



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Role of intestinal microbiota in cardio-metabolic diseases

Katiraei, S.

Citation

Katiraei, S. (2023, March 30). *Role of intestinal microbiota in cardio-metabolic diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3589804>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3589804>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING

Hoofdstuk 1 dient als algemene introductie en licht de rol van de darmmicrobiota in cardiometabole aandoeningen toe. De hoofdoorzaak van cardiometabole aandoeningen is atherosclerose, die voornamelijk veroorzaakt wordt door dyslipidemie en inflammatie. In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe de darmmicrobiota het immuunsysteem lokaal en systemische beïnvloedt. Daarnaast richt dit hoofdstuk zich op de technische aspecten van cardiometabool en microbiota onderzoek. Beenmergtransplantatie (BMT), een veelgebruikte methode bij het bestuderen van gen-functies bij atherogenese, en Next Generation Sequencing, een methode voor het profileren van de darmmicrobiota worden uitvoerig besproken.

Experimentele beenmergtransplantatie is een relatief eenvoudige en effectieve strategie voor het bestuderen van de rol van specifieke immuungerelateerde genen bij pathofysiologische mechanismen in muizen. Opvallend genoeg wordt de toepassing van BMT bij obesitasonderzoek belemmerd door een significante vermindering van hoog vet dieet (HFD) geïnduceerde obesitas, dit als direct gevolg van de BMT-procedure. In **hoofdstuk 2** hebben wij de metabole organen die door de BMT-procedure mogelijk beïnvloed kunnen worden en die de HFD-geïnduceerde respons kunnen verstoren uitvoerig bestudeerd. Wij hebben geconcludeerd dat de BMT-procedure verschillende effecten op het organisme heeft en metabool belangrijke organen beïnvloedt. Deze effecten zijn geassocieerd met metabole afwijkingen die betrekking hebben op zowel het wit vetweefsel (WAT) als op pancreasdisfunctie in reactie op een HFD. Daarom kunnen de metabole effecten van BMT niet genegeerd worden en moeten deze serieus in acht genomen worden bij het onderzoeksontwerp en bij de interpretatie van de onderzoeksdata.

Naast de metabole bijwerkingen van BMT zoals beschreven in **hoofdstuk 2**, veroorzaakt de conditionering van BMT acute systemische inflammatie, darmschade en resulteert in veranderingen in de samenstelling van de darmmicrobiota. Aangezien veranderingen in de intestinale microbiota composities geassocieerd zijn met zowel obesitas als ontregeling van het immuunsysteem, kan dit de metabole bijwerkingen van BMT verklaren. In **hoofdstuk 3** hebben wij de regulatie van het perifere immuunsysteem onderzocht, als direct gevolg van veranderingen in de darmmicrobiota veroorzaakt door BMT. Wij hebben in muizen het effect onderzocht van BMT op de reactiepatronen van splenocyten en peritoneale macrofagen op verschillende pathogene stimuli als markers van het extra-intestinale immuunsysteem. Splenocyten zijn een gemengde populatie van immuuncellen en vertegenwoordigen daarmee reacties van zowel het aangeleerde als het aangeboren immuunsysteem, terwijl peritoneale macrofagen alleen het aangeboren immuunsysteem vertegenwoordigen. De potentiële rol van de darmmicrobiota in de reactiepatronen van splenocyten en peritoneale macrofagen werd onderzocht door controlemuizen samen te huisvesten met BMT-behandelde muizen en door overdracht van cecum-inhoud naar germfree muizen. Wij hebben laten zien dat 24 weken na BMT, splenocyten, maar niet peritoneale macrofagen, een verhoogde cytokinereactie laten

zien bij *ex-vivo*-stimulatie met verschillende pathogenen in vergelijking met onbehandelde controles. Het patroon van door BMT-geïnduceerde cytokinereacties werd overgedragen op splenocyten, en niet op peritoneale macrofagen, van gezonde controles via samen-huisvesting en overgedragen op germfree muizen via transplantatie van cecum-inhoud. Concluderend, de darmmicrobiota verhoogt de cytokinereacties van splenocyten na BMT. Dit fenotype kan op splenocyten van gezonde controles door samen-huisvesting of op germfree muizen via overdracht van cecum-inhoud worden overgedragen, wat impliceert dat dit fenotype onafhankelijk van BMT-geïnduceerde darmschade en lekkende darm syndroom is.

