

*Invloed van het orale microbioom op leveraandoeningen via  
 de gut-liver axis en door activering van de hepatische  
 stellaatcel*

---

*Fadia Hadi S3117545  
 Email: [F.S.Hadi@student.rug.nl](mailto:F.S.Hadi@student.rug.nl)  
 Supervisor: Prof. Dr. K.Poelstra  
 Datum van indiening: 10-11-2020  
 Locatie: Rijksuniversiteit Groningen*

## Abstract

Leverfibrose is de meest voorkomende leveraandoening wereldwijd. Het is de progressieve beschadiging van de lever wat veroorzaakt wordt door verlittekening van de lever. Dit proces wordt veroorzaakt door onder andere chronische infecties (zoals het hepatitis B- of C-virus), langdurige blootstelling aan toxische stoffen, zoals chronische alcoholisme, ernstige zwaarlijvigheid en buitensporige consumptie van vetten, erfelijke stofwisselingsziekten (zoals de ziekte van Wilson) of door auto-immunreacties.

Recente onderzoeken tonen aan dat bacteriën en bacteriële producten in de darmen het ziekteproces van diverse leveraandoeningen, zoals niet-alcoholische leververvetting (NAFLD), alcoholische leververvetting (ALD) en cirrose, kunnen versnellen of versterken. Er is een bidirectionele relatie tussen de micro-organismen in de darmen (microbiota) en de lever die de 'gut-liver axis' wordt genoemd. Uit verscheidene onderzoeken is gebleken dat producten van bacteriën (onder andere LPS) het fibrose proces bij leveraandoeningen stimuleren. Voorheen werd er gedacht dat zulke producten de darmslijmvliesbarrière niet zouden kunnen passeren maar het tegendeel is wetenschappelijk bewezen. Een abnormaal of ongebalanceerde microbiota kan leiden tot een verhoogde darmpermeabiliteit wat translocatie van micro-organismen en microbiële producten mogelijk maakt. Deze componenten kunnen werken op onder andere de hepatische stercellaten en Kupffer cellen die vervolgens kan resulteren in ontstekingsreacties leidend tot leverfibrose en uiteindelijk zelfs cirrose. Tot op het heden is er naast levertransplantatie geen andere therapie voor leverziekten beschikbaar. Door deze nieuwe inzichten kan er gefocust worden op aankomende therapieën die gericht zijn op de darmen waaronder probiotica, postbiotica en fecale microbiota-transplantatie. Uit onderzoeken is gebleken dat er een significante relatie is tussen parodontitis en chronische ziekten als hart- en vaatziekten, diabetes type II en Alzheimer. Het doel van mijn onderzoek is een antwoord vinden op de vraag of naast het microbiom in de darm ook het microbiom in de mondholte een rol kan spelen in de gut-liver-axis. Er wordt vooral gefocust op de orale pathogenen *Porphyromonas gingivalis* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uit verschillende onderzoeken is gebleken *P. gingivalis* fibrose van NASH verergert door HSC-activering wat geïnduceerd wordt door TGF- $\beta$ 1 en Gal-3 productie uit HSC's en hepatocyten. Ook is er aangetoond dat *P.gingivalis* verminderde glucosetolerantie, insulineresistentie en leversteatose veroorzaakte bij muizen die een vetrijk dieet kregen. *P.gingivalis* draagt bij aan NAFLD en verandert de darmflora. Ook is gebleken dat *A. actinomycetemcomitans* kan een risicofactor zijn voor NAFLD omdat het de darmflora verandert. De oral-gut-liver axis speelt dus een rol bij de progressie van NAFLD en ALD.

**Trefwoorden:** microbiota; dysbiose; chronische leverziekten; gut-liver axis; oral-gut-liver axis; leverfibrose; cirrose; intestinale permeabiliteit; lekkende darm; LPS; endotoxemie; niet-alcoholische leververvetting; periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

## Inhoudsopgave

<b>Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>Introductie .....</b>	<b>3</b>
<b>Hoofdstuk 1 .....</b>	<b>4</b>
Gut-liver axis .....	4
De darmmicrobiota .....	4
Verdedigingsmechanismen → darmbarrière en immuunsysteem .....	5
Verstoringen van de gut-liver axis .....	10
Alcoholische leververvetting (ALD) .....	10
Niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) .....	12
<b>Hoofdstuk 2 .....</b>	<b>15</b>
HSC cel .....	15
Alkaline phosphatase .....	19
<b>Onderzoek .....</b>	<b>20</b>
<i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	21
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	25
<b>Therapieën.....</b>	<b>27</b>
<b>Conclusie .....</b>	<b>29</b>
<b>Referenties .....</b>	<b>30</b>

## Introductie

Leverfibrose ontstaat als gevolg van een chronische leverontsteking dat leidt tot het vormen van littekenweefsel. Onder normale omstandigheden is dit proces van essentieel belang. Wanneer dit proces echter chronisch wordt dan kan dit leiden tot ernstige schade aan de lever. De chronische aandoeningen van de lever zoals infecties (onder andere het hepatitis B-virus (HBV) en het hepatitis C-virus (HCV)), overmatig alcoholgebruik, niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) en sommige genetische defecten kunnen het fibrose proces aanzetten. NAFLD is de meest voorkomende veroorzaker van chronische leverziekten wereldwijd [1]. De omkeerbare leverfibrose kan evalueren tot de onomkeerbare levercirrose indien de oorzaak niet spoedig wordt aangepakt [2]. Cirrose geeft een verhoogd risico op het hepatocellulair carcinoom en leverdecompensatie waardoor levertransplantatie genoodzaakt wordt [3]. Chronische ontstekingen zetten aan tot de activatie van hepatische stercellaten (HSC). HSC's spelen een rol bij leverfibrose doordat deze cellen fibrogene factoren afscheiden die portale fibrocyten, fibroblasten en myofibroblasten aansporen om collageen te produceren en daardoor fibrose te verspreiden [4]. Kortgeleden werd dysbiose in de darm geïdentificeerd als een belangrijk factor in de pathogenese van leverziekten. Lekkages in de darmslijmvliesbarrière en een verhoging in de translocatie van bacteriën in de lever via de 'gut-liver axis' blijkt een rol te spelen in de ontwikkeling van leverziekte [5]. De gut-liver axis is de bidirectionele relatie tussen de micro-organismen in de darmen (microbiota) en de lever. Deze interactie komt tot stand door aan de ene kant de poortader die producten afkomstig van de darmen naar de lever transporteert en aan de andere kant de lever die gal en antilichamen naar de darmen afscheidt. Dieet-, genetische- en omgevingsfactoren genereren signalen die leiden tot deze interactie. Verstoring in de darmbarrière resulteert in verhoogde influx van micro-organismen en hun producten naar de lever, waar ze de fibrotische processen stimuleren [6]. Door deze nieuwe inzichten kunnen er nieuwe therapieën gevonden worden om chronische leverziekten tegen te gaan door de gut-liver axis homeostase te herstellen: probiotics, postbiotics, fecale microbiota-transplantatie en farnesoid X-receptor (FXR)-agonisten. In dit literatuuronderzoek zal hoofdstuk 1 focussen op recente updates over de gut-liver axis en de rol van de darmbarrière, intestinale permeabiliteit, het microbiom. Daarnaast zal de kenmerkende verstoringsspatronen van de gut-liver axis in chronische leverziekten ALD en NAFLD beschreven worden. Hoofdstuk 2 zal ingaan op de hepatische stercellaten en op aankomende therapieën die gericht zijn op de darmen waaronder probiotica, postbiotica en fecale microbiota-transplantatie. Daarna zal ingegaan worden op de vraag of het microbiom in de mondholte (micro-organismen zoals *Porphyromonas gingivalis* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) een effect kunnen hebben op het microbiom van de darmen en zo een bijdrage kunnen leveren aan leverfibrose.

# Hoofdstuk 1

## Gut-liver axis

De gut-liver axis is de anatomische en functionele interactie tussen het darmmicrobioom en de lever. Producten afkomstig uit de lever, zoals galzuren, komen via de galwegen in de darmen terecht waar ze een hele belangrijke rol spelen in het controleren van de microbiële populaties [5]. Galzuren gedragen zich als ligand van de nucleaire receptoren (FXR) en G-eiwit gekoppelde galzuurreceptor 1 (GPBAR1). Via de nucleaire receptortranscriptiefactoren moduleren ze metabolische routes in de hepatocyten of de darmepitheelcellen om de homeostase van de lever te behouden [7]. Andersom komen producten afkomstig uit de darmen via de poortader de lever binnen. De gut-liver axis is erg belangrijk in het onderhouden van de homeostase van het immuunsysteem aangezien het ons beschermt tegen potentiële schadelijke substanties vanuit de darmen. Verhoogde intestinale permeabiliteit is het gevolg van een beschadigde intestinale barrière. Hierdoor wordt de lever blootgesteld aan bacteriële componenten die leverschade kunnen veroorzaken: 'pathogen-associated molecular patterns' (PAMP) en 'damage-associated molecular patterns' (DAMP) [7,8]. PAMP's zijn afgeleid van micro-organismen en veroorzaken ontstekingen als reactie op infecties. Een bekende PAMP is lipopolysaccharide (LPS), dat wordt aangetroffen op de buitenste celwand van gramnegatieve bacteriën. DAMP's zijn afgeleid van gastheercellen, waaronder tumorcellen, dode of stervende cellen, of producten die uit cellen worden afgegeven als reactie op signalen. PAMP'S en DAMP's binden aan patroonherkenningsreceptoren waaronder Toll-like receptoren (TLR's). Deze componenten kunnen in de lever een interactie aangaan met immuuncellen zoals de Kupffer-cellen en stellaatcellen. Wanneer deze cellen geactiveerd worden zullen ze pro-inflammatoire reacties induceren. Daarnaast kunnen ze ook antivirale en anti-apoptotische reacties in de hepatocyten op gang zetten [9,10]

## De darmmicrobiota

De darmmicrobiota, bestaande uit meer dan 100 triljoen micro-organismen, leeft in mutualisme samen met de mens [11]. Deze bacteriën profiteren van de darmen aangezien het rijk is aan voedingsstoffen en daarnaast biedt het bescherming en een stabiele omgeving. De micro-organismen zijn essentieel voor de gastheer aangezien deze bacteriën een hoge metabolische activiteit vertonen. Ze zijn in staat complexe koolhydraten te verteren aangezien de mens de enzymen er zelf niet voor heeft. Bovendien is de darmmicrobiota een belangrijke bron van metaboliëten, hormonen en neuro-mediators die rechtstreeks de darmfunctie reguleren en indirect de functie van andere organen moduleren. Er wordt recent veel onderzoek gedaan naar de impact van het darmmicrobioom op de gezondheid van de mens [12,13]. Het is bewezen dat de darmmicrobiota een belangrijk effect hebben op de fysiologie van het maagdarmkanaal en zouden ook een impact kunnen hebben op andere organen zoals de lever, nieren, hersenen en het cardiovasculaire systeem [14].

De communicatie van de darmmicrobiota met deze organen komt rechtstreeks tot stand via de Toll-like receptoren en indirect via de bacteriële metaboliëten en signaalmoleculen [13].

Uit onderzoek is gebleken dat de compositie en functie van de darmflora essentieel is voor de gezondheid van de mens. Verschillende factoren kunnen een invloed hebben op de compositie van het microbiom en zo het risico op dysbiose verhogen: omgeving (pollen, luchtverontreinigende stoffen, pesticiden), dieet, roken, alcohol, geneesmiddelen (bv. antibiotica, liraglutide, metformine, curcumine) en leeftijd [12,14].

Een door vetrijke dieet geïnduceerde obesitas veroorzaakt veranderingen in de darmflora bij ratten en de mens [15]. Daarnaast resulteert alcoholvoeding van muizen in een toename van het totale aantal en diversiteit van de bacteriën in de darm vergeleken met muizen die een isocalorisch dieet kregen [16].

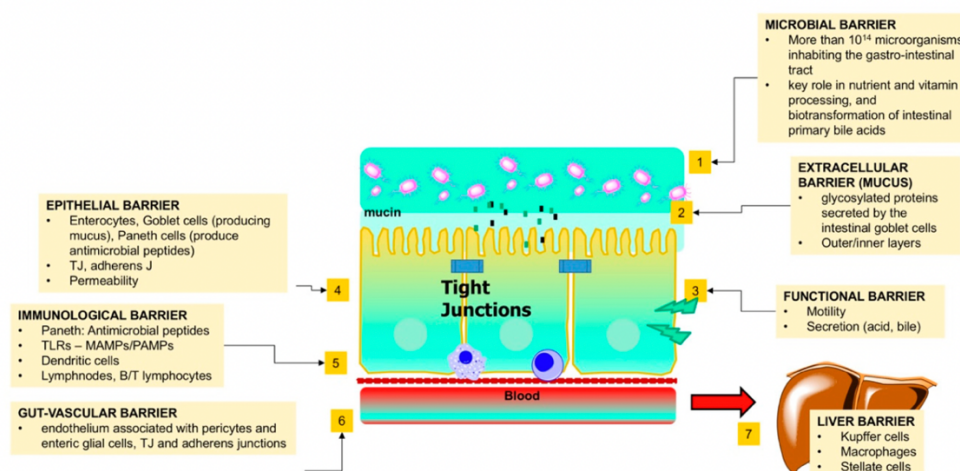
Veranderingen van het darmmicrobioom kan schadelijke gevolgen hebben voor de integriteit van de darmslijmvliesbarrière, de functie van de epitheliale darmcellen en de efficiëntie van het immuunsysteem. Doordat veranderingen in het darmmicrobioom geassocieerd wordt met een verhoging van de intestinale permeabiliteit, kan er translocatie plaats vinden van bacteriën naar andere organen en daar ontstekingsreacties induceren [5]. Daarom is het van essentieel belang dat het darmmicrobioom gescheiden gehouden blijft van het darmweefsel.

