

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22040> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Geerling, Janine Janetta

Title: Central nervous system control of triglyceride metabolism

Issue Date: 2013-10-23

Een westerse levensstijl, gekenmerkt door een overvloed aan voedsel dat rijk is aan vet en suiker en een tekort aan fysieke activiteit, kan ertoe leiden dat het lichaam ongevoelig raakt voor insuline. Dit hormoon, dat door de alvleesklier wordt afgegeven, zorgt er onder andere voor dat de bloedsuikerspiegel in balans blijft. Wanneer het lichaam ongevoelig raakt voor insuline, kan dit leiden tot suikerziekte, ook wel diabetes type 2 genoemd, waarbij de bloedspiegel van zowel suiker (glucose) als insuline chronisch verhoogd is. Naast de suikerbalans is bij diabetes type 2 patiënten vaak ook de vetbalans in het bloed verstoord. Deze afwijking wordt ‘diabetische dyslipidemie’ genoemd en wordt gekarakteriseerd door een tekort aan ‘goed’ cholesterol in het bloed, gecombineerd met een overschot aan ‘slecht’ cholesterol en vetten, de zogeheten triglyceriden (TG). Diabetische dyslipidemie is een risicofactor voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten zoals aderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd.

De TG, bestaande uit drie vetzuurmoleculen (‘tri’) gekoppeld aan een glycerolmolecuul (‘glyceride’), vormen een belangrijke energiebron voor het lichaam. De afgifte van deze vetten in het bloed enerzijds, en de opname ervan door verschillende weefsels anderzijds, bepalen de TG balans in het bloed. De TG kunnen op twee manieren worden afgegeven in het bloed. Allereerst worden TG vanuit het voedsel opgenomen in de darmen. Omdat TG slecht oplosbaar zijn in bloed, worden ze eerst samen met cholesterol uit het voedsel verpakt in speciale deeltjes, zogeheten lipoproteïnen, voordat ze worden afgegeven in het bloed. In het geval van de darm worden deze deeltjes chylomicronen genoemd. Naast de darmen, is ook de lever in staat om TG te produceren. Deze TG worden, ook samen met onder andere cholesterol, verpakt in zogeheten zeer-lage dichtheids-lipoproteïnen (VLDL) en vervolgens afgegeven in het bloed. Omdat chylomicronen en VLDL voornamelijk TG bevatten, worden deze deeltjes ook wel TG-rijke lipoproteïnen genoemd. De vetzuren vanuit de TG-rijke lipoproteïnen kunnen worden opgenomen door verschillende weefsels, om vervolgens verbrand of opgeslagen te worden. Het hart en de skeletspieren verbranden vetzuren en zetten deze om naar energie. Het bruine vetweefsel verbrandt vetzuren om warmte te genereren en zodoende de lichaamstemperatuur op peil te houden. Daarentegen slaat het witte vetweefsel de vetzuren juist op en dient hiermee als een belangrijk reservedepot voor TG in ons lichaam. Als de TG inname het TG verbruik overstijgt zal het teveel aan TG opgeslagen worden in het witte vetweefsel. Dit kan uiteindelijk leiden tot de ontwikkeling van overgewicht en obesitas (beter bekend als zwaarlijvigheid of vetzucht). Als de opnamecapaciteit van het witte vetweefsel overschreven wordt, kan het vet zelfs worden opgeslagen in organen zoals de lever (‘steatose’), wat een risicofactor is voor atherosclerose.

