

## Het Warburg-effect bij niet-neoplastische cellen: toekomstmogelijkheden voor het paard?

*The Warburg effect in non-neoplastic cells: future possibilities for horses?*

F.J. van Kootwijk, R. Ducatelle

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Richard.ducatelle@ugent.be

### SAMENVATTING

Het Warburg-effect, ook aerobe glycolyse genoemd, is een biochemische pathway die in de humane geneeskunde een belangrijke rol speelt in een grote verscheidenheid van disciplines. In dit overzichtsartikel worden de biochemische achtergrond en de voordelen van het Warburg-effect beschreven. Vervolgens worden een aantal fysiologische en pathologische processen besproken die een mogelijke relevantie hebben voor de diergeneeskunde van het paard. Daarbij wordt de rol van het Warburg-effect bij endocrinopathieën en laminitis benadrukt. Er wordt ook uitgebreid ingegaan op de rol van het Warburg-effect in het gastro-intestinale stelsel en in het ontstaan van colitis, dysbacteriose en koliek. Tot slot worden de verschillende manieren toegelicht waarop het Warburg-effect kan worden gediagnosticeerd en wordt besproken wat de mogelijke farmacologische interventies zijn.

Omdat het Warburg-effect bij verscheidene veterinaire pathologieën de 'missing link' zou kunnen zijn, is dit een belangrijk onderwerp dat verder wetenschappelijk onderzoek vergt.

### ABSTRACT

The Warburg effect, or the aerobic glycolysis, is a biochemical pathway known for its importance in humane medical science, for example in oncology and immunology. In human medicine, there is a large amount of evidence for its existence and advantages. In veterinary medicine, there are a few physiological and pathological processes in the horse in which the Warburg effect may play a critical role. In endocrinopathies and in the development of laminitis, the Warburg effect may be the missing link. The effect is also known for its importance in the gastro-intestinal tract and may therefore be essential in the pathophysiology of colitis, dysbacteriosis and colic in horses.

If the Warburg effect is crucial in veterinary medicine, diagnostic possibilities and treatment options of the Warburg effect are of major importance. Because of the possible significance of the Warburg effect in equine veterinary medicine, more research is necessary.

### INLEIDING

In 1925 ontdekte Otto Warburg dat tumorale cellen glucose op een andere manier metaboliseren dan niet-tumorale cellen, namelijk via aerobe glycolyse ofwel het Warburg-effect. Niet-tumorale cellen metaboliseren glucose in een aerobe omgeving via oxidatieve fosforylatie, die plaats vindt in de mitochondriën. Tumorale cellen daarentegen metaboliseren glucose in een aerobe omgeving via glycolyse (Warburg, 1925).

Sindsdien werd vastgesteld dat het Warburg-effect een rol blijkt te spelen in talloze celsystemen en pathologische processen.

Aangezien het Warburg-effect wijdverspreid voorkomt, is er een duidelijk voordeel van het effect voor niet-oncogene cellen. Kort opgesomd heeft het Warburg-effect de volgende voordelen:

- Snellere adenosinetrifosfaat- (ATP) productie voor de homeostase en proliferatie van cellen (Pfeiffer et al., 2001; Lunt en VanderHeiden, 2011)

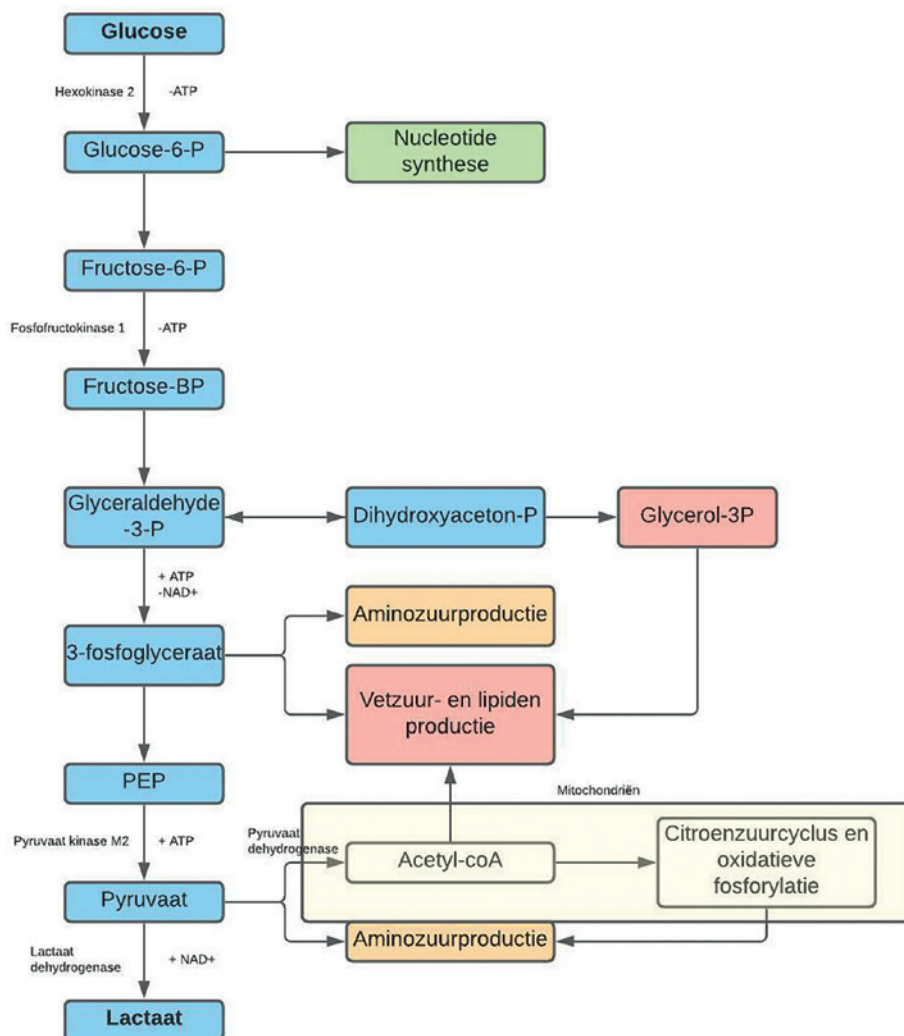
- ATP-productie voor het behoud van glycolytische flux (Berg et al., 2007)
- synthese van macromoleculen, zoals DNA, RNA, eiwitten en lipiden (Lunt en Vander Heiden, 2011) (Figuur 1)
- vermijden van vorming van schadelijke zuurstof-radicalen in de elektrontransportketen van mitochondriën (Brand en Hermfisse, 1997; Le et al., 2010; Holmström en Finkel, 2014)
- synthese van zuurstof radicaalvangers zoals pyruvaat (Rodríguez-Nogales, 2019)
- productie van NAD<sup>+</sup> en NADPH (Feron, 2009; Lunt en Vander Heiden, 2011; Chiarugi et al., 2012)
- Opregulatie van glucosetransporters in de celwand en hierdoor een verhoogde glucoseopname in de cel (Abdel-Haleem et al., 2017).

