

2014•2015
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Impact van nutriënsensoren in het maagdarmstelsel in de metabole herprogrammering na maagbypasschirurgie

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
prof. dr. INGE DEPOORTERE
Mevr. SANDRA STEENSELS

Thomas Swennen

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2014•2015
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Impact van nutriëntsensoren in het maagdarmstelsel in de
metabole herprogrammering na maagbypasschirurgie

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
prof. dr. INGE DEPOORTERE
Mevr. SANDRA STEENSELS

Thomas Swennen

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

Woord vooraf

Zonder begeleiding, hulp en steun is het onmogelijk om een thesis af te werken. Daarom zou ik graag in dit woord vooraf iedereen willen bedanken die me rechtstreeks of onrechtstreeks heeft geholpen.

Ten eerste wil ik mijn promotor Inge Depoortere bedanken om stage te mogen lopen in haar labo en voor het zeer interessante onderwerp van deze masterproef. De ervaring die ik hier heb mogen opdoen is van zeer grote waarde.

Ten tweede wil ik graag mijn begeleidster Sandra Steensels bedanken voor de dagelijkse steun en begeleiding. De waardevolle adviezen en technieken die ze me heeft aangeleerd tijdens de stage zullen me niet snel ontgaan. Ik bedank haar voor het vertrouwen, de tijd die ze voor me vrijmaakte en de talloze vragen die ik telkens mocht stellen.

Als derde wil ik ook graag Leen bedanken voor al die keren dacht ik haar lastig mocht vallen met vragen en uiteraard ook dank aan de andere studenten Anouk, Dries en Valerie voor de leuke pauzes!

Tenslotte wil ik graag mijn ouders bedanken voor de steun en het vertrouwen. Mede dankzij hen heb ik mijn studies tot een goed einde kunnen brengen. Ook wil ik mijn vrienden en medestudenten bedanken voor de mooie studentenjaren en de, af en toe, nodige afleiding.

Inhoudsopgave

Woord vooraf	1
Inhoudsopgave	3
Lijst van tabellen	7
Lijst van figuren	9
Verklarende woordenlijst	13
Abstract	15
Abstract in English	17
1 Inleiding	19
2 Literatuurstudie	23
2.1 Obesitas	23
2.1.1 Karakterisering	23
2.1.2 Oorzaak en comorbiditeiten	23
2.1.3 Behandeling	23
2.1.3.1 Veranderen van levensstijl	23
2.1.3.2 Farmacologisch	24
2.1.3.3 Chirurgie	25
2.2 Smaakreceptoren	26
2.2.1 Inleiding	26
2.2.2 Chemosensorische cellen in de tong	26
2.2.2.1 Type I TRC	27
2.2.2.2 Type II TRC	27
2.2.2.3 Type III TRC	27
2.2.3 Chemosensorische cellen in het gastro-intestinaal stelsel	27
2.2.3.1 Ghrelinecel	28
2.2.3.2 L-cel	30
2.2.4 Chemosensorische cellen in de pancreas	33
2.2.5 Chemosensorische cellen in het vetweefsel	34
2.3 Roux- en-Y maagbypassoperatie	34
2.3.1 Inleiding	34
2.3.2 Effecten van een Roux-en-Y maagbypass	35
2.3.2.1 Effect op lichaamsgewicht en voedselinname	35
2.3.2.2 Effect op energie-uitgave	36

2.3.2.3	Effect op glucose-homeostase	37
2.3.2.4	Effect op concentratie van circulerende darmhormonen.....	37
2.3.2.5	Effect op gastro-intestinale permeabiliteit	38
2.3.2.6	Effect op darmmorfologie	39
2.3.2.7	Effect op microbiota en korteketenvezuren.....	40
3	 Materiaal en methoden.....	41
3.1	In vivo experimenten	41
3.1.1	Muizen.....	41
3.1.2	Opzet van experimenten.....	41
3.1.3	RYGB-operatie	42
3.1.4	Opoffering	42
3.2	Metten van octanoylghreline en totale ghrelineconcentraties in plasmastalen	43
3.2.1	Ghreline-extractie	43
3.2.2	Radioimmunoassay (RIA)	43
3.3	RNA-extractie uit weefsels, cDNA synthese en real-time PCR.....	44
3.4	Bepaling van KKV uit faeces	45
3.5	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)</i>	45
3.6	Statistische analyse	46
4	 Onderzoeksresultaten	47
4.1	Lichaamsgewicht en voedselinname.....	47
4.2	Plasmawaardes bij opoffering.....	48
4.2.1	Ghreline.....	48
4.2.2	Glucagon-like peptide-1	49
4.2.3	Insuline	50
4.2.4	Glucose.....	51
4.3	Relatieve mRNA expressie van darmhormonen	51
4.3.1	Ghreline.....	51
4.3.2	Proglucagon.....	53
4.3.3	PYY.....	53
4.4	Relatieve mRNA expressie van nutriëntensensoren	54
4.4.1	TAS1R3, GLUT2 en SGLT1	54
4.4.1.1	Maag.....	54
4.4.1.2	Biliopancreatische segment	54
4.4.1.3	Roux-segment	55

4.4.2	FFAR2 en FFAR3.....	56
4.4.2.1	Distaal colon.....	56
4.5	KKV-bepaling in het caecum.....	57
5	Discussie.....	59
5.1	Effect van RYGB op lichaamsgewicht en cumulatieve voedselinname.....	59
5.2	Effect van RYGB op plasmaghrelinwaarden	60
5.3	Effect van RYGB op plasmawaardes van GLP-1, insuline en glucose	63
5.4	Effect van RYGB op relatieve mRNA expressie van PYY	65
5.5	Effect van RYGB op mRNA expressie van nutriëntensoren	65
5.5.1	TAS1R3, SGLT1 en GLUT2	65
5.5.2	FFAR2 en FFAR3.....	66
5.6	Effect van RYGB op caecale KKV gehalten	67
5.7	Algemene conclusie	67
5.8	Toekomstige onderzoeksplannen	68
	Literatuurlijst	69
	Bijlagen.....	77
	Bijlage A: samenstelling nutridrink®	78

Lijst van tabellen

Tabel 1: <i>Forward</i> en <i>reverse</i> primers van genen die onderzocht worden met behulp van RT-PCR.....	45
--	----

Lijst van figuren

Figuur 1: De Roux-en-Y maagbypass en de daar bijhorende omleiding van nutriënten grafisch weergegeven.....	20
Figuur 2: Restrictieve (A,B) en hybride (C,D) chirurgische maagingrepen. Een verstelbare maagband (A), <i>sleeve</i> gastrectomie (B), Roux-en-Y maagbypass (C) en een biliopancreatische diversie met duodenale <i>switch</i> (D).	25
Figuur 3: Vorming van de biologisch actieve vorm van ghreline, octanoylghreline, door GOAT.	29
Figuur 4: Het effect op de inname van drie verschillende macronutriënten op de plasmawaardes van octanoylghreline, uitgedrukt in percentage ten opzichte van de <i>baseline</i> in functie van de tijd (minuten). De <i>baseline</i> wordt verkregen door het gemiddelde van octanoylghreline te nemen 10 minuten, 5 minuten en vlak voor de maaltijd.	30
Figuur 5: Mechanismen van de glucosegeïnduceerde secretie van GLP-1.	31
Figuur 6: De Roux-en-Y maagbypass grafisch weergegeven. De rode en groene pijlen volgen respectievelijk de weg van voedsel en verteringssappen.....	35
Figuur 7: Willekeurige indeling van C57Bl6 muizen in de opzet van het experiment. 23 wildtype (WT) muizen en 24 <i>gustducine</i> ^{-/-} knockout muizen (α - <i>gust</i> ^{-/-}) worden willekeurig onderverdeeld in een shamgroep, sham pair-fed groep en RYGB-groep.....	41
Figuur 8: Effect van een RYGB-operatie, <i>pair-feeding</i> en een shamoperatie op lichaamsgewicht (g) één dag voor opoffering in WT (n = 5-8) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 6-8) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: # p < 0,05).	47
Figuur 9: Het effect van een RYGB ten opzichte van een shamoperatie op de cumulatieve voedselinname (g) in WT (n = 5-8) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 6-8) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* p < 0,05).	48
Figuur 10: Het effect van een RYGB-operatie, <i>pair-feeding</i> en een shamoperatie op de plasmaconcentraties van (A) octanoylghreline in WT (n = 6-9) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 8-9) muizen en (B) totaal ghreline in WT (n = 6) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 6-7) muizen in pg/ml en op de plasmaconcentraties, gecorrigeerd voor lichaamsgewicht, voor (C) octanoylghreline in WT (n = 6-9) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 8-9) muizen en (D) totaal ghreline in WT (n = 6) en α - <i>gust</i> ^{-/-} (n = 6-7) muizen in pg/ml. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (*p < 0,05; ** p < 0,01; genotype*operatie-effect: # p < 0,05; ## p < 0,01).	49
Figuur 11: Het effect van een RYGB-operatie, <i>pair-feeding</i> en een shamoperatie op de plasmawaardes van GLP-1 (pg/ml) op het moment van opoffering, 15 minuten na een gavage	

van nutridrink® in WT (n = 5-9) en α -gust^{-/-} (n = 7-9) muizen. De plasmawaardes van GLP-1 is de som van de actieve vormen GLP-1₍₇₋₃₆₎ amide en GLP-1₍₇₋₃₆₎. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± SEM (**p < 0,01; *** p < 0,001)..... 50

Figuur 12: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op plasma-insulinewaardes (pg/ml) bij opoffering in WT (n = 5-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± SEM (* p < 0,05; genotype*operatie effect: # p < 0,05). 50

Figuur 13: Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op bloedglucosewaardes (mg/dl) op het moment van opoffering, 15 minuten na een gavage van nutridrink® in WT (n = 7-9) en α -gust^{-/-} (n = 8-9) muizen. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± SEM..... 51

Figuur 14: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van ghreline in (A) de maag in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 5-7) muizen, (B) het biliopancreatisch segment in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 7) muizen, (C) het Roux-segment in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen en in (D) het distaal colon in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde ± SEM (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: # p < 0,05). 52

Figuur 15: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van proglucagon in (A) het Roux-segment in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en in (B) het distaal colon in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde ± SEM (*** p < 0,001; genotype*operatie effect: # p < 0,05). 53

Figuur 16: Effect van een RYGB, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van PYY in het distaal colon in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde ± SEM (*** p < 0,001)..... 53

Figuur 17: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units van TAS1R3 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 5-8) muizen in de maag. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde ± SEM..... 54

Figuur 18: Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in het biliopancreatisch segment van (A) SGLT1 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en (B) GLUT2 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen (B). De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde ± SEM..... 55

Figuur 19: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van (A) TAS1R3 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen, (B) SGLT1 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen en (C) GLUT2 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen in het Roux-segment. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (** p < 0,01; genotype*operatie effect: # p < 0,05). 56

Figuur 20: Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in het distaal colon van (A) FFAR2 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en (B) FFAR3 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (** p < 0,01; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: # p < 0,05). 57

Figuur 21: Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op (A) boterzuurconcentraties in WT (n = 6- 8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen, (B) propionzuurconcentraties in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen en (C) acetaatconcentraties in WT (n = 7-9) en α -gust^{-/-} (n= 7) muizen in μ g/100 mg caecaal faeces. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (*p < 0,05; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: ### p < 0,001). 58

Verklarende woordenlijst

-/-	knockout
α -gust ^{-/-}	α -gustducine knockout
AGB	verstelbare maagband
AMP	adenosinemonofosfaat
ATP	adenosinetrifosfaat
AU	arbitraire units
AUC	<i>area under the curve</i> / oppervlakte onder de curve
BMI	<i>body-mass</i> index
BPD/DS	biliopancreatische diversie met duodenale <i>switch</i>
BPL	biliopancreatische segment
BSA	bovine serum albumine
Ca ²⁺	tweewaardig calciumion
CaSR	calciumgevoelig kanaal
CCK	cholecystokinine
cDNA	complementair DNA
dNTP	deoxynucleotidetrifosfaat
DPP4	dipeptidyl peptidase 4
DTT	dithiothreitol
EE	energie-uitgave
EEC	entero-endocriene cellen
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
ELISA	<i>enzyme-linked immuno assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> / Europees Geneesmiddelenagentschap
FFAR	<i>free fatty acid receptor</i> / vrijevetzurreceptor
GHS-R	groeihormoonsecreterende receptor
GI	gastro-intestinaal
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GLP-2	glucagon-like peptide 2
GLUT2	glucosetransporter 2
GOAT	ghreline-O-acyltransferase
GPCR	G-proteïnegekoppelde receptor
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Hz	Hertz
IP ₃	inositol trifosfaat
K ⁺	kaliumion
KKV	korteketenvetzuren
LPS	lipopolysaccharide
MBOAT	membraangebonden O-acyltransferase
mRNA	messenger ribonucleïnezuur
Na ⁺	natriumion
NRS	<i>normal rabbit serum</i> / normaal konijnenserum
PF	<i>pair fed</i>
PLC β 2	fosfolipase C β 2
POMPC	pro-opiomelanocortine
PYY	peptide tyrosine tyrosine
REE	energie-uitgave in rust
RIA	<i>Radio Immuno Assay</i>
RNA	ribonucleïnezuur

rpm	rotaties per minuut
Rpl13a	ribosomaal proteïne L13a
RT-PCR	<i>real-time</i> PCR
RYGB	Roux-en-Y <i>Gastric Bypass</i> / Roux-en-Y maagbypass
SEM	<i>standard error of mean</i>
SG	<i>sleeve</i> gastrectomie
SGLT1	Na ⁺ -glucose cotransporter 1
T2DM	type 2 diabetes mellitus
TAS1R	smaakreceptor familie 1
TAS2R	smaakreceptor familie 2
TEE	totale energie uitgave
TFA	trifluorazijnzuur
TGR5	G-proteïne gekoppelde galzuurreceptor 1
TRC	smaakreceptorcel
TRPM5	transiënt receptor potentiaal kation kanaal subfamilie M lid 5
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	wildtype
VVZ	vrije vetzuren
ZO1	zona occludens 1

Abstract

Een Roux-en-Y maagbypassoperatie (RYGB) is de efficiëntste procedure voor de behandeling van obesitas. Na de operatie komen onverteerde voedingsstoffen terecht in het distale deel van de dunne darm en wordt het grootste deel van de maag en duodenum overgeslagen. Mechanismen voor het waarnemen van nutriënten in de darm, door smaakreceptoren die gekoppeld zijn aan α -gustducine, worden hierdoor beïnvloed.

