

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32608> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ellenbroek, Johanne Hendrike (Rianne)

Title: Pancreatic β - and α -cell adaptation in response to metabolic changes

Issue Date: 2015-25-03

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of publications

Nederlandse samenvatting

In Nederland lijden ongeveer 1 miljoen mensen aan diabetes mellitus. Diabetes wordt gekarakteriseerd door een absolute of relatieve tekortkoming aan de hoeveelheid insuline die de β -cellen uitscheiden. Deze β -cellen bevinden zich in de eilandjes van Langerhans in het pancreas. Het insulinetekort leidt tot een verstoorde balans in de glucosehuishouding. Voor mensen met diabetes zijn therapieën nodig die de β -celfunctie herstellen, onderhouden en het verlies van deze van deze cellen tegengaan. Het is daarom van groot belang om te begrijpen hoe het aantal β -cellen, de β -celmassa, wordt gereguleerd. Wanneer de vraag naar insuline chronisch is verhoogd door fysiologische of pathologische metabole veranderingen, zoals bijvoorbeeld gedurende een zwangerschap of bij obesitas, kan het endocriene pancreas zich aanpassen door de insulinesecretie te laten toenemen. Dit kan gebeuren via een verhoogde β -celfunctie of een vermeerdering van het aantal β -cellen. Door deze adaptatie van de β -cellen kan de balans in de glucosehuishouding behouden worden. Onvoldoende β -celadaptatie leidt tot de ontwikkeling van een verhoogde bloedsuiker en uiteindelijk diabetes mellitus.

β - en α -celadaptatie zijn topologisch heterogeen

Het pancreas is een regionaal heterogeen orgaan. Tijdens de embryonale ontwikkeling wordt het pancreas gevormd door twee epitheliale uitstulpingen. De ventrale uitstulping vormt het posterioere gedeelte van de kop en het uncinat proces, en de dorsale uitstulping vormt de kop, romp en staart van het volgroeide pancreas. Eilandjes van Langerhans die ontstaan in het ventrale gedeelte van het pancreas bevatten meer cellen die pancreas polypeptide maken, terwijl eilandjes van de dorsale uitstulping meer glucagon-producerende α -cellen bevatten. Ook scheiden deze dorsale eilandjes meer insuline uit als ze gestimuleerd worden met glucose. Daarnaast hebben diverse studies laten zien dat in het pancreas van mensen meer eilandjes in de staartregio zitten vergeleken met de kop- en rompregio. Echter, het is niet bekend of de adaptatie van β -cellen aan een toegenomen vraag naar insuline homogeen plaatsvindt door het hele pancreas.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we een studie waarin muizen een hoog-vet dieet (HVD) gevoerd kregen, om daarmee insulineresistentie te veroorzaken, of een controledieet. We verdeelden het pancreas in drie regio's: een duodenale, gastrische en een splenische regio (respectievelijk corresponderend aan de kop-, romp- en staartregio van het pancreas in mensen). In elk gedeelte bepaalden we de β -celmassa, β -celproliferatie en β -celfunctie. Na 6 weken dieet was het aantal delende β -cellen en de β -celfunctie significant toegenomen in eilandjes afkomstig van de splenische regio van het pancreas in vergelijking met eilandjes van de duodenale en gastrische regio. Hieruit concluderen we dat de adaptatie van β -cellen in reactie op een HVD in muizen regionaal verschillend is. Ook zagen we dat de α -celmassa was afgenomen in de splenische regio van het pancreas, maar niet in de andere regio's.

Daarna hebben we onderzocht of β -celadaptatie ook topologisch heterogeen is in een ander diermodel van insulineresistentie. Glucocorticoid-geïnduceerde insulineresistentie openbaart zich binnen 5 dagen na de start van de behandeling in ratten en is daarom een acute stimulans voor β -celadaptatie. In **hoofdstuk 3** bestuderen we regionale β -celadaptatie in het pancreas van glucocorticoid-geïnduceerde insulineresistente ratten. De relatieve β -celmassa was significant toegenomen na 6 weken dexamethason (DXM) behandeling in ratten en de toename was het grootst in de splenische regio van het pancreas.

Vervolgens wilden we weten of β -celadaptatie in mensen ook topologisch heterogeen verloopt. In **hoofdstuk 4** beschrijven we een studie waarin we de β -celmassa en de glucagonproducerende α -celmassa onderzoeken in verschillende regio's van het pancreas in mensen. Hiervoor bestudeerden we het donorpancreas van 15 obese individuen zonder diabetes en 15 slanke controles met een vergelijkbare leeftijd. Zowel de relatieve β - als α -celmassa was het grootste in de staartregio van het pancreas. In obese individuen waren de β - en α -celmassa groter. In de kop-regio van het pancreas waren de relatieve β - en α -celmassa significant groter vergeleken met de slanke controles. De eilandjesdichtheid was significant hoger in de staartregio van obese individuen. Deze resultaten laten zien dat in obese individuen de β - en α -celmassa adaptatie regionaal heterogeen zijn.