Met de experimenten die beschreven zijn in dit proefschrift hebben we ons vooral gericht op de regulatie van de TG balans op het niveau van de lever, het witte vetweefsel en het bruine vetweefsel. Deze worden alle drie via zenuwen aangestuurd door de hersenen, met name door een specifiek hersengebied dat de hypothalamus heet. De hersenen en het ruggenmerg vormen samen het zogeheten centrale zenuwstelsel, alle zenuwen die daarbuiten liggen vormen het perifere zenuwstelsel. De zenuwen die de verschillende organen aansturen behoren tot het autonome deel van dit perifere zenuwstelsel. Het autonome zenuwstelsel kan verder opgedeeld worden in twee takken. De parasympatische tak reguleert de zogeheten

‘rest and digest’ (rusten en verteren) respons. Het zorgt ervoor dat het voedsel wordt verteerd en dat de hartslag wordt verlaagd en brengt daarmee het lichaam in een staat van rust en herstel. De sympathische tak daarentegen reguleert de zogeheten ‘fight or flight’ (vluchten of vechten) respons en brengt het lichaam in een staat van paraatheid, door bijvoorbeeld de hartslag te verhogen en energie vrij te maken voor de spieren. In **hoofdstuk 1** hebben we beschreven hoe dit sympathische zenuwstelsel, op het niveau van de lever, het witte vetweefsel en het bruine vetweefsel, de TG balans in het bloed beïnvloedt.

Naast haar rol in de handhaving van de bloedsuikerspiegel, is recent aangetoond dat insuline ook de TG balans in het bloed reguleert, door de opslag van vetzuren in het witte vetweefsel te verhogen. Omdat insuline de hersenen kan binnendringen en daar een effect uitoefent op de hypothalamus, hebben we in **hoofdstuk 2** onderzocht of de hersenen betrokken zijn bij het effect van insuline op de TG huishouding in wit vetweefsel. Een verhoging van het insulineniveau in het bloed had geen effect op onder andere de lever en het bruine vetweefsel, maar veroorzaakte een toename in de opslag van vetzuren specifiek in het witte vetweefsel. Toediening van insuline rechtstreeks in de hersenen had hetzelfde effect. Echter, wanneer we de insulinesignalering specifiek in de hersenen blokkeerden, zagen we dat een groot deel van het eerder genoemde effect van insuline op de vetzuuropslag in wit vetweefsel teniet werd gedaan. Hieruit concludeerden wij dat de hersenen inderdaad een belangrijke rol spelen in het effect van insuline op de TG huishouding in het witte vetweefsel.

De hypothalamus reguleert de energiebalans in het lichaam hoofdzakelijk via twee verschillende populaties van zenuwcellen (neuronen): neuronen die proopiomelanocortine/cocaïne- en amfetamine-gereguleerd transcript produceren en neuronen die neuropeptide Y (NPY)/agouti-gerelateerd eiwit produceren. Eerdere studies hebben aangetoond dat NPY de vethuishouding in de lever beïnvloedt, omdat NPY toediening in de hersenen van ratten leidde tot een verhoging van de VLDL-TG productie door de lever. Een verhoogde TG spiegel in het bloed zou uiteindelijk kunnen leiden tot het ontstaan van atherosclerose. Omdat ratten en muizen een andere vethuishouding hebben dan mensen waardoor zij van nature geen atherosclerose ontwikkelen, zijn er specifieke genetisch aangepaste muismodellen nodig om een dergelijk effect te kunnen bestuderen. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** allereerst onderzocht of NPY ook de VLDL-TG productie verhoogt in ‘gewone’ muizen. Ons uiteindelijke doel hierbij was om in één van onze speciale muismodellen te onderzoeken welke rol NPY in de hersenen heeft bij de ontwikkeling van atherosclerose. Bij deze experimenten injecteerden we NPY rechtstreeks in de hersenen van muizen en bestudeerden vervolgens de VLDL-TG productie door de lever. In tegenstelling tot de eerdere studies in ratten, zagen wij geen effect van centrale toediening van NPY op de VLDL-TG productie door de lever in onze muizen. Als controle hebben we tevens de voedselinname na centrale NPY toediening bekeken en deze werd, zoals eerder aangetoond, wel verhoogd door NPY. Het aantonen van dit verschil in de effecten van NPY tussen ratten en muizen, specifiek voor de VLDL-TG productie door de lever, is naar onze mening erg belangrijk voor verdere dierstudies naar het effect van de hersenen op de regulatie van de VLDL-TG productie door de lever.