Deze masterproef onderzoekt of de veranderde verteringsroute na een RYGB effecten veroorzaakt op de energie- en glucosehomeostase door wijzigingen in smaakreceptoren die de vrijzetting van (an)orexigene gastrointestinale (GI) hormonen reguleren. Hiertoe wordt het effect van een RYGB op de metabole wijzigingen vergeleken tussen wildtype (WT) en α -gustducine^{-/-} (α -gust^{-/-}) muizen. Plasmaconcentraties van ghreline, GLP-1, insuline en glucose worden bepaald m.b.v. RIA, ELISA en glucosemeter.

RYGB induceert gewichtsverlies dat meer uitgesproken is in WT dan in α -gust^{-/-} muizen. Dit kan verklaard worden door de gedaalde voedselinname die enkel bij WT muizen voorkomt. Het verschil in voedselinname kan veroorzaakt worden door de stijging in plasmaoctanoylghrelinewaarden die enkel voorkomt in α -gust^{-/-} muizen maar niet door GLP-1 dat in gelijke mate stijgt in beide genotypes. Bloedglucosewaarden verschillen niet tussen de genotypes maar plasma-insulinewaardes dalen enkel in WT muizen. α -gustducine en bij gevolg smaakreceptoren spelen dus een rol in het effect van RYGB op lichaamsgewicht, voedselinname en glucosehomeostase.

Abstract in English

A Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB) is the most efficient procedure for the treatment of obesity. After this operation, undigested nutrients arrive into the distal part of the small intestine whereby the major part of the stomach and duodenum are bypassed. Mechanisms for nutrientsensing in the intestine, by taste receptors that are linked to α -gustducin, are affected due to this rerouting.

This master's thesis examines whether the altered digestion route after RYGB causes effects on the energy and glucose homeostasis by changes in taste receptors that regulates the release of (an) orexigenic gastrointestinal (GI) hormones. Hereby, the effect of a RYGB on the metabolic changes is compared between wild type (WT) and α -gustducin^{-/-} (α -gust^{-/-}) mice. Plasma concentrations of ghrelin, GLP-1, insulin and glucose are determined by means of RIA, ELISA and glucose meter.

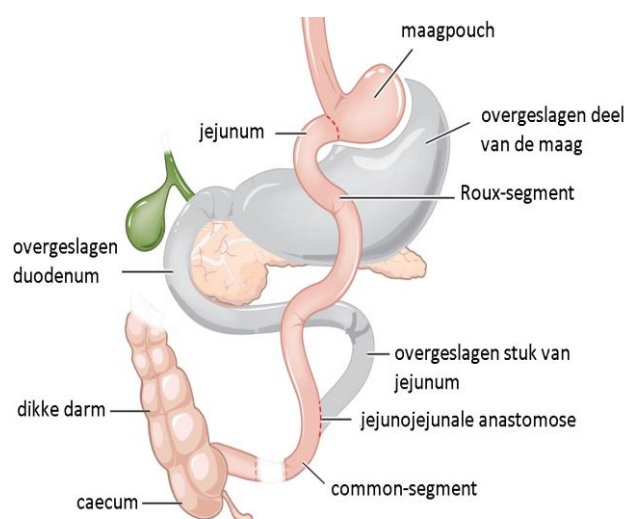
RYGB induces weight loss that is more pronounced in WT than in α -gust^{-/-} mice and can be explained by the reduced food intake that only occurs in WT mice. This difference in food intake may be caused by the increase of plasma values of octanoyl ghrelin which occurs only in α -gust^{-/-} mice but not by GLP-1, which rises to the same extent in both genotypes. Blood glucose values do not differ between the genotypes but plasma insulin levels only decrease in WT mice. α -gustducin and consequently taste receptors therefore play a role in the effect of RYGB on body weight, food intake and glucose homeostasis.

1 Inleiding

Deze masterproef vindt plaats aan de KU Leuven, departement Klinische en Experimentele Geneeskunde, in het "Gut Peptide Research Lab" van het Translationeel Onderzoekscentrum voor Gastro-intestinale Aandoeningen. Het Gut Peptide Research Lab is gericht op het begrijpen van de rol van gastro-intestinale peptiden en hun receptoren in de regulatie van voedselinname en gastro-intestinale motiliteit onder normale en pathologische condities.

Deze masterproef onderzoekt hoe het omleiden van nutriënten na Roux-en-Y maagbypasschirurgie (RYGB-chirurgie) leidt tot een metabolische herprogrammering van het gastro-intestinaal stelsel.

Obesitas is een chronische vorm van overgewicht die gekenmerkt wordt door een overmatige opstapeling van lichaamsvetten, wat nadelige effecten op de gezondheid kan hebben. Obesitas wordt vaak gerelateerd met type 2 diabetes mellitus (T2DM) en een verhoogde kans op cardiovasculaire aandoeningen. Het is één van de meest voorkomende gezondheidsproblemen in de Westerse samenleving. Mokdad *et al.* hebben vastgesteld dat maar liefst 19,8 % van de bevolking in de Verenigde Staten aan obesitas lijdt [1, 2]. Het aanpassen van de levensstijl en het innemen van geneesmiddelen geven vaak teleurstellende resultaten op lange termijn waardoor gastro-intestinale chirurgie steeds vaker wordt toegepast. De RYGB-operatie is een chirurgische methode die beschouwd wordt als één van de efficiëntste behandelingen van obesitas [3]. Bij een RYGB-operatie wordt met chirurgische nietjes een klein maagreservoir gevormd (maagpouch). Hierdoor wordt de hoeveelheid voedsel die een patiënt kan nuttigen beperkt tot ongeveer 30 gram. Het overgebleven, grotere deel van de maag wordt van de maagpouch gescheiden, samen met het duodenum, maar niet weggenomen. Het jejunum wordt omhooggebracht en aan de maagpouch vastgemaakt. De weggenomen maag en duodenum worden vervolgens aan het nieuwe Y-vormige darmstelsel vastgemaakt zoals weergegeven in figuur 1 [4].



Figuur 1 De Roux-en-Y maagbypass en de daar bijhorende omleiding van nutriënten grafisch weergegeven [5].

Door deze RYGB-operatie komt het voedsel, via een zeer kleine maag, rechtstreeks in het Roux-segment terecht. Het duodenum en het grootste deel van de maag worden hierbij overgeslagen. Door deze herschikking (of *rerouting*) komen onverteerde voedingsstoffen terecht in het Roux-segment waardoor smaakreceptoren aanwezig in dit segment op een andere manier geactiveerd kunnen worden. Inderdaad, smaakreceptoren komen niet enkel voor op de tong maar ook verder in het gastro-intestinaal stelsel. Er is recent aangetoond dat entero-endocriene cellen (EEC) in de darm nutriënten kunnen waarnemen door middel van smaakreceptoren en chemosensorische signaalwegen. Zo zijn verscheidene smaakreceptoren en het smaak G-proteïne, α -gustducine, in de GLP-1 secreterende L-cellen aangetoond. Hierbij is α -gustducine essentieel voor de signaaltransductie in G-proteïne gekoppelde smaakreceptoren die bitter, zoet en umami detecteren. Deze L-cellen, die vooral aanwezig zijn in de dunne darm, zetten het incretinehormoon GLP-1 vrij dat de bloedglucosewaarden en eetlust controleert in respons op aanwezige voedingsstoffen [6].

Een RYGB-operatie zorgt bij obesitaspatiënten voor een blijvend gewichtsverlies over een lange periode. Dit kan verklaard worden door de verkleining van de maag, en dus een verminderde voedselinname, en door malabsorptie aangezien een groot deel van de dunne darm wordt overslagen. Maar er lijkt meer te gebeuren dan enkel restrictie en malabsorptie. Een RYGB-operatie verbetert in een korte tijdspanne T2DM bij obese patiënten. Hoe deze verbetering tot stand komt is niet geweten. Er wordt suggereerd dat hoofdzakelijk veranderingen in de balans van darmhormonen zorgt voor een metabole verbetering. Hierdoor wordt gedacht dat naast restrictie en malabsorptie er belangrijkere oorzaken kunnen zijn voor het blijvend gewichtsverlies en de verbetering van T2DM [7].

Het probleem is dat de rol van smaakreceptoren in het gastro-intestinaal stelsel in de effecten van een RYGB-operatie niet zijn begrepen maar van groot belang kunnen zijn voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen of efficiëntere chirurgische ingrepen.

In deze masterproef wordt nagegaan of de veranderende verteringsroute van het voedsel na een RYGB-operatie effecten veroorzaakt in het waarnemen van nutriënten in de darm door smaakreceptoren op de EEC. Dit kan een belangrijke impact hebben op de vrijzetting van darmhormonen die belangrijk zijn in het behouden van de effecten van RYGB op energie- en glucosehomeostase. Deze signaalwegen onderzoeken, en eventueel ontcijferen, kan uiteindelijk leiden tot de ontdekking van nieuwe therapeutische doelwitten, waardoor op lange termijn zware chirurgische ingrepen mogelijk vermeden kunnen worden.

Voor het uitvoeren van deze masterproef zal gebruik gemaakt worden van proefdieronderzoek. Er wordt gewerkt met C57Bl6 muizen en α -gustducine knockout muizen. Deze knockout muizen bevatten het smaak G-proteïne α -gustducine niet, waardoor we de rol van de nutriëntensing in de effecten van RYGB kunnen nagaan. De muizen worden in drie groepen onderverdeeld. Eén groep ondergaat de RYGB-operatie terwijl een tweede groep een shamoperatie ondergaat. De shamoperatie omvat een gastrostomie en jejunostomie. De derde groep ondergaat een shamoperatie en ontvangt per dag de hoeveelheid voedsel die de dag ervoor door de RYGB muizen gegeten wordt. Deze laatste groep wordt de *sham pair-fed* groep genoemd. De shamgroep wordt gebruikt zodat alle muizen die bestudeerd worden dezelfde stress hebben ondergaan. De *sham pair-fed* groep geeft een indicatie van hormonale veranderingen en wijzigingen in het nutriëntwaarnemingssysteem veroorzaakt door een wijziging in de voedselinname. Deze *sham pair-fed* groep dient om na te gaan of de waargenomen effecten te wijten zijn aan een geïnduceerde daling in voedselinname of door andere, operatiegeïnduceerde factoren.

De muizen worden in hun 6^e levensweek op een hoogvet-hoogsuikerdieet gezet. De muizen worden zo obees en diabeet. In de 18^e levensweek worden ze geopereerd. In de 25^e levensweek worden de muizen opgeofferd waarbij weefsel- en bloedstalen worden genomen. Het opofferen gebeurt na zes uur vasten gevolgd door een gavage van een vloeibare maaltijd, namelijk 200 μ l nutridrink®. Vijftien minuten later worden ze opgeofferd.

De concentraties van de hormonen ghreline, insuline en GLP-1 worden in de bloedstalen gemeten. Ghrelineconcentraties worden gemeten met behulp van een op het labo ontwikkelde radioimmunoassay (RIA). GLP1 en insuline worden met behulp van een *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), volgens Meso Scale Discovery, gedetecteerd.