Deze voordelen dragen bij tot de belangrijkste eigenschap van cellen die als dominante pathway aerobe glycolyse vertonen, namelijk de snel prolifererende

cellen. Tot de snel prolifererende cellen behoren zowel kankercellen als niet-kankercellen. Voor snelle proliferatie hebben deze cellen naast de opregulatie van aerobe glycolyse ook oxidatieve fosforylatie nodig. Dit betekent dat cellen die naar aerobe glycolyse als dominante pathway schakelen, functionerende mitochondriën hebben. Bijgevolg vereist het Warburg-effect geen defecte mitochondriën zoals lang aangenomen werd (Abdel-Haleem et al., 2017).

Naast een snelle proliferatie vertonen deze cellen ook eigenschappen als uitgebreide angiogenese, immuno-evasie en immunosuppressie, het vermijden van apoptose, etc. (Abdel-Haleem et al., 2017; Ganapathy-Kanniappan, 2017; Lunt en Vander Heiden, 2017).

De metabole shift naar het Warburg-effect wordt geïnduceerd door een aantal factoren. De belangrijkste bij niet-kankercellen zijn een verhoogde opname van glucose en een opregulatie van glucosetransporters (Abdel-Haleem et al., 2017), een opregulera-



**Figuur 1.** Grafische voorstelling van glycolyse met de belangrijkste enzymen en lactaat als eindproduct (blauwe vakjes, links). In de andere gekleurde vakjes wordt afgebeeld hoe verschillende biosynthetische processen kunnen ontstaan uit glycolyse (Naar: Lunt en Vander Heiden, 2011).

tie van pro-inflammatoire cytokines en pathways door weefselschade of infectie (O'Neill en Hardie, 2013), een opregulatie van glycolytische enzymen, zoals PFKFB3 (6-fosfofructo-2-kinase/fructose-6-bifosfatase-3 is een allosterische activator van PFK1, een van de twee snelheidsbeperkende enzymen van de glycolyse (Figuur 1)), pyruvaatkinase en hexokinase-2 (Bekkering et al., 2016), een downregulatie van pyruvaatdehydrogenase (Donohoe et al., 2012a) en een tekort aan butyraat in het gastro-intestinale stelsel (Donohoe et al., 2012a).

## DE MOGELIJKE ROL VAN HET WARBURG-EFFECT BIJ INSULINERESISTENTIE-GERELATEERDE PATHOLOGIEËN EN LAMINITIS

Uit immunologisch onderzoek blijkt dat er een verband is tussen het Warburg-effect, een pro-inflammatoir fenotype van de immuuncellen en een pro-inflammatoire status van weefsels. Pro-inflammatoire cellen hebben een hoge opname van glucose, een hoge aerobe glycolytische flux en dus ook veel GLUT1-transporters op hun celmembraan. In een studie van Van Diepen et al. (2016) werd aangetoond dat hoge concentraties circulerend glucose zorgen voor een stimulatie van glycolyse via GLUT1-transporters en een pro-inflammatoir fenotype induceren bij immuuncellen, waaruit blijkt dat hyperglycemie direct gelinkt is aan een pro-inflammatoire status in het lichaam. Het hyperglycemie-geïnduceerde pro-inflammatoire fenotype in M1-macrofagen speelt een belangrijke rol in insulineresistentie (Freemerman et al., 2014). Insulineresistentie of insulinedysregulatie wordt namelijk versterkt door de aanwezigheid van M1-macrofagen in het vetweefsel. Dit leidt tot de inductie van een pro-inflammatoire status van de adipocyten, waardoor er een systemische insulineresistentie of insulinedysregulatie ontstaat (Johnson et al., 2013; Freemerman et al., 2014). Insulinedysregulatie is dus gelinkt aan de door het Warburg-effect geïnduceerde pro-inflammatoire status van het vetweefsel en de immuuncellen.

