines represent an equally important regulatory mechanism of these immune responses. Based on these findings it is conceivable that exogenous polyamines might have therapeutic effects during intestinal inflammation such as observed in coeliac disease and sepsis.

## SAMENVATTING

Het eerste gedeelte van Hoofdstuk 1 geeft een algemene beschrijving van polyamines en de polyamine synthese. Polyamines zijn organische amines met een koolstof keten als basis. Alhoewel de exacte functie van deze amines nog niet geheel duidelijk is, is het wel bekend dat deze cellulaire componenten betrokken zijn bij veel verschillende cellulaire processen en essentieel zijn voor celdeling. In het tweede gedeelte van Hoofdstuk 1 wordt de belangrijke rol van polyamines in de ontwikkeling van de dunne darm mucosa en het mucosale immuunsysteem na de geboorte beschreven. Het feit dat remming van polyamine synthese in neonatale knaagdieren leidt tot een remming van de morfologische en biochemische ontwikkeling van de dunne darm geeft aan dat polyamine synthese essentieel is voor een normale ontwikkeling van de dunne darm na de geboorte.

Het bewijs dat polyamines essentieel zijn voor het in stand houden van de integriteit van de is geleverd door studies die aantonen dat inhibitie van polyamine synthese in de dunne darm resulteert in weefselschade. Bovendien is aangetoond dat aanwezigheid van verhoogde concentraties van polyamines in het darmlumen het herstel van darmschade stimuleert. Verder is een interessant gegeven dat polyamines indirect gevormd worden uit het aminozuur L-arginine dat anderzijds tevens een precursor is voor de potente ontstekingsmediator NO. Vanuit dit perspectief beschrijft het derde gedeelte van Hoofdstuk 1 de rol van NO in de integriteit van de darm en in ontstekingsreacties in de darm. In tegenstelling tot het beschermende effect van polyamines, veroorzaakt een verhoogde productie van NO gedurende een ontstekingsreactie een toename in de permeabiliteit van de dunne darm. De functie van polyamines en NO gedurende ontstekingsreacties in de dunne darm zoals die optreden bij coeliakie en sepsis worden bediscussieerd.

Aan het einde van de introductie wordt de functie van polyamines in het immuunsysteem beschreven. Enerzijds zijn polyamines essentieel voor celdeling en spelen derhalve een belangrijke rol tijdens celactivatie en proliferatie als reactie op mitogene stimuli. Anderzijds wordt gesuggereerd dat de hoge concentraties van polyamines zoals die gevonden worden in tumoren en foetaal weefsel verantwoordelijk zijn voor het uitblijven van een immunologische afweerreactie tegen tumoren en de foetus. Deze suggestie wordt verder ondersteund door de observatie dat inhibitie van polyamine synthese in tumor dragende muizen de immunologische afweerreactie tegen de tumor doet toenemen. Tenslotte wordt de rol van polyamine oxidase activiteit in relatie met tot immunosuppressieve effecten van polyamines beschreven.

Hoofdstuk 2 beschrijft een studie naar de normale ontwikkeling van het fenotype van intra-epitheliale lymfocyten (IEL) en lamina propria lymfocyten (LPL) in de dunne darm van de muis na de geboorte. Terwijl de toename van het aantal LPL plaats vindt voor dag 15 na de geboorte, neemt het aantal IEL pas toe na dag 15. Wanneer de

dieren gespeend worden op dag 21 na de geboorte (dat wil zeggen van de moeder vandaan gehaald worden) eten ze alleen nog vast voedsel. Rondom het spenen verandert het expressie patroon van celmembraan antigenen van zowel IEL als LPL in het mature fenotype van deze lymfocyten. Verder is opvallend dat het aantal thymus-onafhankelijke IEL, welke TCR $\gamma\delta$  tot expressie brengen (TCR $\gamma\delta^+$  IEL), eerder toeneemt dan het aantal thymus-afhankelijke TCR $\alpha\beta^+$  IEL. De toename van het aantal TCR $\alpha\beta^+$  IEL wordt vooral gestimuleerd door de verandering van voedsel na het spenen. Samenvattend laat deze studie zien dat het mucosale immuunsysteem in de dunne darm van de muis zich ontwikkelt gedurende de eerste drie weken na de geboorte, en dat na het spenen het fenotype van IEL en LPL overeenkomt met het fenotype van deze cellen in volwassen muizen.