Na het opofferen van de muizen wordt weefsel van onder meer het duodenum, maag, jejunum en colon gecollecteerd. mRNA wordt uit de weefsels geëxtraheerd waar vervolgens cDNA van wordt gemaakt. Uiteindelijk wordt een RT-PCR uitgevoerd en kan men het expressieniveau berekenen van de hormonen en de smaakreceptoren ten opzichte van de huishoudgenen. De KKV-concentraties van azijn-, boter- en propionzuur worden bepaald met behulp van een gaschromatografie-massaspectrometrie quadrupool. De verkregen resultaten worden statistisch geanalyseerd met behulp van 'Statistica versie 12'. Verschillen worden beschouwd als significant bij een p-waarde kleiner dan 0,05.

2 Literatuurstudie

2.1 Obesitas

2.1.1 Karakterisering

Obesitas is een chronische metabole ziekte die het resultaat is van een onevenwicht tussen energieopname en –uitgave en wordt gekenmerkt door een overmatige opstapeling van lichaamsvetten die nadelige effecten op de gezondheid kunnen hebben. Obesitas wordt gedefinieerd met behulp van de *body-mass index* (BMI), welke bepaald wordt door het lichaamsgewicht te delen door de lichaamslengte². Als de BMI groter is dan 25 kg/m² spreken we van overgewicht, bij een BMI groter dan 30 kg/m² wordt gesproken van obesitas. Wereldwijd is de prevalentie van overgewicht en obesitas zo sterk toegenomen dat de World Health Organisation (WHO) obesitas als epidemie heeft uitgeroepen (WHO, 2005). Mokdad *et al.* hebben vastgesteld dat maar liefst 19,8 % van de bevolking in de Verenigde Staten aan obesitas lijdt [1, 2]. Finkelstein *et al.* toonden aan dat in Amerika obesitas gerelateerde medische kosten jaarlijks tot \$147 miljard kunnen oplopen. Dit is maar liefst 9 % van alle medische kosten [8].

2.1.2 Oorzaak en comorbiditeiten

Genetische-, omgevings-, psychologische- en gedragsfactoren liggen aan de basis van de oorzaak van obesitas. Genetische factoren spelen een belangrijke rol in de controle van eetlust en energie-uitgave en kunnen op deze manier obesitas veroorzaken. Met omgevingsomstandigheden bedoelt men de makkelijkere toegang tot voedsel en het caloriegehalte van het voedsel. Met psychologische factoren doelt men op eetstoornissen zoals bijvoorbeeld boulimie en met gedragsfactoren kijkt men naar de eetgewoontes en fysieke activiteit [2]. Obesitas wordt vaak gerelateerd met verscheidende comorbiditeiten zoals diabetes mellitus type 2 (T2DM), cardiovasculaire aandoeningen en verschillende soorten kanker [9-11].

2.1.3 Behandeling

2.1.3.1 Veranderen van levensstijl

Het aanpassen van de levensstijl is de eerste optie in een behandeling die men toepast op obesitaspatiënten en omvat drie componenten: het volgen van een dieet, sporten en een gedragstherapie [12]. Men verlaagt de calorie-inname en verhoogt de energie-uitgave en probeert op deze manier de energiebalans te herstellen en gewichtsverlies te induceren [13]. Gedragstherapie is gebaseerd op het afleren van slechte eetgewoontes en is bedoeld om te

helpen bij het overwinnen van hindernissen tijdens het dieet of de fysieke activiteiten. Maar het veranderen van de levensstijl heeft bij obesitaspatiënten een typisch patroon met een maximaal gewichtsverlies na 6 maanden, gevolgd door een plateau en uiteindelijk terug bijkomen tot het oorspronkelijk gewicht [14].

2.1.3.2 Farmacologisch

Men gaat over op een farmacologische behandeling wanneer het veranderen van de levensstijl geen blijvend gewichtsverlies veroorzaakt. In grote lijnen zijn er 2 types van geneesmiddelen voor obesitas. Een eerste type remt de eetlust of verhoogt het verzadigingsgevoel terwijl het tweede type zorgt voor een malabsorptie. Elk geneesmiddel vertoont nevenwerkingen waardoor het belangrijk is om na te gaan of er wel degelijk een gewichtsverlies optreedt op lange termijn en of de nevenwerkingen niet dramatisch worden.

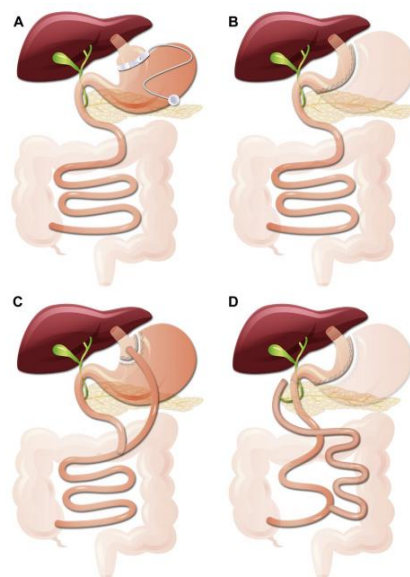
Er zijn bijvoorbeeld geneesmiddelen die gebruikt kunnen worden op lange termijn, namelijk Xenical[®], Qsymia[®] en lorcaserin. Xenical[®], dat verkrijgbaar is in België en geen maximale behandelingsduur kent, bevat orlistat. Orlistat is een inhibitor van het maag- en pancreaslipase waardoor de absorptie van vet in de darm tot 30 % wordt verminderd. Een behandeling met orlistat wordt geassocieerd met verbeteringen van een aantal comorbiditeiten zoals bloeddruk en insulineresistentie. Een vettig rectaal verlies, flatulentie, diarree en abdominale pijn zijn nevenwerkingen van dit geneesmiddel [15]. Orlistat kan leiden tot 10 % gewichtsverlies na een inname van 27 weken bij één op de twee patiënten, maar zij vertoonden wel nevenwerkingen [16]. Terwijl Douglas *et al.* aantonen dat patiënten, na 3 jaar gebruik van orlistat, bijna naar hun oorspronkelijk gewicht terugkeerden. Saxenda[®] is onlangs goedgekeurd door het Europees Geneesmiddelenagentschap (EMA) en bevat liraglutide. Liraglutide werkt als een nieuw langwerkend GLP-1 analoog dat eerst werd gebruikt voor de behandeling van diabetespatiënten, die uiteindelijk gewichtsverlies vertoonden. Misselijkheid en hypoglycemie zijn de nevenwerkingen van liraglutide.

Qsymia[®] en Lorcaserin en een naltrexon/bupropion preparaat zijn andere geneesmiddelen die momenteel in de Verenigde Staten op de markt zijn maar in Europa nog niet zijn goedgekeurd.

Qsymia[®] is een combinatie van phentermine en topimaraat. Phentermine is een sympathomimetisch amine dat de eetlust onderdrukt via een verhoogde vrijzetting van noradrenaline [17]. Topimaraat is een anticonvulsant dat werkt via GABA-erge neuronen. Het phentermine/topimaraat heeft cardiovasculaire en psychiatrische bijwerkingen. Lorcaserin is een selectieve serotonine 5-HT_{2C} receptor agonist waarvan men denkt dat deze de eetlust vermindert via het activeren van de pro-opiomelanocortine (POMC) productie die invloed heeft op het verzadigingsgevoel. Bijwerkingen van lorcaserin zijn misselijkheid, hoofdpijn en duizeligheid. Naltrexon/bupropion is een recent middel dat wordt gebruikt voor obesitaspatiënten. Bupropion inhibeert de heropname van dopamine en noradrenaline en stimuleert de POMC neuronen terwijl naltrexon werkt als een μ -opioïd antagonist [18].

2.1.3.3 Chirurgie

Aangezien farmacologische oplossingen vaak ontoereikend zijn bij obesitas wordt vaak, als de obesitaspatiënt aan de voorwaarden voldoet (BMI hoger dan 40 kg/m²), naar een chirurgische ingreep overgeschakeld. Chirurgische ingrepen zorgen voor een blijvend gewichtsverlies en verbetering van verschillende comorbiditeiten door vooral restrictie en malabsorptie [19]. Chirurgische ingrepen worden onderverdeeld in restrictieve en hybride ingrepen. Een restrictieve ingreep zorgt voor een verminderde inname van voedsel door een verkleining van de maag terwijl een hybride ingreep naast een restrictie ook zorgt voor een malabsorptie van voedingsstoffen door een deel van de darm over te slaan [20]. De verstelbare maagband (AGB) is een restrictieve ingreep waarbij een verstelbare siliconen maagband rond het bovenste deel van de maag wordt aangebracht en zo de maag verdeelt in een kleiner bovenste en groter onderste gedeelte. De doorsnede van deze band kan worden aangepast door meer of minder vloeistof in het onderhuidsreservoir te spuiten zoals weergegeven op figuur 2A. Door de nauwe band wordt de doorgang van het voedsel bemoeilijkt waardoor de patiënt gedwongen wordt om traag te eten. Het bovenste maaggedeelte zal snel gevuld worden en geeft de patiënt een voortijdig gevoel van verzadiging. De patiënt eet minder en zal hierdoor gewicht verliezen. *Sleeve* gastrectomie (SG) is een restrictieve ingreep waar een stuk van de maag in de lengterichting verwijderd wordt zoals weergegeven op figuur 2B. Deze maagverkleining is irreversibel.



Figuur 2 Restrictieve (A,B) en hybride (C,D) chirurgische maagingrepen. Een verstelbare maagband (A), *sleeve* gastrectomie (B), Roux-en-Y maagbypass (C) en een biliopancreatische diversie met duodenale *switch* (D) [21].

Bij een biliopancreatische diversie met duodenale *switch* (BPD/DS) wordt een deel van de maag verkleind en wordt de dunne darm gesplitst net boven de galbuis. Het deel met galbuis wordt een stuk verder, dicht bij de dikke darm, weer op het spijsverteringskanaal aangesloten zoals weergegeven op figuur 2D. Het deel dat niet is aangesloten aan de galbuis wordt vastgemaakt aan de verkleinde maag. Bij deze ingreep wordt de voedselstroom gescheiden van de de gal- en alvleeskliersappen en is hierdoor een hybride ingreep. De Roux-en-Y

maagbypass (RYGB) is een hybride chirurgische ingreep zoals weergegeven in figuur 2C en wordt in paragraaf 2.3 in detail uitgelegd [21]. De meest uitgevoerde bariatrische ingreep wereldwijd is de RYGB (45 %) gevolgd door SG (37 %) en AGB (10 %) terwijl BPD/DS zelden wordt uitgevoerd [3]. Na 10 jaar opvolgen van geopereerd patiënten blijkt de RYGB de ingreep te zijn die het grootste gewichtsverlies induceert, gevolgd door SG en AGB [22].

2.2 Smaakreceptoren

2.2.1 Inleiding

Smaak is meer dan een genotservaring. Enerzijds wijst het ons op de aanwezigheid van energierijk voedsel dat belangrijk is voor de overleving maar anderzijds waarschuwt het ons voor de aanwezigheid van toxische bestanddelen of voor de aanwezigheid van onrijp of vervallen voedsel. De mens kan vijf basissmaken waarnemen: zoet, zout, umami, bitter en zuur. De zout- en zuursmaak worden gedecteerd door middel van ionenkanalen terwijl zoet-, umami- en bittermaken worden waargenomen door activatie van G-proteïnegekoppelde smaakreceptoren (GPCR's) [23]. Subtypes van de smaakreceptor 1 familie (TAS1R) heterodimeriseren om zoet (TAS1R2-TAS1R3) en umami (TAS1R1-TAS1R3) te detecteren. Bitter wordt gedetecteerd met behulp van 25 subtypes van de smaakreceptor 2 familie (TAS2R). Vet wordt vaak gepostuleerd als zesde smaak aangezien vrije vetzuren waargenomen kunnen worden door vrije vetzuurreceptoren (zoals bijvoorbeeld FFAR1 of FFAR4). Dit wordt aangetoond door gebruik te maken van knockout muizen voor FFAR1 en FFAR4. Deze verloren hun voorkeur, in zenuw- en voorkeurstesten, voor lange onverzadigde vetzuren ten opzichte van wildtype (WT) muizen [24].

2.2.2 Chemosensorische cellen in de tong

Smaakpapillen, gelegen op de tong, bestaan uit clusters die tot 100 smaakreceptorcellen (TRC's) bevatten. TRC's zijn neuro-epitheliale cellen. Eens de TRC's geprikkeld worden door een smaakstof wordt er een signaal getransporteerd naar de afferente zenuw, namelijk de *nervus vagus*, die op zijn beurt de prikkel doorstuurt naar specifieke delen in de hersenen die instaan voor smaakbeleving [25]. Naast smaakgewaarwording gebeurt ook de eerste vertering reeds in de tong. Smaakpapillen op de tong worden gestimuleerd om fysiologische reflexen te initiëren die de darm voorbereiden op de absorptie van voedingsstoffen, vrijzetting van verteringsenzymen en het initiëren van de peristalsis.