Insulinedysregulatie bij het paard houdt net als in de humane geneeskunde verband met disfunctieel vetweefsel met een pro-inflammatoir fenotype. Insulinedysregulatie bij het paard leidt evenals bij de mens tot hyperinsulinemie en hyperglycemie. Hyperglycemie, hyperinsulinemie en insulinedysregulatie worden vastgesteld bij paarden met obesitas, equine metabool syndroom (EMS) en disfunctie van de pars intermedia van de hypofyse (PPID) (Durham et al., 2018). Deze aandoeningen hebben één risicofactor gemeenschappelijk, namelijk het risico op endocrinopathische laminitis of hoefbevangenheid (Knowles en Grieve, 2020). Uit onderzoek blijkt dat insulinedysregulatie bij het paard leidt tot een histologische verandering ter hoogte van de lamellen van de hoef. Het cytoskelet van de lamellaire epitheelcellen wordt verstoord. Dit leidt tot loslating van de lamellaire epi-

theelcellen en lamellaire stretching, ofwel laminitis (Belknap et al., 2020).

Naast de endocrinopathische vorm van laminitis zijn er nog twee andere vormen van laminitis bij het paard bekend, namelijk laminitis door overbelasting en sepsis-gerelateerde laminitis. Beide vormen vertonen dezelfde histologische veranderingen ter hoogte van de lamellen als de endocrinopathische vorm van laminitis (Belknap et al., 2020).

Bij de sepsis-gerelateerde vorm van laminitis wordt er een uitgesproken inflammatoire reactie waargenomen in het lamellaire weefsel met de productie van een groot aantal pro-inflammatoire cytokines tot gevolg (Belknap, et al., 2020). Het ontstaan van een pro-inflammatoir fenotype in de lamellaire epitheelcellen doet een shift naar het Warburg-effect vermoeden. Wanneer het metabolisme van de lamellaire cellen in deze vorm van laminitis in beschouwing wordt genomen, blijkt er bovendien een disfunctie van de mitochondriale respiratie te zijn (Belknap et al., 2020). Mitochondriale disfunctie vereist een shift naar glycolyse om aan de ATP-eis van lamellaire epitheelcellen te voldoen. Vermoedelijk vindt er dan ook een shift naar aerobe glycolyse plaats. Verder wetenschappelijk onderzoek is echter noodzakelijk.

## De rol van het Warburg-effect bij koliek

Lactaat speelt een belangrijke rol in het gastro-intestinale stelsel. Lactaat kan op twee manieren worden geproduceerd, namelijk cellulair ofwel L-lactaat, en bacterieel ofwel D-lactaat. Het verschil tussen cellulair en bacterieel lactaat is stereo-isomerie, i.e. de linksdraaiende of rechtsdraaiende eigenschap (Gillis et al., 2018).

D-lactaat dat wordt geproduceerd in het gastro-intestinale stelsel, bindt op de GPR81-receptor van mucosale dendritische cellen en macrofagen in het colon. Bij fysiologische concentraties van D-lactaat leidt dit tot een anti-inflammatoir fenotype van het colon (Ranganathan et al., 2018).

Uit een studie van Vernia et al. (1988) blijkt echter dat er een significante correlatie bestaat tussen intraluminaal lactaatconcentraties en colitis. Uit deze studie blijkt ook dat er een positieve correlatie is tussen de concentratie lumaal lactaat en de ernst van de colitis: bij extreem hoge lumaal lactaatconcentraties werd in die studie de hoogste graad van colitis vastgesteld. Hieruit blijkt dus dat een pathologische stijging van intraluminaal lactaat leidt tot een pro-inflammatoir fenotype. Onderzoek van Gillis et al. (2018) wijst uit dat een stijging van intraluminaal lactaat van cellulaire oorsprong is en in een aeroob milieu gebeurt. Inflammatie-geassocieerde dysbiose is dus gelinkt aan een shift naar aerobe glycolyse en de productie van intraluminaal L-lactaat. Uit deze studie blijkt ook dat hoge lactaatconcentraties geassocieerd zijn met lage butyraatconcentraties. Bij paarden met koliek worden

