

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20903> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Auvinen, Hanna Elina

Title: Glucocorticoids, metabolic adaptations and recovery : studies in specific mouse models

Issue Date: 2013-05-23

7

NEDERLANDSE SAMENVATTING
ACKNOWLEDGEMENTS
LIST OF PUBLICATIONS
CURRICULUM VITAE

Nederlandse samenvatting

In de huidige westerse maatschappij die gekenmerkt wordt door weinig lichaamsbeweging en fastfood, komen overgewicht, type 2 diabetes (T2D) en hart-en vaatziekten en de complicaties daarvan steeds vaker voor. Tegelijkertijd is de waargenomen maatschappelijke stress factor door de 24-uurseconomie erg toegenomen. Er wordt gepostuleerd dat chronische stress, of dit nu maatschappelijk, sociaal, of door welke andere oorzaak dan ook, leidt tot disfunctie van de hypothalamus-hypofyse-bijnier (HPA) as en dat dit betrokken is bij de ontwikkeling van het metabool syndroom. Een duidelijk voorbeeld hiervan zijn patiënten met het syndroom van Cushing die veel kenmerken hebben van het metabool syndroom en ook veel manifestaties hebben van hart-en vaatziekten. Het is echter onduidelijk wat de effecten zijn van (de ontwikkeling van) het metabool syndroom op de activiteit van de HPA as, en anderszins, wat de effecten zijn van overmatige blootstelling aan cortisol op het metabolisme. De geïnduceerde metabole veranderingen zoals deze gezien worden bij patiënten met het syndroom van Cushing zijn overduidelijk, maar zijn heel moeilijk te evalueren bij de mens.

Het eerste deel van het proefschrift beschrijft in specifieke muizenmodellen de effecten van het vetgehalte in het dieet op de basale, dus niet gestimuleerde, activiteit van de HPA as, daar gesuggereerd is in de literatuur dat dit betrokken is in de pathofysiologie van het Metabool syndroom. In **hoofdstuk 2** is een systematische review verricht gebruik makende van de belangrijkste elektronische databases, te weten: PubMed, EMBASE, Web of Science, the Cochrane database, en Science Direct. De primaire onderzoeksvraag was het effect te evalueren van studies die in muizen hebben gekeken naar de effecten van een hoog vetdieet op de activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as. We includeerden alleen originele muizenstudies die parameters van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as beschreven na hoog vet dieet, en daarbij minstens een basale corticosteron spiegel vermelden met een adequate controle groep. Studies die gebruik maakten van muizen na adrenalectomie, alleen transgene muizen, een hoog vet dieet voor minder dan 2 weken, of behalve een hoog vet dieet ook andere interventies rapporteerden, werden geëxcludeerd. Alle studies werden beoordeeld door twee onderzoekers. We vonden twintig studies die voldeden aan de inclusie criteria, waarbij echter de evaluatie van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as de primaire onderzoeksvraag was in slechts 5 van deze studies. De plasma corticosteron concentraties na dietaire interventie waren onveranderd in 40%, verhoogd in 30%, en verlaagd in 20% van de studies. Ook de effecten in de perifere weefsels en in het centrale zenuwstelsel waren niet consistent en werden slechts onderzocht in een klein aantal studies. Er waren echter tussen de studies grote verschillen in de gebruikte muizenstammen, experimentele condities, en de samenstelling en duur van het dieet. Uit deze studie komt dus duidelijk naar voren dat gegevens over de effecten van hoog vet dieet op de basale activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as in muizen beperkt zijn en niet-conclusief. Verschillen in experimentele condities maken een betrouwbare vergelijking erg moeilijk en benadrukken de noodzaak van gestandaardiseerde evaluaties om een betrouwbare evaluatie van de effecten van dieet geïnduceerde obesitas op de activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as mogelijk te maken. Daarom is het absoluut noodzakelijk de studie design hierop af te stemmen en moet tevens ook nog rekening worden gehouden met de volgende factoren: de keuze voor een specifieke muismodel (welke genetische achtergrond), de duur- en de samenstelling van het dieet, en standaardisatie van de huisvesting van de diertjes met de mogelijkheid om voor de start van het experiment te kunnen wennen aan de nieuwe

omgeving. Tot slot moeten ook methoden toegepast worden die het mogelijk maken om 'stress vrij' bloedmonsters af te kunnen nemen (de zgn sampling voor bepaling van corticosteron en/of ACTH) en moet ook rekening worden gehouden met het tijdstip van sampling.