## Verdedigingsmechanismen → darmbarrière en immuunsysteem

Het grootste interface van het lichaam tussen de interne en externe omgeving is het darmkanaal [17]. De darm heeft twee tegenovergestelde functies:

- 1) Selectief permeabel zijn zodat benodigde voedingsstoffen vanuit het darmlumen in de bloedsomloop terecht komen.
- 2) Het voorkomen van het binnendringen van micro-organismen en andere schadelijke componenten.

Voor de laatste functie dient de darm als een barrière. Deze barrière bestaat uit 7 niveaus, zie figuur 1 [18].



Figuur 1. De darmbarrière bestaat uit verschillende lagen. De eerste laag bestaat uit microbiota, de tweede laag is de intestinale mucus, de derde laag omvat de gastro-intestinale motiliteit, de vierde laag is de monocellulaire laag bestaande uit epitheelcellen dat net onder de mucuslaag zit, de vijfde laag is de immunologische barrière, de zesde laag is de darm-vasculaire barrière, de zevende laag is de leverbarrière [64].

In het eerste niveau van de darmen zit de microbiota dat bestaat uit  $10^{14}$  bacteriën met een totaalgewicht van 1 tot 1.5 kilogram. DNA-onderzoek heeft uitgewezen dat er meer dan 1000 soorten aanwezig zijn in het darmlumen waarvan 99% anaeroob is [12].

Het tweede niveau van de darmbarrière is de intestinale mucus. De mucus bestaat uit geglycosyleerde eiwitten wat uitgescheiden wordt door de slijmbekercellen die gelegen zijn tussen de enterocyten in de darmbekleding [19]. De microbiota is vooral in de dikke darm aanwezig waardoor de mucuslaag daar dikker is dan in de andere segmenten van de darm [20].

De mucuslaag bestaat in de dikke darm uit twee lagen, de binnenlaag en de buitenlaag. De binnenste laag is steviger en bevindt zich dicht bij het epitheel. De binnenlaag is niet tot nauwelijks gekoloniseerd door micro-organismen, en dus steriel, omdat er antimicrobiële peptiden en microbiota-excluderende eiwitten aanwezig zijn zoals lysozym en zymogeen granula eiwit 16 (ZG16). Deze eiwitten communiceren met micro-organismen en verhinderen hun penetratie door de binnenlaag [21].

De buitenste laag wordt gekoloniseerd door bacteriën die de mucuslaag als voedingsbron gebruiken. Ze hechten zich rechtstreeks of via mucine-IgA-interactie aan de buitenste laag om niet uit de darmen gewassen te worden door peristaltische bewegingen. De functie van de mucus is het voorkomen van direct contact tussen schadelijke stoffen/organismen met de enterocyten [22]. De intestinale mucus regelt de gelaagdheid van de microbiota en de microbiota zelf regelt de vormgeving van het mucine. Dit komt zeer waarschijnlijk doordat slijmbekercellen de aanwezigheid van bacteriële producten kunnen signaleren en als reactie hierop Muc2 produceren via de activatie van het inflammasoom NLRP6. MUC knock-out muizen ontwikkelen colitis. MUC2 expressie is dus cruciaal in bescherming tegen ziektes. De micro-organismen stimuleren ook celgededieerde immuniteit via de TLR-gededieerde signalering [23]. De mucuslaag is een voedingsbron voor bacteriën, bijvoorbeeld voor de slijmafbrekende bacterie genaamd *Akkermansia muciniphila*. Dieet kan ook invloed hebben op de vormgeving van de microbiota [24]. Een vezel-arm dieet is een oorzaak voor een overvloed aan slijmafbrekende bacteriën en dit zorgt voor het dunner worden van de mucuslaag [25]. Verandering in de samenstelling van de mucus kan grote gevolgen hebben op de gezondheid aangezien dit kan leiden tot een directe interactie tussen de microbiota en het epitheel. Hierdoor is opname mogelijk van giftige stoffen, wat kan leiden tot de aanzetting en instandhouding van ontstekingsreacties zoals te zien is bij inflammatory bowel disease (IBD) en cystische fibrose [25].

Het derde niveau omvat de gastro-intestinale motiliteit en de secreties vanuit het maag-darmstelsel wat een invloed heeft op de buitenlaag van de mucus aangezien het ervoor zorgt dat de proliferatie van micro-organismen voorkomen wordt. Maagzuur en galzuren hebben een antimicrobiële werking [26]. Primaire galzuren worden in de lever gesynthetiseerd uit cholesterol. Het in de lever vrijgekomen galzuren worden naar de darmen getransporteerd om verder gemetaboliseerd te worden door de microbiota. Galzuren worden dan vervolgens uitscheiden met de ontlasting om een overmaat aan cholesterol uit ons lichaam te verwijderen. Galzuren vervullen daarnaast nog andere belangrijke functies in ons lichaam. In de darmen zijn galzouten bijvoorbeeld nodig voor de absorptie van vetten uit onze voeding. Galzuren spelen ook een rol in de vormgeving van de microbiota [26]. In ons lichaam circuleren galzuren in een enterohepatische kringloop.

Dit houdt in dat na de uitscheiding via de gal in de darm, de galzuren opgenomen worden in de poortader vanuit de darm en vervolgens retourneren naar de lever. Primaire galzuren zijn geconjugeerd tot de aminozuren glycine en taurine, en worden vervolgens uitgescheiden in de galblaas tijdens het vasten. Na een maaltijd vindt er galblaascontractie plaats en geconjugeerde galzuren worden geresorbeerd door de darmepitheel en komen via de poortader weer in de lever terecht. Galzuren kunnen invloed hebben op bepaalde processen met betrekking tot de productie en het transport van galzuren [27]. Deze invloed wordt gemedieerd door nucleaire receptoren zoals de FXR-receptor. Deze receptoren kunnen de epitheel en de darm vasculaire barrière verbeteren. Stimulatie van deze receptoren leiden tot een verminderde galzuurproductie en voorkomt opeenhoping van galzuren in de lever, waardoor leverschade voorkomen kan worden [28].

Het vierde niveau is de monocellulaire laag bestaande uit epitheelcellen dat net onder de mucuslaag zit. Deze barrièrelaag is ondoordringbaar voor de meeste opgeloste stoffen en die hebben dus een specifieke transporter nodig om transcellulair de barrière te passeren [29]. Aangrenzende epitheelcellen zitten verankert aan elkaar door tight junctions (TJ) waardoor intercellulaire ruimtes gesloten worden. Dit zijn grote eiwitcomplexen die verbonden worden aan het cytoskelet van epitheelcellen. Hierdoor wordt voorkomen dat er ongecontroleerde translocatie van stoffen plaats vindt aangezien de epitheellaag door de tight junctions een zeer stevig netwerk wordt [30]. De borstelzoom microvili zijn negatief geladen waardoor het zich afstoot tegen de negatieve lading van de bacteriële celwand met als gevolg dat het ook translocatie van bacteriën remt [31]. Een monocellulaire laag tegen de grote hoeveelheid microbiota heeft aanvullende beschermingsmechanismen nodig om de risico op lekkages zo veel mogelijk tegen te gaan. Deze laag bestaat uit enterocyten, slijmbekercellen, tuft cellen en Paneth cellen. Paneth cellen geven antibacteriële lectinen vrij zoals de regenerating islet-derived protein III (REG3G) die bacteriële adhesie aan de mucuslaag voorkomt [32]. Al deze cellen werken samen om de darmen te beschermen tegen schadelijke stoffen die onder andere ontstaan door de microbiota. De gobletcellen produceren mucus wat een beschermende laag vormt op het darmepitheel waardoor direct contact tussen de micro-organismen en de epitheelcellen voorkomen wordt. Antimicrobiële peptiden worden door gespecialiseerde epitheelcellen uitgescheiden. Deze peptiden kunnen niet door de epitheelcellen heen diffunderen vanwege de aanwezigheid van de mucuslaag. Hierdoor bevinden ze zich dichtbij de epitheellaag en zullen ze bacteriën doden wanneer ze in de buurt komen van de epitheellaag. Tenslotte zitten in de lamina propria plasmacellen die antistoffen de darmholte in sturen om bacteriën te neutraliseren, genaamd immunoglobuline A (IgA). Bij beschadiging aan het darmepitheel kunnen er bacteriën in de lamina propria terecht komen. Echter, een kleine hoeveelheid van de ontsnapte bacteriën kunnen zich via de systemische bloedcirculatie verspreiden [33].



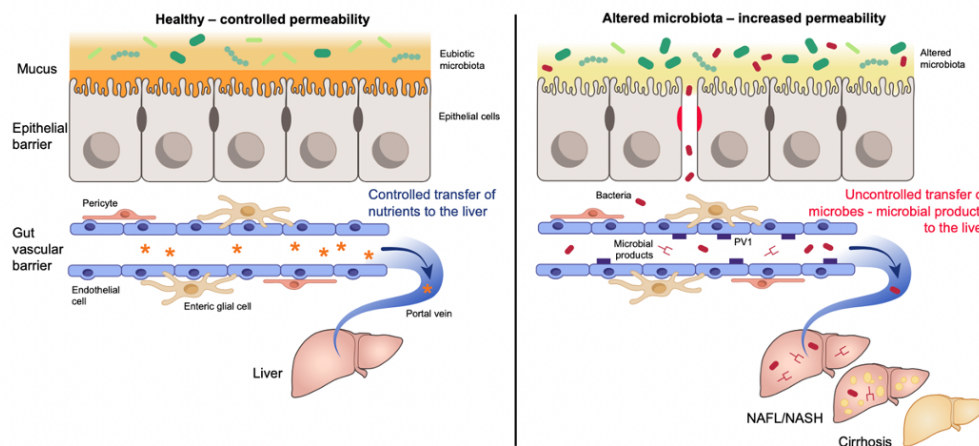
Het vijfde niveau is de immunologische barrière. Door de aanwezigheid van verscheidene immuuncellen wordt de barrière in stand gehouden. De immuuncellen kunnen onderverdeeld worden in intra-epitheelcellen en lamina propria cellen. Intra-epitheelcellen bestaan uit Intra-epitheliale lymfocyten waaronder conventionele en onconventionele  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  T-cellen en intra-epitheliale mononucleaire fagocyten [34].

Intra-epitheliale lymfocyten gedragen zich als eerste verdedigingslinie in de strijd tegen infecties. Daarnaast induceren deze cellen tolerantie voor voedsel afkomstige antigenen. Intra-epitheliale lymfocyten geven type 1 cytokines en antimicrobiële peptiden vrij na activering door intestinale epitheelcel vrijgemaakte cytokines of bij betrokkenheid van natural killer cellen (NK). Intra-epitheliale mononucleaire fagocyten bevatten uitsteeksels wat signalering van antigenen in het darmlumen mogelijk maakt [35].

Immuuncellen gedragen zich als tweede verdedigingslinie. Wanneer de lamina propria beschadigd is, zorgen deze cellen ervoor dat weefselregeneratie wordt gestimuleerd. Naast CD4+ T-lymfocyten kan men onderscheid maken tussen aangeboren cellen zoals NK-cellen en slijmvlies geassocieerde invariante T-cellen. Deze cellen zijn gespecialiseerd in het herkennen van microbiële antigenen of metabolieten. Slijmvlies geassocieerde invariante T-cellen herkennen riboflavin metabolieten die gepresenteerd worden door MR1 moleculen terwijl NK-cellen lipiden die gepresenteerd worden op CD1 moleculen herkennen [36]. CD4+ T-cellen omvatten twee typen cellen: T-helper 17 (Th17) -cellen en regulerende T-cellen. Regulerende T-cellen worden onderverdeeld in thymus afkomstige en perifere afgeleide regulerende T-cellen. Thymus afkomstige regulerende T-cellen herkennen zelfantigenen en regelen de functie van autoreactieve T-cellen. De perifere afgeleide regulerende T-cellen herkennen voedselantigenen of microbiële antigenen waar ze de tolerantie voor onschadelijke niet-eigen antigenen beheersen. Th17 cellen worden geactiveerd na adhesie van gesegmenteerde filamenteuze bacteriën. Na activatie scheiden ze interleukines (IL) uit waaronder IL17-A, IL17-F en IL-22 die betrokken zijn in het versterken van de tight junction moleculen en in het stimuleren van het regenereren van epitheelcellen. Interleukines zijn een soort cytokine. Ze spelen een essentiële rol bij de activering en differentiatie van immuuncellen. Ze hebben ook pro-inflammatoire en ontstekingsremmende eigenschappen. De primaire functie van interleukines is daarom het moduleren van groei, differentiatie en activering tijdens ontstekings- en immuunresponsen.

Daarnaast zetten de Th17 cellen de IgA productie op gang en de expressie van pIgR, wat hun transport richting het darmlumen mogelijk maakt. In de darmen kunnen ook aangeboren lymfoïde cellen worden aangetroffen. Deze cellen geven diverse cytokines vrij die een snelle reactie op infecties induceren [37]. Toll-like receptoren en nucleotide-bindende oligomerisatie domein-achtige receptoren op de darmeptitheelcellen zijn patroonherkenningsreceptoren. Deze receptoren zorgen voor een nauwkeurig evenwicht tussen de darm en de inwonende microbiota. Patroonherkenningsreceptoren zullen microbe-geassocieerd moleculair patronen (MAMP's) en PAMP's herkennen die de darmbarrière passeren [38].