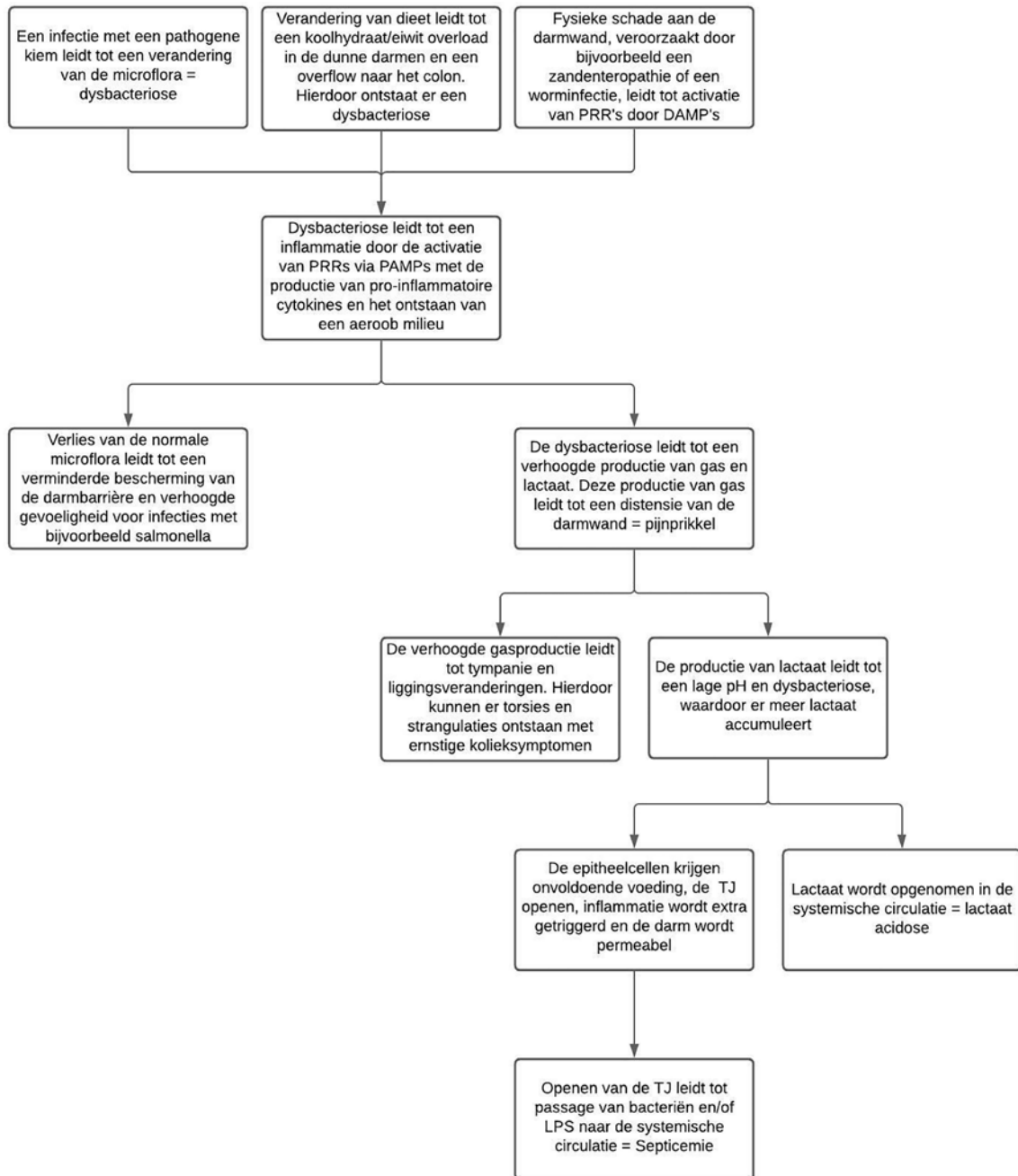
vaak zeer hoge concentraties lactaat aangetroffen, zowel in de darmen als in de peritoneale holte (Delesalle et al., 2007; Park et al., 2021) (Figuur 2).

**WISSELWERKING TUSSEN BUTYRAAT EN LACTAAT, HET WARBURG-EFFECT EN HET MOGELIJK VERBAND MET KOLIEK**

Butyraat is een vluchtig vrij vetzuur dat wordt geproduceerd in het anaerobe milieu van het colon en cecum. Butyraat heeft een belangrijk anti-inflammatoir effect op de colonocyten en versterkt de darmbarrière.

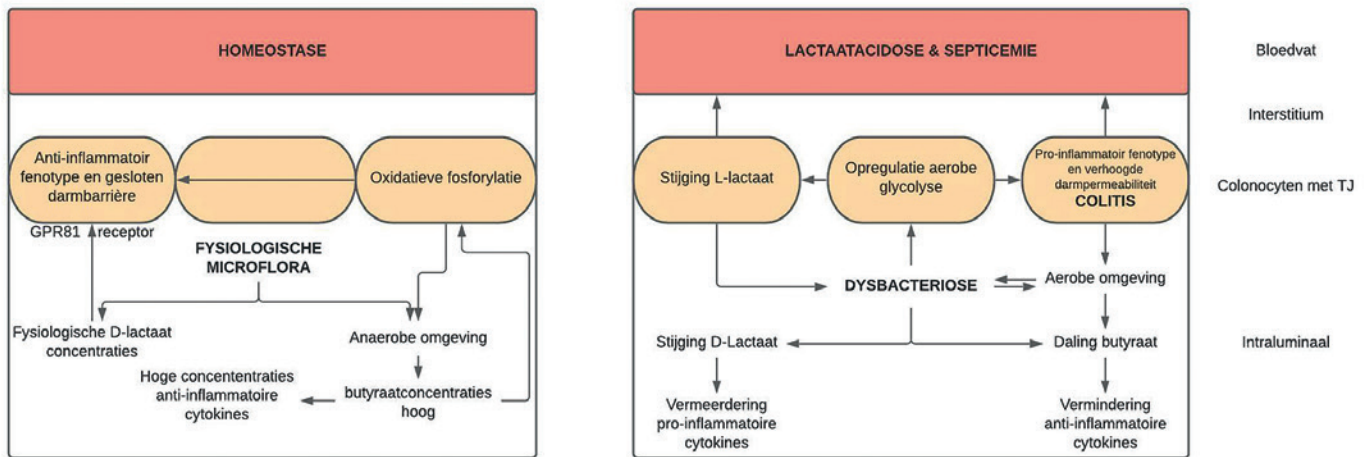
Een goede darmbarrière vermijdt lekkage van antigenen naar het lymfoïde weefsel en hiermee een lokale en systemische inflammatie. Daarnaast vermijdt het ook de translocatie van pathogene bacteriën naar de algemene circulatie en het ontstaan van septicemie en systemische inflammatie (Donohoe et al., 2012a; Donohoe et al., 2012b; Kaiser et al., 2017; Belizario et al., 2018; Fachi et al., 2019) (Figuur 3).

Intraluminaal butyraat is de belangrijkste bron van ATP voor de colonocyten via  $\beta$ -oxidatie en oxidatieve fosforylatie. De afwezigheid van intraluminaal butyraat tijdens dysbiose leidt tot een intracellulaire stijging van L-lactaat in de colonocyten doordat er



Figuur 2. Kort overzicht van de pathofysiologie van koliek bij het paard (Naar: Arena et al., 2017; Belizario et al., 2018; Gillis et al., 2018; Sanchez, 2018).

