

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

(ook voor niet-ingewijden)

Door middel van dit proefschrift, dat grotendeels bestaat uit (gepubliceerde of nog te publiceren) artikelen, proberen we meer te weten te komen over hoe het menselijk lichaam reageert op een operatieve ingreep, en dan met name over de stressreactie van het lichaam door de 'schade van het snijden' oftewel de chirurgische stress respons. Ook trachten we deze chirurgische stress respons te verminderen door voedingsinterventies toe te passen met anti-oxidanten.

In dit hoofdstuk worden de resultaten van dit proefschrift kritisch besproken aan de hand van de belangrijkste bevindingen van ons onderzoek. In aanvulling op het voorgaande trekken we, waar mogelijk, conclusies en zal een toekomstperspectief gegeven worden.

In **hoofdstuk 1**, de algemene inleiding, wordt een overzicht gegeven van de bestaande kennis over de chirurgische stress respons, over hoe de chirurgische stress respons met voedingsinterventies verminderd wordt en over voedingsinterventies die de chirurgische stress respons zouden kunnen verminderen.

De ontregeling van het metabolisme (oftewel stofwisseling) door een operatie is dermate complex, dat de omschrijving hiervan middels 'chirurgische stress respons' mogelijk te simplistisch is. Enige ontregeling van het metabolisme lijkt gunstig te zijn voor genezing¹. Echter, ontregeling van het metabolisme in overvloed, bijvoorbeeld na een operatie, kan schadelijk zijn. Dit wil zeggen dat het kan leiden tot een verhoogde kans op complicaties en zelfs op overlijden na een operatie². Reduceren van de chirurgische stress respons kan een invalshoek zijn om het herstel van patiënten na een operatie te verbeteren.

Recente ontwikkelingen in de kennis van de chirurgische stress respons laten zien dat het ontstaan van postoperatieve insuline ongevoeligheid^A een belangrijke rol speelt in de ontregeling van het metabolisme na een operatie. Aanvullend wordt een sterke interactie verondersteld tussen insuline ongevoeligheid en oxidatieve stress^B. In dit proefschrift worden zowel insuline ongevoeligheid als oxidatieve stress onderzocht.

A insuline ongevoeligheid: onder normale omstandigheden stimuleert insuline de opname van glucose door het lichaam. Bij ongevoeligheid voor insuline neemt het lichaam minder makkelijk glucose op.

B oxidatieve stress: oxidatieve stress is het uit balans zijn van de aanmaak van oxidanten (oftewel zuurstof radicalen) en de afbraak/het onschadelijk maken van oxidanten door anti-oxidanten, resulterend in een overvloed aan oxidanten.

Naast het krijgen van meer kennis over deze onderwerpen, proberen we door het doen van verschillende studies zowel de insuline ongevoeligheid als de oxidatieve stress volgend op een operatie ten gunste te beïnvloeden.

In **hoofdstuk 2**, presenteren we een klinische studie over het gebruik van een combinatie van anti-oxidatieve voedingssupplementen, waaronder glutamine, vitamine C, vitamine E, bètacaroteen, zink en selenium. De voedingssupplementen werden toegediend via een jejunostomie^C aan patiënten die een grote operatie ondergingen aan het bovenste gedeelte van het maagdarmkanaal. Vanaf de eerste postoperatieve dag kregen de patiënten de voedingssupplementen toegediend via de jejunostomie op een gerandomiseerde manier. Gerandomiseerd wil zeggen dat de interventiegroep standaard voeding kreeg aangevuld met voedingssupplementen en dat de controle groep de standaard voeding kreeg, zonder dat patiënten of onderzoekers wisten wie welke voeding kreeg. De voedingsinterventie ging door tot bijna een week na de operatie. In deze studie werd gekeken naar het effect van de voedingssupplementen op parameters van het anti-oxidanten systeem (het verdedigingssysteem) in het bloed en op oxidatieve stress parameters in het bloed.

Een belangrijke bevinding van deze studie was dat er een significante daling gevonden werd van de concentratie anti-oxidanten in het bloed na een grote operatie, zoals een daling in de concentratie van glutamine, vitamine C, vitamine E, bètacaroteen, zink en selenium op de eerste postoperatieve dag³. Ondanks de toediening, was alleen de concentratie van selenium en glutamine genormaliseerd aan het einde van de eerste postoperatieve week³.