	Model	Kop / DR	Romp / GR	Staat / SR
β -celfunctie	Muizen	=	=	↑
β -celmassa	Muizen	=	=	↑
	Ratten*	=	=	↑
	Mensen*	↑	=	=
α -celmassa	Muizen	=	=	↓
	Mensen*	↑	=	=

Tabel 1. Veranderingen in β -celfunctie, en de β - en α -celmassa in verschillende regio's van het pancreas in hoog-vet dieet gevoede vs. controle muizen (Muizen), dexamethason-behandelde vs. controle ratten (Ratten) en obese vs. slanke mensen (Mensen). *relatieve celmassa: afgeleid van gemeten cel- en pancreasoppervlaktes. DR = duodenale regio, GR = gastrische regio, SR = splenische regio.

De heterogeniteit in adaptatie van β -cellen uit verschillende regio's van het pancreas in reactie op een verhoogde vraag naar insuline kan op twee manieren verklaard worden: (i) de eilanden afkomstig van de verschillende pancreas regio's zijn intrinsiek verschillend, of, (ii) de eilanden in elk van de regio's in het pancreas ontvangen andere extrinsieke signalen via bv. de bloedtoevoer, zenuwimpuls of het omliggende exocriene weefsel van het pancreas. In **hoofdstuk 2** testen we deze laatste hypothese door eilandjes afkomstig uit verschillende pancreasregio's van onbehandelde muizen te transplanteren naar een locatie buiten het pancreas (onder het nierkapsel) in muizen met diabetes. In een muis met diabetes is de vraag naar insuline sterk verhoogd. Dit resulteert in aanpassing van de getransplanteerde eilandjes om daarmee de hoeveelheid insuline te verhogen. Tien dagen na de transplantatie hadden eilandjes afkomstig uit

de verschillende regio's van het pancreas zich op dezelfde manier aangepast. Dit suggereert dat de heterogeniteit in adaptatie van eilandjes die we eerder in HVD-gevoede muizen observeerden het resultaat is van extrinsieke signalen die aanwezig zijn in het micromilieu van de eilandjes in het pancreas.

De resultaten uit **hoofdstuk 2 – 4** impliceren dat kwantificatie van de β - en α -celmassa in het pancreas van dieren en mensen gebaseerd moet zijn op representatieve monsters uit het gehele orgaan. In de literatuur worden histologische studies naar de β - en/of α -celmassa beschreven waarbij de kopregio van het pancreas vaak niet is meegenomen. Dit kan in deze studies geleid hebben tot een incorrecte inschatting van de veranderingen in de endocriene celmassa. Daarnaast kan het vergelijken van regionale verschillen in β -celadaptatie leiden tot de identificatie van nieuwe factoren die betrokken zijn bij de groei en functie van β -cellen.

β -celadaptatie in reactie op diverse metabole stimuli

In dit proefschrift bestuderen we de adaptatie van β -cellen in reactie op verschillende metabole veranderingen (tabel 2). Een van de belangrijkste stimuli voor adaptatie van β -cellen is insulineresistentie. In de **hoofdstukken 2 - 4** laten we zien dat insulineresistentie leidt tot een vergrote β -celmassa in knaagdieren en mensen. HVD-geïnduceerde insulineresistentie in muizen leidt tot een toename van de β -celfunctie, β -celproliferatie en β -celmassa ter compensatie voor de toegenomen vraag naar insuline (**hoofdstuk 2**). Ook obesitas bij mensen, dat vaak samen gaat met insulineresistentie, is geassocieerd met een grotere β -celmassa vergeleken met slanke individuen (**hoofdstuk 4**). In **hoofdstuk 3** zien we dat DXM behandeling van ratten gedurende 3 weken resulteert in een verhoging van de insulinesecretierespons na een glucosestimulus en een toename van de β -celmassa.