TJ = “Tight junctions”; PRRs = “pattern recognition receptors”; DAMPs = “damage associated molecular patterns”; LPS = lipopolysacharide



**Figuur 3. Overzicht van de verschillende metabole pathways in normale colonocyten en pathologische colonocyten.**

een verhoogde opname is van glucose dat via het Warburg-effect gemetaboliseerd wordt (Donohoe et al., 2012a). Een stijging van intraluminaal butyraat leidt tot inhibitie van het Warburg-effect door een shift naar oxidatieve fosforylatie. Andersom leidt inhibitie van het Warburg-effect tot een daling van intestinaal L-lactaat en een stijging van  $\beta$ -oxidatie van butyraat (Gillis et al., 2018). Wanneer de shift naar het Warburg-effect in de colonocyten gebeurt, is er geen gebruik van gediffundeerde zuurstof in de oxidatieve fosforylatie en lekt deze zuurstof dus via diffusie naar het darmlumen. Dit veroorzaakt een shift van een anaeroob naar een aeroob milieu in het colon (Gillis et al., 2018) en leidt tot het afsterven van obligaat anaerobe, butyraat-producerende bacteriën (Figuur 3).

Dalende concentraties van intraluminaal butyraat gaan gepaard met een verlies van regulatie van pro-inflammatoire cytokines en dus met het ontstaan van een pro-inflammatoir fenotype in het colon. Cellen die een shift ondergaan naar het Warburg-effect, nemen ook een pro-inflammatoir fenotype aan. Beide leiden tot het ontstaan van dysbiosis-geassocieerde colitis.

Het pro-inflammatoir fenotype brengt een verhoogde vasculaire permeabiliteit in het gastro-intestinale stelsel teweeg. Dit veroorzaakt op zijn beurt een verdere lekkage van zuurstof naar het lumen van de darm en dus een meer aeroob milieu, met een toename van pathogene bacteriën tot gevolg (Gillis et al., 2018). Daarnaast is er ook lekkage van pathogenen, LPS en lactaat naar de algemene circulatie, waardoor er endotoxemie, septicemie, hyperlactatemie en lactaatacidose ontstaan (Sanchez, 2018). Het systemisch geabsorbeerde intestinale lactaat leidt tot een verergering van de septicemie door onder andere immunosuppressie van T-cellen en macrofagen, die gezien wordt bij paarden met een verstoorde darmbarrière door colitis, dysbacteriose en algemene koliek (Awasthi et al., 2019; Ganapathy-Kanniappan, 2017; Yang et al., 2014) (Figuur 3).

Het is belangrijk om bij hyperlactatemie en lactaatacidose een onderscheid te maken tussen type A (een

stijging van lactaat door hypoperfusie of hypoxie) en type B, waarbij er een stijging van lactaat ontstaat onder normale zuurstofconcentraties, zoals bij sepsis, endotoxemie en “systemic inflammatory response syndrome” (SIRS). Hierbij zijn een verhoging van aerobe glycolyse en de inhibitie van oxidatieve fosforylatie de oorzaak van de lactaatstijging (Neil, 2008; Tennent-Brown et al., 2008). Volgens Tennent-Brown et al. (2008) is een persisterend verhoogde lactaatconcentratie suggestief voor hyperlactatemietype B. Daarnaast stelden deze auteurs vast dat de lactaatconcentratie bij het paard een belangrijke factor is voor de prognose van endotoxemie, SIRS en septicemie. Volgens de studie leidt elke mmol/L lactaat tot een 7,3x hogere kans op sterfte en houdt een slechte klaring van lactaat eveneens verband met een verhoogde kans op sterfte.

Uit het onderzoek van Tennent-Brown et al. (2008) blijkt dus dat het Warburg-effect een belangrijke rol speelt in systemische inflammatie, hyperlactatemie en lactaatacidose bij het paard en dat dit een negatieve invloed heeft op de prognose.

### AANTONEN VAN HET WARBURG-EFFECT

Volgens de auteurs werd in de literatuur nog niet beschreven of het Warburg-effect ook daadwerkelijk een rol speelt in de pathologie en fysiologie van het paard. Om het Warburg-effect aan te tonen, dient eerst de aanwezigheid of opregulatie van de glycolyse bevestigd te worden en vervolgens de aanwezigheid van een aeroob milieu. Om glycolyse aan te tonen, kunnen het eindproduct, L-lactaat (Higgins, 2011; Gillis et al., 2018) of glycolytische sleutelenzymen aangetoond worden. Een aantal interessante sleutelenzymen zijn PFKFB3, HK2 en PKM2. Deze kunnen worden bevestigd via een mRNA-expressie-analyse, western blot of via ELISA (Donohoe et al., 2012b; Alves-Filho en Pålsson-McDermott, 2016; Bekkering et al., 2016; Almousa et al., 2018). Het aantonen van een aeroob

milieu is uitdagender. Hierbij zijn er twee opties. Er kan in vivo een aerob milieu aangetoond worden door de omstandigheden te beschouwen waarin het staal is bekomen. Anderzijds kan gebruik gemaakt worden van celculturen, waarbij een aerob milieu gecreëerd wordt en zo de OCR/ECAR-ratio (“oxygen consumption rate”/ “extracellular acidification rate”, i.e. een maat voor de lactaatproductie) kan bepaald worden (Zhou et al., 2017).