Het zesde niveau is de darm-vasculaire barrière. Deze barrière voorkomt de translocatie van micro-organismen en hun componenten in de poortader. De darm-vasculaire barrière is samengesteld uit nauw op elkaar inwerkende endotheelcellen, gliacellen en pericyten. Wanneer de barrière beschadigd wordt dan kunnen er bacteriën en hun componenten doordringen. Zo komen deze schadelijke stoffen via de poortader in de lever terecht waar ze ontstekingen kunnen induceren of stimuleren, zie figuur 2 [39].



Figuur 2. Wanneer er een ontsteking optreedt, zal de darmbarrière verstoord raken op verschillende plekken. Wanneer de darm-vasculaire barrière ook beschadigd raakt, dan kan translocatie van bacteriën en hun componenten plaatsvinden. Zo komen deze schadelijke stoffen via de poortader in de lever terecht waar ze ontstekingen kunnen induceren of stimuleren [64].

Het zevende niveau is de leverbarrière. De lever is meestal vrij van bacteriën. Micro-organismen en bacteriële producten kunnen na beschadiging van het slijmvlies in de mesenteriale lymfeklieren terecht komen. Hier worden microben gedood zonder het krijgen van inflammatoire reacties op systemisch niveau [40]. Wanneer de micro-organismen aan de mesenteriale lymfeklieren weten te ontsnappen zal de lever in actie komen. Kupffer cellen in de lever zijn essentieel voor de reactie op infecties of letsel. Kupffer cellen induceren als gevolg hierop een voortdurende ontstekingsreactie die ons lichaam beschermt tegen infectie en orgaanschade [9]. Aldus spelen de Kupffer cellen in vele gevallen een beschermende en een genezende functie. Echter, bij andere soorten aanvallen op de lever is de Kupffer-cel niet in staat om de activeringstoestand op de juiste manier te beheersen. Dit onvermogen draagt bij aan een aantal chronische ontstekingsziekten in de lever. Chronische alcoholisme is een oorzaak van ongecontroleerde Kupffer-celactivering. Op de Kupffer cel zitten de Toll-like receptoren TLR4 en CD14. Deze receptoren internaliseren endotoxines (LPS) met als gevolg van de productie van superoxiden en de transcriptie van pro-inflammatoire cytokines. Tumornecrosefactor-alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) is een belangrijke mediator van de ontstekingsreactie. Signalen worden bij een ontstekingsreactie overgedragen die cellulaire activering en proliferatie, cytotoxiciteit en apoptose reguleren.  $\text{TNF}\alpha$  onder andere activeert de stellaatcel in de lever wat uiteindelijk leidt tot collageensynthese en fibrose met als gevolg functieverlies van de lever [41].

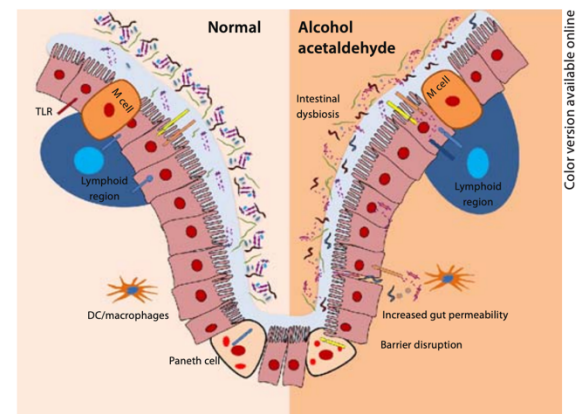
## Verstorings van de gut-liver axis

ALD en NAFLD verstoren de gut-liver axis. Uit verschillende onderzoeken is gebleken dat in deze ziektes een beschadiging aan de darmbarrière zorgt voor een influx aan LPS en postbiotica (metabolieten van microbiota) naar de lever waar ze een pro-inflammatoire cascade op gang brengen met als gevolg een verergering van een hepatische ontsteking [42].

### Alcoholische leververvetting (ALD)

Langdurig, overmatig alcoholgebruik is vaak een oorzaak van de verstoring van vetstofwisseling in de lever waardoor er een opeenstapeling van vet in de levercellen ontstaat wat leververvetting veroorzaakt. Inname van alcohol heeft direct effect op de darmmicrobiota [43]. Zowel alcoholgevoede muizen als individuen met een voorgeschiedenis van chronische alcoholmisbruik vertonen een verminderde bacteriële diversiteit en een verminderde fungale diversiteit [44]. Er ontstaat een grote overvloed aan rottingsbacteriën (Proteobacteria) en Candida en een vermindering aan Bacteroidetes en Firmicutes. Vooral de groei van gramnegatieve bacteriën in de darm wordt bevorderd bij blootstelling aan alcohol, wat leidt tot een verhoogde productie van LPS [45]. De lever is betrokken in alcoholmetabolisme door de aanwezigheid van enzymen (enzym alcoholdehydrogenase) wat ethanol omzet tot acetaldehyde. Naast de levercellen kunnen de gramnegatieve bacteriën in de darmen en de darmpitheelcellen ook alcohol metaboliseren tot acetaldehyde. Acetaldehyde schaadt de intestinale tight junctions en dit brengt op zijn beurt de darmbarrière in gevaar, waardoor translocatie van microbiële producten mogelijk wordt gemaakt, zie figuur 3[46].

Daarnaast werden in die individuen en in muizen een intestinale ontsteking, dat wil zeggen een verhoging van monocyten en macrofagen aangetoond wat leidde tot het produceren van  $\text{TNF}\alpha$  in de intestinale lamina propria.  $\text{TNF}$ -receptor I ( $\text{TNFRI}$ ) op darmpitheelcellen medieert een verstoring van de tight junctions, gedeeltelijk door activering van myosine-lichte-keten-kinase (MLCK) [47]. Dit resulteert in een verhoging van de intestinale permeabiliteit met als gevolg translocatie van micro-organismen en leverontsteking. In de onderzochte individuen en muizen is er een onderdrukking van de afgifte van REG3G lectinen geconstateerd. Dit leidt tot een verhoogde adhesie van bacteriën aan de mucuslaag [44,48].



*Figuur 3. Alcohol beïnvloedt de microbiële samenstelling van de darm. De dysbiose in de samenstelling en een verhoging van de intestinale permeabiliteit zorgt voor een verhoogde translocatie van bacteriële producten in de systemische bloedcirculatie [65].*

Er is steeds meer bewijs voor een rol van LPS/ TLR4-signalering bij de pathogenese van ALD. Chronische alcoholconsumptie zorgt voor een opregulatie van hepatische TLR4 receptoren. Dit resulteert in een verhoogde productie van ontstekingsmediatoren zoals  $\text{TNF}\alpha$  en in inductie van reactieve zuurstofsoorten (ROS). Om dit te voorkomen moet de LPS/TLR4-signalering geremd worden. Dit kan door het veranderen van de darmmicrobiota en LPS-productie met antibiotica of probiotica (*Lactobacillus*) die de LPS-concentratie verminderen wat uiteindelijk resulteert in de onderdrukking van de door alcohol veroorzaakte leverbeschadiging. Daarnaast kan de TLR4-genexpressie onderdrukt worden. Uit onderzoek is gebleken dat TLR4-mutanten muizen een vermindering van ALD vertonen ondanks een verhoogde LPS-concentratie [49]. Activering door LPS van TLR4 in Kupffer-cellen is een belangrijk pathogenetische mediator van ALD door de productie van inflammatoire cytokines en ROS. Uit onderzoek is gebleken dat Kupffer-cellen een cruciaal doelwit van LPS zijn tijdens alcohol geïnduceerde leverschade. Het is namelijk aangetoond dat er een sterke vermindering van alcoholische leverbeschadiging is opgetreden na uitputting van Kupffer-cellen met gadoliniumchloride. Daarnaast is er ook aangetoond dat in ALD het TLR4-gemedieerde signaal wordt gemedieerd via een myeloïde differentiatie primaire respons 88 (MYD88). Dit zorgt ervoor dat transformerende groeifactor ( $\text{TGF-}\beta$ ) afgeven wordt.  $\text{TGF-}\beta$  is een profibrogenetische cytokine die de HSC kan activeren met hepatische fibrose tot gevolg. Productie van inflammatoire mediators ( $\text{TNF}\alpha$  en IL-6) en TLR4-coreceptoren (CD14 en MD2) door chronisch alcoholconsumptie, kan voorkomen worden door TLR4-deficiëntie [49].

Naast het feit dat immunologische reacties een impact hebben op de darmbarrière, spelen bioactieve componenten ook een rol in ADL. Bij de met alcohol geïnduceerde muizen is er aangetoond dat de verstoorde microbiota een verminderd vermogen hebben om lange vetzuurketens (LCFA) te synthetiseren. Hierdoor krijg je een gebrek aan micro-organismen, zoals *Lactobacillus*, waarvan de groei afhangt aan LCFA. Het is gebleken dat door gebruik te maken van voedingssupplementen met LCF, stabilisatie van de darmbarrière en door alcohol geïnduceerde leverbeschadiging verbeterd wordt [50].

Chronische alcoholconsumptie leidt ook tot verstoringen van de FXR-activeringsroute, waardoor er een lage FXR-activiteit in enterocyten tot stand komt. Een verminderde stimulatie van deze receptoren leiden tot een verhoogde galzuurproductie en uiteindelijk tot een opeenhoping van galzuren in de lever, met leverschade als gevolg [51].

## Niet-alcoholische leververvetting (NAFLD)

Niet-alcoholische leververvetting is een ziektebeeld dat vaak het gevolg van een ongezonde leefstijl met calorierijke voeding en weinig lichaamsbeweging is. NAFLD is een verzamelnaam van leveraandoeningen die niet geïnduceerd zijn door overmatig alcoholgebruik. Deze leveraandoeningen kunnen ingedeeld worden in niet-progressieve (NAFL) en progressieve fenotypes (NASH). Er is een hypothese met meerdere treffers voorgesteld waarin meerdere factoren, waaronder lipopolysaccharide (LPS), darmmicrobiota, voedingsfactoren en genetische en epigenetische factoren, samenwerken om NAFLD te induceren. NAFLD is sterk geassocieerd met diabetes type 2, obesitas en insulineresistentie. Het is aangetoond dat een vetrijk dieet het microbiom verandert met als gevolg dat het darmbarrière schaadt [52]. Dit leidt tot een instroom van bacteriële producten in de poortader, waardoor leverontstekingen verergeren.

Preklinische en klinische studies hebben aangetoond dat de prevalentie van intestinale bacteriële overgroei en veranderingen in microbiota-samenstelling hoger is bij patiënten met NAFLD dan bij gezonde controles. Bij de NAFLD-patiënten is er een verhoogde intestinale permeabiliteit aangetoond [53].

Door middel van metagenomica is er een verband aangetoond tussen aan de ene kant een microbioomsignatuur, met een verhoogde aanwezigheid van *Escherichia coli* en *Bacteriodes vulgatus*, en aan de andere kant gevorderde fibrose bij NAFLD-patiënten [54].

Onder vetrijke voedingsomstandigheden is er een verhoogde darmpermeabiliteit, afwijkingen in de darmflora en metabole afwijkingen bij NAFLD-patiënten en muizen, die een vetrijk of vezelarm dieet krijgen, geconstateerd [55]. Door de abnormale samenstelling van het microbiom is een verhoogde bacteriële penetreerbaarheid en een verminderde dikte van de slijmlaag hiervan het gevolg. Daarnaast zijn de tight junction-eiwitten van de epitheliale barrière herverdeeld [55, 56]. Uit onderzoek is gebleken dat niet zo zeer het voedingsregime verantwoordelijk is voor het verstoren van de darmepitheel- en vaatbarrières maar dat de veranderde microbiota direct verantwoordelijk is.

Er werd namelijk een microbiële fecale transplantatie uitgevoerd van muizen die een vetrijk dieet kregen, naar muizen die een standaarddieet kregen en in de muizen die een standaarddieet kregen, werd er schade aan de darmbarrière geconstateerd [52]. Het is dus de veranderde microbiota die de schade aan het epitheel veroorzaakt.

Patiënten met NAFL vertonen verminderde regulerende T-cellen en verhoogde T-helper 1 cellen, CD8+ T-cellen en  $\gamma\delta$  T-cellen in de lamina propria. Deze cellen produceren de proinflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en IL-17 die ontstekingen bevorderen [57]. Daarnaast is er een vermindering van Jam 1 expressie in de darmen bij NAFL-patiënten. Jam 1 is een adhesiemolecuul dat de tight junctions strak bij elkaar houdt. Er is een verhoogde darmpermeabiliteit en leverontsteking in muizen op een vetrijkdieet met een genetische deficiëntie in Jam 1 [55]. Door de verhoogde darmpermeabiliteit kunnen PAMP's en metaboliëten via de poortader de lever bereiken en daar ontstekingen aanzetten. Om te kijken of PAMP's bijdragen aan leverschade bij NAFLD zijn er preklinische studies gevoerd om te kijken of bij TLR-4- of TLR-9-deficiënte muizen ontsteking en fibrose verminderen onder een vetrijkdieet. Uit dit onderzoek is gebleken dat er inderdaad bij deze muizen sprake is van minder ontsteking en fibrose, waaruit geconcludeerd kan worden dat PAMP's zoals LPS bijdraagt aan leverschade bij NAFLD [58].