De TRC's worden ingedeeld in drie verschillende types die elk beschikken over een verschillende signaaltransductieweg om smaak waar te nemen en worden hieronder verder besproken.

2.2.2.1 Type I TRC

Type I cellen zijn de meest voorkomende cellen in de smaakpapillen. Ze lijken betrokken te zijn in het beëindigen van de synaptische signaaltransmissie en het beperken van de verspreiding van transmitters door het opnemen van glutamaat of het hydrolyseren van extracellulaire adenosinetrifosfaat (ATP) en worden daardoor glia-achtige cellen genoemd [26-28].

2.2.2.2 Type II TRC

Type II cellen kunnen zoet, umami en bitter waarnemen door de aanwezigheid van verschillende GPCR's. De intracellulaire signaalweg van deze GPCR's werd onderzocht door middel van fosfolipase C β 2 (PLC β 2) en transiënt receptor potentiaal kationkanaal subfamilie M lid 5 (TRPM5) knockout muizen, die hun smaak voor zoet, bitter en umami verloren, maar niet voor zout of zuur die waargenomen worden door ionenkanalen [29]. De meeste GPCR's zijn gekoppeld aan het gustatorische G-proteïne, gustducine, dat bestaat uit 3 subunits, de α - β - en γ -subunit. α -gustducine^{-/-} (α -gust^{-/-}) muizen vertoonden een lagere respons op zoet, umami en bitter ten opzichte van WT muizen maar niet voor zout of zuur [30]. Hieruit wordt vastgesteld dat α -gustducine een belangrijke factor is in het waarnemen van de zoet-, bitter- en umamismaak. De respons was niet volledig weg waaruit geconcludeerd kan worden dat er nog andere G-proteïnen een rol kunnen spelen in de signaaltransductieweg zoals bijvoorbeeld transducine, het ander smaak G-proteïne. Na het binden van een smaakstof op een GPCR ontstaat een conformatieverandering in het $\alpha\beta\gamma$ -proteïne. Hierdoor komt de α -subunit los van de $\beta\gamma$ -subunit. De $\beta\gamma$ -subunit bindt hierna met het PLC β 2 die zorgt voor de productie van inositol trifosfaat (IP₃). IP₃ zorgt hierna voor een stijging van de intracellulaire calciumconcentratie waardoor uiteindelijk de TRPM5 wordt geactiveerd die op zijn beurt zorgt voor een natriuminflux. De calciumafhankelijke opening van TRPM5 zorgt voor een membraandepolarisatie, genereert een actiepotentiaal en zorgt uiteindelijk voor de exocytose van ATP waardoor de afferente zenuwen worden geactiveerd die gebieden in de hersenen activeren die instaan voor smaakbeleving [30, 31].

2.2.2.3 Type III TRC

Type III cellen nemen zuur waar via ionenkanalen. Ze beschikken over meerdere synaptische membraanproteïnen die zorgen voor de exocytose van bepaalde neurotransmitters en worden hierdoor pre-synaptische cellen genoemd. Type III cellen verkrijgen input van type II cellen en sturen deze signalen door en kunnen op deze manier reageren op meerdere smaken [32].

2.2.3 Chemosensorische cellen in het gastro-intestinaal stelsel

Het gastro-intestinaal (GI) stelsel staat in voor de vertering en opname van voedingsstoffen. Recente studies hebben aangetoond dat smaak niet enkel wordt waargenomen door de smaakpapillen in de tong maar dat ook het GI stelsel deze smaken kan waarnemen door

middel van gelijkaardige smaakreceptoren en chemosensorische signaalwegen. Op deze manier reguleren opgenomen voedingsstoffen de vrijzetting van GI hormonen die de darmhersen-as activeren en zo honger en verzadiging kunnen controleren [33].

In het GI stelsel zijn er drie soorten cellen die smaakreceptoren tot expressie brengen, namelijk enterocyten, borstelcellen en entero-endocriene cellen (EEC's).

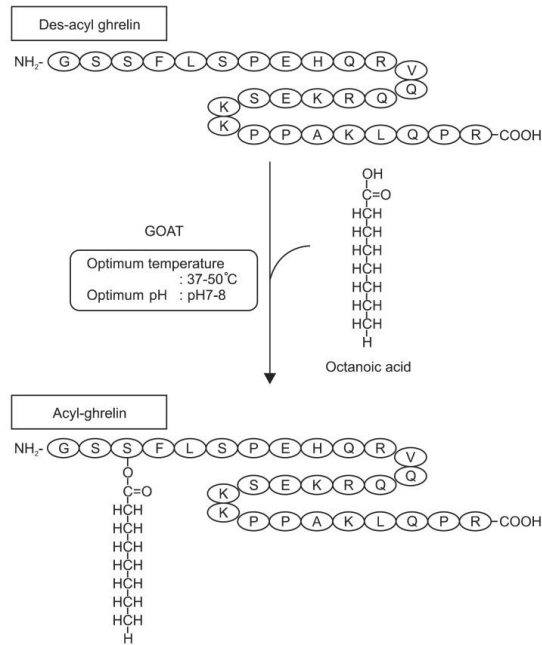
Enterocyten zijn absorberende cellen die microvilli bevatten aan de apicale zijde. Hierdoor wordt het absorberend oppervlak vergroot en is er meer contact met de luminale inhoud. Ze bevatten verscheidene transportproteïnen voor de opname van suikers, vetzuren en aminozuren vanuit het lumen [34]. Een speciaal type enterocyt is de borstelcel. Deze beschikt over lange apicaal gelegen microvilli, smaakreceptoren en α -gustducine maar heeft geen intracellulaire granules met darmhormonen. Ze staan waarschijnlijk in voor het doorgeven van informatie aan geslotentype EEC's die de nutriënten niet rechtstreeks in het lumen kunnen detecteren [35].

EEC's zijn gespecialiseerde endocriene cellen van het maagdarmsstelsel. In respons op verschillende stimuli produceren ze GI hormonen met een paracriene of endocriene functie, of dienen ze voor activatie van het enterisch zenuwstelsel. EEC's kunnen onderverdeeld worden in twee groepen op basis van hun vorm en lokalisatie in het epitheel. We onderscheiden namelijk opentypecellen en geslotentypecellen. De opentypecellen beschikken over microvilli die direct contact kunnen maken met de luminale inhoud. Hierdoor kan deze EEC direct geactiveerd worden door nutriënten wat uiteindelijk leidt tot het moduleren van de secretie van darmhormonen. Deze darmhormonen kunnen direct, via de bloedbaan, of indirect, via de *nervus vagus*, communiceren met de hypothalamus om voedselinname te controleren. Geslotentypecellen reiken niet tot de epitheellaag en kunnen enkel indirect voedingsstoffen waarnemen door neuronale of hormoongemedieerde signaalwegen. EEC's vormen het grootste endocriene orgaan in het lichaam, ondanks het feit dat zij uit slechts 1 % van de aanwezige cellen in het darmepitheel bestaan [36]. Afhankelijk van het type endocriene cel produceren en scheiden ze een aantal hormonen uit. De X/A-cel produceert ghreline, de G-cel gastrine, de I-cel cholecystokinine (CCK) en de L-cel glucagon-like peptide 1 (GLP-1), glucagon-like peptide 2 (GLP2) en peptide YY (PYY) [37]. De X/A- en L-cel worden respectievelijk in 2.2.3.1 en 2.2.3.2 in detail besproken.

2.2.3.1 Ghrelinecel

Ghreline producerende cellen, oftewel X/A-cellen genoemd in muizen, komen vooral voor in de maag en in mindere mate ook in de dunne en dikke darm [38]. Ghreline, een hongerhormoon, is een peptide dat bestaat uit 28 aminozuren [39]. Voor het verkrijgen van de biologisch actieve vorm van ghreline heeft het een post-translationele modificatie nodig. Deze wordt uitgevoerd door het ghreline O-acyltransferase (GOAT) die een octanoylgroep inbouwt op het derde aminozuur van ghreline, namelijk serine zoals aangetoond op figuur 3. Dit enzym

is een integraal membraanproteïne en behoort tot de membraangebonden O-acyltransferase familie (MBOAT) [40]. Ghreline is een endogeen ligand dat kan binden op de groeihormoonsecreterende receptor (GHS-R) om zo het vrijzetten van groeihormonen te stimuleren.

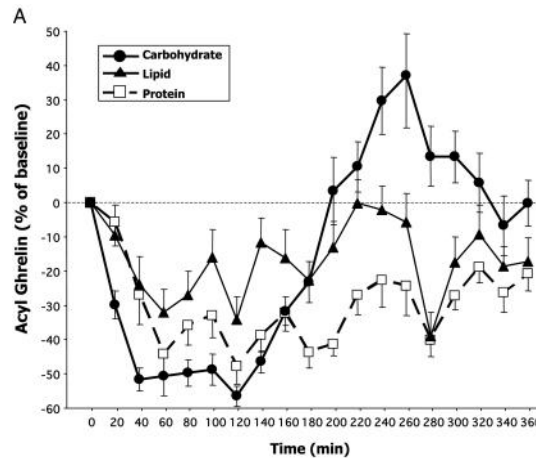


Figuur 3 Vorming van de biologisch actieve vorm van ghreline, octanoylghreline, door GOAT [41].

De secretie van ghreline verloopt maaltijdafhankelijk. Plasmaghrelinewaardes stijgen vóór, en dalen na elke maaltijd, zoals weergegeven in figuur 4 [42]. De postprandiale daling is afhankelijk van de nutriëntsamenstelling van de maaltijd. Koolhydraten onderdrukken ghrelinesecreties sterker dan respectievelijk proteïnen en vetten. Drie uur na het innemen van koolhydraten wordt een *overshoot* van ghrelineconcentraties waargenomen. Het volume, totale calorische inhoud en energiedensiteit is bij elke maaltijd hetzelfde, enkel de macronutriëntsamenstelling verschilt.

Het feit dat de plasmaghrelinewaarde na de maaltijd afhankelijk is van de nutriëntsamenstelling van de maaltijd is een indicatie van het bestaan van smaakreceptoren op de X/A cel [43].

Op het membraan van de ghrelinecel worden de volgende smaakreceptoren teruggevonden: TAS1R3, TAS2R, calcium gevoelige kanalen (CaSR), vrije vetzuur receptor 2 (FFAR2), FFAR3 en FFAR4 [44-47]. De ghrelinecel kan hierdoor respectievelijk zoet, umami, bitter en korte en medium keten vetzuren detecteren waarbij uiteindelijk ghrelinevrijstelling gemoduleerd kan worden.



Figuur 4 Het effect op de inname van drie verschillende macronutriënten op de plasmawaarden van octanoylghreline, uitgedrukt in percentage ten opzichte van de *baseline* in functie van de tijd (minuten). De *baseline* wordt verkregen door het gemiddelde van octanoylghreline te nemen 10 minuten, 5 minuten en vlak voor de maaltijd [43].

Ghreline stimuleert verder het innemen van voedsel en verhoogt de adipogenese waardoor ghreline een toename in lichaamsgewicht kan induceren [48, 49]. Ghreline is een belangrijk gastroprokinetisch hormoon [50]. Het inhibeert de glucosegeïnduceerde vrijzetting van insuline en speelt daardoor een belangrijke rol in de regulatie van de glucosehomeostase [51].

2.2.3.2 L-cel

L-cellen zijn EEC's die vooral aanwezig zijn in het epitheel van het distale deel van de dunne darm en het colon. L-cellen produceren en secreteren GLP-1, GLP-2 en PYY [52].

GLP-1 is het belangrijkste en het meest geproduceerde hormoon van de L-cel. GLP-1 is een eiwit van 30 aminozuren dat afkomstig is van het proglucagon-gen. Proglucagon wordt door het prohormoon convertase 2 geknipt in GLP-1, GLP-2 en andere eiwitten. GLP-1 is een incretinehormoon dat de insulinesecretie verhoogt na een maaltijd. Naast het stimuleren van insulinesecretie inhibeert GLP-1 de secretie van glucagon door het stimuleren van de secretie van somatostatine, die op zijn beurt glucagon inhibeert. Door de snelle afbraak van GLP-1 door het dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) bereikt slechts 10 tot 15 % van het gescreteerde GLP-1 de systemische circulatie in zijn actieve vorm en worden de geknipte metaboliëten GLP-1 (9-36) amide en GLP-1 (9-37) amide verkregen. Deze metaboliëten kunnen als antagonisten inwerken op de GLP-1 receptor. GLP-1 bindt de GLP-1 receptor op de β -cellen van de pancreas om zo zijn invloed op insulinesecretie uit te voeren. GLP-1 inhibeert de GI motiliteit en secretie van vloeistoffen en vertraagt op deze manier de voortgang van de chyme in de darm. GLP-1 is een verzadigingssignaal en inhibeert hierdoor de voedselinname [53].