In **hoofdstuk 3** hebben we de in hoofdstuk 2 voorgestelde studie design toegepast met als doel de basale, dus niet gestreste, activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as te bestuderen in muizen tijdens de ontwikkeling van obesitas. De ontwikkeling van veel voorkomende kenmerken van het metabool syndroom, zoals insuline resistentie en obesitas kunnen gemakkelijk gestimuleerd worden met behulp van hoog-vet dieet in diermodellen van dieet geïnduceerde obesitas (DIO). In deze studie kregen mannelijke C57Bl/6J muizen een hoog- of laagvet dieet voor een periode van 12 weken waarbij de activiteit van HPA-as gemeten werd door middel van bepaling van de plasma corticosteron concentraties op een aantal vaste tijdstippen van de dag (om 07.00, 12.00, en om 18.00 h) elke twee weken. Daarnaast werd in het centrale zenuwstelsel de activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as aan het einde van het experiment gemeten aan de hand van de mRNA expressie van corticotropine-releasing hormone (CRH) en glucocorticoïd receptor (GR) in de hippocampus, de amygdala, en in de hypothalamus, alsook in de perifere weefsels middels de expressie van 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 en -2 (11β -HSD-1 en -2) in vetweefsel en in de lever. Binnen 1 week na start van het HFD was het lichaamsgewicht al significant hoger dan in de controle groep, hetgeen gepaard ging met significant lagere corticosteron concentraties om 12.00 en 18.00 uur. Deze verlaagde waarden persisteerden gedurende de hele periode van 12 weken. Aan het einde van het experiment (na 12 weken HFD) werden ook veranderingen waargenomen in de centrale aansturing van de HPA as: de expressie van CRH mRNA in de PVN en amygdala en GR mRNA in de PVN was om 9.00 uur verlaagd, terwijl deze om 18.00 uur in de PVN en amygdala juist verhoogd was, alsook de GR mRNA expressie in een deel van de hippocampus (de CA1 regio). De 11β -HSD-1 expressie in het vetweefsel was om 9.00 en 18.00 uur verlaagd zowel in het gonadale-, visceraal- en subcutane vet, terwijl de hepatische 11β -HSD-1 expression om 18.00 uur verhoogd was, zonder detecteerbare veranderingen in 11β -HSD-2 expressie. Dus door het toepassen van een gestandaardiseerde, zgn "stress free" study design, is het mogelijk om de werkelijke effecten van een simpele interventie zoals een HFD op de basale activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as te onderzoeken. Deze studie toont aan dat HFD complexe veranderingen induceert in de diurnale regulatie van de verschillende componenten van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as. Deze veranderingen worden niet overwegend gekenmerkt door verhoogde, maar juist door een verlaagde activiteit van de HPA as, die zeer waarschijnlijk adaptieve veranderingen weerspiegelen.

Het tweede gedeelte van het proefschrift richtte zich op de effecten van glucocorticoiden op het metabolisme. Het referentiekader hiervoor zijn waarnemingen bij patiënten met het syndroom van Cushing, waar blootstelling aan cortisol excess, is geassocieerd met kenmerken van het metabool syndroom (MetS), zoals insuline resistentie, abnormale vet distributie en dyslipidemia en hart- en vaatziekten. Deze veranderingen blijken gegeven recentelijk onderzoek te persisteren zelfs als patiënten al langdurig in remissie zijn na correctie van het cortisol excess. Bovendien is de rol van glucocorticoiden in de ontwikkeling van atherosclerosis nog niet duidelijk. Humane studies laten een duidelijke associatie zien tussen glucocorticoïd excess en hart- en vaatziekten; maar de meeste diermodellen wijzen op een remmend effect van glucocorticoiden op de ontwikkeling van atherosclerose. Echter, deze diermodellen weerspiegelen noch de lange-termijn effecten van langdurige endogene GC overexpositie zoals sprake is bij de mens, noch benaderen ze een humaan lipoproteïne metabolisme.