Ook inflammasoomdeficiëntie kan de progressie van NAFLD stimuleren. Een inflammasoom is een complex van verschillende eiwitmoleculen dat gevormd en geactiveerd wordt in bepaalde cellen van het immuunsysteem. Ontstekingsbevorderende eiwitten, pro-inflammatoire cytokines, worden geproduceerd na activatie van een inflammasoom. De NLRP6- en NLRP3-inflammasomen en het effector-eiwit IL-18 werken de progressie van NAFLD / NASH tegen, evenals meerdere aspecten van het metabool syndroom via modulatie van de darmmicrobiota. Verschillende diermodellen laten zien dat met inflammasoomdeficiëntie geassocieerde veranderingen, zoals door genetische deletie van Nlrp3, in de configuratie van de darmmicrobiota gerelateerd zijn aan verergerde hepatische steatose en ontsteking. Dit ontstaat door instroom van TLR4- en TLR9-agonisten in de portale circulatie, dat uiteindelijk leidt tot verhoogde hepatische TNF- $\alpha$ -expressie die de progressie van NASH stimuleert [59].

Verschillende rapporten maken bekend dat microbiom afhankelijke metaboliëten van choline sterk geassocieerd worden met NAFLD en NASH. Het transport van lipiden in hepatocyten wordt vergemakkelijkt door choline waardoor het de ophoping van lipiden in de lever voorkomt. Het microbiom is betrokken bij het metabolisme van choline. Het zet choline om in choline metaboliëten als (dimethylamine, trimethylamine (TMA), dimethylglycine, betaine). Deze metaboliëten worden naar de lever getransporteerd en worden daar omgezet tot trimethylamine oxide (TMAO) dat leverontsteking induceert. Een verminderde biologische beschikbaarheid van choline en een verhoogde instroom van trimethylamine in de poortader is een indicatie voor een verstoorde darmbalans wat aangetoond werd bij NAFLD-patiënten. De aantallen darmmicroben die choline metaboliseren zijn toegenomen bij muizen op vezelrijkdieet, waardoor er meer metaboliëten zoals trimethylamine worden geproduceerd en de hepatische steatose wordt gestimuleert [60].

Daarnaast is NAFLD ook in verband gebracht met metabolieten van het darmmicrobioom, zoals fenylazijnzuur.

Chronische toediening van fenylazijnzuur of transplantatie van fecale microbiota van menselijke donoren met leversteatose veroorzaakte bij recipiënte muizen steatose wat de pathogene rol van metabolieten verder aantoont [61,62].

Bacteriële fermentatie van onverteerbare koolhydraten (voedingsvezels) produceren korteketen vetzuren (SCFA's), onder andere butyraat, die darmontsteking verminderen. Door voeding geïnduceerde hepatische steatose bij muizen wordt verbeterd door suppletie met SCFA's [63].

Ook bij de pathogenese van NAFLD speelt LPS/TLR4-signalering een belangrijke rol. Naast bacteriële overgroei in de darmen, een verhoging van de darmpermeabiliteit en een verhoogde bacteriële translocatie van bacteriële LPS, is er aangetoond dat er in NAFLD een verhoogde gevoeligheid is ontstaan voor LPS, voornamelijk door verhoogde hepatische TLR4-expressie [49]. Er is gebleken dat leptinereceptor-deficiënte dieren, die geen verzadigingsgevoel hebben en dus genetisch zwaarlijvig zijn, zeer vatbaar zijn voor LPS en al bij een lage dosis LPS ontwikkelen ze NAFLD [49].

Door verandering van het darmmicrobioom, door middel van antibiotica, probiotica of genetische manipulatie tegen NAFLD, kan de LPS-TLR4-signalering worden onderdrukt dat voor bescherming zorgt tegen NAFLD. Door selectief bepaalde bacteriën in de darm te doden, is er een verlaagde LPS-concentratie bij muizen op een vetrijkdieet geconstateerd. De TLR4-signalering speelt een belangrijke rol in NAFLD, aangezien in TLR4-mutante muizen is er een verminderde leverbeschadiging en lipide-accumulatie is geconstateerd na een dieet-geïnduceerde NAFLD. Uit recente onderzoeken is gebleken dat verhoogde LPS/TLR4-signalering NAFLD bevordert. Vernietiging van Kupffer-cellen in muizen op een methionine- en choline-deficiënt dieet, voorkwam toename van TLR4-expressie. Dit benadrukt een directe link tussen TLR4-en Kupffer-cellen binnen de pathogenese van NAFLD. Ook de Myd88- en TNF $\alpha$ -concentraties waren significant ( $P < 0,05$ ) verlaagd in TLR4-mutante muizen op fructosedieet in vergelijking met wild-type muizen op fructosedieet. Dit wijst erop dat bij de bevordering van NAFLD, MyD88 belangrijk kan zijn bij het mediëren van de effecten van TLR4-activering, door activering van Kupffer-cellen en een verminderde ROS en TNF- $\alpha$  productie [49].

## Hoofdstuk 2

### HSC cel

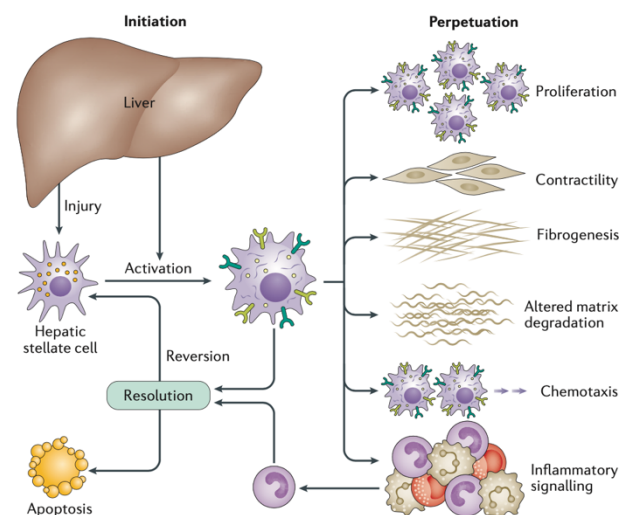
Zoals eerder benoemd spelen HSC's de hoofdrol als het gaat om leverfibrose. Met 'activering' van de HSC wordt de transdifferentiatie van de HSC in een geactiveerd myofibroblastische celtype verstaan [67]. Hepatische fibrose is een proces dat wordt gekenmerkt door de ophoping van extracellulaire matrix (ECM) als gevolg van een chronische leverbeschadiging. Zoals eerder benoemd kan de oorzaak onder andere auto-immuunziektes, chronische virale infecties, ALD of NASH zijn. Fibrose is omkeerbaar na het elimineren van de oorzaak van het letsel. Echter, een chronische leverbeschadiging die niet onder controle wordt gehouden, kan leiden tot onomkeerbare cirrose [67]. Cirrose wordt gekenmerkt door het afsterven van levercellen. De levercellen worden vervangen door littekenweefsel waardoor de lever minder in staat is zijn functies uit te voeren. Er kunnen ernstige problemen ontstaan als de lever bij gevorderde levercirrose niet goed meer kan functioneren. Levercirrose veroorzaakt een abnormale bloedstroom en daardoor een verhoogde druk in de poortader (portale hypertensie) waardoor er klachten ontstaan zoals: spataderen in de slokdarm of maag, vochtophoping in de buikholte, hoger risico op kanker in de lever en een vergrote milt [68].

HSC's brengen een reeks genen en eiwitten tot expressie die hen onderscheiden van andere leverceltypen. Deze genen en eiwitten kunnen dus als markers gebruikt worden. Deze markers zijn onder andere: PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ ), het enzym lecithine retinol acyltransferase (LRAT), de transcriptiefactor HAND2 (heart- and neural crest derivatives expressed protein 2) en de cytoskeletproteïnen desmine en glia fibrillair zuur proteïne (GFAP) [69].

HSC's bevinden zich in de perisinusoïdale ruimte van de lever, een klein gebied tussen de leversinusoïdale endotheelcellen (LSEC's) en de hepatocyten, ook wel bekend als de ruimte van Disse. In een gezonde lever behouden HSC's een niet-proliferatief, rustgevend fenotype [70].

De lipidedruppeltjes in het cellichaam slaan vitamine A op als retinolester.

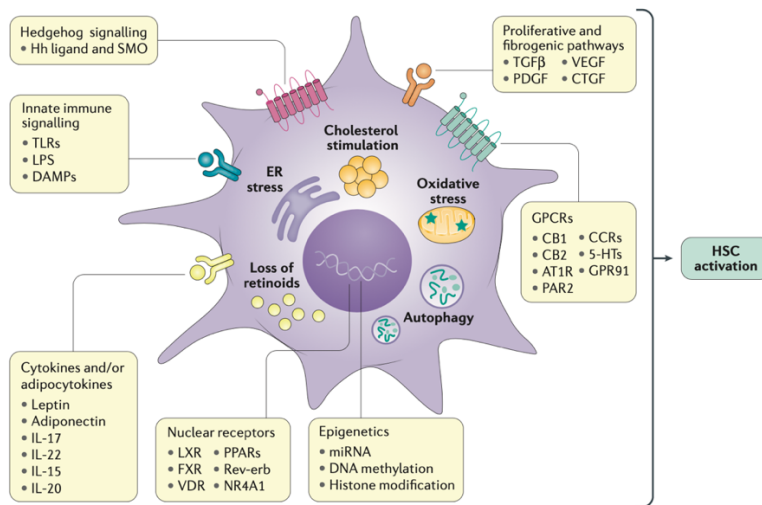
Wanneer de HSC's geactiveerd zijn differentiëren ze van vitamine A-bewaarcellen naar hun geactiveerde fenotypen. Voortzetting volgt, gekenmerkt door proliferatie, contractiliteit, fibrogenese, veranderde matrixafbraak, chemotaxis en inflammatoire signalering, zie figuur 4 [66]. Geactiveerde HSC's kunnen stopgezet worden door apoptose of terugkeer naar een geïnactiveerd fenotype.



*Figuur 4. Leverschade initieert de transdifferentiatie van HSC. Wanneer de HSC's geactiveerd zijn differentiëren ze van vitamine A-bewaarcellen naar hun geactiveerde fenotypen. Voortzetting volgt, gekenmerkt door proliferatie, contractiliteit, fibrogenese, veranderde matrixafbraak, chemotaxis en inflammatoire signalering [66].*



Een grote schaal aan signalen kunnen HSC's activeren, zie figuur 5. Processen die HSC's activeren:



Figuur 5. Een grote schaal aan signalen kunnen HSC's activeren: Proliferatieve en fibrogene processen, G-eiwit gekoppelde receptoren, Epigenetica, Nucleaire receptoren, Cytokines en/of adipokines, aangeboren immuunsignaling, Hedgehog signaalroute, autophagie, oxidatieve stress, retinoïde stress en cholesterol [66].

- **Proliferatieve en fibrogene processen**  
De proliferatieve en fibrogene processen die bijdragen aan fibrose zijn onder andere transformerende groeifactor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), bloedplaatjes afgeleide groeifactor (PDGF), vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) en bindweefselgroeifactor (CTGF) [71].
- **G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs)**  
HSC's brengen een breed scala aan G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR's) tot expressie, waaronder cannabinoïde receptor 1 (CB1), CB2, type 1 angiotensine II-receptor (AT1R), proteïnase-geactiveerde receptor 2 (PAR2), CC-chemokinereceptoren (CCR's), 5-hydroxytryptamine-receptoren (5-HT's) en GPR91 (ook bekend als succinaatreceptor 1), die negatieve of positieve effecten hebben op HSC-activering en fibrose [72].
- **Epigenetica**  
Epigenetische signalen, waaronder microRNA's (miRNA's), DNA-methylatie en histonmodificatie regelen zowel activering als inactivering van HSC's [73].
- **Nucleaire receptoren**  
HSC's brengen diverse groepen nucleaire transcriptiefactorreceptoren tot expressie, waaronder lever X-receptor (LXR), farnesoïde X-receptor (FXR, ook bekend als galzuurreceptor), PPAR $\gamma$  en PPAR $\delta$ . Deze nucleaire receptoren reguleren het glucose- en lipidenmetabolisme en kunnen de HSC-activering en fibroseprogressie negatief beïnvloeden [74].
- **Cytokines en/of adipokines**  
Cytokinen zijn circulerende peptiden die de celsignaling kunnen beïnvloeden, en verschillende zijn al vele jaren betrokken bij HSC-activering. Adipokines zijn eiwitten die vrijkomen uit vetweefsel en die hepatische fibrogenese moduleren. Deze eiwitten beïnvloeden verschillende biologische processen die betrokken zijn bij de leverfunctie, waaronder angiogenese, vasodilatatie, ontsteking en afzetting van extracellulaire matrixeiwitten. Adipokines moduleren de ernst van de ziekte bij patiënten met levercirrose [75].

- *Aangeboren immuunsignalering*  
Aangeboren immuunsignalering die vooral gemedieerd zijn door Toll-like receptoren, is betrokken bij HSC-activering [53].
- *Hedgehog signaalroute*  
De hedgehog (Hh) -route is een complex systeem van liganden, receptoren en transcriptiefactoren dat een belangrijke regulator is over het lot van de voorlopercellen, letsel, herstel en fibrose in levende organismen. Hh-liganden bevorderen HSC-activering [76].
- *Autofagie*  
Autofagie stimuleert HSC-activering door energiesubstraten te leveren en is gekoppeld aan verhoogde endoplasmatische reticulum (ER)-stress [77].
- *Oxidatieve stress*  
Oxidatieve stress speelt een duidelijke rol bij HSC-activering. Reactieve zuurstofsoorten (ROS) geproduceerd door beschadigde hepatocyten leveren paracrine activeringssignalen aan HSC's [78].
- *Retinoïde te kort*  
Verlies van retinoïde is een bepalend kenmerk van HSC-activering [79].
- *Cholesterol*  
Cholesterol, vrije vetzuren en triglyceriden worden opgeslagen in HSC's. Vrij cholesterol stimuleert de HSC-activering [9].