Naast insuline is ook het hormoon glucagon-gelijkend peptide-1 (GLP-1) betrokken bij de regulatie van de bloedsuikerspiegel. GLP-1 voert zijn functie uit door te binden aan de GLP-1 receptor, een eiwit dat aan de buitenkant van een groot aantal cellen zit en dat specifiek reageert op GLP-1. Activatie van de GLP-1 receptor door middel van synthetische GLP-1 analoga leidt tot een verbetering van de glucosehuishouding. Recent is aangetoond dat deze analoga in zowel mensen als muizen ook de TG niveaus in het bloed verlagen en hiermee dus een gunstig effect hebben op niet alleen de glucose- maar ook op de TG huishouding. In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar het effect van GLP-1 receptoractivatie op de VLDL-TG productie door, en de TG huishouding in, de lever. Hiervoor hebben we een speciaal muismodel gebruikt, de APOE*3-Leiden transgene muis waarin de vethuishouding meer vergelijkbaar is met de situatie in de mens. Alle muizen werden gevoed met een vetrijk dieet. Gedurende vier weken werd door middel van een onderhuids geplaatst minipompje een groep muizen chronisch behandeld met de GLP-1 analoog exendin-4, een tweede groep met de GLP-1 analoog CNTO3649, en een laatste groep werd behandeld met fysiologisch zout (controle). Na vier weken van behandeling hebben we de VLDL-TG productie en de vethuishouding in de lever bestudeerd. Beide GLP-1 analoga verbeterden de glucose-huishouding en verlaagden de VLDL productie door de lever. Daarnaast verlaagde de behandeling de vetinhoud van de lever en de expressie van genen die betrokken zijn bij de aanmaak van TG in de lever. Deze data bieden de hoop dat behandeling met GLP-1 analoga, naast een verbetering in de glucosehuishouding, ook kan leiden tot een verbetering van diabetische dyslipidemie en een verlaging in leververvetting in type 2 diabetes patiënten.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of de door exendin-4 geïnduceerde verlaging van de VLDL-TG productie door de lever afhankelijk is van de hoeveelheid vet in het dieet of van de activatie van GLP-1 receptoren in de hersenen. Om de effecten van de hoeveelheid vet in het dieet te onderzoeken, werd de helft van de muizen gevoed met een vetrijk dieet (HFD), terwijl de andere helft een vetarm dieet (LFD) ontving. In beide groepen werd de helft van de muizen gedurende vier weken behandeld met exendin-4 en de andere helft met fysiologisch zout (controle), door middel van een onderhuids geplaatst minipompje. Op deze manier konden we vier verschillende groepen bestuderen: HFD/exendin-4, HFD/controle, LFD/exendin-4 en LFD/controle. Na vier weken van behandeling hebben we in deze groepen de VLDL-TG productie door de lever gemeten. Hieruit bleek dat exendin-4 de VLDL-TG productie niet alleen verlaagd in HFD, maar ook in LFD gevoede dieren. Om de rol van GLP-1 receptoren in de hersenen te bestuderen, hebben we bij HFD gevoede muizen een infusiesysteem in de hersenen geïmplantéerd, welke verbonden was aan een minipompje dat onderhuids werd geplaatst. Op deze manier konden we de dieren specifiek in hun hersenen continue behandelen met een remmer van de GLP-1 receptor (exendin-9), of met een controlestof. Na een week van herstel ontvingen de dieren een tweede, tevens onderhuids geplaatst, minipompje waarmee exendin-4 of fysiologisch zout (controle) onderhuids werd toegediend. Op deze manier konden we vier groepen bestuderen: dieren die alleen controlestof ontvingen, dieren die alleen exendin-9 ontvingen in de hersenen, dieren die alleen exendin-4 onderhuids ontvingen en dieren die zowel exendin-9 in de