## **HET WARBURG-EFFECT ALS MOGELIJK DOELWIT VOOR EEN NIEUWE GENERATIE VAN THERAPEUTISCHE FARMACA BIJ HET PAARD: EEN TOEKOMSTPERSPECTIEF**

In de humane geneeskunde zijn meerdere farmaceutische preparaten beschikbaar om het Warburg-effect te beïnvloeden. De preparaten lijken ook veelbelovend voor de diergeneeskunde. Glycerylbutyraat (Tributyryn) is een orale vorm van butyraat die leidt tot een daling van L-lactaatconcentraties bij muizen met dysbiose. Daarnaast heeft butyraat een anti-inflammatoir en celproliferatie-stimulerend effect (Gillis et al., 2018). In de literatuur werden reeds enkele studies beschreven naar het gebruik van butyraat bij paarden. In 2004 werd het effect van butyraat in vitro onderzocht op colonepitheelcellen van het paard die beschadigd waren door oxidatie (Rotting et al., 2004). In die studie werd geen stimulerend effect vastgesteld op het herstel van colonocyten. Volgens de auteurs van dat onderzoek lag dit mogelijk aan de opzet van de studie. In een studie van Wambacq et al. (2020) werd in vivo gecoat butyraat toegediend aan gezonde paarden, maar dat gaf slechts een zeer gering effect op de darmgezondheid. Wat het effect van butyraat is op een gecompromitteerde darmgezondheid bij paarden is nog onbekend.

Pyruvaat is een veelbelovende molecule in de behandeling van endotoxemie bij het paard. Calciumpyruvaat-monohydraat (CPM) is een stabiele vorm van pyruvaat die oraal toegediend kan worden. CPM werkt anti-inflammatoir, analgetisch en vermindert reactieve zuurstofcomponenten (ROS) door zijn eigenschap als radicaal “scavenger” (Rodriguez-Nogales et al., 2019). Ethylpyruvaat is een andere stabiele vorm van pyruvaat. Het heeft een anti-oxidatief en een anti-inflammatoir effect door de onderdrukking van LPS-geïnduceerde TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ -, IL6- en IL8-productie. Het toedienen van ethylpyruvaat aan LPS-gestimuleerde equine monocytten resulteert ook in een daling van TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ -, IL6- en IL 8-concentraties, zowel voorafgaand aan als na stimulatie met LPS. Daarnaast is ethylpyruvaat een veilig geneesmiddel zonder negatieve effecten op de leefbaarheid van monocytten. In een in-vivostudie van Jacobs et al. (2012) verminderde de toediening van ethylpyruvaat aan paarden met LPS-geïnduceerde endotoxemie de klinische effecten van endotoxemie en de expressie van pro-inflammatoire genen beter dan flunixin-meglumine. Ethylpy-

ruvaat is aldus een zeer interessante farmacologische kandidaat voor de behandeling van endotoxemie bij paarden (Cook et al., 2011; Schroeder et al., 2011).

Metformine induceert het Warburg-effect maar werkt anti-inflammatoir en verlaagt systemische glucoseconcentraties, doordat het leidt tot een daling van hepatische gluconeogenese en een verhoging van glucose-opname (Andrzejewski et al., 2014). Metformine zorgt ook voor een herprogrammering van M1-macrofagen tot M2-macrofagen door de inhibitie van getrainde immuniteit (Van Diepen et al., 2016). Bovendien leidt metformine tot de inhibitie van de productie van ROS en IL-1 $\alpha$  door macrofagen (Pålsson-McDermott en O’Neill, 2020). Metformine wordt gebruikt in de behandeling van het equine metabool syndroom, omdat het een daling geeft van basale insulineconcentraties. De biologische beschikbaarheid van metformine is echter laag bij paarden en er is geen systemisch effect. Daarom wordt het effect van metformine bij paarden toegeschreven aan een lagere enterische glucose-absorptie (Durham et al., 2019).

## **DISCUSSIE**

Om uiteindelijk tot duidelijke en wetenschappelijk correcte conclusies te komen over het Warburg-effect bij het paard, is verder fundamenteel onderzoek noodzakelijk. Zonder duidelijk wetenschappelijk bewijs is de rol die het Warburg-effect speelt in de verschillende pathologieën en de normale fysiologie van het paard, en bij uitbreiding van andere diersoorten, hypothetisch.

Op basis van de literatuur in de humane geneeskunde kunnen echter wel enkele hypothesen opgesteld worden inzake de rol van het Warburg-effect bij het paard en kunnen de volgende vragen gesteld worden voor verder onderzoek: Leidt insulinedysregulatie bij het paard tot een door het Warburg-effect-geïnduceerde pro-inflammatoire status van het vetweefsel en immuuncellen? Speelt het Warburg-effect een rol in de histologische veranderingen in lamellaire epitheelcellen bij paarden met insulinedysregulatie? Wordt colitis bij het paard mede veroorzaakt door een dysbacteriose-geïnduceerde opregulatie van het Warburg-effect? Indien deze laatste vraag beantwoord kan worden, wordt duidelijk of aerobe glycolyse een belangrijke oorzaak is in het ontstaan van inflammatie van het gastro-intestinale stelsel na dysbacteriose, wat de trigger kan zijn voor koliek, colitis, sepsis en endotoxemie. In de humane geneeskunde werd een onderzoek verricht dat hier antwoord kan bieden (Almoussa et al., 2017). In deze studie werd PKM2 bepaald via een ELISA-test in een intestinaal in-vitro-epitheelmodel, waarbij inflammatie werd geïnduceerd met LPS en TNF $\alpha$ , en in serum en feces van patiënten met “inflammatory bowel disease” (IBD); dit om aan te tonen dat PKM2 een indicator is voor Warburg-effect-geïnduceerde inflammatie en dysbacteriose. Wanneer dit onderzoek herhaald wordt in een in-vitro- en in-

vivomodel bij paarden met colitis, kan worden aangetoond dat het Warburg-effect een “missing link” is in de inflammatie van het gastro-intestinale stelsel.