Er zal verder worden ingegaan op de proliferatieve en fibrogene processen, immuunsignalering en de G-gekoppelde receptoren.

### **De mechanismen van HSC-activering veroorzaakt door TGF $\beta$**

Transformerende groeifactor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) is een cytokine die door verschillende celpopulaties in de lever wordt afgegeven. TGF $\beta$ -1 staat bekend als de meest belangrijke factor van fibrose in verschillende organen zoals de longen, nieren en lever. Binding van deze cytokine induceert fosforylering van SMAD-eiwitten, voornamelijk SMAD3. SMAD's zijn eiwitten en de belangrijkste signaaltransducers voor receptoren van TGF $\beta$ , die van cruciaal belang zijn voor het reguleren van celontwikkeling en -groei. Wanneer SMAD3 wordt geactiveerd tijdens de HSC-activering, wordt de transcriptie van collageen-genen bevordert [80]. TGF $\beta$  activeert ook mitogeen-geactiveerde proteïne kinase (MAPK) signaalroutes. Een signaalroute die eronder valt is de extracellulaire signaalgereguleerde kinase (ERK, ook bekend als MAPK1). TGF $\beta$ , SMAD en ERK-signaleringsroutes leiden tot opwaartse regulatie van de markers van leverfibrose, zoals  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) en collageen type 1 [81]. HSC's brengen GPCR's tot expressie, waaronder proteïnase-geactiveerde receptor 2 (PAR2). PAR2 wordt geactiveerd na proteolyse (afbraak van eiwitten door enzymen) door de enzymen serineproteasen, waaronder tryptasen uit mestcellen en geactiveerde stollingsfactoren. Bij muizen vermindert PAR2-deficiëntie de progressie van leverfibrose. PAR2 stimuleert activering, proliferatie, collageenproductie en TGF $\beta$ -eiwitproductie in HSC's [82].

### **De mechanismen van HSC-activering veroorzaakt door Gal-3**

Wat naast de boven genoemde processen ook invloed kan hebben op HSC-activatie is Galectine 3. Galectine 3 is een lectine dat celproliferatie, adhesie, differentiatie, angiogenese en apoptose reguleert. Gal-3 wordt door HSC's geproduceerd door middel van activatie van NF- $\kappa$ B via TLR4 en TLR2 of door fagocytose via integrines. Integrines zijn transmembraanreceptoren die cel-extracellulaire matrixhechting vergemakkelijken. Galectine 3 zorgt voor TGF $\beta$ -gemedieerde myofibroblastactivering en matrixproductie. Dode hepatocyten verhogen de Galectine 3 productie uit HSC en activeert HSC. Gal-3 niveau in serum werd gerapporteerd hoger te zijn in gevorderde gevallen van leverfibrose. Gal-3 knock-out-muizen vertoonden een significante ( $P < 0,05$ ) vermindering van leverfibrose [83].

### **Aangeboren immuunsignalering**

Translocatie van bacteriële metaboliëten, zoals LPS, door een verhoogde intestinale epitheliale permeabiliteit, stimuleren de activering van HSC's via TLR's. Geactiveerde HSC's brengen TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 en TLR9 tot expressie. TLR2 en zijn ligand (palmitinezuur), activeren HSC's, en zijn belangrijkste componenten IL1 $\alpha$ , en IL1 $\beta$  en caspase1 activering, dat uiteindelijk resulteert in de progressie van NASH bij muizen [84]. Activering van TLR3 in HSC's door hepatocyt-afgeleide exosomen verergert leverfibrose door de productie van IL17A door  $\gamma\delta$  T-cellen te verbeteren [85]. TLR4 speelt een cruciale rol bij leveraandoeningen (zie bladzijde 10 en 13) . T-celresponsen dragen bij tot leverontsteking en fibrogenese, vooral bij chronische virale infecties en auto-immuunhepatitis. Uit onderzoek is gebleken dat het aantal  $\gamma\delta$  T-celaantallen in de lever opmerkelijk toenam bij verschillende ontstekingsaandoeningen bij muizen en mensen [86].

## Alkaline phosphatase

Alkalische fosfatase (AP) is een enzym dat de hydrolytische verwijdering van fosfaat uit verscheidende moleculen kan katalyseren. Intestinale alkalische fosfatase (IAP) komt tot expressie in het maagdarmkanaal. IAP is aanwezig in de apicale microvilli van de borstelgrens van enterocyten en worden uitgescheiden in het darmlumen en de bloedbaan. De AP is een verdedigingsfactor van het darmslijmvlies waardoor het essentieel is voor het handhaven van de darmhomeostase. Een van de belangrijkste functies van IAP is de modulatie van de opname van intestinale langeketenvetzuren, regulering van bicarbonaatsecretie en pH aan het duodenale oppervlak. Maar de belangrijkste functie is het ongiftigen van LPS waardoor IAP een ontstekingsremmend effect heeft. IAP is belangrijk voor het behoud van de homeostase van de darmmicrobiota en de remming van hun translocatie naar de bloedbaan [87].

Niet alleen in de darmen wordt ALP gevonden maar ook in de mond. ALP wordt gebruikt als een diagnostische marker van gingivale creviculaire vloeistof (GCF). GCF is een vloeistof welke in kleine hoeveelheden in de ruimte tussen tand en tandvlees voorkomt. Als er bacteriën in die ruimte terecht komen, zorgt dat voor een ontsteking van het tandvlees. ALP wordt opgeslagen in secretoire blaasjes in neutrofielen en komen wanneer ze aankomen op de plek van de infectie. Daarnaast is het ook aanwezig in tandplak, osteo- en fibroblasten. Uit onderzoek is gebleken dat de totale enzymactiviteit van ALP significant ( $P < 0,05$ ) hoger was bij parodontitis in vergelijking tot gezond tandvlees. ALP kan dus als marker beschouwd worden voor parodontitis omdat het onderscheid kan maken tussen gezonde en ontstoken plaatsen [88].

Doordat ALP naast de darmen ook in de mond voorkomt kan dit duiden op een verband tussen orale bacteriën en het darmmicrobioom.

## Onderzoek

Tussen parodontitis en chronische ziekten als hart- en vaatziekten, diabetes type II en Alzheimer is gebleken dat er een significante relatie is [89,90,91]. Parodontitis is een van de meest voorkomende ontstekingsziekten wereldwijd. Het is een vergevorderde tandvleesontsteking wat leidt tot vernietiging van tandondersteunende structuren. Onder invloed van externe factoren kan het evenwicht tussen de zogenaamde gunstige bacteriën en pathogene bacteriën verstoord raken met een overmaat aan orale pathogenen tot gevolg. Een slecht voedingspatroon is een voorbeeld van een externe factor. Een van de primaire oorzaken van gingivitis (tandvleesontsteking) en parodontitis is de dysbiose van de orale mondflora [92]. Dysbiose van orale mondflora induceert de ziekte maar de parodontale weefselvernietiging treedt op als gevolg van een ontregeld immuunrespons op de microbiële beschadiging [93]. *Porphyromonas gingivalis* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zijn pathogenen die een belangrijke rol spelen in de pathogenese van parodontale ziekten. Onder andere deze pathogenen produceren verschillende virulentiefactoren zoals LPS, fimbriae en enzymen, die kunnen leiden tot ontstekingen in parodontale weefsels [94].

Uit de mondholte kunnen pathogenen migreren naar de bloedbaan op de plek van ontsteking waardoor parodontitis een risicofactor lijkt voor diverse chronische ziekten. Door het doorslikken van speeksel heeft de mondflora invloed op de intestinale flora waarbij, bij een verstoorde intestinale flora een relatie bestaat met diverse aandoeningen [95].

Het doel van mijn onderzoek is een antwoord vinden op de vraag of de orale pathogenen *Porphyromonas gingivalis* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* een effect kunnen hebben op het microbioom van de darmen en zo een bijdrage leveren aan leverfibrose.

## *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* (P.g.) behoort tot het "rode complex", een groep bacteriën die wordt geassocieerd met parodontale infecties, waardoor ze een van de belangrijkste parodontale pathogenen zijn. P.g wordt niet alleen gedetecteerd in biofilm in de parodontale pockets, maar ook in geïnfecteerde pulpakamers met periapicale parodontale aandoeningen [96]. P.g. is een gramnegatieve anaërobe bacterie waarvan bekend is dat deze in de bloedsomloop terechtkomt en door het hele lichaam wordt verspreid. Het wordt beschouwd als een versturende risicofactor voor systemische ziekten zoals hart- en vaatziekten, diabetes mellitus, vroeggeboorte en reumatoïde artritis. *Porphyromonas gingivalis* produceren verschillende virulentiefactoren zoals LPS, fimbriae en enzymen, die kunnen leiden tot ontstekingen in parodontale weefsels. De relatie tussen infectie door parodontale bacteriën en NAFLD heeft de laatste tijd veel onderzoeks aandacht gekregen. P. gingivalis kan een risicofactor zijn voor de ontwikkeling en progressie van NAFLD/NASH. Om hierachter te komen zullen er twee onderzoeken over *P.gingivalis* besproken worden [96].

### Onderzoek 1

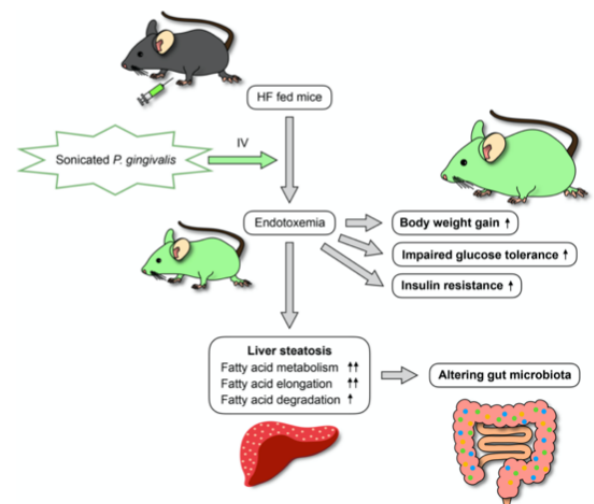
Het eerste onderzoek dat besproken zal worden en het effect van *P.gingivalis* op de lever bestudeert, is het onderzoek van *Sasaki et al, 2018 [94]*. Dit onderzoek evalueerde of endotoxemie van *P.gingivalis* een effect heeft op NAFLD of glucose/lipidenmetabolisme. Dit werd gedaan door onderzoek te doen op het effect van intraveneus geïnjecteerde gesonificeerde *P.gingivalis* op glucose/lipidenmetabolisme, leversteatose en darmmicrobiota. In dit onderzoek werd er getest op C57BL/6J muizen. De muizen kregen een vetrijk dieet omdat leversteatose alleen sterk beïnvloed wordt door een lage dosis LPS bij vetrijke-dieet gevoede muizen, en niet bij normale voer-gevoede muizen. Daarnaast is er ook alleen bij de vetrijke-dieet gevoede muizen, een verhoogde lipidenophoping in de lever gemeld, wat niet werd gedetecteerd bij normale voer-gevoede muizen. De muizen werden verdeeld in twee groepen. Een groep (HGPg) kreeg twee keer per week een injectie van gesonificeerde *P.gingivalis*. En de controlegroep (HFco) die een injectie van zoutoplossing kreeg. De muizen werden 12 weken lang getest. P. gingivalis werd gekweekt en gedeactiveerd, maar zijn endotoxinen bleven over. In de dierexperimenten werd de t-test van Student toegepast om twee groepen te vergelijken met SPSS;  $P < 0,05$  werd als statistisch significant beschouwd.

Micro-computed tomography (CT) is uitgevoerd om het totale volume lichaamsvet, onderhuids vet en visceraal vet te bestuderen. Uit onderzoek is gebleken dat deze na 12 weken significant ( $P < 0,05$ ) hoger was bij de HFPg-muizen dan bij de HFco-muizen. Om te bepalen of de toediening van *P.gingivalis* tot een vermindering in glucosetolerantie en insulineresistentie leidt, is er een orale glucosetolerantie toets (GTT) en een insulinetolerantie toets (ITT) uitgevoerd. Na 12 weken is er een vermindering in glucosetolerantie en insulinetolerantie bij de HFPg-muizen in vergelijking met de HFco-muizen aangetoond.

Histologische analyse toonde na 12 weken een duidelijke accumulatie van lipiden in HFPg vergeleken met die in HFco-muizen. Het totale oppervlak van lipidedruppeltjes was significant toegenomen bij HFPg-muizen in vergelijking met die in HFco-muizen ( $P < 0,01$ ). Na 12 weken waren de levertriglyceriden- en glycogeenniveaus volgens de auteurs significant verhoogd.