In Hoofdstuk 3 wordt aangetoond dat exogene polyamines een rol spelen in zowel de ontwikkeling van het mucosale immuunsysteem van de dunne darm als ook in de biochemische rijping van de enterocyten. Orale toediening van het polyamine spermine aan muizen van 12 dagen oud resulteert in een toename van het aantal IEL dat TCR $\alpha\beta$ , CD4 en CD5 tot expressie brengt, overeenkomend met het fenotype van de thymus-afhankelijke IEL. Toediening van spermine heeft geen effect op het aantal of het fenotype van de LPL. Aangezien het effect van spermine op IEL alleen optreedt als er biochemische rijping van de enterocyten plaats vindt, wordt geconcludeerd dat het effect van spermine op de fenotypische ontwikkeling van de IEL mogelijk gemedieerd wordt via de inductie van biochemische maturatie van de enterocyten.

In Hoofdstuk 4 wordt de ontwikkeling van een ELISA voor het bepalen van nitrotyrosine in humaan plasma beschreven. De reactie tussen NO en superoxide anion resulteert in peroxynitriet. Nitrotyrosine is een stabiel eindproduct van de reactie van peroxynitriet met tyrosine residuen. Tot nu toe werden serum levels van de NO-oxidatie producten (NO $_x$ ) nitraat en nitriet worden gebruikt al maat voor de hoeveelheid geproduceerd NO. Echter serum NO $_x$  heeft een relatief korte halfwaardetijd in de circulatie hebben. Daarbij komt dat NO-toxiciteit het gevolg van de vorming van de sterke oxidant peroxynitriet resulterend nitrotyrosine vorming en niet van NO $_x$  zelf. Aangezien de meeste (genitreeerde) plasma eiwitten een langere halfwaarde tijd hebben dan NO $_x$  zouden plasma nitrotyrosine levels een mogelijk stabielere marker zijn voor NO-gemedieerde schade dan plasma NO $_x$  concentraties. In dit hoofdstuk wordt tevens aangetoond dat de concentraties van zowel nitrotyrosine als NO $_x$  sterk zijn toegenomen in plasma van kinderen met actieve coeliakie. Nitrotyrosine en NO $_x$  concentraties nemen af als deze kinderen een gluten vrij dieet krijgen. Deze resultaten suggereren een relatie tussen de ontsteking in de dunne darm en een toename van plasma nitrotyrosine en NO $_x$  concentraties.

In Hoofdstuk 5 wordt de betrokkenheid van NO in de pathofysiologie van darm ontsteking bevestigd door immunohistochemische kleuring van iNOS en nitrotyrosine

in duodenum biopsies van patiënten met actieve coeliakie. Induceerbaar NOS en nitrotyrosine komen duidelijk tot expressie in het epitheel van de crypten, hetgeen duidt op de vorming van peroxynitriet leidend tot de nitratie van cellulaire eiwitten. Tevens wordt aangetoond dat het totale aantal macrofagen in de darm is toegenomen, met name het aantal infiltrerende macrofagen, die in tegenstelling tot residente darm macrofagen CD14 tot expressie brengen. De in deze studie gevonden co-expressie van iNOS met CD14 suggereert een rol voor de infiltrerende macrofagen in de pathofysiologie van coeliakie.

In Hoofdstuk 6 wordt de rol van de endogene cytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  en IL-10 in NO productie *in vivo* onderzocht in een sepsis model in de muis. Terwijl het blokkeren van hetzij endogeen TNF- $\alpha$  of hetzij IFN- $\gamma$  geen effect heeft op de concentratie van NO<sub>x</sub> in de circulatie na i.p. toediening van LPS, resulteert het gelijktijdig inactiveren van beide ontstekingsmediatoren in een zeer sterke afname van de LPS-geïnduceerde NO<sub>x</sub> concentraties. Deze bevindingen duiden erop dat LPS NO productie induceert via zowel TNF- $\alpha$  als IFN- $\gamma$ . Tevens wordt in deze studie enerzijds aangetoond dat IL-10 betrokken is bij de inhibitie van LPS-gestimuleerde NO productie remming van TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  productie, terwijl anderzijds de resultaten van de gecombineerde behandeling van anti-IL-10 met anti-TNF- $\alpha$  of anti-IFN- $\gamma$  aantonen dat IL-10 tevens betrokken is bij de inductie van NO productie na LPS stimulatie.