hersenen als exendin-4 onderhuids ontvingen. Vier weken na de start van de infusie in de hersenen hebben we de VLDL-TG productie door de lever gemeten. Zoals verwacht, werd de VLDL-TG productie verlaagd door exendin-4. Er was echter geen verschil te zien in VLDL-TG productie tussen de dieren die alleen exendin-4 ontvingen en de dieren waarbij de GLP-1 receptor in de hersenen geblokkeerd werd. Uit deze gecombineerde resultaten maakten wij daarom op dat het verlagende effect van exendin-4 op de VLDL-TG productie door de lever niet afhankelijk is van de hoeveelheid vet in het dieet, noch van de activatie van GLP-1 receptoren in de hersenen.

Leververvetting kan, in combinatie met een infiltratie van ontstekingscellen in de lever, leiden tot de ontwikkeling van niet-alcoholische steatohepatitis (NASH; vervetting-gerelateerde leverontsteking). De ontwikkeling van NASH deelt een aantal gemeenschappelijke ontstekingsmechanismen met atherosclerose en beide aandoeningen worden daarom wel eens genoemd als zijnde 'twee zijden van eenzelfde munt'. In hoofdstuk 4 hebben we laten zien dat exendin-4 leververvetting tegengaat. Tevens is recent in proefdieren aangetoond dat de ontwikkeling van atherosclerose kan worden geremd door een behandeling met exendin-4. Het effect van exendin-4 op de ontwikkeling van NASH is echter nog onbekend. Daarom hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht wat het effect van exendin-4 is op de ontwikkeling van zowel NASH als atherosclerose. Hiervoor hebben we wederom een speciaal muismodel gebruikt, ditmaal de APOE*3-Leiden.CETP transgene muis, die gevoed werd met een Westers dieet dat naast vet ook cholesterol bevatte. Deze dieren werden, wederom met behulp van een onderhuids geplaatst minipompje, behandeld met exendin-4 of fysiologisch zout (controle). Na een behandeling van vier weken werden verschillende parameters voor NASH en atherosclerose gemeten. Hoewel het effect op de vetspiegels in het bloed slechts klein was, veroorzaakte exendin-4 een sterke verlaging van de ontwikkeling van atherosclerose. Daarnaast verlaagde exendin-4 de cholesterolinhoud van de lever, troffen we hier minder ontstekingscellen aan en werden er minder ontstekingscellen vanuit het bloed aangetrokken naar de lever. Dit alles geeft aan dat exendin-4 inderdaad de ontwikkeling van NASH kan remmen. We concludeerden daarom dat exendin-4 naast de ontwikkeling van atherosclerose ook de ontwikkeling van NASH kan tegengaan. Exendin-4 zou daarom een waardevol medicijn kunnen zijn om patiënten te behandelen die lijden aan zowel NASH als hart- en vaatziekten zoals atherosclerose.

Net als GLP-1 analoga verlaagt ook metformine, het medicijn dat altijd als eerste wordt toegepast bij de behandeling van type 2 diabetes, de VLDL-cholesterol en VLDL-TG spiegels in het bloed. Hoe metformine dit precies doet was nog niet bekend. In **hoofdstuk 7** hebben we daarom geprobeerd om het moleculaire mechanisme achter deze verlaging te ontrafelen. Hiervoor hebben we wederom APOE*3-Leiden.CETP muizen gebruikt die gevoed werden met een Westers dieet dat zowel vet als cholesterol bevatte. We hebben eerst laten zien dat metformine ook in deze muizen zorgde voor een sterke verlaging van de VLDL-cholesterol en VLDL-TG spiegels in het bloed. Deze regulatie van de TG spiegel gebeurde echter niet op het niveau van de lever, aangezien metformine geen effect had op de VLDL-TG productie. Wel verhoogde metformine de opname van TG door het bruine vetweefsel. Dit effect ging samen met een verhoging van het aantal mitochondriën in dit weefsel, de

