

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33222> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Braak, Bas ter

Title: Carcinogenicity of insulin analogues

Issue Date: 2015-06-18

Samenvatting

◀ IN THE PICTURE

DNA is a molecule that encodes the genetic instructions of all living organisms. Small changes in this molecule may have big consequences on biological processes. A scientist can make specific mutations to unravel the function of specific parts (or genes) of this molecule. In the picture, gel electrophoresis equipment is presented. This machine makes use of an electrical current to separate fractions of the DNA molecule. The blue line represents large fragments and in the yellow line smaller fractions are present.

◀ IN BEELD

DNA is een molecuul waarin alle genetische informatie is opgeslagen van alle organismen. Kleine veranderingen in dit molecuul kunnen grote biologische effecten teweeg brengen. Een onderzoeker kan specifieke mutaties maken om de functie van delen van dit molecuul (genoemd 'genen') te achterhalen. Op de foto is een elektroforese apparaat te zien. Met behulp van dit apparaat kunnen stukjes van het DNA molecuul op grootte worden gescheiden. In de blauwe lijn op de foto zitten grote fragmenten van het DNA, in de gele de kleine.

Wereldwijd zijn er momenteel meer dan 380 miljoen diabetes patiënten en door de westerse levenswijze denkt men dat dit aantal de komende jaren fors gaat toenemen. Al deze patiënten zullen uiteindelijk medicijnen moeten gebruiken om hun bloedglucosewaarden op pijl te houden. Een veel gebruikte behandeling is een dagelijks injectieregime van de zogenaamde insuline analogen. Dit zijn moleculen die op moleculair niveau heel veel op normale insuline lijken, maar kleine mutaties hebben grote gevolgen op de werkingsduur van het insuline molecuul. Zo zijn er kort en lang werkende insuline analogen. Insuline glargine (LANTUS) is een voorbeeld van een lang werkend insuline analoog en wordt wereldwijd door miljoenen mensen gebruikt. Drie kleine mutaties in het glargine molecuul hebben ervoor gezorgd dat het na injectie langzaam opgenomen wordt door het menselijk lichaam waardoor het slechts eenmaal per dag gebruikt hoeft te worden door de diabetes patiënt. Deze mutaties hebben er echter ook voor gezorgd dat het molecuul naast een hoge affiniteit voor de insuline receptor (IR) ook een verhoogde affiniteit voor de insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) heeft. Waar de IR voornamelijk betrokken is bij de metabole effecten (zoals glucose opname) heeft de IGF1R een grote rol in de mitogene effecten (zoals cel deling en groei). Verschillende patiëntenstudies hebben inderdaad de link gelegd tussen het gebruik van glargine en een hogere kans op het krijgen van kanker, met name borstkanker, terwijl andere studies dit effect niet hebben gevonden. De interpretatie van dergelijke patiëntenstudies is vaak erg lastig omdat diabetes zelf al een verhoogd risico vormt voor het ontwikkelen van kanker. Daarnaast worden vaak belangrijke patiënten gegevens (leeftijd, geslacht, leefgewoonten, duur en dosis van insuline behandeling) niet meegenomen in de interpretatie van deze studies terwijl deze factoren grote effecten kunnen hebben op het risico op het ontwikkelen van kanker. Een studie waarbij de invloed van deze mogelijke factoren wordt uitgesloten, en waar slechts de insulinebehandeling verschilt, zou deze tekortkomingen verhelpen. Helaas zijn dergelijke studies schaars en omvatten tot nu toe niet genoeg patiënten. Het directe mitogene effect van deze moleculen zou ook bepaald kunnen worden met in vitro experimenten waarbij het aantal celdelingen wordt gekwantificeerd door gebruik te maken van cellijnen. Er zijn momenteel ongeveer 50 studies in de literatuur bekend die dergelijke experimenten beschrijven. De resultaten van deze in vitro studies zijn daarnaast vaak tegenstrijdig, voornamelijk omdat ze een verschillende methodologie gebruiken. Daarnaast kunnen enkele parameters niet bestudeerd worden door middel van dergelijke studies. Om de kankerverwekkende eigenschappen van insuline analogen in een levend wezen te bepalen is het helaas onvermijdelijk in vivo experimenten uit te voeren. Bij dergelijke experimenten worden dieren, in veel gevallen muizen of ratten, geïnjecteerd met een hoge dosis van een bepaalde stof. Vervolgens wordt gekeken of bij deze dieren de tumor eigenschappen (incidentie, type, grote etc.) beïnvloed zijn. Studies die dieren chronisch hebben blootgesteld aan insuline analogen zijn in aantal zeer gering maar hebben er wel toe geleid dat een bepaalde insuline analoog, AspB10, nooit op de markt is gekomen omdat er een verhoogde tumor incidentie werd waargenomen.