Een andere belangrijke bevinding was dat de toediening van anti-oxidanten een daling gaf van de concentratie lipopolysaccharide binding protein (oftewel LBP) in het bloed. LBP, een acute fase eiwit, moduleert de afweerreactie op endotoxinen. Door te binden aan de endotoxinen vormt LBP samen met de endotoxinen een complex. Dit complex is vervolgens makkelijker zichtbaar voor het afweersysteem³⁻⁶. Deze bevinding suggereert dat onze voedingsinterventie met anti-oxidanten mogelijk in staat is om de darmen te beschermen tegen oxidatieve stress schade³⁻⁶.

Door het meten van oxidatieve stress parameters (F2-isoprostane in de urine, malondialdehyde in het bloed en glutathion peroxidase in het bloed), hebben we helaas niet kunnen aantonen dat er sprake is van een situatie van oxidatieve stress na een grote operatie. Tevens konden we niet aantonen dat onze voedingsinterventie een effect had op deze oxidatieve stress parameters.

C jejunostomie: een jejunostomie is een verbinding die wordt gemaakt van buiten het lichaam naar een deel van de dunne darm om voeding door te kunnen geven.

Hoofdstuk 3 van dit proefschrift gaat over dezelfde klinische studie als in hoofdstuk 2 beschreven is. Echter, in hoofdstuk 3 wordt besproken welk effect deze voedingsinterventie had op immuun-inflammatoire parameters in het bloed. Zoals verwacht zagen we een forse immuun-inflammatoire reactie na een grote operatie in zowel de groep die de voedingsinterventie kreeg als in de controle groep.

Een belangrijke bevinding van dit onderdeel van de studie was dat er een indicatie was dat de voedingsinterventie zou zorgen voor een vermindering van de inflammatoire reactie. Ten eerste, doordat C-reactief proteïne (CRP) gedurende de hele studieperiode lager was in de interventiegroep in vergelijking met de controlegroep. Ten tweede, doordat er stabilisatie was van de concentratie van oplosbaar tumor necrose factor receptor, TNF-R75, in de interventiegroep in vergelijking met een continue stijging in de controlegroep⁷. Tumor necrose factor (TNF) is een pro-inflammatoire cytokine, dat wordt geïnactiveerd door oplosbare TNF receptoren, zoals TNF-R75⁸⁻¹¹.

Internationale onderzoeksdata laten zien dat het belangrijk is om te starten met voedingsinterventies vóór een operatie om het postoperatieve herstel gunstig te beïnvloeden¹²⁻¹⁴. Vandaar dat in onze vervolgonderzoeken de voedingsinterventie start vóór een operatie. In **hoofdstuk 4** presenteren we een gerandomiseerde, placebo gecontroleerde, klinische studie over een nieuwe preoperatieve drank. Deze nieuwe preoperatieve drank bevat koolhydraten, glutamine en anti-oxidanten (groene thee extract, vitamine C, vitamine E, bètacaroteen, zink en selenium). Dit voedingssupplement werd op drie momenten preoperatief aangeboden en gedronken door patiënten die een operatie ondergingen in verband met een maligniteit van de endeldarm. In deze klinische studie onderzochten we het effect van het voedingssupplement op de postoperatieve insuline ongevoeligheid. De insuline gevoeligheid van de patiënten werd onderzocht in de week voorafgaand aan de operatie en op de eerste postoperatieve dag. Niet eerder werd insuline gevoeligheid tegelijkertijd onderzocht in zowel lever, als spier, als vetweefsel. Derhalve is het een belangrijke bevinding dat er een forse postoperatieve insuline ongevoeligheid is van het glucose metabolisme, zowel hepatisch (~ lever) als perifere (~ spier), en een postoperatieve insuline ongevoeligheid van het vetzuurmetabolisme. Het gegeven voedingssupplement had alleen een effect op de insuline gevoeligheid van één van deze drie. Het voedingssupplement kon de postoperatieve perifere insuline ongevoeligheid niet voorkomen, maar wel verminderen. Het gebruikte voedingssupplement is ontworpen om de postoperatieve inflammatoire en oxidatieve stress respons gunstig te beïnvloeden. Er zijn aanvullende bepalingen gedaan om ook deze reacties te kunnen volgen. Een andere bevinding is dat we een aanwijzing hebben gevonden dat het voedingssupplement een verminderde postoperatieve inflammatoire respons gaf. In de interventiegroep werd namelijk een lagere concentratie CRP gevonden in vergelijking met de controlegroep gedurende

de gehele postoperatieve week. Ook hebben we aangetoond dat er postoperatief een toename is in oxidatieve stress, door het meten van hogere postoperatieve concentraties malondialdehyde in zowel de interventie- als de controlegroep. Er werd helaas geen effect gevonden van het supplement op parameters van oxidatieve stress en geen effect op parameters van de anti-oxidanten capaciteit.