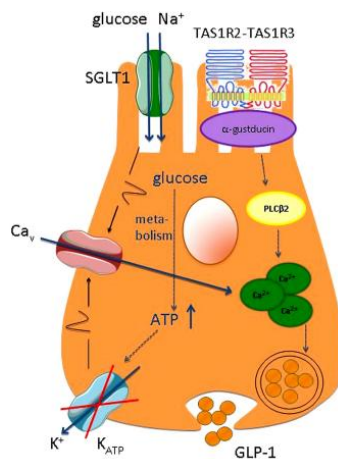
GLP-2 heeft een trofisch effect en heeft invloed op de intestinale permeabiliteit door het verhogen van de expressie van tight-junctions zoals zona occludens 1 (ZO-1) en occludin-1 [54]. PYY is een anorexigeen peptide dat de voedselinname en gewichtstoename doet dalen na omzetting tot zijn biologisch actieve vorm, PYY₃₋₃₆, door DPP4 [55].

L-cellen beschikken over receptoren om suikers (TAS1R2, TAS1R3), proteïnen (TAS1R3, GPRC6A), vetten (FFAR1, FFAR4) en bitterstoffen (TAS2R) waar te nemen. Als respons op deze receptoragonisten kan de L-cel ondermeer GLP-1 secreteren. Het meest bestudeerde mechanisme is de glucosegestimuleerde GLP-1-secretie. De signaalweg, weergegeven in 2.2.3.2.1, is nog niet volledig gekend maar wordt steeds duidelijker.

2.2.3.2.1 De zoetsmaakreceptor op de L-cel

De zoetsmaakreceptor (TAS1R2-TAS1R3), α -gustducine en de natrium-gekoppelde glucose transporter (SGLT-1) zijn essentieel voor de glucosegestimuleerde GLP-1 secretie in de dunne darm, terwijl ATP-gevoelige K^+ -kanalen een rol kunnen spelen voor de glucose gestimuleerde GLP-1 secretie in de dikke darm [56]. Deze veronderstelling wordt gestaafd door een aantal onderzoeken.

Voor de smaakreceptor gemedieerde signaalweg wordt de volgende hypothese naar voren geschoven. Het binden van glucose aan de TAS1R2-TAS1R3-receptor zorgt ervoor dat de α -subunit, α -gustducine, loskomt van de $\beta\gamma$ -subunit. α -gustducine beïnvloedt de cAMP en cGMP-concentraties terwijl een belangrijkere rol is weggelegd voor de $\beta\gamma$ -subunit. Deze activeert het PLC β 2 wat leidt tot een IP $_3$ -gemedieerde vrijstelling van Ca^{2+} zoals weergegeven op figuur 5. Dit zorgt voor verhoogde intracellulaire Ca^{2+} -concentraties. Hierdoor kunnen vesikels die GLP-1, GLP-2 of PYY bevatten fuseren met het membraan en op deze manier het darmhormoon secreteren [57].



Figuur 5 Mechanismen van de glucosegeïnduceerde secretie van GLP-1 [57].

Deze hypothese wordt gestaafd in volgende studies. Ten eerste hebben Steinert *et al.* en Jang *et al.* aangetoond dat TAS1R2, TAS1R3 en α -gustducine aanwezig zijn in humane L-cellen in de dunne darm [6, 52]. Ten tweede kunnen sucrose, glucose, fructose en sucralose binden op TAS1R2-TAS1R3 en zo GLP-1 secretie uitlokken. Dit wordt aangetoond in weefselculturen van het jejunum en het ileum van de muis en in entero-endocriene cellijnen van muis (GLUTag) en mens (NCI-H716) [6]. Glucosegestimuleerde GLP-1 secretie is bijna zo goed als afwezig in α -

gust^{-/-} en in TAS1R3 knockout muizen [58]. Lactisol, een zoetsmaakinhibitor, reduceert alsook systemische waarden van GLP-1 en PYY in mensen [52].

Glucose gaat niet enkel interageren met de zoetsmaakreceptor, maar kan aan de apicale zijde van de cel ook opgenomen worden door SGLT1. Hierdoor wordt een Na⁺-influx verkregen die een depolarisatie van de L-cel veroorzaakt. Het intracellulaire glucose kan gemetaboliseerd worden in de L-cel zelf of getransporteerd worden naar de bloedbaan via glucosetransporter 2 (GLUT2) die aan de basale zijde van de L-cel gelegen is. Wanneer glucose wordt gemetaboliseerd in de krebscyclus stijgen de intracellulaire ATP-concentraties. Deze stijging zorgt voor het sluiten van het ATP-gevoelig K⁺-kanaal. Dit zorgt voor een depolarisatie van het membraan waardoor Ca²⁺-afhankelijke kanalen opengaan waardoor een influx van Ca²⁺ wordt verkegen. Hierdoor kunnen vesikels met GLP-1, GLP-2 of PYY met het membraan fuseren en op deze manier het darmhormoon secreteren.

De belangrijke rol van SGLT1 in de glucosegestimuleerde GLP-1 secretie wordt aangetoond door studies met SGLT1^{-/-} muizen. Deze vertonen, vijf minuten na een gavage van glucose, lagere GLP-1 concentraties ten opzichte van de WT muizen. SGLT1^{-/-} muizen verliezen aldus de glucose-geïnduceerde GLP-1 secretie en ontwikkelen een glucose-galactose malabsorptie syndroom. We kunnen hieruit besluiten dat SGLT1 belangrijk is voor de absorptie van glucose en de glucose-geïnduceerde secretie van GLP-1 [59].

SGLT1 en de andere glucose transporter, GLUT2, worden opgereguleerd in enterocyten als respons op de aanwezigheid van zoetstoffen en downgereguleerd bij TAS1R3^{-/-} muizen die dus niet beschikken over de zoetsmaakreceptor op de L-cel [60]. Men besluit hier uit dat er een sterke correlatie is tussen smaakreceptoractivatie in L-cellen en het veranderen van de expressie van glucosetransporters in enterocyten. Dit kan mogelijk verwezenlijkt worden door GLP-2 [61].

Het ATP-gevoelige K⁺-kanaal speelt een belangrijke rol in de glucose-geïnduceerde GLP-1 vrijstelling van de dikke darm aangezien tolbutamide, een K⁺-kanaalblokker, de GLP-1 secretie verhoogt in GLUTag cellen of in geïsoleerde L-cellen van de dunne darm of het colon [60].

Plasmaconcentraties van GLP-1 zijn bij obese personen lager in respons op bijvoorbeeld koolhydraten ten opzichte van gezonde mensen [62]. Bij obese patiënten wordt ook een verhoogde expressie van α -gustducine vastgesteld, terwijl de expressie van TAS1R2-TAS1R3 verlaagd is. Dit kan te danken zijn aan een adaptief mechanisme dat het maagdarmkanaal toelaat zich aan te passen aan een langdurige positieve energiebalans. Bij diabetici, met verhoogde bloedglucosewaarden, is de expressie van TAS1R2-TAS1R3 en α -gustducine verlaagd. Dit duidt erop dat intestinale expressie van smaakreceptoren afhankelijk is van de metabolische toestand. Men kan bijvoorbeeld met behulp van GLP-1 receptor agonisten type 2 diabetes mellitus aanpakken aangezien bij deze ziekte de glucosespiegels te hoog zijn. Verschillende GLP-1 mimetica met verhoogde stabiliteit en DDP4 inhibitoren zijn momenteel

op de markt voor de behandeling van obesitas gerelateerde type 2 diabetes. Elementen van de smaaksignaalweg kunnen hierin mogelijk een belangrijk doelwit worden [63].

2.2.3.2.2 Andere smaakreceptoren op de L-cel

De L-cel beschikt naast de zoetsmaakreceptor ook over andere smaakreceptoren. L-cellen brengen ook FFAR1 en FFAR4 tot expressie die zorgen voor het waarnemen van lange en medium vetzuren. Hier zorgt bijvoorbeeld een orale inname van α -linoleenzuur voor een verhoogde GLP-1 secretie *in vivo* door activatie van FFAR4 [64].

FFAR3 en FFAR2 zijn twee korteketenvezuren receptoren (KKV-receptoren) die voorkomen op de L-cel en gekoppeld zijn aan het G-proteïne, α -gustducine [65]. KKV, aanwezig in het colon, zijn afkomstig van de microbiële fermentatie van koolhydraten door de aanwezige microbiota. FFAR3 wordt vooral geactiveerd door propionzuur (C3) en boterzuur (C4) en in mindere mate door azijnzuur (C3) [66]. Ichimura *et al.* toonden aan dat na het koloniseren van kiemvrije muizen met microbiota dit zorgde bij wildtype muizen, en niet bij FFAR3^{-/-} muizen, voor een stijging in PYY waarden. Dus, de PYY-secretie van intestinale L-cellen kan gereguleerd worden door KKV die inwerken op FFAR3 en afkomstig zijn van de microbiota [67]. De ligandaffiniteit van FFAR2 verschilt van die van FFAR3. FFAR2 wordt sterk geactiveerd door azijnzuur en propionzuur en in mindere mate door boterzuur en andere KKV [66].

Activatie van FFAR2 stimuleert de secretie van GLP-1 in primaire colonculturen van muizen. FFAR2^{-/-} muizen vertoonden een verlaagde KKV-geïnduceerde GLP-1 secretie ten opzichte van WT muizen zowel *in vivo* als *in vitro* en vertonen een verzwakte glucosetolerantie [68]. Tot op heden is niet geweten of FARR2 en FARR3 zich bevinden aan de apicale en/of aan de basolaterale zijde van de L-cel. Zowel lumaal als systemisch kunnen KKV GLP-1 secretie stimuleren [68, 69].

Bitterliganden stimuleren secretie van GLP-1 via de TAS2R-receptoren aanwezig op de L-cel waardoor ook bitterreceptoren een invloed kunnen hebben op de regulatie van glucose en insuline [70]. Recent is aangetoond dat de GPRC6A fungeert als een aminozuursensor in GLUTag cellen en zo de GLP1-secretie verhoogt [71].

2.2.4 Chemosensorische cellen in de pancreas

Glucagon en insuline zijn de belangrijkste regulatoren van de bloedglucoseconcentraties. Insuline wordt gesecreteerd door de β -cellen van de pancreas. Het stimuleert de opname van glucose in het weefsel, vooral in de lever, en uiteindelijk de glycogeenproductie waardoor de bloedglucosewaarde daalt. Glucagon, gesecreteerd door de α -cellen van de pancreas, verhoogt de bloedglucosewaardes door het stimuleren van de glycogenolyse. GLP-1, die receptoren op de β -cellen van de pancreas kan binden, stimuleert de insulinesecretie en beperkt aldus de postprandiale bloedglucoseconcentraties. GLP-1 verzorgt op deze manier de glucosehomeostase.

De zoetsmaakreceptor TAS1R2-TAS1R3 is aanwezig in de pancreatische β -cellen en in de MIN6 insulinoma cellijn. Via deze zoetsmaakreceptor kan glucose mogelijk direct insulinesecretie stimuleren via Ca^{2+} - en cAMP-afhankelijke mechanismen [72]. Amino-zuren en vrije vetzuren (VVZ) stimuleren ook de insulinesecretie. Hoe amino-zuren dit doen is tot op heden nog niet gekend, maar men vermoedt dat dit verloopt via het TAS1R1-TAS1R3 heterodimeer [73]. De VVZ kunnen binden op FFAR1 aanwezig op de β -cel en verhogen zo de activiteit van het fosfolipase C en de vorming van IP_3 en diacylglycerol. Binden van IP_3 op de IP_3 -receptor leidt tot Ca^{2+} -vrijzetting uit het endoplasmatisch reticulum. Diacylglycerol en Ca^{2+} activeren proteïne kinase C die zorgt voor de vrijzetting van insuline [74].

2.2.5 Chemosensorische cellen in het vetweefsel

Leptine wordt gesecreteerd door adipocyten, bereikt via het bloed de hersenen en stimuleert op deze manier het verzadigingscentrum waardoor het hongergevoel daalt. De tegenhanger van leptine is ghreline die het hongergevoel doet toenemen, beide hormonen bepalen het hongergevoel en dus de timing van de maaltijd. Leptine heeft ook invloed op de energiehomeostase. Leptine reguleert het lichaamsgewicht en staat gecodeerd in het ob-gen. Muizen, met een mutatie in dit ob-gen, vertonen lagere plasmawaardes van leptine en worden hierdoor obees. Toediening van leptine veroorzaakte een daling in lichaamsgewicht bij deze muizen en kan zo bij muizen werken als een anti-obesitas agens. Obese personen hebben hoge circulerende leptinewaardes maar zijn hier resistent tegen geworden, waardoor leptine-behandeling niet efficiënt is bij obese personen. Tot dusver is er nog weinig geweten om deze resistentie te voorkomen [75, 76].