In Hoofdstuk 7 wordt aangetoond dat de dunne darm, de long en het hart de belangrijkste organen zijn die betrokken zijn bij de toename in NO productie na LPS stimulatie. Tevens wordt gedemonstreerd dat TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  en IL-10 betrokken zijn bij de regulatie van iNOS expressie in deze organen. Terwijl de aanwezigheid van TNF- $\alpha$  of IFN- $\gamma$  essentieel is voor iNOS expressie na LPS stimulatie, is IL-10 via inhibitie van TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  betrokken bij de onderdrukking van iNOS expressie in deze organen. De resultaten van de gecombineerde behandeling met anti-IL-10 en anti-TNF- $\alpha$  of anti-IFN- $\gamma$  tonen daarentegen aan dat IL-10 mogelijk ook betrokken is bij de inductie van iNOS expressie na LPS stimulatie.

In Hoofdstuk 8 worden de effecten van de polyamines cadaverine, putrescine, spermidine en spermine op de cytokine productie van humane PBMCs en gezuiverde monocytten *in vitro* bestudeerd. Polyamines zelf hebben noch effect op de basale cytokine productie noch op de LPS- of PHA-gestimuleerde cytokine productie. Echter, in de aanwezigheid van polyamine oxidase activiteit worden spermine en spermidine geoxideerd tot producten die afhankelijk van hun concentratie pro-inflammatoire dan wel anti-inflammatoire effecten kunnen hebben. In lage concentraties stimuleren deze oxidatie producten cytokine productie en oefenen daarmee pro-inflammatoire effecten uit, terwijl ze in hoge concentraties de cytokine productie remmen en dus anti-inflammatoir werken. Afname van de cytokine



productie gaat vergezeld van een toename in het aantal dode cellen, wat impliceert dat de gevormde polyamine oxidatie producten toxisch zijn voor humane PBMCs en monocytten.

In Hoofdstuk 9 wordt aangetoond dat exogene polyamines zowel *in vitro* als *in vivo* LPS-gestimuleerde NO productie remmen. De afname van de LPS-gestimuleerde NO productie in een muizen macrofagen cellijn door spermine is niet het resultaat van een afname in TNF- $\alpha$  productie. Tevens wordt gedemonstreerd dat orale toediening van spermine aan LPS-gestimuleerde muizen resulteert in een afname van iNOS en nitrotyrosine expressie en het aantal infiltrerende macrofagen en neutrofielen in de dunne darm van deze dieren. Deze resultaten suggereren een mogelijke rol van exogene polyamines in de beperking van inflammatoire darmschade. Bovendien leidt het oraal toedienen van spermine in deze dieren ook tot een afname in serum concentraties van NO<sub>x</sub> en van de ontstekingsmediator IFN- $\gamma$ , en in een toename in de serum concentratie van het anti-inflammatoire cytokine IL-10, hetgeen een immunosuppressieve werking van polyamines afkomstig uit het darm lumen doet vermoeden.

In Hoofdstuk 10 stellen we dat polyamines een belangrijke rol spelen bij de ontwikkeling van het immuunsysteem van de darm na de geboorte. Verder wordt er geconcludeerd dat zowel polyamines als NO betrokken zijn bij de normale fysiologische immunreactie, ontstekingsreactie en de niet-specifieke afweerreactie. Polyamines en NO bezitten beide pro-inflammatoire en anti-inflammatoire eigenschappen afhankelijk van hun concentratie en lokalisatie. Alhoewel polyamines en NO dezelfde precursor hebben, is de regulatie van hun productie een complex systeem, dat beïnvloed wordt door een verscheidenheid aan regulatoire cytokines. Samenvattend, terwijl de studies gepresenteerd in dit proefschrift een centrale rol voor NO in de fysiologische immunreactie en ontstekingsreactie ondersteunen, is de belangrijkste nieuwe bevinding van dit proefschrift dat exogene en endogene polyamines een evenzeer belangrijke rol spelen in de regulatie van immunreacties. Op grond van deze resultaten is het aannemelijk dat exogene polyamines een therapeutisch effect kunnen hebben bij bepaalde intestinale ontstekingsreacties als gevolg van voedsel allergie of tijdens sepsis.