Om veranderingen in genexpressie in de lever te identificeren, werd een microarray-analyse uitgevoerd.  $\text{TNF}\alpha$ -signalering werd via de  $\text{NgkB}$ - en hypoxia-gensets opgereguleerd in HFPg-muizen. Hypoxie-induceerbare factor 2a stimuleert de progressie van NAFLD door de afgifte van histidinerijke glycoproteïnen uit hepatocyten op gang te brengen.  $\text{NFkB}$  speelt een rol bij de ontwikkeling van de door obesitas geïnduceerde insulineresistentie, metabool syndroom en NAFLD. Activering van de  $\text{NFkB}$ -route wordt veroorzaakt door de stimulatie van  $\text{TLR4}$ . De  $\text{TNF}\alpha$  waren significant ( $P < 0,05$ ) verhoogd in de levers van HFPg-muizen in vergelijking met die van HFco-muizen. Dit suggereert dat LPS van gesoniceerde *P.gingivalis* de activering van  $\text{NFkB}$  kan hebben geïnduceerd en daardoor de progressie van NAFLD hebben gestimuleerd.

Daarnaast is gebleken dat de darmmicrobiota is verandert na orale toediening van gesoniceerde *P.gingivalis*. Dit kan erop wijzen dat de darmmicrobiota verandert na veranderingen van het leverfenotype. Er is bijvoorbeeld bij de HFPg-muizen een verhoging van de gram-positieve bacterie *Allobaculum* in de darmen geconstateerd. Een overvloed aan *Allobaculum* is gecorreleerd met darmontsteking en verhoogde darmpermeabiliteit ten gevolge van verminderde expressie van tight-junction eiwitten. Zoals eerder gezegd kan een vermindering in tight-junction eiwitten leiden tot tranlocatie van pathogenen in de lever, waardoor vervolgens de progressie van NAFLD wordt gestimuleerd.



Figuur 6. Een mechanistisch model dat de bevindingen van het onderzoek samenvat.

Dit onderzoek heeft kortom aangetoond dat een intraveneuze injectie van gesonificeerd *P.gingivalis* verminderde glucosetolerantie, insulineresistentie en leversteatose veroorzaakte bij muizen die een vetrijk dieet kregen, zie figuur 6. Bloedinfusie van *P.gingivalis* draagt dus bij aan NAFLD en verandert de darmflora.

## Onderzoek 2

Het tweede onderzoek dat besproken zal worden en het effect van *P.gingivalis* op de lever heeft bestudeerd, is het onderzoek van Nagasaki et al, 2020 [97].

In dit onderzoek werd een 'high fat diet' werd gedurende 12 weken aan 10 muizen gevoerd om leververvetting te induceren. Vervolgens werden de muizen gescheiden in 2 groepen: met (genaamd HP) of zonder (genaamd HFD) *P.gingivalis*-odontogene infectie. *P.gingivalis* W83-stam werd dentaal aangebracht op 5 muizen. Na 9 weken *P.gingivalis*-infectie werden lichaamsgewichten gemeten en werden weefselmonsters zoals parodontaal weefsel en leverweefsel afgenomen voor histologische analyse. De verschillen tussen de groepen werden geëvalueerd met 'one-way ANOVA', gevolgd door de post-test van Tukey.

*P.gingivalis* heeft veel pathogene factoren, waaronder fimbria, bacterieel DNA, gingipain en LPS.

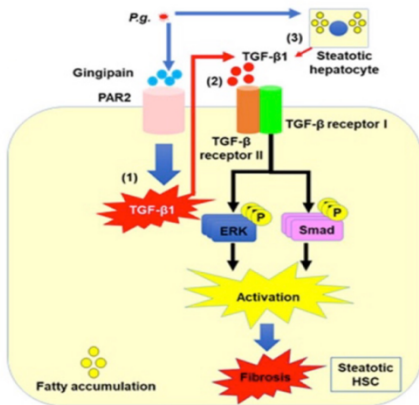
- Gingipain is een protease dat PAR2 activeert in orale epitheelcellen en in zowel de fibroblasten als de immuuncellen in het tandvlees. Ze produceren cytokines wat resulteert in parodontale afbraak.
- Wanneer *P.gingivalis*-LPS in de systemische circulatie terecht komt kan het in andere organen terecht komen en daar een ontstekingsreactie induceren. Sommige studies gaven aan dat *P.gingivalis*-LPS TLR4-receptoren kunnen activeren, maar TLR2-receptoren echter niet. TLR2-receptoren zouden door lipoproteïnen worden geactiveerd. In deze studie werd daarom liganden voor TLR2- (*P.gingivalis*-lipoproteïne) en TLR4-receptoren (*P.gingivalis*-LPS) gebruikt.

Het doel van deze studie is te kijken welke mechanismen ten grondslag liggen aan de progressie van leverfibrose veroorzaakt door *P.gingivalis*-odontogene infectie. Daarnaast werden de rollen van HSC-activatie wat veroorzaakt wordt door *P.gingivalis*-infectie in het proces van leverfibrose geanalyseerd, waarbij er vooral gericht werd op TGF- $\beta$ 1 en Gal-3. Uit resultaten is gebleken dat *P.gingivalis*-lipoproteïne TLR2 signalering induceerde via ongereguleerde TLR2-expressie dat veroorzaakt is door vetophoping in de lever, wat leidt tot excessieve Gal-3 productie samen met een zwakke TLR-4 signalering door *P.gingivalis*-LPS. *P.gingivalis*-LPS en *P.gingivalis*-lipoproteïnen kunnen dus potentiële factoren zijn voor de pathologische progressie van NASH.

Daarnaast werd er in de lever van vetrijk dieet-geïnduceerde NASH-muismodel met *P.gingivalis*-odontogene infectie, immunolokalisatie van *P.gingivalis* aangetroffen in de necrotische pulpa en periapicaal granuloom.

In de HFD-groep was de afzetting van microvesiculaire lipiden aanwezig, maar de ontsteking was gering. In de HP-groep was een significante toename ( $P < 0,05$ ) in de afzetting van macrovesiculaire lipiden en 'hepatic crown-like structures (hCLS) aanwezig. Deze structuren zijn aggregaties van macrofagen. Histologische analyse geeft aan dat hCLS nauw verband houdt met geactiveerde fibroblasten en collageenafzetting, waardoor het positief gecorreleerd is met de mate van leverfibrose.



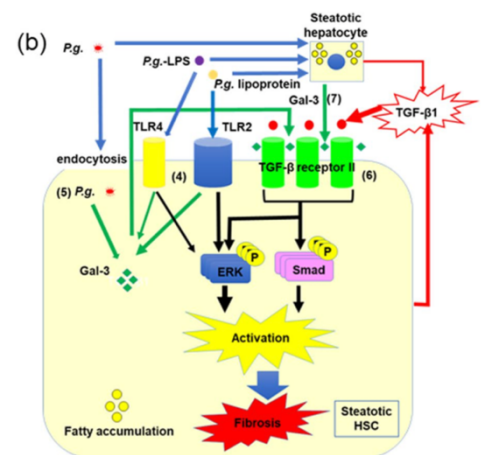


Figuur 7 Schematische weergave van de karakteristieke mechanismen van pathologische progressie van NASH veroorzaakt door odontogene infectie van *P.g.* Op de afbeelding is de mechanismen van HSC-activering veroorzaakt door TGF- $\beta$ 1 weergegeven.

Galectin-3 is een andere factor voor het activeren van HSC-activering (dit proces is uitgelegd op onder het kopje 'HSC-cel' in hoofdstuk 2). Gal-3 wordt door HSC's geproduceerd door middel van activatie van NF- $\kappa$ B via TLR4 en TLR2 of door fagocytose via integrines. *P.gingivalis* is bekend dat het wordt gefagocyteerd via integrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 en  $\alpha$ 5 $\beta$ 3, terwijl *P.gingivalis*-LPS en lipoproteïne de NF- $\kappa$ B-route activeren via TLR4 en 2, respectievelijk. Stimulatie van de *P.gingivalis*-afgeleide LPS/lipoproteïne stabiliseerde TGF $\beta$ -receptor II. Dit resulteerde in een toenemende gevoeligheid voor TGF- $\beta$ 1, wat uiteindelijk leidde tot HSC-differentiatie als gevolg van Smad- en ERK-signalering, zie figuur 8.

Naast de HSC's is bewezen dat de hepatocyten ook bij een *P.gingivalis*-infectie significant ( $P < 0,05$ ) TGF- $\beta$ 1 en Gal-3 produceren. Dit geeft aan dat extra productie van TGF- $\beta$ 1 en Gal-3 uit hepatocyten verdere activering van HSC/s op een paracrine manier kan induceren.

Kortom, *P.gingivalis*-odontogene infectie verergert fibrose van NASH door HSC-activering wat geïnduceerd wordt door TGF- $\beta$ 1 en Gal-3 productie uit HSC's en hepatocyten.



Figuur 8. Schematische weergave van de karakteristieke mechanismen van pathologische progressie van NASH veroorzaakt door odontogene infectie van *P.g.* Op de afbeelding is de mechanismen van HSC-activering veroorzaakt door Gal-3 weergegeven.

## *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is een gramnegatieve bacterie en wordt vaak gedetecteerd bij ernstige parodontitis waardoor het vaak geassocieerd wordt met agressieve parodontitis [98]. Van de parodontale pathogenen bezitten alleen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* naast endotoxine ook exotoxine. Leukotoxine, het exotoxine van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, maakt deze bacterie anders dan andere parodontale pathogenen [99]. Ook *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kan een risicofactor zijn voor de ontwikkeling en progressie van NAFLD/NASH. Het effect van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* op de lever wordt in het onderstaande onderzoek beschreven.

### Onderzoek

Het onderzoek dat besproken zal worden en het effect van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* op de lever heeft bestudeerd, is het onderzoek van *komazaki et al, 2017* [99].

In dit onderzoek werd de relatie tussen parodontitis en NAFLD onderzocht door het meten van IgG-antilichaamtiter tegen parodontopathische bacteriën bij NAFLD-patiënten. Ook kregen muizen gedurende 6 weken *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* of zoutoplossing (controle) en kregen ze ofwel normaal voer (NCAa, NCco) ofwel een vetrijk dieet (HFAa en HFco) om de invloed van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infectie op de darmmicrobiota, glucose/ lipidenmetabolisme en leversteatose bij muizen te onderzoeken. De gegevens werden beoordeeld met behulp van de Shapiro-Wilk-test. Correlatie tussen IgG-antilichaamtiter en klinische/ biochemische parameters werd geëvalueerd door de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman. Bij dierproeven werd de t-test van Student toegepast om twee groepen te vergelijken. Eenzijdige variantieanalyse, gevolgd door een t-test, werd uitgevoerd met behulp van SPSS.

In deze studie werden IgG-antilichaamtiter gemeten tegen drie belangrijke parodontopathische bacteriën bij NAFLD-patiënten: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* en *Porphyromonas gingivalis*. De IgG-antilichaamtiter is een indicator van chronische infectieuze status veroorzaakt door parodontale bacteriën. De IgG-antilichaamtiter was significant hoger bij de 52 NAFLD-patiënten dan bij systemisch gezonde proefpersonen ( $P < 0,05$ ).

Muizen kregen gedurende 6 weken een *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* of een zoutoplossing (controle) en kregen daarnaast ofwel normaal voer (NCAa, NCco) of een vetrijk dieet (HFAa en HFco) om de invloed van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infectie op de darmmicrobiota, glucose/ lipidenmetabolisme te onderzoeken en leversteatose bij muizen. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway-analyse in levermicroarrays suggereerde de inductie van metabole stoornissen, zoals verrijking van de glucagon-signaleringsroute, insulineresistentie en adipocytokine-signaleringsroute, na toediening van *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Bovendien vertoonden HF<sub>AA</sub>-muizen een verhoogde hepatische steatose met behulp van histologische analyse.

Er zijn opmerkelijke verschillen in de samenstelling van het microbioom geconstateerd tussen normale voer- en vetrijke muizenvoeding. Het aantal operationele taxonomische eenheden van veel bacteriesoorten verschilden na toediening van *A. actinomycetemcomitans*.

*actinomycetemcomitans* volgens de auteurs significant tussen NC<sub>co</sub>- en NC<sub>AA</sub>-muizen, en ook tussen HF<sub>co</sub>- en HF<sub>AA</sub>-muizen. In het bijzonder was het geslacht *Turicibacter* ondervertegenwoordigd in muizen die door *A. actinomycetemcomitans* werden toegediend. Dit geslacht correleert naar verluidt met de productie van boterzuur. Een verhoging van boterzuur is in verband gebracht met een verbeterde insulinegevoeligheid. Daarom kan toediening van *A. actinomycetemcomitans* de insulineresistentie beïnvloeden door het darmmicrobiom te veranderen en de boterzuurspiegels te verlagen. De mRNA-expressie van cytokines (Tnf $\alpha$ , Il6 en Il1 $\beta$ ) in de lever bleek niet significant te verschillen in reactie op de toediening van *A. actinomycetemcomitans* bij muizen die een normaal voer of een vetrijk dieet kregen. Daarom is insulineresistentie het gevolg van verandering van de darmmicrobiota door *A. actinomycetemcomitans* in plaats van door endotoxine geïnduceerde ontsteking in de lever. Daarnaast is er ten opzichte van de NC<sub>co</sub>-muizen een hoger glucagonconcentratie in het bloedplasma gemeten van de NC<sub>AA</sub>-muizen.

KEGG-pathway-analyse gaf aan dat orale toediening van *A. actinomycetemcomitans* de darmmicrobiota veranderde, waardoor de functionele bacteriële genen die verband hielden met auto-immuunziekten werden opgereguleerd. Bovendien waren de spijsverterings- en excretiesysteem in staat grotere hoeveelheden vetzuur te verwerken. Accumulerend vetzuur in de darmen kan via de poortader naar de lever worden getransporteerd en leversteatose verergeren.