Een van de meest potente hormonen die zowel β -celfunctie als β -celproliferatie kan stimuleren is de incretine glucagon-like peptide-1 (GLP-1). In diermodellen van diabetes is aangetoond dat behandeling met GLP-1 receptor agonisten (GLP-1RA) de β -celmassa kan vergroten. Therapieën gebaseerd op het werkingsmechanisme van GLP-1 verbeteren de glycemische controle in patiënten met type 2 diabetes. Vanwege positieve effecten op lichaamsgewicht en lipidewaarden in het bloed worden deze therapieën nu ook geëvalueerd in individuen met obesitas en/of hart- en vaatziekten die geen diabetes hebben. De gevolgen van deze behandeling op de β -celmassa tijdens normoglycemische condities, waarbij er geen vraag is naar extra insuline, is echter niet duidelijk. In **hoofdstuk 5** bestuderen we het effect van de GLP-1RA liraglutide op de β -celmassa en β -celfunctie in normoglycemische muizen. Muizen werden met liraglutide of PBS behandeld en kregen een controle of een HVD gedurende 1 of 6 weken. Zes weken behandeling met liraglutide resulteerde in een toegenomen gevoeligheid voor insuline en voorkwam HVD-geïnduceerde insulineresistentie. Na 1 week behandeling met liraglutide was het aantal delende β -cellen sterk verminderd wat resulteerde in een kleinere β -celmassa na 6 weken behandeling. Geïsoleerde eilanden van met liraglutide behandelde normoglycemische muizen lieten een

toename zien van glucose-geïnduceerde insulinesecretie. Deze data laten zien dat GLP-1RA behandeling van normoglycemische muizen kan leiden tot toename van de gevoeligheid voor insuline en β -celfunctie. Dit is geassocieerd met een reductie van de β -celmassa om daarmee de glucosehuishouding in balans te houden.

Voedingsstoffen zoals glucose en vrije vetzuren kunnen de groei en functie van β -cellen beïnvloeden. In een aantal populaire gewichtsverminderende diëten is de hoeveelheid vetten substantieel verhoogd ten koste van koolhydraten. Dergelijke diëten dwingen het lichaam om als primaire energiebron vetten in plaats van koolhydraten te gebruiken. De langetermijneffecten van deze hoog-vet laag-koolhydraat ketogene diëten op endocriene cellen in het pancreas zijn echter onbekend. Een langdurig ketogeen dieet zou een metabole omgeving kunnen creëren waarin de vraag naar insuline sterk is verlaagd, terwijl de vraag naar glucagon verhoogd zou kunnen zijn om hiermee gluconeogenese te stimuleren. **Hoofdstuk 6** beschrijft een studie waarin muizen gedurende 22 weken een ketogeen dieet gevoed kregen. Hoewel er in de eerste weken van het dieet een gewichtsverlies optrad, resulteerde het ketogeen dieet na 22 weken niet in een verminderd gewicht. Een langdurig ketogeen dieet leidde tot glucose-intolerantie, dat geassocieerd was met een tekort aan insulinesecretie door de β -cellen. Na 22 weken was de β -celmassa kleiner in ketogeen dieet-gevoede muizen vergeleken met controlemuizen. Onze data laten zien dat een langdurig ketogeen dieet leidt tot dyslipidemia, een proinflammatoire staat, tekenen van leversteatose, glucose-intolerantie en afname van de β -celmassa, maar geen gewichtsverlies. Deze resultaten suggereren dat een langdurig ketogeen dieet leidt tot symptomen die ook zijn geassocieerd met het metabole syndroom en een toename op het risico voor type 2 diabetes bij mensen.

Model	Soort	β -celfunctie	β -celmassa
Obesitas	Mensen		↑
DXM	Ratten	↑	↑
HVD	Muizen	↑	↑
GLP-1RA	Muizen	↑	↓
HVD + GLP-1RA	Muizen	↑	↓
KD	Muizen	↓	↓

Tabel 2. Veranderingen in β -celfunctie en β -celmassa in obese vs. slanke mensen (Obesitas), dexamethason-behandelde vs. controle ratten (Ratten), HVD-gevoede vs. controle muizen (HVD), liraglutide-behandelde vs. controle muizen (GLP-1RA), liraglutide-behandelde HVD-gevoede vs. controle muizen (HVD + GLP-1RA), KD dieet-gevoede vs. controle muizen (KD). DXM = dexamethason, HVD = hoog-vet dieet, GLP-1RA = glucagon-lijke peptide 1 receptor agonist, KD = ketogeen dieet.

α -celadaptatie in reactie op diverse metabole stimuli

Voor de glucosehomeostase is het van belang dat de hoeveelheid glucose die de circulatie binnenkomt en uitgaat in balans is. In dit proces spelen zowel insuline als glucagon een belangrijke rol. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de insulineproducerende β -celmassa zich

kan aanpassen aan veranderde metabole omstandigheden. Er is echter weinig bekend over de rol van de α -celmassa in dit proces. In **hoofdstuk 4 – 6** laten we zien dat metabole veranderingen tot aanpassing van zowel de β - als de α -celmassa leiden.