Adipocyten bevatten zoete smaakreceptoren TAS1R2 en TAS1R3. Dit wordt aangetoond in 3T3-L1 cellijnen [77]. FFAR2 komt ook voor op de adipocyt. KKV kunnen via deze receptoren de leptineproductie stimuleren en kunnen aldus vetopslag en het hongergevoel regelen [78].

2.3 Roux- en-Y maagbypassoperatie

2.3.1 Inleiding

RYGB-operatie is een chirurgische methode die beschouwd wordt als één van de efficiëntste behandelingen van obesitas en wordt bij mensen gekenmerkt door een gewichtsverlies van 32 % [1, 22]. Bij een RYGB wordt met chirurgische nietjes een klein maagreservoir gevormd (maagpouch). Hiermee wordt de hoeveelheid voedsel die een patiënt kan nuttigen beperkt tot ongeveer 30 gram. Het overgebleven, grotere deel van de maag wordt van het maagpouch gescheiden, samen met het duodenum, maar niet weggenomen. Het jejunum wordt omhooggebracht en aan de maagpouch vastgemaakt. De weggenomen maag en het duodenum worden vervolgens aan het nieuwe Y-vormige darmstelsel vastgemaakt zoals weergegeven in figuur 6 [22].



Figuur 6 De Roux-en-Y maagbypass grafisch weergegeven. De rode en groene pijlen volgen respectievelijk de weg van voedsel en verteringssappen [22].

Door deze RYGB-operatie komt het voedsel, via een zeer kleine maag, rechtstreeks in het jejunum terecht. Het duodenum en het grootste deel van de maag worden hierbij overgeslagen. Door deze herschikking (of 'rerouting') komen onverteerde voedingsstoffen terecht in de darm. Bueter *et al.* hebben aangetoond dat muizen zo een 20 % van hun prechirurgisch lichaamsgewicht verliezen waarna hun lichaamsgewicht op lange termijn constant blijft [79]. Initieel werd gedacht dat men het duidelijk gewichtsverlies kon verklaren door de verkleining van de maag, en dus een verminderde voedselinname, en door malabsorptie. Maar verdere onderzoeken hebben aangetoond dat er andere, eventueel belangrijkere oorzaken zijn zoals een verhoogde energie-uitgave, effect van galzuren, microbiota en een veranderde metabole secretie van darmhormonen. Aangezien T2DM ongeveer na 2 dagen een RYGB-operatie reeds opmerkelijk verbetert, is het duidelijk dat de verbeteringen in glucosehomeostase niet enkel te wijten zijn aan een daling van het lichaamsgewicht [80].

2.3.2 Effecten van een Roux-en-Y maagbypass

Een RYGB-operatie heeft effect op een zeer groot aantal factoren. Namelijk het lichaamsgewicht, voedselinname, energie- en glucosehomeostase, GI permeabiliteit, darmmorfologie, hormonenconcentraties, galzuren, microbiota en het centraal zenuwstelsel. Door het groot aantal variërende factoren is het moeilijk te achterhalen welke oorzakelijk of causaal zijn. De effecten van een RYGB staan hieronder beschreven.

2.3.2.1 Effect op lichaamsgewicht en voedselinname

Ratten en muizen vertonen na een RYGB-operatie een snelle daling van het lichaamsgewicht vergeleken met *sham* geopereerde dieren. RYGB-geopereerde ratten verliezen gemiddeld 20 % van hun prechirurgisch gewicht waarna het constant blijft [79]. Deze daling in lichaamsgewicht is vooral te danken aan een daling van de vetmassa terwijl de vetvrije massa typisch constant blijft. Een vermindering van de totale voedselinname kan als een belangrijke oorzaak gezien worden in het gewichtsverlies [81]. Studies in mensen hebben aangetoond dat na een RYGB-

operatie, het hongergevoel voor de maaltijd niet hoger is en het verzadigingsgevoel na de maaltijd niet lager is ondanks het feit dat men globaal genomen een gedaalde voedselinname kent [82]. De meeste studies vertonen hierin gelijkaardige resultaten. Mokadem *et al.* hebben bijvoorbeeld aangetoond dat de voedselinname bij RYGB-muizen significant daalt [83]. Bueter *et al.* toonden aan dat *sham* geopereerde ratten, *gematcht* op basis van lichaamsgewicht, minder voedsel nodig hadden dan de bypassratten om hetzelfde lichaamsgewicht te behouden. Dat wil zeggen dat bypassratten een hogere voedslefficiëntie hebben dan de *sham* geopereerde ratten [79]. De RYGB-operatie induceert alsook een gewijzigde voedselpreferentie waarbij men minder zin heeft in vetten en suikers na een RYGB-operatie. Saeidi *et al.* toonden dit aan met RYGB-geopereerde ratten die een gewijzigde voedselpreferentie vertoonden ten opzichte van *sham* geopereerde ratten [84].

2.3.2.2 Effect op energie-uitgave

De totale energie-uitgave (TEE) is de som van de hoeveelheid energie besteedt in rust (REE), en de energie-uitgave van de totale fysieke activiteit. De energie-uitgave (EE) is afhankelijk van de verhouding vetvrije- en vetmassa. Gewichtsverlies zorgt voor een daling van de energie-uitgave door veranderingen in lichaamssamenstelling- en grootte [85]. Bueter *et al.* hebben aangetoond dat een RYGB bij ratten, waarvan het lichaamsgewicht daalde, leidde tot een stijging in de energie-uitgave (EE) gecorrigeerd voor lichaamsgewicht ten opzichte van *sham* geopereerde ratten, *ad libitum* ratten en niet geopereerde ratten met hetzelfde lichaamsgewicht. Deze stijging was vooral te danken door een stijging in de lichtfase, waar de activiteit van ratten typisch zeer laag is. Er is dus vooral een stijging in REE. De veranderingen in de energiehuishouding na RYGB kunnen verantwoordelijk zijn voor de effectiviteit van de ingreep en kan verklaren waarom obesitaspatiënten op lange termijn hun gewichtsverlies kunnen behouden terwijl dit vaak mislukt bij patiënten die een dieet volgen. De ratten die ondervoed werden en op deze manier evenveel gewichtsverlies hadden, vertoonden een compensatiemechanisme. Namelijk een daling in EE, om tegen het gewichtsverlies in te gaan. Dit compensatiemechanisme lijkt bij RYGB ratten afwezig te zijn. De waargenomen stijging in EE suggereert dat RYGB de fysiologische mechanismen verandert die in het lichaam de energiebalans reguleren [79].

De studies op ratten staan in contrast met onsamenhangende resultaten van humane testen. Sommige humane studies vertonen een daling in lichaamsgewicht gecorrigeerde REE waar men aldus op lange termijn geen significante veranderingen heeft in energie-efficiëntie. Deze daling in REE werd voorspeld door een daling in lichaamsweefsel en dus lichaamsgewicht [86]. Andere humane studies tonen dan weer een stijging in lichaamsgewicht gecorrigeerde REE [87].

2.3.2.3 Effect op glucose-homeostase

Obesitaspatiënten vertonen meestal T2DM die veroorzaakt wordt door insulineresistentie en β -cel dysfunctie. Bij een β -cel dysfunctie ontstaat er onvoldoende of een te late insulineafscheiding terwijl bij de insulineresistentie het plasma-insulinegehalte normaal kan zijn maar perifere weefsels een lagere gevoeligheid vertonen.

Glucosetolerantie, oftewel de mate waarin het lichaam de aangeboden glucose verwerkt, verbetert sterk na een RYGB-operatie. Dit is ondermeer aangetoond in een studie van Meirelles *et al.* die een reductie van 29 % in de oppervlakte onder de curve voor bloedglucosewaarden waarnam ten opzichte van de *sham pair fed (sham PF)* groep. Dit is een groep ratten die een shamoperatie ondergaan en evenveel voedsel aangeboden krijgen als de geopereerde RYGB-groep eet. De RYGB ratten vertoonden een significant lager basaal niveau van insulineaardenes 60 en 120 minuten na een gavage met dextrose ten opzichte van de *sham PF* groep. Hieruit kan men concluderen dat zowel het basaal insuline, als het basaal glucoseniveau lager is ten opzichte van *sham* geopereerde ratten [88]. De RYGB normaliseert hyperglycemie, herstelt de insulinegevoeligheid en verbetert de glucosetolerantie [89]. De meeste studies tonen na enkele dagen, voordat er gewichtsverlies optreedt, een terugkeer naar euglycemie en normale insulineaardenes aan. Hieruit kan men suggereren dat de controle van T2DM waarschijnlijk wordt gemedieerd door veranderingen in de secretie van entero-endocriene hormonen en niet door de daling van het lichaamsgewicht [90]. Stijgende plasmawaardenes van GLP-1, na een RYGB, worden gepostuleerd als een mogelijke oorzaak van deze plotse verbetering in glucosetolerantie. Jørgensen *et al.* toonden aan dat GLP-1 een belangrijke functie heeft in het verbeteren van de glucosetolerantie en de β -cel functie. In deze humane studie met 9 T2DM-patiënten werd gebruik gemaakt van een infusie van een specifieke GLP-1 receptorblokker, exendin (9-39), die samen met een maaltijd werd ingenomen. Deze GLP-1 receptorantagonist werkte de verbeteringen in glucosetolerantie en β -cel glucosensitiviteit tegen waaruit besloten werd dat stijgende GLP-1 waardenes belangrijk zijn voor de voordelige effecten in de glucosehomeostase na een RYGB [91].

Maar studies in muizen konden geen oorzakelijke rol van de GLP-1 stijging aantonen. Mokadem *et al.* toonde dit aan in muizen die niet beschikten over een GLP-1 receptor (GLP-1 $r^{-/-}$ muizen). In dit model zorgde de RYGB-operatie voor een daling in lichaamsgewicht en een verbeterde glucosehomeostase ten opzichte van WT RYGB muizen. Zij concludeerden hieruit dat GLP-1, via zijn receptor of zijn actieve metabolieten, geen invloed heeft op de verbeterde glucosetolerantie of gewichtsverlies na een RYGB-operatie [83].

2.3.2.4 Effect op concentratie van circulerende darmhormonen

Een RYGB-operatie heeft een effect op de circulerende darmhormonen. Atkinson *et al.* toonden aan dat ratten minder aten nadat ze geïnjecteerd werden met plasma afkomstig van RYGB ratten. Dit effect werd niet waargenomen wanneer deze ratten werden geïnjecteerd met plasma afkomstig van *sham* geopereerde ratten. Na deze studie kon men concluderen dat de

onderdrukking van voedselinname te danken is aan een transfereerbare humorale factor en niet door ziekte of ongemak na de zware RYGB-operatie [92]. Maar, zoals hierboven beschreven wordt dit niet door elke studie beaamd. Mokadem *et al.* hebben bijvoorbeeld aangetoond dat de voedselinname bij RYGB muizen niet significant daalt [83].

De verzwakte eetlust kan na een RYGB-operatie toegeschreven worden aan de verhoogde secretie van darmhormonen afkomstig van de L-cel, namelijk GLP-1 en PYY maar ook amyline en cholecystokinine (CCK). Deze stijging is zowel basaal als postprandiaal waarneembaar. Verder werd aangetoond dat RYGB-patiënten, met een gewichtsverlies van 40 %, een veel hogere postprandiale GLP-1 en PYY respons hebben ten opzichte van RYGB-patiënten met een gewichtsverlies van 20 % [93]. De combinatie van deze verzadigingshormonen zouden een logische verklaring kunnen geven voor de gedaalde voedselinname die waargenomen wordt in RYGB-ratten. Le Roux *et al.* benadrukte dit en toonde aan dat de eetlust terugkomt wanneer de vrijzetting van deze darmhormonen wordt geïnhibeerd [94]. Men concludeerde hieruit dat darmhormonen een invloed hebben op de verzwakte eetlust na een RYGB en zo een effect kunnen uitoefenen op het gewichtsverlies. Cummings *et al.* toonden aan met een studie op mensen dat plasmaghrelineconcentraties zeer sterk dalen na een RYGB, ten opzichte van controlepatiënten, en niet meer afhankelijk zijn van de maaltijd [42]. Dit klinkt logisch aangezien men hierdoor minder eetlust verkrijgt. Maar studies op ghreline blijven onsamenhangend [95].

Tot op heden zijn de prikkels die zorgen voor een verhoogde secretie van darmhormonen na een RYGB ongekend en worden enkel hypothesen vooropgesteld. Na een RYGB wordt het grootste aantal L-cellen teruggevonden in de meer proximale delen van de dunne darm, namelijk het Roux-segment en dus niet in het ileum [96]. Hierdoor komen hogere concentraties nutriënten in contact met deze L-cellen die kunnen zorgen voor hogere secreties van GLP-1 en PYY. Hier komt nog eens bij dat onverdunde galzuren terechtkomen in het common-segment waar ze de secretie van de L-cel kunnen stimuleren via de TGR5-receptor. Maar het is voorlopig onduidelijk of er een directe link is tussen een verhoogde blootstelling van galzuren aan de L-cel en een stijging in PYY en GLP-1 [97].