Naast interesse in voedingssupplementen waarbij een veelvoud aan anti-oxidanten tegelijkertijd wordt gebruikt, is onze onderzoeksgroep ook geïnteresseerd in enkelvoudige voedingssupplementen. Onze onderzoeksgroep kreeg hernieuwde interesse in taurine, dat leidde tot nieuwe onderzoeksideeën. In **hoofdstuk 5** presenteren we een verkennende studie naar het humane taurine metabolisme. Dit onderzoek werd gedaan bij patiënten die een operatie aan de lever ondergingen. Nadat er bij deze operatie toegang tot de buikholte was verkregen, werden er van verschillende bloedvaten in de buik bloedmonsters afgenomen en werd hun bloedstroom gemeten. Het belang van deze verkennende studie is dat we voor het eerst humane data genereerden over orgaan fluxen en fractionele extracties van zowel de darmen, de lever en de nieren. Een andere belangrijke bevinding was dat er afgifte was van taurine door de darmen. Deze afgifte van taurine vindt plaats terwijl de patiënt, voorafgaand aan de operatie, een periode van vasten heeft gehad. Door deconjugatie van taurine bevattende galzuren kan er taurine in de darm vrijkomen, ook tijdens een operatie, en kan de darm taurine opnemen en vervolgens afgeven aan het bloed ¹⁵. Dit lijkt ons de meest aannemelijke verklaring van de bevinding dat de darmen taurine afgeven tijdens een operatie. Onze redenering wordt gesteund doordat vergelijkbare resultaten, in een studie met ratten, leidden tot een vergelijkbare verklaring en doordat de darmen de nodige enzymen lijken te missen voor de productie van taurine ¹⁶.

Vervolgens was het plan om in studieverband taurine te geven aan oudere chirurgische patiënten. Voordat deze studie startte, hebben we een systematisch overzichtsartikel geschreven over deze patiëntenpopulatie. In **hoofdstuk 6** beschrijven we welke voorspellende waarde preoperatieve voedingsparameters hebben op postoperatief herstel, in de groep oudere patiënten die een algemeen chirurgische operatie ondergaan. Op een systematische manier stelden we vast dat er slechts twee adequate parameters zijn om postoperatief herstel te voorspellen bij oudere patiënten die een algemeen chirurgische operatie ondergaan, te weten preoperatief gewichtsverlies en preoperatief gemeten albumine in bloed ¹⁷.

In **hoofdstuk 7** presenteren we een gerandomiseerde, placebo gecontroleerde, klinische studie waarbij taurine als enkelvoudige voedingsinterventie werd gegeven. Taurine werd in capsule vorm gegeven aan oudere heupfractuur patiënten. Er werd preoperatief begonnen met de voedingsinterventie en de inname ging door tot en met de vijfde postoperatieve dag. Er werd gedurende een week gekeken naar het effect

van taurine op postoperatieve oxidatieve stress, en gedurende een jaar naar het effect op postoperatief herstel. De belangrijkste bevinding van deze klinische studie was dat taurine gebruik de postoperatieve oxidatieve stress verminderde. Dit kwam tot uiting in een lagere concentratie 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in urine, in een afgevlakte malondialdehyde reactie in het bloed en in een tendens tot lagere lactaat-pyruvaat ratio in het bloed ¹⁸.