Om na te gaan of 1. butyraat een preventieve werking heeft bij paarden die een risico hebben om colitis te ontwikkelen, of 2. het toedienen van butyraat een effect op het herstel en de prognose van paarden met colitis, dysbacteriose of koliek en van paarden na een koliekoperatie heeft, kunnen de butyraat- en lactaatconcentraties van paarden met colitis, dysbacteriose en/of koliek in de feces gemeten en vergeleken worden met de concentraties van een gezonde controlepopulatie. Om gedurende enkele dagen de lactaat- en butyraatconcentraties in de feces te meten, kan vervolgens butyraat toegediend worden volgens de studie van Wambacq et al. (2020). Enerzijds zou op deze manier kunnen worden aangetoond dat er een shift is van hoge concentraties intraluminaal butyraat naar hoge concentraties intraluminaal L-lactaat bij paarden met gastro-intestinale problemen en anderzijds kan de werking van exogeen toegediend butyraat aangetoond worden (Gillis et al., 2018).

Indien de biologische beschikbaarheid van metformine verbeterd kan worden, kan in verder onderzoek nagegaan worden of metformine dan ook een systemisch anti-inflammatoir effect heeft door de beïnvloeding van het Warburg-effect bij paarden met EMS, obesitas en laminitis.

## CONCLUSIE

Het Warburg-effect speelt een belangrijke rol in de fysiologie en pathologie van de mens. Het lijkt dus niet onlogisch dat het ook een belangrijke rol speelt in de fysiologie en pathologie van het paard. Het Warburg-effect zou de oorzaak of de ‘missing link’ kunnen zijn in een aantal pathologische processen bij het paard. Daarom is het van uitermate belang dat er meer onderzoek wordt gedaan naar de rol van het Warburg-effect in de diergeneeskunde.

## LITERATUUR

Abdel-Haleem, A.M., Lewis N.E., Jamshidi N., Mineta K., Gao X., Gojobori T., (2017). The emerging facets of non-cancerous Warburg Effect. *Frontiers in Immunology* 8, 279.

Almoussa A.A., Morris M., Fowler S., Jones J., Alcorn J. (2017). Elevation of serum pyruvate kinase M2 (PKM2) in IBD and its relationship to IBD indices. *Clinical Biochemistry* 53, 19-24.

Alves-Filho J.C., Pålsson- McDermott E.M. (2016). Pyruvate kinase M2: A potential target for regulating inflammation. *Frontiers in Immunology* 7, 145.

Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & Metabolism* 2, 12.

Arena, E. T., Tinevez, J. Y., Nigro, G., Sansonetti, P. J., Marteyn, B. S. (2017). The infectious hypoxia: occur-

rence and causes during Shigella infection. *Microbes and infection* 19(3), 157–165.

Awasthi D., Nagarkoti S., Sadaf S., Chandra T., Kumar S., Dikshit M. (2019). Glycolysis dependent lactate formation in neutrophils: A metabolic link between NOX-dependent and independent NETosis. *Biochimica et Biophysica acta. Molecular Basis of Disease* 1865(12), 165-542.

Belknap J., Parks A., Dern K. (2020). Laminitis. In: Baxter, G. M. Adams and Stashak (Editors). *Lameness in Horses*. Seventh edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, p. 490-511.

Bekkering S., van den Munckhof I., Nielen T., Lamfers E., Dinarello C., Rutten J., de Graaf J., Joosten L.A.B., Netea M.G., Gomes M.E.R., Riksen N.P. (2016). Innate immune cell activation and epigenetic remodelling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis* 254, 228-236.

Belizário, J. E., Faintuch, J., Garay-Malpartida, M. (2018). Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: new frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators of Inflammation*, doi: 10.1155/2018/2037838.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto G.J., Stryer, L. (2007). Glycolysis and gluconeogenesis. In: Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (Editors). *Biochemistry*. Eighth edition, W.H. Freeman & company, New York, p. 449-494.

Brand K.A., Hermfisse U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: A protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(5), 388–395.

Chiarugi A., Dölle C., Felici R., Ziegler M. (2012). The NAD metabolome – a key determinant of cancer cell biology. *Nature reviews. Cancer* 12(11), 741–752.

Cook, V. L., Holcombe, S. J., Gandy, J. C., Corl, C. M., Sordillo, L. M. (2011). Ethyl pyruvate decreases proinflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated equine monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141(1-2), 92–99.

Delesalle C., Dewulf J., Lefebvre R.A., Schuurkes J.A.J., Proot J., Lefere L., Deprez P. (2007). Determination of lactate concentrations in blood plasma and peritoneal fluid in horses with colic by an accusport analyzer. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 293–301.

Van Diepen J.A., Thiem K., Stienstra R., Riksen N.P., Tack C.J., Netea M.G. (2016). Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggressive? *Cellular and Molecular life science* 73, 4675-4684.

Donohoe D.R., Wali A., Brylaswski B.P., Bultman S.J. (2012a). Microbial regulation of glucose metabolism and cell cycle progression in mammalian colonocytes. *Plos One* 7(9), e46589.

Donohoe D.R., Collins L.B., Wali A., Bigler R., Sun W., Bultman S.J. (2012b). The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular cell* 48, 612-626.

Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I., Feige, K., Fey, K. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33(2), 335–349.