2.3.2.5 Effect op gastro-intestinale permeabiliteit

De darmwand laat de opname van nutriënten toe en vormt een barrière van slechts één cellaag die ons lichaam beschermt tegen schadelijke stoffen. De permeabiliteit van deze barrièrelaag is een belangrijke factor die bepaalt in welke mate de darmwand ons tegen toxines kan beschermen. Obesitas wordt geassocieerd met een stijging in de intestinale permeabiliteit waardoor endotoxines in het lumen makkelijker worden opgenomen [98]. Teixeira *et al.* toonde dit aan in muizen waar een verhoogde intestinale permeabiliteit steeds gecorreleerd werd met verhoogde plasma-endotoxinewaarden [99]. Deze plasma-endotoxinewaarden worden nog sterker verhoogd door een hoogvetdieet waar de proportie van een LPS-bevattende microbiota sterk toenam. Deze endotoxines worden gerelateerd met

obesitas, insulineresistentie en een gestegen GI permeabiliteit. Deze relatie is in mensen nog steeds niet bevestigd [100].

De RYGB-operatie zorgt voor een verbetering van de intestinale permeabiliteit. GLP-2 kan hier een belangrijke rol in spelen aangezien het de intestinale mucosale epitheellaag onderhoudt door in te werken op de motiliteit, nutriëntabsorptie, cryptproliferatie en apoptose en heeft hierdoor een directe invloed op de intestinale permeabiliteit. De werking van GLP-2 verloopt waarschijnlijk via de intestinale epitheliale IGF-1 receptor. Dit is aangetoond in een studie waar men een GLP-2- analoog toediende in muizen. Dit zorgde voor een opregulatie van de *tight-junctions* claudine-3 en claudine-7 ten opzichte van controlemuizen die de IGF-1 receptor niet bevatten en resulteert in een daling van de gastro-intestinale permeabiliteit [101].

In humane studies werd een verhoogde expressie van de *tight junctions* claudine-3 en claudine-4 waargenomen terwijl het expressieniveau van occludine en zona occludens-1 daalde. Door de aanwezigheid van een hoger aantal *tight-junctions* worden de cellen lateraal dichter tegen elkaar gedrukt waardoor de permeabiliteit daalt [102].

2.3.2.6 Effect op darmmorfologie

De RYGB-operatie zorgt voor morfologische veranderingen in de intestinale mucosa. Er wordt een duidelijke verdikking waargenomen in het Roux-segment en het common-segment van RYGB muizen. Het totale en mucosale oppervlak van het doorgesneden Roux- en common-segment waren significant hoger ten opzichte van shammuizen. Dit wijst op hypertrofie. In het Roux- en commonsegment van RYGB-muizen zijn de villi veel langer en liggen de epitheliale cryptes dieper ten opzichte van shamgeopereerde muizen. Mucosale hypertrofie werd in het colon niet waargenomen. Het biliopancreatische segment, dat niet in aanraking komt met voedsel, vertoont ook geen hypertrofie [96].

In RYGB-muizen worden ook dubbel zo veel L-cellen teruggevonden ten op zichte van shammuizen. Deze stijging is vooral te danken door een grote stijging van L-cellen in het Roux-segment en in zeer kleine mate in het common-segment. In het biliopancreatische segment en in het colon wordt geen enkele stijging waargenomen. Maar, door het groter mucosavolume, is de dichtheid van de L-cellen niet veranderd. Het lijkt dat de L-celdichtheid in het DNA gecodeerd staat en door de hypertrofie er een L-cel hyperplasie plaatsvindt waardoor de dichtheid van de L-cel niet verandert. Hoe deze hypertrofie ontstaat is niet geweten. Men kan postuleren dat hypertrofie in bepaalde segmenten van de darm een respons is op het veranderde aanbod van voedingsstoffen en dat hypertrofie een manier is om de vertering en absorptie van voedingsstoffen te verbeteren. De hypertrofie kan mogelijks verklaard worden door verhoogde GLP-2 vrijzetting uit intestinale L-cellen, aangezien GLP-2 de productie van trofische peptiden stimuleert. Het mechanisme waarop deze werken is niet gekend [103].

2.3.2.7 Effect op microbiota en korteketenvezuren

Darmbacteriën hebben een belangrijke functie in het energiemetabolisme van het lichaam en zelfs in de ontwikkeling van obesitas. Verschillende studies hebben aangetoond dat de microbiota veranderen na een RYGB-operatie. Dit gebeurt niet enkel door anders te eten na de operatie maar vooral door het *rerouten* van de voedingsstoffen en de biliopancreatische secreties. Veranderingen in de samenstelling van de microbiota hebben een belangrijk effect op het lichaamsgewicht na een RYGB. Dit wordt aangetoond in studies waar de darmflora van RYGB muizen werd overgebracht op kiemvrije muizen. Deze kiemvrije muizen vertoonden een daling in hun lichaamsgewicht en hun vetmassa vergeleken met muizen die de darmflora verkregen van shammuizen. Dit kan te wijten zijn door een veranderde microbiële productie van korteketenvezuren (KKV) [104]. De microbiota komt, na een RYGB-operatie, in contact met hogere nutriëntconcentraties waardoor er meer microbiële fermentatie mogelijk is en KKV-concentraties zullen stijgen. Azijnzuur (C2), propionzuur (C3) en boterzuur (C4) zijn de meest voorkomende KKV en kunnen de fysiologie van de gastheer op verschillende manieren beïnvloeden. KKV kunnen dienen als primaire energiebron voor de colonocyten, als substraten voor vetopslag in het vetweefsel en als modulators in het immuunsysteem. Ze kunnen het vet- en glucosemetabolisme en eetlust regelen door te binden op de G-proteïne gekoppelde vetzurreceptoren FFAR3 en FFAR2 [105, 106].

FFAR2 en FFAR3 komen beide tot expressie in de L-cel in het colon waar de concentratie van KKV het hoogst is. In de colon spelen FFAR's een belangrijke rol in de secretie van darmhormonen. Dit werd aangetoond in FFAR2^{-/-} and FFAR3^{-/-} muizen waar een verminderde KKV-afhankelijke GLP-1 secretie werd waargenomen. Een verhoogde concentratie aan KKV kunnen aldus zorgen voor een verhoogde secretie van GLP-1 na een RYGB [68]. FFAR3 komt naast de L-cel ook nog voor op de adipocyt. KKV stimuleren de leptineproductie en kunnen aldus vetopslag en het hongergevoel regelen. Bij verhoogde KKV-concentraties, na een RYGB, kan dus de leptinesecretie toenemen waardoor de vetopslag en de eetlust verminderd wordt [78].

3 Materiaal en methoden

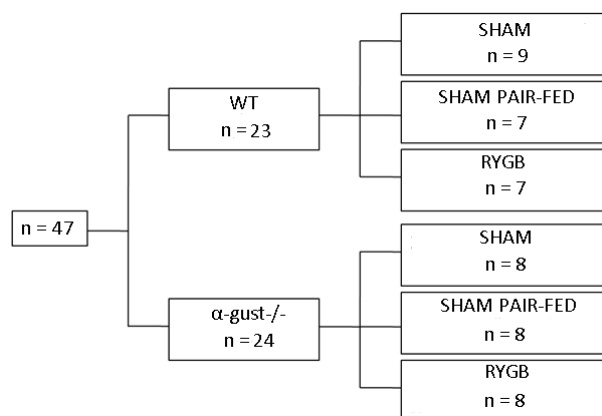
3.1 In vivo experimenten

3.1.1 Muizen

Er wordt in dit onderzoek gebruik gemaakt van mannelijke C57 black 6 (C57Bl6) WT muizen en α -gustducine^{-/-} knockout muizen (α -gust^{-/-}) met een C57Bl/6 achtergrond. Deze knockout muizen bevatten het smaak G-proteïne α -gustducine niet, waardoor we de rol van de nutriëntsensing in de effecten van RYGB-operatie kunnen nagaan. Alle experimenten zijn goedgekeurd door het ethisch commissie voor proefdieren van de Katholieke Universiteit van Leuven (projectnummer P176/2013).

3.1.2 Opzet van experimenten

Muizen van 6 weken oud worden in een temperatuurgecontroleerde omgeving (20-22 °C) in een 14 uur licht/10 uur donker cyclus gehuisd. De muizen hebben vrije toegang tot een hoogvet-hoogsuikerdieet (Harlan, TD.08811, Harlan research Diets, Indianapolis, USA) en water. De muizen worden willekeurig toegewezen aan 1 van de 6 groepen zoals weergegeven in figuur 7. Eén groep ondergaat de RYGB-operatie, een andere groep ondergaat een shamoperatie en een laatste groep ondergaat een shamoperatie en ontvangt per dag de hoeveelheid voedsel die de dag ervoor door de RYGB muizen gegeten wordt. Deze laatste groep wordt de *sham pair-fed* groep genoemd. De shamoperatie omvat een gastrostomie en jejunostomie. De shamgroep wordt gebruikt zodat alle muizen die bestudeerd worden dezelfde stress hebben ondergaan. De *sham PF* groep geeft een indicatie van hormonale veranderingen en wijzigingen in het nutriëntwaarnemingssysteem veroorzaakt door een wijziging in de voedselinname. Dit is om na te gaan of de waargenomen effecten te wijten zijn aan een geïnduceerde daling in voedselinname of door andere operatie-geïnduceerde factoren.



Figuur 7 Willekeurige indeling van C57Bl6 muizen in de opzet van het experiment. 23 wildtype (WT) muizen en 24 gustducine^{-/-} knockout muizen (α -gust^{-/-}) worden willekeurig onderverdeeld in een shamgroep, sham *pair-fed* groep en RYGB-groep.

3.1.3 RYGB-operatie

De RYGB-operatie wordt uitgevoerd door M. Lannoo, een obesitaschirurg in het UZ Leuven. M. Lannoo heeft reeds ervaring met deze operatie in muizen en maakt gebruik van het protocol beschreven in Seyfried *et al.* [107]. Chirurgische anesthesie met isofluraan (2-3 %) en met O₂ wordt geïnduceerd en onderhouden doorheen de procedure. De muizen worden op een warmtepad geplaatst om hypothermie te voorkomen en de buikstreek wordt geschoren en gedesinfecteerd alvorens een laparotomie van 4 cm uit te voeren. In de RYGB-groep gaat het jejunum 10 cm aboraal ten opzichte van de pylorus getransecteerd worden om het biliopancreatische segment te creëren. Het aborale einde en de bloedvaten hierrond worden geligeerd om bloedingen te voorkomen. De oesogastrische junctie wordt blootgelegd en de oesophagus wordt gemobiliseerd. De esofagogastrische junctie wordt gesloten. Het aborale jejunum wordt aan de esofagogastrische junctie geanastomeerd op een *end-to-side* manier. Het jejunum wordt 10 cm na de junctie opengesneden om het Roux-segment te creëren. Daar wordt een *end-to-side* jejunostomie uitgevoerd om het common-segment te creëren. De buikholte wordt hierna weer dichtgenaaid. In de shamgroep wordt een 4 cm laparotomie uitgevoerd. Vervolgens wordt een gastrostomie en een jejunostomie uitgevoerd om de RYGB-operatie na te bootsen. Na de RYGB-operatie is 55 % van WT muizen en 63 % van de α -gust^{-/-} gestorven waardoor er 7 WT en 8 α -gust^{-/-} muizen overgebleven zijn.

3.1.4 Opoffering

De muizen worden in hun 6^e levensweek op een hoogvet-hoogsuiker dieet (Harlan, TD.08811, Harlan research Diets, Indianapolis, VS) gezet. De muizen worden zo obees en diabeet. In de 18^e levensweek worden ze geopereerd. In de 25^e levensweek worden de muizen opgeofferd waarbij weefsel- en bloedstalen worden genomen. Het opofferen gebeurt na zes uur vasten gevolgd door een gavage van een vloeibare maaltijd, namelijk 200 μ l nutridrink[®], 15 minuten voor de opoffering. De samenstelling van nutridrink[®] is weergegeven in bijlage A. De muizen worden geïnjecteerd met 400 μ l anestheticum bestaande uit 1 % Xyl-M[®] (2 % xylazine hydrochloride, VDM, Arendonk, België) en 20 mg/ml Anesketin[®] (115 mg/ml ketamine hydrochloride, Eurovet, Bladel, Nederland). De muizen worden opgeofferd door middel van een cardiale punctie waarbij het bloed wordt gecollecteerd.

Ethyleendiaminetetra-acetaat (EDTA, 1/10), 4-(2-aminoethyl) benzeensulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF, 1/20) en dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPPIV, 1/100) worden aan de bloedstalen toegevoegd alvorens ze gedurende 10 minuten aan 2000 rpm op 4 °C te centrifugeren. Plasma wordt gecollecteerd en het deel dat gebruikt wordt voor de ghrelinebepaling wordt aangezuurd (10 %, 1 M HCl) en bewaard op -80 °C.