ALGEMENE CONCLUSIES EN EEN TOEKOMSTPERSPECTIEF

De klinische studies die we in dit proefschrift presenteren, vergroten de kennis over de chirurgische stress respons. Nog niet eerder was er op zo'n nauwgezette manier, simultaan op drie verschillende niveaus, de postoperatieve insuline gevoeligheid gemeten (ons onderzoek in **hoofdstuk 4**). We toonden aan dat een grote operatie, zoals een operatie bij endeldarm maligniteit, leidt tot een forse insuline ongevoeligheid van het glucose metabolisme, zowel hepatisch als perifere, en van het vetzuurmetabolisme. In drie klinische onderzoeken waarbij anti-oxidatieve voedingssupplementen werden gegeven, was het lastig voor ons om postoperatieve oxidatieve stress aan te kunnen tonen. We konden wel postoperatieve oxidatieve stress aantonen in twee van de drie klinische onderzoeken, zoals weergegeven in **hoofdstuk 4** en **7**, maar niet in het klinische onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** en **3**. In onze klinische onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van verschillende parameters om oxidatieve stress aan te kunnen tonen, zoals parameters van peroxidatie van lipiden (malondialdehyde, F2-isoprostane in urine en bloedplasma, en geoxideerd low-density lipoprotein, oftewel LDL), een parameter van DNA schade (8-hydroxy-2-deoxyguanosine in urine), en een indirecte parameter aangaande mitochondriale functie (de lactaat-pyruvaat ratio). Al deze parameters staan bekend als betrouwbaar en toepasbaar in klinisch onderzoek. Echter, er zijn naast de gebruikte en genoemde parameters nog veel meer betrouwbare parameters om oxidatieve stress te meten, zowel in bloed als in urine. En, als we naar weefsel kijken en wat er daarin te meten valt qua oxidatieve stress, neemt het aantal te meten oxidatieve stress parameters aanzienlijk toe. Er is dus een groot bereik om oxidatieve stress te meten. Door selectie, waarbij één of een aantal parameters wordt gekozen om te gebruiken in een onderzoek, kan het voorkomen dat er juist wel veranderingen optreden in de parameters die niet geselecteerd zijn. Dit probleem van selectie komt niet alleen voor bij oxidatieve stress parameters, maar bijvoorbeeld ook bij parameters voor de immuun-inflammatoire reactie. Een aanvullend probleem is dat de parameters bepaald worden in bloed, terwijl de te onderzoeken processen doorgaans plaatsvinden in weefsels en organen. In het merendeel van de gevallen meten we dus indirect. Toekomstig onderzoek zou meer aandacht moeten besteden aan het vinden

van adequate directe parameters (voor weefsel en organen) en/of aan het eenvoudiger toe kunnen passen van reeds bestaande parameters. Een vergelijkbare suggestie werd al meer dan tien jaar geleden gedaan in een overzichtsartikel. In dit overzichtsartikel werd voorgesteld om de intracellulaire en intercellulaire communicatie te onderzoeken, om tot een beter begrip te komen van de mogelijk essentiële functie van glutathion als beschermer tegen postoperatieve oxidatieve stress¹⁹. Er zijn verschillende onderzoeken die data presenteren over oxidatieve stress in andere compartimenten dan het bloed. In een studie met ratten werd bijvoorbeeld postoperatieve oxidatieve stress aangetoond zowel in bloedserum als in leverweefsel²⁰. Een andere studie bij patiënten met brandwonden (dat gepaard gaat met een behoorlijke oxidatieve stress), laat zien dat de anti-oxidanten status gemeten werd zowel in het bloed als in de huid²¹.

De voedingsinterventie studies met anti-oxidanten die zijn beschreven in dit proefschrift waren ten delen in staat om de chirurgische stress respons te verminderen, maar niet zo intens als in opzet bedacht was. Ten delen zijn we in staat geweest de postoperatieve inflammatoire respons en de postoperatieve oxidatieve stress te verminderen, maar we hebben het klinische herstel niet kunnen veranderen. Desalniettemin, onze voedingsinterventies zijn niet schadelijk geweest voor onze patiënten. In de REDOX en Meta Plus studies (recentelijk gepubliceerd) krijgen ernstig zieke patiënten, opgenomen op een intensieve zorg unit (ICU), anti-oxidanten toegediend, vergelijkbaar in samenstelling als bij ons onderzoek in **hoofdstuk 4**. In deze twee studies wordt er gesuggereerd dat er mogelijk sprake is van oversterfte door de toegediende anti-oxidanten²²⁻²⁴. Feit is dat anti-oxidanten zich kunnen gedragen als oxidanten^{25,26}. Verder is er weinig bekend over de interactie tussen anti-oxidanten. Internationaal gezien staat men nog steeds achter de hypothese dat de chirurgische stress respons verminderd kan worden door reductie van de postoperatieve oxidatieve stress en de postoperatieve insuline ongevoeligheid door middel van anti-oxidanten. Echter, er is nog veel onderzoek nodig om de kennis aangaande de genoemde mechanismen te vergroten en om de juiste supplementen te vinden. Translationeel onderzoek lijkt mij de adequate benadering hiervoor. Toekomstig onderzoek zou zich moeten richten op het ontrafelen van de mechanismen gebruikmakend van weefsel- en orgaanparameters. Interventie studies met anti-oxidanten zouden zich vervolgens kunnen richten op de anti-oxidatieve effecten op de gevonden mechanismen in de weefsels en de organen, voordat er een onderzoek komt naar het effect op het klinische herstel. Om tot een adequate mix van anti-oxidanten te komen is het van belang om in studieverband de mix op te bouwen door toevoeging van één anti-oxidant per keer, om meer te weten te komen over de interactie tussen de anti-oxidanten. Echter, verschillende patiëntengroepen hebben mogelijk verschillende mixen nodig. Naast het vinden van