De hoge kosten van dergelijke studies is zeer waarschijnlijk de reden van deze schaarste. De organisatie die verantwoordelijk is voor de toelating van nieuwe medicijnen op de Europese markt, EMA, heeft onlangs aangegeven hoe men beter en doelgerichter onderzoek kan doen naar de kankerverwekkende eigenschappen van insuline analogen. In deze thesis is beschreven hoe wij, gebaseerd op dit document, gedurende 4 jaar onderzoek hebben gedaan naar deze stoffen.

Om iets nieuws te onderzoeken met men eerst weten wat er al is gedaan. Daarom zijn we begonnen met het uitvoeren van een uitgebreid en systematisch literatuuronderzoek, welke beschreven staat in **hoofdstuk 2**. In dit review hebben we resultaten van zowel patiëntenstudies, *in vitro*- als *in vivo*- studies opgenomen en hebben we ons gericht op de blootstelling aan insuline analogen in relatie tot borstkanker. Hierin kwam naar voren dat studies in veel gevallen slecht zijn opgezet en niet de juiste positieve en negatieve controles hanteren. Daarnaast zijn er niet genoeg *in vivo* studies uitgevoerd om uitsluitel te kunnen geven over de mitogene potentiaal van deze moleculen in een levend organisme.

In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe wij nieuwe cellijnen gegenereerd hebben om de mitogene potentiaal te kunnen bepalen van alle commerciële insuline analogen. Met dit celsysteem was het mogelijk om de betrokkenheid van de verschillende receptoren te kunnen bepalen. Glargine bleek op korte termijn mitogene signaal transducerende cascades te induceren vooral via de IGF1R. Maar dit leidde er niet toe dat op langere termijn veel meer cellen aanwezig waren in vergelijking tot de insuline blootstelling. Uiteindelijk bleek dat glargine in deze langdurige experimenten afgebroken werd in bepaalde moleculen met een lage mitogene potentiaal. Deze bevinding is ook klinisch van groot belang omdat deze omzetting ook in het menselijk lichaam blijkt plaats te vinden.

Hetzelfde celsysteem wordt gebruikt in de experimenten beschreven in **hoofdstuk 4**. Hier hebben we geprobeerd om op transcriptioneel niveau te achterhalen welke genen betrokken zijn bij de verhoogde mitogeniteit van enkele insuline analogen. Vervolgens hebben we de expressie van deze twintig genen gebruikt om de mitogene potentiaal van andere insuline analogen te voorspellen. Het voorspellend vermogen bleek hoog en stabiel in verschillende modellen. We hopen dat dit systeem overgenomen kan worden door de farmaceutische industrie om vroeg in het ontwikkelingsproces de mitogene bijwerkingen van nieuwe medicijnen te ontdekken.

Eerder hebben we aangegeven wat het belang is van het uitvoeren van experimenten waarbij een levend organisme chronisch wordt blootgesteld aan insuline analogen. In **hoofdstuk 5**, beschrijven we een dergelijk experiment. Hierbij hebben we een speciaal muismodel gebruikt met een genetische achtergrond waarbij ze spontaan humaan relevante borsttumoren ontwikkelen. Wij hebben gekeken hoe chronische blootstelling aan insuline analogen verschillende parameters van de tumorontwikkeling beïnvloedt. Zo hebben we kunnen vaststellen dat na frequente AspB10 en IGF1 injectie de tumoren significant eerder ontstonden.

Ook konden we meten dat de mitogene signaaltransductie in deze tumoren verhoogd was. Dit laatste was ook het geval bij enkele tumoren uit de glargine injectie groep.

In het laatste experimentele hoofdstuk, **hoofdstuk 6**, hebben we de tumoren uit het bovengenoemd experiment verder onderzocht. Door gebruik te maken van een nieuwe techniek konden we het gehele transcriptoom van de tumoren onderzoeken. We kwamen erachter dat verschillende parameters die belangrijk worden geacht in de ontwikkeling van een tumor beïnvloed waren door de langdurige insuline analogen (AspB10) blootstelling. Zoals verwacht had chronische blootstelling aan insuline analogen geen direct effect op de stabiliteit van DNA in de tumoren.

Kortom, het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven staat, toont aan dat glargine zelf een verhoogde mitogene potentiaal heeft, maar dat er geen directe aanwijzingen zijn dat dit ook leidt tot een verhoogd risico op het ontwikkelen van kanker in een levend organisme. Alle andere commerciële insuline analogen bleken geen verhoogde celdeling te induceren in vergelijking met normaal humaan insuline. Meer onderzoek op dit vlak is zeker nodig en we hopen dat de kennis die we hier hebben opgedaan in de toekomst zal leiden tot het verbeteren van de mitogeniteitstesten door de farmaceutische industrie. Door het gebruik van slimme modellen en een goed doordachte methodologie kan men grote stappen zetten in het kankeronderzoek.