De aanpassing van de α -celmassa in obese mensen (**hoofdstuk 4**) en in normoglycemische muizen onder behandeling van de GLP-1RA liraglutide (**hoofdstuk 5**) was vergelijkbaar met de veranderingen die optraden in de β -celmassa, en resulteerde in het behoud van de balans tussen α - en β -cellen (tabel 3). Uit literatuur weten we dat in humane eilanden er veel celcontacten zijn tussen α - en β -cellen en dat dit contact resulteert in een verhoging van de insulinesecretie. Deze functionele verbinding tussen α - en β -cellen zou kunnen verklaren waarom de verhouding tussen α - en β -cellen behouden blijft in reactie op metabole veranderingen. In **hoofdstuk 5** zien we dat veranderingen in de α -celmassa plaatsvinden voordat deze in de β -celmassa zichtbaar worden in HVD-gevoede muizen. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat de ratio α - tot β -cellen in muizen die langdurig een ketogeen dieet ontvingen was verlaagd door een sterke reductie in de α -celmassa. Deze verandering kan een directe consequentie zijn van het ketogeen dieet of een aanpassingsreactie van de α -celmassa om zo de ontstane glucose-intolerantie tegen te gaan.

Een disbalans tussen glucagon en insuline is karakteristiek voor zowel type 1 als type 2 diabetes. Het suggereert dat het falen van zowel de β - als α -celadaptatie kan bijdragen aan de ontwikkeling van diabetes. Voor toekomstig onderzoek naar veranderingen in de β -celmassa is het daarom relevant om ook de α -celmassa te bestuderen.

Model	Soort	α -celmassa	Ratio α - tot β -cellen
Obesitas	Mensen	↑	=
HVD	Muizen	↓	=
GLP-1RA	Muizen	↓	=
HVD + GLP-1RA	Muizen	↓	=
KD	Muizen	↓	↓

Tabel 3. Veranderingen in de α -celmassa en de ratio α - tot β -cellen in obese vs. slanke mensen (Obesitas), HVD-gevoede vs. controle muizen (HVD), liraglutide-behandelde vs. controle muizen (GLP-1RA), liraglutide-behandelde HVD-gevoede vs. controle muizen (HVD + GLP-1RA), KD dieet-gevoede vs. controle muizen (KD). HVD = hoog-vet dieet, GLP-1RA = glucagon-like peptide 1 receptor agonist, KD = ketogeen dieet.

Onderzoek naar adaptatie mechanismen in humane eilandjes

Voor het bestuderen van β - en α -celadaptatie in humane eilandjes zijn we momenteel afhankelijk van histologische analyses van bipten die genomen worden bij een autopsie of na pancreatectomie. Dit is altijd een momentopname. Diermodellen bieden meer mechanistisch inzicht omdat β - en α -celadaptatie in reactie op metabole veranderingen op een gecontroleerde wijze en op verschillende tijdstippen bestudeerd kunnen worden. In aanvulling hierop zouden in vitro biotechnologische platforms een uitkomst kunnen bieden. Hierbij worden primaire humane eilandjes cellen gebruikt om de invloed van verschillende metabole stimuli en factoren

op de functie en overleving van eilandjes te bestuderen. Zo zouden we nieuwe mechanismen kunnen identificeren die betrokken zijn bij de adaptatie van β - en α -cellen. Momenteel is er echter geen assayplatform beschikbaar waarmee adaptatie van humane eilandjes gemeten kan worden. Daarom hebben we drie 'high-throughput' kweekplatformen opgezet met humane eilandjes om hiermee de functie van β -cellen te meten (**hoofdstuk 7**): (i) intacte humane eilandjes, en (ii) cellen afkomstig van uit elkaar gehaalde eilandjes gekweekt in een monolaag op extra-cellulaire matrix of (iii) gereaggregeerd in humane eilandjesclustertjes. De uit elkaar gehaalde eilandjescellen kunnen efficiënt worden getransduceerd met adeno- of lentivirussen. Uit elkaar gehaalde eilandjescellen die in clusters werden gekweekt leken qua functie het meest op intacte humane eilandjes. De platforms kunnen ook gebruikt worden om andere aspecten van de humane eilandjesadaptatie te bestuderen, zoals α -celfunctie, β - of α -celproliferatie en β - of α -celoverleving. De drie kweekplatforms kunnen bij toekomstig onderzoek gebruikt worden voor het screenen van virale shRNA-collecties of collecties van chemische moleculen om zo nieuwe mechanismen te identificeren die betrokken zijn bij β - en α -celadaptatie van humane eilandjes.