‘energiefabriekjes’ waarin de opgenomen vetzuren worden omgezet in warmte. Op basis van deze resultaten konden we concluderen dat metformine de TG niveaus in het bloed kan verlagen door de opname van TG in het bruine vetweefsel, en vervolgens de verbranding van de vetzuren, te verhogen. Hiermee hebben we het bruine vetweefsel geïdentificeerd als een belangrijke, nieuwe speler in het TG-verlagende effect van metformine. Het bruine vetweefsel zal daarom een interessant nieuw doelwit zijn voor de toekomstige behandeling van diabetische dyslipidemie.

Apolipoproteïne AV (APOA5) speelt ook een rol in de TG huishouding. Eerder is aangetoond dat ApoAV de opname van VLDL-TG door verschillende weefsels kan verhogen. Dat verklaarde waarom in muizen die een gebrek hebben aan (functioneel) APOA5 een verhoging van TG spiegels in het bloed te zien is. Omdat deze dieren, door het gebrek aan APOA5 waarschijnlijk minder TG kunnen opnemen in hun vetweefsel, veronderstelden wij dat deze dieren ongevoelig zouden zijn voor de ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas. In **hoofdstuk 8** hebben we daarom gekeken naar de rol die APOA5 speelt in de ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas, door zowel controlemuizen als muizen met een gebrek aan APOA5 (*Apoa5*^{-/-}) te voeden met een HFD. In tegenstelling tot wat we verwachtten, werden *Apoa5*^{-/-} muizen op een HFD juist meer obese ten opzichte van de controlemuizen, wat verklaard kon worden door een verhoogde voedselinname. Wanneer in deze dieren de APOA5-productie door de lever hersteld werd, verdween het effect op de voedselinname. Daarnaast zorgde injectie van APOA5 in het bloed of in de hersenen van controlemuizen voor een verlaging van de voedselinname. We hebben met deze studie laten zien dat APOA5 een rol speelt in de regulatie van voedselinname door de hersenen en hiermee een nieuwe functie beschreven voor dit apolipoproteïne, naast haar reeds bekende effect op de TG huishouding.

In **hoofdstuk 9** hebben we de resultaten uit dit proefschrift in het licht gesteld van de in **hoofdstuk 1** beschreven sympathische aansturing van de lever, het witte vetweefsel en het bruine vetweefsel en hebben de mogelijkheden besproken waarop het sympathisch zenuwstelsel de in dit proefschrift beschreven effecten zou kunnen mediëren. Daarnaast hebben we nieuwe therapeutische mogelijkheden beschreven waarmee dyslipidemie behandeld kan worden door deze te richten op het sympathisch zenuwstelsel. Samenvattend geven de studies in dit proefschrift meer inzicht in de rol die de hersenen spelen in de TG huishouding in het kader van diabetische dyslipidemie. We hebben meer kennis vergaard over de rol van twee hormonen, insuline en GLP-1, in de productie en opname van TG. Tevens hebben we een nieuwe functie beschreven voor APOA5 in de regulatie van de voedselinname door de hersenen. Daarnaast hebben we een belangrijk verschil beschreven tussen ratten en muizen, met oog op de rol die NPY in de hersenen speelt in de regulatie van de VLDL-TG productie door de lever. Dit verschil kan erg belangrijk kan zijn voor toekomstige dierstudies binnen dit specifieke onderzoeksgebied. Tenslotte hebben we het mechanisme achter het TG-verlagende effect van twee veelgebruikte medicijnen voor de behandeling van diabetes, metformine en exendin-4, gedeeltelijk ontrafeld en hebben hiermee nieuwe therapeutische mogelijkheden voor deze medicijnen geboden.