In **hoofdstuk 4** hebben wij de effecten van orale toediening van een enkele bacteriesoort op metabole en immunologische markers van atherogenese in muizen onderzocht. Voorgaande muisstudies hebben aangetoond dat orale toediening van de darmbacterie *A. muciniphila* bescherming bood tegen HFD-geïnduceerde obesitas en het verbeterde de metabole en immunologische markers zoals glucose tolerantie, hypercholesterolemie en cytokinesecretie door verschillende immuun cellen. De effecten van *A. muciniphila* op atherogenese waren echter nog niet onderzocht. Wij hebben de effecten van *A. muciniphila* op lipide metabolisme, immuun systeem en cuff-geïnduceerde neointima vorming in hyperlipidemische APOE * 3-Leiden.CETP (E3L.CETP) muizen onderzocht. Wij hebben het effect onderzocht van 4 weken orale *A. muciniphila*-toediening bij E3L.CETP muizen op 1) plasma lipidenniveaus, 2) de immuunrespons door het meten van poortader lipopolysaccharide (LPS) niveaus, samenstelling van immuuncellen in mesenterische lymfeknopen (mLN) en *ex vivo* responsen van circulerende leukocyten op LPS en 3) neointima vorming en samenstelling. Wij bevonden dat de toediening van *A. muciniphila* hyperlipidemie verlaagde in de hypercholesterolemische E3L.CETP muizen en immuun modulerende eigenschappen heeft. Aangezien zowel hyperlipidemie als het immuunsysteem betrokken zijn bij de pathogenese van atherosclerose, suggereren deze waarnemingen dat *A. muciniphila* anti-atherogene potentie heeft. In tegenstelling tot onze hypothese was *A. muciniphila* echter niet in staat om atherosclerose te verbeteren in ons cuff-geïnduceerde neointima vormingsmodel, wat suggereert dat de anti-atherogene effecten van *A. muciniphila* in dit muismodel niet voldoende sterk waren.

Het monitoren en inzichtelijk maken van de darmmicrobiota compositie en diens veranderingen als gevolg van een experimentele interventie, is in verschillende hoofdstukken van dit boek een belangrijke parameter. In het veld van microbiom onderzoek is het sequensen van een relatief klein deel van het 16S rRNA-gen, de zogenaamde V4-regio, een veelgebruikte methode om de microbiële compositie te monitoren. In **hoofdstuk 5** hebben wij onderzocht of het sequensen van het volledige 16S rRNA-gen de resultaten en interpretatie van een dieetinterventie beïnvloedt, in vergelijking met sequensen van slechts de V4-regio van dit gen. Om de effecten van de dieetinterventie te vergelijken, is het PacBio-platform voor sequensen van het volledige 16S rRNA-gen en het Illumina MiSeq-platform voor sequensen van de V4-regio gebruikt. Vervolgens hebben wij taxonomische en diversiteitsanalyse uitgevoerd. Hiertoe werden muizen een dieet met en zonder de prebioticum inuline toegediend. Cecum-inhoud van deze muizen is gebruikt om twee primaire datasets te generen: 1) een volledige 16S rRNA dataset gegenereerd door het PacBio-platform; 2) een 16S-rRNA V4-regio dataset gegenereerd door

het Illumina MiSeq-platform. Door het 16S rRNA V4-regio uit de volledige 16S rRNA PacBio dataset in silico te extraheren, is een derde (afgeleide) dataset gegenereerd. Analyse van de primaire en afgeleide 16S rRNA V4-regio datasets vertoonde vergelijkbare bacteriële abundantie, en α - en β -diversiteit. Echter, vergelijking van de volledige 16S rRNA dataset met de primaire en afgeleide 16S rRNA V4-regio datasets, onthulde verschillen in relatieve bacteriële abundantie en α - en β -diversiteit. Wij concluderen dat sequensen van het volledige 16S rRNA-gen ongeacht het sequencingplatform een ander beeld geeft ten aanzien van de relatieve bacteriële abundantie, in-monster-diversiteit en inter-monsterdiversiteit, in vergelijking met V4-regio sequencing. Deze bevinding heeft duidelijke implicaties voor de interpretatie van biologische data na een dieetinterventie.

In **hoofdstuk 6** beschrijven wij de causale rol van de darmmicrobiota in gastheer metabolisme, immuunsysteem en pathofysiologie van atherosclerose. De studies die in dit proefschrift beschreven zijn, tonen aan dat orale toediening van de bacterie *A. muciniphila* lipidenmetabolisme van de gastheer beïnvloedt. Bovendien gaven onze samen-huisvesting-experimenten na BMT aan dat darmbacteriën een cruciale rol spelen bij systemische immuunreacties. Wij hebben kritische inzichten verschaft over twee algemeen aanvaarde en breed toegepaste onderzoeksmethoden in cardiometabole en microbiom-onderzoek, namelijk BMT en 16S rRNA sequencing. Deze inzichten zouden in acht genomen moeten worden bij het onderzoeksontwerp en bij de interpretatie van de onderzoeksdata, wanneer deze methoden toegepast worden.