Kortom, *A. actinomycetemcomitans* kan een risicofactor zijn voor NAFLD omdat het de darmflora verandert.

## Therapieën

Voor leverfibrose zijn de behandelingsopties afhankelijk van de onderliggende oorzaak van de fibrose. Als iemand bijvoorbeeld NAFLD heeft dan kan een arts dieetveranderingen en beweging aanbevelen om af te vallen. Als iemand overmatig alcohol drinkt, kan een arts een behandelprogramma aanbevelen om degene te helpen stoppen met drinken.

Een arts kan daarnaast ook medicijnen voorschrijven waarvan is aangetoond dat ze de kans op leverlittekens verminderen. Deze medicijnen worden antifibrotica genoemd.

Voorbeelden van behandelingen zijn [100,101]:

- Voor chronische leverziekte: ACE-remmers (Benazepril, Lisinopril en Ramipril)
- Voor hepatitis C-virus: Alfatocoferol of interferon-alfa.
- Voor niet-alcoholische steatohepatitis PPAR-alfa-agonist

Er zijn momenteel geen medicijnen die de effecten van leverfibrose kunnen omkeren.

Levertransplantatie is de enige behandeling wanneer de lever zodanig beschadigd is dat het niet of nauwelijks meer kan functioneren.

Omdat uit vele onderzoeken is gebleken dat het microbioom ook een invloed kan hebben op de progressie van leveraandoeningen is het aanbevolen om naast de bovenstaande antifibrotica, medicijnen te gebruiken om de verstoringen van de gut-liver-axis tegen te gaan. Er zijn enkele therapeutische interventies bekend die gericht zijn op de darminhoud en het slijm, het darmmicrobiom, het darmslijmvlies of op het orale microbiom.

### Gericht op darminhoud

Interventies die gericht zijn op de darminhoud [64]:

- Darmbeperkte polymeren  
Darmbeperkte polymeren zijn polymere geneesmiddelen die selectief binden aan oppervlaktekenmerken op bacteriën of virussen, toxines en anorganische ionen (kalium, fosfaat of galzuren).
- Koolstofnanodeeltjes  
Koolstofnanodeeltjes zijn koolstofdeeltjes met een hoog adsorptievermogen voor bacteriële toxines en vertegenwoordigen een nieuwe strategie om dysbiose en translocatie van bacteriële afkomstige producten tegen te gaan.
- Niet-selectieve bètablokkers  
Bètablokkers verminderen de belasting van enterische bacteriën en remmen bacteriële overgroei in de darm door de voedseltransporttijd te verkorten en de intestinale permeabiliteit te verminderen.

### Gericht op het darmmicrobioom

Interventies die gericht zijn op het darmmicrobioom [64]:

- Niet-opneembare antibiotica  
Deze verminderen selectief de schade van bacteriën die vooral bijdragen aan translocatie door het verminderen van bijvoorbeeld endotoxines.
- Bacteriofagen  
Bacteriofagen zijn virussen die specifiek bacteriële pathogenen in de darm infecteren en doden. In tegenstelling tot antibiotica wekken fagen geen resistentie op.
- Synthetische levende bacteriële therapieën  
Dit zijn probiotica die selectief toxische metabolieten in de darm kunnen consumeren en deze in niet-toxische vormen kunnen omzetten.
- Fecale microbiële transplantatie  
Fecale microbiële transplantatie is een methode om een gezonde microbiële omgeving in de darm aan te vullen en fysiologische kolonisatie te herstellen door de darm opnieuw te koloniseren met microbiële flora van een gezonde donor.

### Gericht op het darmslijmvlies

Interventies die gericht zijn op het darmslijmvlies [64]:

- Postbiotica  
Postbiotica zijn metabolische producten van darmbacteriën die immuno-modulerende en beschermende functie op intestinale barrièrefunctie hebben. In het bijzonder kunnen postbiotica inwerken op immuuncellen die het darmweefsel beschermen tegen immunopathologie door de afscheiding van ontstekingsremmende cytokines.
- FXR-agonisten  
FXR-agonisten reconstrueren de samenstelling van de microbiota, herstellen de epitheliale en vasculaire darmbarrièrefunctie, verbeteren de aangeboren afweermechanismen van de darmen, verminderen darmontsteking en verminderen bacteriële translocatie en endotoxemie.

### Gericht op het orale microbioom

Er zijn geen antibiotica die specifiek zijn voor *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en *Porphyromonas gingivalis*, waardoor het onmogelijk wordt om alleen deze pathogenen uit te schakelen [99]. Om parodontitis te bestrijden moet er gelet worden op het bestrijden van een slechte mondhygiëne. Als eerste is het belangrijk om je tanden twee keer per dag twee minuten te poetsen met een fluoridetandpasta die chloorhexidine en CPC bevat. Chloorhexidine helpt plakvorming te verwijderen en te voorkomen. CPC helpt het effect van CHX te versterken [102]. Regelmatig de tandarts bezoeken wordt hier aangeraden om vroegtijdig bij tandvleesontstekingen te zijn zodat het niet ontwikkelt tot parodontitis. Mondhygiënist zullen het tandvlees beoordelen en tandsteen verwijderen zodat parodontitis tegen wordt gegaan.

## Conclusie

De darm-lever-as is de wederzijdse wisselwerking tussen de micro-organismen in de darmen en de lever. Deze interactie komt tot stand door aan de ene kant de poortader die producten afkomstig van de darmen naar de lever transporteert en aan de andere kant de lever die gal en antilichamen naar de darmen afscheidt. Dieet-, genetische- en omgevingsfactoren genereren signalen die leiden tot deze interactie. Dysbiose in de darm wordt geïdentificeerd als een belangrijk factor in de pathogenese van leverziekten. Lekkages in de darmslijmvliesbarrière en een verhoging in de translocatie van bacteriën in de lever via de 'gut-liver axis' blijkt een rol te spelen in de ontwikkeling van NAFLD en ALD. Om leveraandoeningen tegen te gaan is het erg belangrijk om de verstoringen van de gut-liver-axis tegen te gaan. Er zijn enkele therapeutische interventies bekend zoals probiotics, postbiotics, fecale microbiota-transplantatie en FXR-agonisten. Een van de primaire oorzaken van parodontitis is de dysbiose van de orale mondflora. *Porphyromonas gingivalis* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zijn de pathogenen die een belangrijke rol spelen in de pathogenese van parodontale ziekten. Uit de mondholte kunnen deze pathogenen migreren naar de bloedbaan op de plek van ontsteking waardoor parodontitis een risicofactor lijkt voor diverse chronische ziekten. Uit onderzoek is gebleken dat *P. gingivalis* fibrose van NASH verergert door HSC-activering wat geïnduceerd wordt door TGF- $\beta$ 1 en Gal-3 productie uit HSC's en hepatocyten. Ook is er aangetoond dat *P. gingivalis* verminderde glucosetolerantie, insulineresistentie en leversteatose veroorzaakte bij muizen die een vetrijk dieet kregen. *P. gingivalis* draagt bij aan NAFLD en verandert de darmflora. Ook is gebleken dat *A. actinomycetemcomitans* een risicofactor kan zijn voor NAFLD omdat het de darmflora verandert. Kortom, naast het microbiom in de darmen speelt dus ook het microbiom in de mondholte een belangrijke rol in de darm-lever-as.

## Referenties

1. Li, B., Zhang, C., & Zhan, Y.-T. (2018). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/2784537>
2. Friedman, S. L. (z.d.). *Pathogenesis of hepatic fibrosis*. uptodate. Geraadpleegd 3 september 2020, van [https://www-uptodate-com.proxy-ub.rug.nl/contents/pathogenesis-of-hepatic-fibrosis?search=liverfibrosis&source=search\\_result&selectedTitle=2~150&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www-uptodate-com.proxy-ub.rug.nl/contents/pathogenesis-of-hepatic-fibrosis?search=liverfibrosis&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2)
3. Rinella, M. E., & Sanyal, A. J. (2016). Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(4), 196–205. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.3>
4. Gandhi, C. R. (2017). Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *Journal of Hepatology*, 67(5), 1104–1105. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.001>
5. Milosevic, I., Vujovic, A., Barac, A., Djelic, M., Korac, M., Radovanovic Spurnic, A., Gmizic, I., Stevanovic, O., Djordjevic, V., Lekic, N., Russo, E., & Amedei, A. (2019). Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 395. <https://doi.org/10.3390/ijms20020395>
6. Konturek, P., Harsch, I., Konturek, K., Schink, M., Konturek, T., Neurath, M., & Zopf, Y. (2018). Gut–Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver? *Medical Sciences*, 6(3), 79. <https://doi.org/10.3390/medsci6030079>
7. Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Ståhlman, M., Greiner, T. U., Perkins, R., & Bäckhed, F. (2016). Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*, 66(3), 429–437. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310283>
8. Tilg, H., Moschen, A. R., & Szabo, G. (2016). Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 64(3), 955–965. <https://doi.org/10.1002/hep.28456>
9. Sato, K., Hall, C., Glaser, S., Francis, H., Meng, F., & Alpini, G. (2016). Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury. *The American Journal of Pathology*, 186(9), 2238–2247. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.003>
10. Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
11. Jandhyala, S. M. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
12. Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369–2379. <https://doi.org/10.1056/nejmra1600266>
13. Schroeder, B. O., & Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*, 22(10), 1079–1089. <https://doi.org/10.1038/nm.4185>

14. Feng, Q., Chen, W.-D., & Wang, Y.-D. (2018). Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00151>
15. de La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G440–G448.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>
16. Yan, A. W., E. Fouts, D., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., Tsukamoto, H., E. Nelson, K., A. Brenner, D., & Schnabl, B. (2010). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*, 53(1), 96–105.  
<https://doi.org/10.1002/hep.24018>
17. König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(10), e196.  
<https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>
18. Nicoletti, A., Ponziani, F. R., Biolato, M., Valenza, V., Marrone, G., Sganga, G., Gasbarrini, A., Miele, L., & Grieco, A. (2019). Intestinal permeability in the pathogenesis of liver damage: From non-alcoholic fatty liver disease to liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, 25(33), 4814–4834.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4814>
19. Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 260(1), 8–20.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12182>
20. Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
21. Bergström, J. H., Birchenough, G. M. H., Katona, G., Schroeder, B. O., Schütte, A., Ermund, A., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2016). Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13833–13838.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1611400113>
22. Gibbins, H. L., Proctor, G. B., Yakubov, G. E., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2015). SIgA Binding to Mucosal Surfaces Is Mediated by Mucin-Mucin Interactions. *PLOS ONE*, 10(3), e0119677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119677>
23. Liquori, G. E., Mastrodonato, M., Mentino, D., Scillitani, G., Desantis, S., Portincasa, P., & Ferri, D. (2012). In situ characterization of O-linked glycans of Muc2 in mouse colon. *Acta Histochemica*, 114(7), 723–732.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.12.009>
24. Ouwerkerk, J. P., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2013). Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.001>



25. Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 167(5), 1339–1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>
26. Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D. Q.-H., & Portincasa, P. (2017). Bile Acid Physiology. *Annals of Hepatology*, 16, S4–S14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5493>
27. de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J., & Edwards, P. A. (2013). Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism*, 17(5), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>
28. Li, F., Jiang, C., Krausz, K. W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K. M., Mitchell, J. B., Patterson, A. D., & Gonzalez, F. J. (2013). Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nature Communications*, 4(1), <https://doi.org/10.1038/ncomms3384>
29. Kurashima, Y., & Kiyono, H. (2017). Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 119–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052424>
30. Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(6), C1213–C1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
31. Bennett, K. M., Walker, S. L., & Lo, D. D. (2014). Epithelial Microvilli Establish an Electrostatic Barrier to Microbial Adhesion. *Infection and Immunity*, 82(7), 2860–2871. <https://doi.org/10.1128/iai.01681-14>
32. Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C., & Johansson, M. E. V. (2014). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO reports*, 16(2), 164–177. <https://doi.org/10.15252/embr.201439263>
33. Wiest, R., Lawson, M., & Geuking, M. (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 60(1), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.044>
34. McDonald, B. D., Jabri, B., & Bendelac, A. (2018). Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 18(8), 514–525. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0013-7>
35. Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. C., & Germain, R. N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *Journal of Experimental Medicine*, 203(13), 2841–2852. <https://doi.org/10.1084/jem.20061884>
36. Dias, J., Leeansyah, E., & Sandberg, J. K. (2017). Multiple layers of heterogeneity and subset diversity in human MAIT cell responses to distinct microorganisms and to innate cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), E5434–E5443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705759114>
37. Sandquist, I., & Kolls, J. (2018). Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*, 7, 205. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13020.1>