een geschikte wetenschappelijke benadering, vormen de onderzoekskosten om tot antwoorden te kunnen komen een interessante uitdaging.

REFERENTIES

1. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771:1-18.
2. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Chalidis B et al. Surgical stress response. *Injury* 2006; 37 Suppl 5:S3-S9.
3. van Stijn MF, Ligthart-Melis GC, Boelens PG et al. Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World J Gastroenterol* 2008; 14:6960-6969.
4. Vreugdenhil AC, Snoek AM, Greve JW et al. Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. *J Immunol* 2000; 165:4561-4566.
5. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:785-790.
6. Wischmeyer PE. Glutamine: role in gut protection in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9:607-612.
7. van Stijn MF, Boelens PG, Richir MC et al. Antioxidant-enriched enteral nutrition and immuno-inflammatory response after major gastrointestinal tract surgery. *Br J Nutr* 2010; 103:314-318.
8. Decker D, Tolba R, Springer W et al. Abdominal surgical interventions: local and systemic consequences for the immune system--a prospective study on elective gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 2005; 126:12-18.
9. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115:1-20.
10. el Barbary M, Khabar KS. Soluble tumor necrosis factor receptor p55 predicts cytokinemia and systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 2002; 30:1712-1716.
11. Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 1996; 16:1-11.
12. Weimann A, Braga M, Harsanyi L et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including organ transplantation. *Clin Nutr* 2006; 25:224-244.
13. Gianotti L, Braga M, Nespoli L et al. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2002; 122:1763-1770.
14. Gianotti L. Nutrition and infections. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7 Suppl 2:S29-S32.
15. van Stijn MF, Vermeulen MA, Siroen MP et al. Human taurine metabolism: fluxes and fractional extraction rates of the gut, liver, and kidneys. *Metabolism* 2012; 61:1036-1040.
16. Garcia RA, Stipanuk MH. The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *J Nutr* 1992; 122:1693-1701.
17. van Stijn MF, Korkic-Halilovic I, Bakker MS et al. Preoperative nutrition status and postoperative outcome in elderly general surgery patients: a systematic review. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013; 37:37-43.
18. van Stijn MF, Bruins AA, Vermeulen MA et al. Effect of oral taurine on morbidity and mortality in elderly hip fracture patients: a randomized trial. *Int J Mol Sci* 2015 May 29;16(6):12288-306.

19. Wernerman J, Luo JL, Hammarqvist F. Glutathione status in critically-ill patients: possibility of modulation by antioxidants. *Proc Nutr Soc* 1999; 58:677-680.
20. Kotzampassi K, Kolios G, Manousou P et al. Oxidative stress due to anesthesia and surgical trauma: importance of early enteral nutrition. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53:770-779.
21. Berger MM, Baines M, Raffoul W et al. Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1293-1300.
22. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE et al. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N Engl J Med* 2013; 368:1489-1497.
23. Heyland DK, Elke G, Cook D et al. Glutamine and Antioxidants in the Critically Ill Patient: A Post Hoc Analysis of a Large-Scale Randomized Trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2014.
24. van Zanten AR, Sztark F, Kaisers UX et al. High-protein enteral nutrition enriched with immune-modulating nutrients vs standard high-protein enteral nutrition and nosocomial infections in the ICU: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 312:514-524.
25. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* 2005; 24:172-183.
26. Berger MM, Chioloro RL. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2007; 35:S584-S590.