In **hoofdstuk 4** hebben we de effecten onderzocht van een periode van glucocorticoid excess op insuline gevoeligheid en lichaamssamenstelling. Het doel was om factoren te identificeren die het metabole herstel na een periode van glucocorticoid excess moduleren. Voor dit onderzoek gebruikten we mannelijke C57Bl/6J muizen, die dan wel een hoog- (HFD) of laag vetdieet (LFD) gevoerd werden, en daarnaast corticosteron (CORT) (50µg/ml) of vehicle kregen dat toegevoegd werd aan het drinkwater voor 4 weken, gevolgd door een 'washout' periode van 8 weken. Bloedmonsters voor de bepaling van circadiane plasma spiegels van corticosteron, lipiden, insuline, en glucose werden op reguliere tijdsintervallen afgenomen. De insulinegevoeligheid werd bepaald met behulp van een hyperinsulinemische-euglycemische clamp en lean body- en vetmassa werd geanalyseerd na 12 weken. We vonden dat de toevoeging van corticosteron aan het drinkwater resulteerde in verhoogde plasma corticosteron concentraties, alsook in een verhoogde voedselinname en verhoogde plasma insuline en lipiden concentraties. Het stoppen van de toevoeging van corticosteron aan het drinkwater normaliseerde de corticosteron concentraties, de voedselinname en het lichaamsgewicht. Acht weken na staken van de corticosteron toediening waren de insuline concentraties nog steeds significant hoger met beide dieten dan in het controle experiment en was bij corticosteron behandelde muizen op HFD tevens nog steeds sprake van persisterende verminderde lean body mass en een hogere vetmassa. Het lijkt er dus op dat een periode van corticosteron excess langdurige metabole veranderingen induceert, waarbij de veranderingen in lichaamssamenstelling alleen optreden in aanwezigheid van een HFD. Deze observaties wijzen op dieet-afhankelijke effecten van corticosteron die mogelijk bij zouden kunnen dragen aan het persisterende afwijkende cardiovasculaire risicoprofiel zoals gezien wordt bij patiënten behandeld voor het syndroom van Cushing, en mogelijk dan ook bij individuen die bloot staan aan chronische stress. In **hoofdstuk 5** zijn de effecten van glucocorticoidexcess, zowel passagère als continue toediening, onderzocht op de ontwikkeling van atherosclerose in een specifiek muismodel met een lipoproteïne metabolisme die vergelijkbaar is met die bij de mens, namelijk vrouwelijke APOE*3-Leiden.CETP (E3L.CETP) muizen, en die atherosclerose ontwikkelen na blootstelling aan een zgn 'Western-type' diet. Een dergelijk Western-type dieet bevatte voor dit experiment 0.1% cholesterol en duurde 20 weken. Na 3 weken werden de muizen gematched voor leeftijd, plasma cholesterol concentraties, triglyceriden en fosfolipiden alsook lichaamsgewicht, en kregen ze corticosteron (50 µg/ml) in het drinkwater voor of 5 weken (transient groep) of 17 weken (continue groep), of ze kregen alleen drinkwater zonder corticosteron (controle groep). Aan het einde van de studie, werd de ernst van atherosclerose en de grootte van de atherosclerotische plaque gemeten in de aortaboog. Tevens werd het aantal monocytën aan het endotheel vastgelegd alsook het aantal macrofagen in de plaque. We vonden dat corticosterone behandeling het lichaamsgewicht en voedselinname verhoogde voor de gehele duur van de behandeling en op de lange-termijn de vetmassa verhoogde in beide behandelgroepen. Zowel in de 'transient' als in de 'continue' groep verlaagde corticosteron behandeling het totale oppervlakte van de atherosclerotische lesie in dezelfde mate blijkbaar onafhankelijk van het cholesterol daar de plasma cholesterol concentraties niet lager werden. Na continue behandeling werd tevens een reductie van het aantal macrofagen in de plaque gevonden en eenzelfde trend was aanwezig na 'transient' behandeling. Hieruit kunnen we concluderen dat sterk verhoogde blootstelling aan corticosteron in muizen met een humaan lipoproteïne metabolisme gunstige en langdurige effecten heeft op atherosclerose, maar negatief de vetdistributie en insuline gevoeligheid beïnvloedt, door vetstapeling te faciliteren op de langetermijn. Dit betekent dat de sterke associatie tussen

atherosclerose en glucocorticoid excess zoals geobserveerd wordt bij de mens mogelijk niet gerelateerd zijn aan cortisol *per se*, maar het resultaat kunnen zijn van complex effecten van cortisol op het endotheel en/of op de stollingsactivatie.

Samenvattend dragen deze studies bij aan het begrijpen van de rol van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as en glucocorticoiden in de pathofysiologie van het metabool syndroom, maar illustreren ook dat er effecten zijn van dieet geïnduceerde obesitas op de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as. De studies in dit proefschrift laten duidelijk zien dat voor een betrouwbare evaluatie van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as, een geschikte studie design een absolute voorwaarde is. Dan wordt zichtbaar dat een hoog vet gehalte in het dieet de activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as onderdrukt, hetgeen waarschijnlijk een adaptatie is om de dieet-geïnduceerde ontwikkeling van insuline resistentie en obesitas tegen te gaan, niet alleen in perifere weefsels maar ook in het central zenuwstelsel. Bovendien tonen we in dit proefschrift aan dat een periodieke blootstelling aan hoge corticosteron spiegels langdurige gunstige effecten heeft op atherosclerose, maar tegelijkertijd negatief de lichaamssamenstelling beïnvloedt en, vetstapeling en insuline resistentie bevordert, hetgeen nog meer versterkt worden door een hoog- vet dieet.

De in dit proefschrift gepresenteerde bevindingen zijn voor een breed publiek relevant: eenieder moet leren omgaan met een toenemend aantal hedendaagse dagelijkse stressoren, zoals sociale stress, slaapstoornissen, de consumptie van “comfort food” maar ook “emotional eating” dat de ontwikkeling van obesitas, het metabool syndroom, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten faciliteert. Bovendien geven enkele van deze bevindingen klinische relevante aanknopingspunten voor artsen en patienten als steroïden voorgeschreven dienen te worden voor uiteenlopende indicaties, daar een preventief dieetadvies bij zou kunnen dragen aan verbetering van het metabool profiel en kwaliteit van leven.