38. Gautreaux, M. D., Deitch, E. A., & Berg, R. D. (1994). T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 62(7), 2874–2884. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2874-2884.1994>
39. Spadoni, I., Zagato, E., Bertocchi, A., Paolinelli, R., Hot, E., Di Sabatino, A., Caprioli, F., Bottiglieri, L., Oldani, A., Viale, G., Penna, G., Dejana, E., & Rescigno, M. (2015). A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science*, 350(6262), 830–834. <https://doi.org/10.1126/science.aad0135>
40. Balmer, M. L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M. A. E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., Bernsmeier, C., Ronchi, F., Wyss, M., Stroka, D., Dickgreber, N., Heim, M. H., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2014). The Liver May Act as a Firewall Mediating Mutualism Between the Host and Its Gut Commensal Microbiota. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra66. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008618>
41. Taylor, C. T., Dzus, A. L., & Colgan, S. P. (1998). Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: Role for polarized release of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Gastroenterology*, 114(4), 657–668. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70579-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70579-7)
42. Tilg, H., Moschen, A. R., & Szabo, G. (2016). Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 64(3), 955–965. <https://doi.org/10.1002/hep.28456>
43. Bull-Otterson, L., Feng, W., Kirpich, I., Wang, Y., Qin, X., Liu, Y., Gobejishvili, L., Joshi-Barve, S., Ayvaz, T., Petrosino, J., Kong, M., Barker, D., McClain, C., & Barve, S. (2013). Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment. *PLoS ONE*, 8(1), e53028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053028>
44. Yan, A. W., E. Fouts, D., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., Tsukamoto, H., E. Nelson, K., A. Brenner, D., & Schnabl, B. (2010). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*, 53(1), 96–105. <https://doi.org/10.1002/hep.24018>
45. Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., Kwasny, M., Lau, C. K., & Keshavarzian, A. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), G966–G978. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00380.2011>
46. Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van IJendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J., & Masclee, A. (2012). Effects of Ethanol and Acetaldehyde on Tight Junction Integrity: In Vitro Study in a Three Dimensional Intestinal Epithelial Cell Culture Model. *PLoS ONE*, 7(4), e35008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035008>
47. Chen, P., Stärkel, P., Turner, J. R., Ho, S. B., & Schnabl, B. (2015). Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, 61(3), 883–894. <https://doi.org/10.1002/hep.27489>
48. Hartmann, P., Chen, P., Wang, H. J., Wang, L., McCole, D. F., Brandl, K., Stärkel, P., Belzer, C., Hellerbrand, C., Tsukamoto, H., Ho, S. B., & Schnabl, B. (2013). Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, 58(1), 108–119. <https://doi.org/10.1002/hep.26321>

49. Soares, J.-B., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque, R., & Leite-Moreira, A. (2010). The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatology International*, 4(4), 659–672. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9219-x>
50. Chen, Y., Yang, F., Lu, H., Wang, B., Chen, Y., Lei, D., Wang, Y., Zhu, B., & Li, L. (2011). Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 54(2), 562–572. <https://doi.org/10.1002/hep.24423>
51. Hartmann, P., Hochrath, K., Horvath, A., Chen, P., Seebauer, C. T., Llorente, C., Wang, L., Alnouti, Y., Fouts, D. E., Stärkel, P., Loomba, R., Coulter, S., Liddle, C., Yu, R. T., Ling, L., Rossi, S. J., DePaoli, A. M., Downes, M., Evans, R. M., ... Schnabl, B. (2018). Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, 67(6), 2150–2166. <https://doi.org/10.1002/hep.29676>
52. Mouries, J., Brescia, P., Silvestri, A., Spadoni, I., Sorribas, M., Wiest, R., Miletì, E., Galbiati, M., Invernizzi, P., Adorini, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2019). Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *Journal of Hepatology*, 71(6), 1216–1228. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.005>
53. Kapil, S., Duseja, A., Sharma, B. K., Singla, B., Chakraborti, A., Das, A., Ray, P., Dhiman, R. K., & Chawla, Y. (2015). Small intestinal bacterial overgrowth and toll-like receptor signaling in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(1), 213–221. <https://doi.org/10.1111/jgh.13058>
54. Loomba, R., Seguritan, V., Li, W., Long, T., Klitgord, N., Bhatt, A., Dulai, P. S., Caussy, C., Bettencourt, R., Highlander, S. K., Jones, M. B., Sirlin, C. B., Schnabl, B., Brinkac, L., Schork, N., Chen, C.-H., Brenner, D. A., Biggs, W., Yooseph, S., ... Nelson, K. E. (2017). Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism*, 25(5), 1054-1062.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>
55. Rahman, K., Desai, C., Iyer, S. S., Thorn, N. E., Kumar, P., Liu, Y., Smith, T., Neish, A. S., Li, H., Tan, S., Wu, P., Liu, X., Yu, Y., Farris, A. B., Nusrat, A., Parkos, C. A., & Anania, F. A. (2016). Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*, 151(4), 733-746.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.022>
56. Verdam, F. J., Rensen, S. S., Driessen, A., Greve, J. W., & Buurman, W. A. (2011). Novel Evidence for Chronic Exposure to Endotoxin in Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(2), 149–152. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e3181e12c24>
57. Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X. S., Lei, H., Luk, C. T., Shi, S. Y., Surendra, A., Copeland, J. K., Ahn, J., Prescott, D., Rasmussen, B. A., Chng, M. H. Y., Engleman, E. G., Girardin, S. E., Lam, T. K. T., Croitoru, K., ... Winer, D. A. (2015). Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents. *Cell Metabolism*, 21(4), 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>
58. Saberi, M., Woods, N.-B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J. C., Bandyopadhyay, G., Verma, I. M., & Olefsky, J. M. (2009). Hematopoietic Cell-Specific Deletion of Toll-like Receptor 4 Ameliorates Hepatic and Adipose Tissue Insulin Resistance in High-Fat-

- Fed Mice. *Cell Metabolism*, 10(5), 419–429.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.006>
59. Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaiss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M., & Flavell, R. A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482(7384), 179–185.  
<https://doi.org/10.1038/nature10809>
  60. Chen, Y., Liu, Y., Zhou, R., Chen, X., Wang, C., Tan, X., Wang, L., Zheng, R., Zhang, H., Ling, W., & Zhu, H. (2016). Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep19076>
  61. Hoyles, L., Fernández-Real, J.-M., Federici, M., Serino, M., Abbott, J., Charpentier, J., Heymes, C., Luque, J. L., Anthony, E., Barton, R. H., Chilloux, J., Myridakis, A., Martinez-Gili, L., Moreno-Navarrete, J. M., Benhamed, F., Azalbert, V., Blasco-Baque, V., Puig, J., Xifra, G., ... Dumas, M.-E. (2018). Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nature Medicine*, 24(7), 1070–1080. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0061-3>
  62. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
  63. Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Yu, L., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H., Zhu, X., Shi, Y., Shen, Q., ... Zhang, C. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, 359(6380), 1151–1156. <https://doi.org/10.1126/science.aao5774>
  64. Albillos, A., de Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*, 72(3), 558–577.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
  65. Szabo, G., Bala, S., Petrasek, J., & Gattu, A. (2010). Gut-Liver Axis and Sensing Microbes. *Digestive Diseases*, 28(6), 737–744. <https://doi.org/10.1159/000324281>
  66. Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(7), 397–411.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
  67. Friedman, S. L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125–172.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
  68. Ellis, E. L., & Mann, D. A. (2012). Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 56(5), 1171–1180. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.09.024>
  69. Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J., & Friedman, S. L. (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4), 1563–1569.  
<https://doi.org/10.1172/jci117497>
  70. Friedman, S. L., & Roll, F. J. (1987). Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Analytical Biochemistry*, 161(1), 207–218. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90673-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90673-7)

71. Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E. R., & Brenner, D. A. (1999). The role of TGF $\beta$ 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *Journal of Hepatology*, 30(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80010-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80010-5)
72. Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Van Nhieu, J. T., Deveau, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A., & Lotersztajn, S. (2006). CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nature Medicine*, 12(6), 671–676. <https://doi.org/10.1038/nm1421>
73. Chen, L., Charrier, A., Zhou, Y., Chen, R., Yu, B., Agarwal, K., Tsukamoto, H., Lee, L. J., Paulaitis, M. E., & Brigstock, D. R. (2014). Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 59(3), 1118–1129. <https://doi.org/10.1002/hep.26768>
74. O'Mahony, F., Wroblewski, K., O'Byrne, S. M., Jiang, H., Clerkin, K., Benhammou, J., Blaner, W. S., & Beaven, S. W. (2015). Liver X receptors balance lipid stores in hepatic stellate cells through Rab18, a retinoid responsive lipid droplet protein. *Hepatology*, 62(2), 615–626. <https://doi.org/10.1002/hep.27645>
75. Saxena, N. K., & Anania, F. A. (2015). Adipocytokines and hepatic fibrosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.01.002>
76. Swiderska-Syn, M., Suzuki, A., Guy, C. D., Schwimmer, J. B., Abdelmalek, M. F., Lavine, J. E., & Diehl, A. M. (2013). Hedgehog pathway and pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 57(5), 1814–1825. <https://doi.org/10.1002/hep.26230>
77. Thoen, L. F. R., Guimarães, E. L. M., Dollé, L., Mannaerts, I., Najimi, M., Sokal, E., & van Grunsven, L. A. (2011). A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *Journal of Hepatology*, 55(6), 1353–1360. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.010>
78. Novo, E., Cannito, S., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A., & Parola, M. (2014). Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 548, 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.015>
79. Kluwe, J., Wongsiriroj, N., Troeger, J. S., Gwak, G.-Y., Dapito, D. H., Pradere, J.-P., Jiang, H., Siddiqi, M., Piantadosi, R., O'Byrne, S. M., Blaner, W. S., & Schwabe, R. F. (2011). Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut*, 60(9), 1260–1268. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.209551>
80. Breitkopf, K., Godoy, P., Ciucan, L., Singer, M., & Dooley, S. (2006). TGF- $\beta$ /Smad Signaling in the Injured Liver. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 44(01), 57–66. <https://doi.org/10.1055/s-2005-858989>
81. Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., & Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 27161–27167. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27161>
82. Knight, V., Tchongue, J., Lourensz, D., Tipping, P., & Sievert, W. (2012). Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 55(3), 879–887. <https://doi.org/10.1002/hep.24784>



83. Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Farnworth, S. L., Poirier, F., Russo, F. P., Iredale, J. P., Haslett, C., Simpson, K. J., & Sethi, T. (2006). Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5060–5065. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511167103>
84. Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Brenner, D. A., Ohnishi, H., & Seki, E. (2013). Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology*, 57(2), 577–589. <https://doi.org/10.1002/hep.26081>
85. Byun, J.-S., Suh, Y.-G., Yi, H.-S., Lee, Y.-S., & Jeong, W.-I. (2013). Activation of toll-like receptor 3 attenuates alcoholic liver injury by stimulating Kupffer cells and stellate cells to produce interleukin-10 in mice. *Journal of Hepatology*, 58(2), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.016>
86. Hammerich, L., & Tacke, F. (2014b). Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5(2), 107. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i2.107>
87. Bilski, J., Mazur-Bialy, A., Wojcik, D., Zahradnik-Bilska, J., Brzozowski, B., Magierowski, M., Mach, T., Magierowska, K., & Brzozowski, T. (2017c). The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/9074601>
88. Malhotra, R., Grover, V., Kapoor, A., & Kapur, R. (2010b). Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 531. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74209>
89. Herrera, D., Molina, A., Buhlin, K., & Klinge, B. (2020). Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 66–89. <https://doi.org/10.1111/prd.12302>
90. Casanova, L., Hughes, F. J., & Preshaw, P. M. (2014). Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *British Dental Journal*, 217(8), 433–437. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.907>
91. Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. J. (2014). Active Invasion of *Porphyromonas gingivalis* and Infection-Induced Complement Activation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice Brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/jad-140315>
92. Parodontitis. (2020, 9 november). NVM Mondhygienisten - Consumenten. <https://www.mondhygienisten.nl/parodontitis/>
93. Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M., Ryder, M. I., Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., & Yamazaki, K. (2014). Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Scientific Reports*, 4(1), 4–4828. <https://doi.org/10.1038/srep04828>
94. Sasaki, N., Katagiri, S., Komazaki, R., Watanabe, K., Maekawa, S., Shiba, T., Udagawa, S., Takeuchi, Y., Ohtsu, A., Kohda, T., Tohara, H., Miyasaka, N., Hirota, T., Tamari, M., & Izumi, Y. (2018). Endotoxemia by *Porphyromonas gingivalis* Injection Aggravates Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Disrupts Glucose/Lipid Metabolism, and Alters Gut Microbiota in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02470>
95. Kim, J., & Amar, S. (2006). Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*, 94(1), 10–21. <https://doi.org/10.1007/s10266-006-0060-6>

96. Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., & Duskova, J. (2014). Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/476068>
97. Nagasaki, A., Sakamoto, S., Chea, C., Ishida, E., Furusho, H., Fujii, M., Takata, T., & Miyauchi, M. (2020). Odontogenic infection by Porphyromonas gingivalis exacerbates fibrosis in NASH via hepatic stellate cell activation. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60904-8>
98. Gholizadeh, P., Pormohammad, A., Eslami, H., Shokouhi, B., Fakhrzadeh, V., & Kafil, H. S. (2017). Oral pathogenesis of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Microbial Pathogenesis*, 113, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>
99. Komazaki, R., Katagiri, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Shiba, T., Takeuchi, Y., Kitajima, Y., Ohtsu, A., Udagawa, S., Sasaki, N., Watanabe, K., Sato, N., Miyasaka, N., Eguchi, Y., Anzai, K., & Izumi, Y. (2018). Author Correction: Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23000-6>
100. Nall, R. M. (2018, 13 november). Liver Fibrosis. Healthline. <https://www.healthline.com/health/liver-fibrosis#treatment-options>
101. Schuppan, D., & Mehal, W. (2015). Antifibrotic Therapies in the Liver. *Seminars in Liver Disease*, 35(02), 184–198. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1550055>
102. Behandelng bij parodontitis (paro-traject). (z.d.). De Kliniek voor Tandheelkunde. <https://www.dekliniekvoortandheelkunde.nl/informatie/parodontologie/behandelng-bij-parodontitis>