Fachi, J. L., Felipe, J. S., Pral, L. P., da Silva, B. K., Corrêa, R. O., de Andrade, M., da Fonseca, D. M., Basso, P. J., Câmara, N., de Sales E Souza (2019). Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through

- an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell reports* 27(3), 750–761.
- Feron O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg Effect to symbiotic energy fuel. *Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92(3), 329–333.
- Freemerman A.J., Johnson A.R., Sacks G.N., Milner J.J., Kirk E.L., Troester M.A., Macintyre A.N., Goraksha-Hicks P., Rathmell J.C., Makowski L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 289, 7884–7896.
- Ganapathy-Kanniappan, S. (2017). Linking tumor glycolysis and immune evasion in cancer: Emerging concepts and therapeutic opportunities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1868(1), 212–220.
- Gillis C.C., Hughes E.R., Spiga L., Winter M.G., Zhu W., Furtado de Carvalho T., Chanin R., Behrendt C.L., Hooper L.V., Santos R.L., Winter S.E. (2018). Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support Salmonella growth. *Cell Host Microbe* 23(1), 54–64.
- Higgins C. (2011). L-lactate and D-lactate - clinical significance of the difference. [Acuratetesting.org](http://Acuratetesting.org)
- Holmström K.M., Finkel T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(6), 411–421.
- Kaisar M.M., Pelgrom L.R., van der Ham A.J., Yazdankhsh M., Everts B. (2017). Butyrate conditions human dendritic cells to prime type 1 regulatory T cells via both histone deacetylase inhibition and G-protein coupled receptor 109A signalling. *Frontiers in Immunology* 8, 1429.
- Knowles E.J., Grieve L. (2020). Clinical insights: equine obesity. *Equine Veterinary Journal* 52(5), 635–638.
- Johnson A.R., Milner J.J., Makowski L. (2013). The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological Reviews* 249(1), 218–238.
- Jacobs, C. C., Holcombe, S. J., Cook, V. L., Gandy, J. C., Hauptman, J. G., Sordillo, L. M. (2012). Ethyl pyruvate diminishes the inflammatory response to lipopolysaccharide infusion in horses. *Equine Veterinary Journal* 45(3), 333–339.
- Le A., Cooper C.R., Gouw A.M., Dinavahi R., Maitra A., Deck L.M., Royer R.E., Vander Jagt D.L., Semenza G.L., Dang C.V., (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5), 2037–2042.
- Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27, 441–464.
- O'Neill, L., Hardie, D. (2013). Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493, 346–355.
- Neil, K. (2008). How to use lactate in equine practice. *The Australian Equine Veterinarian* 27 (4), 34–48.
- Pålsson-McDermott, E.M., O'Neill, L.A.J. (2020). Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Research* 30(4), 300–314.
- Park T., Cheong H., Yoon J., Kim A., Yun Y., Unno T. (2021). Comparison of the fecal microbiota of horses with intestinal disease and their healthy counterparts. *Veterinary Sciences* 8, 113.
- Pfeiffer T., Schuster S., Bonhoeffer S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292(5516), 1821–1830.
- Ranganathan P., Shanmugam A., Swafford D., Suryawanshi A., Bhattacharjee P., Hussein M.S., Koni P.A., Prasad P.D., Kurago Z.B., Thangaraju M., Ganapathy V., Manicassamy S. (2018). GPR81, a cell-surface receptor for lactate, regulates intestinal homeostasis and protects mice from experimental colitis. *Journal of Immunology* 200(5), 1781–1789.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri F., Vezza T., Garrido-Mesa J., Moline-Tijeras J.A., Rodríguez-Cabezas M.E., Utrilla M.P., Pischel I., Gálvez J. (2019). Calcium pyruvate exerts beneficial effects in an experimental model of irritable bowel disease induced by dca in rats. *Nutrients*. doi:10.3390/nu11010140.
- Rotting, A. K., Freeman, D. E., Constable, P. D., Eurell, J. A. C., Wallig, M. A. (2004). Effects of phenylbutazone, indomethacin, prostaglandin E2, butyrate, and glutamine on restitution of oxidant-injured right dorsal colon of horses in vitro. *American Journal of Veterinary Research* 65(11), 1589–1595.
- Sanchez L.C. (2018). Disorders of the gastrointestinal system. In: Reed, S. M., Sellon, D. C. en Bayly, W. M *Equine Internal Medicine*. Fourth edition, Elsevier, St. Louis, p. 709–842.
- Schroeder, E. L., Holcombe, S. J., Cook, V. L., James, M. D., Gandy, J. C., Hauptman, J. G., Sordillo, L. M. (2011). Preliminary safety and biological efficacy studies of ethyl pyruvate in normal mature horses. *Equine Veterinary Journal* 43(3), 341–347.
- Tennent-Brown B.S., Boston R.C., Wilkins P.A. (2008). Admission and sequentially measured plasma lactate concentrations as prognostic indicators in adult equine emergencies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 754.
- Vernia P., Caprilli R., Latella G., Barbetti F., Magliocca F.M., Cittadine M. (1988). Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 95, 1564–1568.
- Wambacq W. A., van Doorn D. A., Rovers-Paap P. M., Ducatelle R., Vlaminck L., Lourenço M., Hesta, M. (2020). Dietary supplementation of micro-encapsulated sodium butyrate in healthy horses: effect on gut histology and immunohistochemistry parameters. *BMC Veterinary Research* 16(1), 121.
- Warburg O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The journal of Cancer Research* 9, 148–163.
- Yang, L., Xie, M., Yang, M., Yu, Y., Zhu, S., Hou, W., Kang, R., Lotze, M. T., Billiar, T. R., Wang, H., Cao, L., Tang, D., (2014). PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nature Communications* 5, 4436.
- Zhou W., Ramachandran D., Mansouri A., Dailey M.J. (2017). Glucose stimulates intestinal epithelial crypt proliferation by modulating cellular energy metabolism. *Journal of Cellular Physiology* 233, 3465–3475.