De muizen worden gedissecteerd en de hypothalamus, pancreas, vet, lever, maag, duodenum, jejunum, ileum, caecum en het proximaal en distaal colon worden onderverdeeld in een deel voor een proteïnebepaling en een deel voor RNA-bepaling (overnacht incubatie in RNAlater (RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Hilden, België)) en bewaard op -80 °C voor verdere

bepalingen. Bloedglucose wordt in de nek gemeten met behulp van een glucosemeter (Glucomen XL[®], A. Menarini Diagnostics, Zaventem, België). De inhoud van caecum, distaal en proximaal colon worden gecollecteerd voor latere KKV-bepalingen.

3.2 Meten van octanoylghreline en totale ghrelineconcentraties in plasmastalen

3.2.1 Ghreline-extractie

Ghreline wordt uit de stalen geëxtraheerd met behulp van Sep-Pak C₁₈ kolommen (360 mg *silica beads* met C₁₈-ketens, 55-50 µm Ø, 125 Å, Walters Corporation, Mildford, MA, VS). De C₁₈ kolommen worden gepreëquilibreerd met 80 % CH₃CN-0,1 % TFA (Trifluorazijnzuur, C₂HF₃O₂, ACROS Organics™, Geel, België) en uiteindelijk 3 % CH₃CN-0,1 % TFA. Vervolgens wordt een gelijke hoeveelheid 10 % CH₃CN aan het staal toegevoegd en op de C₁₈ kolommen geladen. Hierna worden de C₁₈ kolommen gewassen met 15 % CH₃CN-0,1 % TFA en tenslotte geëluëerd met 50 % CH₃CN-0,1 % TFA. Het eluaat wordt hierna gelyofiliseerd door gebruik te maken van de Speed-Vac (Univapo 150 ECH, Montreal Biotech, Dorval, PQ, Canada). Het staal wordt uiteindelijk op -80 °C bewaard.

3.2.2 Radioimmunoassay (RIA)

Plasmaconcentraties van totaal ghreline en octanoylghreline worden bepaald met behulp van een *radioimmunoassay* in duplo. De vacuüm gedroogde plasmastalen worden heropgelost in een RIA buffer (50 mM Na₂HPO₄(2H₂O); 25 mM Na₂EDTA; 80 mM NaCl; 0,05 % NaN₃; 0,5 % Triton X-100 en 0,5 % bovine serum albumine (BSA); pH 7,4). Voor het meten van de totale ghrelineconcentraties worden stalen met een factor van drie verdund met RIA buffer.

Het konijn anti-humaan-ghreline antilichaam voor octanoylghreline (AB5004, 100000 X, Peninsula, Laboratories Inc., Bachem) wordt opgelost in 0,5 % normaal konijnenserum (NRS) (normal rabbit serum, Jackson Immunoresearch, 011-000-120). Voor het meten van totaal ghreline wordt het konijn anti-humaan-ghreline antilichaam voor ghreline (AB2066, 30000 x, Peninsula, laboratories Inc., Bachem) opgelost in RIA buffer met 0,5 % NRS. 200 µl van deze antilichaamoplossing wordt aan 100 µl staal toegevoegd. Na een incubatie overnacht op 4 °C wordt hierna 100 µl ¹²⁵I gelabeld ghreline toegevoegd (5000-7000 cpm). Dit mengsel wordt gedurende 48 uur geïncubeerd op 4 °C. Vervolgens wordt 100 µl SAC-CEL anti konijn (AA-SAC1 Lucron Bioproducts, DS Boldon NE35 9PD, Engeland) toegevoegd en 45 minuten geïncubeerd bij 4 °C. Nadien worden de stalen 20 minuten op 3000 rpm bij 4 °C gecentrifugeerd om de niet gebonden antigenen te verwijderen in het supernatans. Als laatste stap wordt de radioactiviteit van ¹²⁵I gemeten in de pellet door de gamma-teller (Cobra II auto-gamma, Packard, Downers grove, IL, VS). De stalen worden uiteindelijk gekwantificeerd met behulp van een standaardcurve voor totaal ghreline (seriële verdunning van ½ vertrekkend vanaf 16000

pg/ml ghreline) en een standaardcurve van octanoylghreline (seriële verdunning van ½ vertrekkend vanaf 4000 pg/ml octanoylghreline).

3.3 RNA-extractie uit weefsels, cDNA synthese en real-time PCR

Aan ongeveer 30 mg weefsel wordt 600 µl RLT buffer (Qiagen, Venlo, Nederland), met 1/100 β-mercapto-ethanol (GIBCO, Gent, België) toegevoegd. Het weefsel wordt vervolgens met een frequentie van 30 Hz 4 minuten gehomogeniseerd met behulp van de Tissuelyzer. De totale RNA-extractie wordt uitgevoerd met behulp van de RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nederland) met enkele verschillen van het standaard protocol. Na de RNA-extractie wordt 3 µl Turbo DNase buffer en 1 µl Turbo DNase toegevoegd aan het RNA en wordt deze 25 minuten geïncubeerd op 37 °C. Hierna wordt 3 µl DNase inactivatiereagens toegevoegd. Het mengsel wordt vervolgens 5 minuten op kamertemperatuur gevortext en daarna gecentrifugeerd op 14000 rpm gedurende 2 minuten. Het supernatans wordt overgebracht in een nieuw epje waarvan de concentratie wordt gemeten met de nanodrop 2000.

Het RNA wordt met behulp van het Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, VS) getranscripteerd tot cDNA. Na 10 minuten voorverwarmen op 58 °C voegt men aan 7 µl staal, dat 2 µg RNA bevat, 12 µl premix toe. Deze premix bevat per staal 4 µl 5X First-Strand buffer (250 mM Tris-HCl; pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M dithiothreitol (DTT), 2 µl 5 mM dNTP, 2 µl RNase vrij water, 1 µl RNase inhibitor en 1 µl oligo-dT₁₂₋₁₈ primers (Life Technologies, Carlsbad, CA, VS). Het staal wordt samen met de premix 2 minuten verwarmd op 42 °C. Hierna wordt 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase toegevoegd en 50 minuten geïncubeerd op 42 °C. Om de reactie te stoppen voegt men per staal 30 µl RNase vrij water en 1 µl 0,1 M EDTA toe en wordt het mengsel 10 minuten op 95 °C verwarmd. Het cDNA wordt uiteindelijk op -80 °C bewaard.

De real-time polymerase ketting reactie (RT-PCR) wordt uitgevoerd met de LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics, Basel, Zwitserland). In een 96-well multititerplaat wordt 1 µl cDNA (bevat 2 µg cDNA) toegevoegd samen met 9 µl premix (3 µl PCR water; 0,5 µl 5 µM *forward* primer; 0,5 µl 5 µM *reverse* primer; 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix). De primersequenties die gebruikt worden zijn weergegeven in tabel 1. Het expressieniveau van het onderzochte gen wordt berekend met behulp van de LightCycler® 480 software en wordt uitgedrukt relatief ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van de Cp-waarden van de huishoudgenen β-actine, ribosomaal proteïne L13a (Rpl13a) en hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1). Voor het berekenen van de relatieve expressie wordt de onderstaande formule gebruikt. De RT-PCR reactie wordt in drievoud uitgevoerd en met behulp van een calibrator wordt gecorrigeerd voor inter-plaat variaties.

$$\text{relatieve expressie ratio } (R) = \frac{(E_{Target})^{\Delta CP_{target}(\text{controle-sample})}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref}(\text{controle-sample})}}$$

Tabel 1 Forward en reverse primers van genen die onderzocht worden met behulp van RT-PCR.

Gen	Forward primer	Reverse primer
β-actine	GATCTGGCACCACACCTTCTAC	TGGATGGCTACGTACATGGCTG
Claudine 1	ACTCCTTGCTGAATCTGAACAGT	CTGATCGCAATCTTTGTGTCC
Ghrelina	CCAGAGGACAGAGGACAAGC	ACATCGAAGAGCATTGAA
GOAT	ACCCGGGCCAGGTACCT	ACCCATGGCAGCAAAAGC
GLUT2	TCTTCACGGCTGTCTCTGTG	AATCATCCCGGTTAGGAACA
GPR41	GTCTGTTGGTTCCTGGCATC	CCTGGCTGTAGTTGCATTT
GPR43	GGGATCTGGGTCACATGCTTAT	ATGTCAGACAGACGGGTACCAA
Hprt1	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
Occludine 3	GCTTATCTTGGGAGCCTGGACA	CAATCATTATGCACAAGCAATGAC
Proglucagon	GAGGAGAACCCAGATCATTCC	GTGGCGTTTGTCTTCATTTCATC
Rpl13a	GATCTGGCACCACACCTTCTAC	GCAGGCATGAGGCAAACAGTC
SLGT1	CGGAAGAAGGCATCTGAGAA	AATCAGCACGAGGATGAACA
TAS1R2	AAGCATCGCCTCCTACTCC	GGCTGGCAACTCTTAGAACAC
TAS1R3	CCCAACAGCATCCCGTGCAA	CTCCACAGCCATCTTCATAGC
Zona Occludens 1b	CCCTACCAACCTCGGCCTT	AACGCTGGAAATAACCTCGTTC

3.4 Bepaling van KKV uit faeces

Voor het analyseren van de KKV wordt een gekende hoeveelheid faeces (± 50 mg) opgelost in 1 ml verzadigde NaCl oplossing (36 %). 3 ml ether, een kleine hoeveelheid Na_2SO_4 , 150 μl H_2SO_4 en 50 μl interne standard (2-ethylboterzuur) worden toegevoegd aan elk staal. Met een injectie van 1 μl staal worden de KKV geanalyseerd door een gaschromatografie-massaspectrometrie quadropool (Finnigan Trace GC, Thermoquest). De injectie is gekoppeld met een on-line *purge-and-trap* systeem (Velocity, Teledyne Tekmar, Mason, VS). Voordat het staal de massaspectrometer ingaat worden de componenten geïoniseerd door een vlamionisatiedetector. De bekomen chromatogrammen worden verwerkt met behulp van AMDIS (Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification Software) aangeboden door het Nationaal Instituut voor Standaarden en Technologie (NIST Californië, VS). De stalen worden gekwantificeerd met behulp van een kalibratiecurve (0 %; 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 6 %; 8 %; 10 %; 15 %; 20 %; 25 % stockoplossing). Deze stockoplossing bevat 522 mg azijnzuur, 100,4 mg propionzuur, 170,6 mg boterzuur and 5 mg octaanzuur per 100 ml.

3.5 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Voor het meten van insuline in het plasma wordt gebruik gemaakt van de *mouse metabolic kit* (MesoScaleDiscovery (MSD), Gaithersburg, VS). GLP-1 wordt geanalyseerd met behulp van de actieve GLP-1 kit (MSD, Gaithersburg, VS). Beide ELISA's worden uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant MSD.

3.6 Statistische analyse

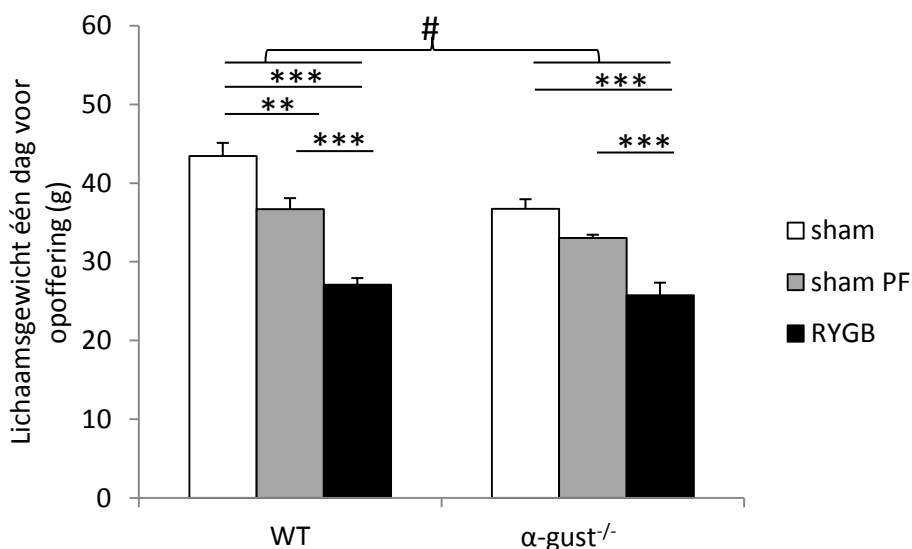
Alle resultaten worden weergegeven als gemiddelde \pm standaardfout van het gemiddelde (*Standard Error of Mean* of SEM). De statistische analyse gebeurt met behulp van STATISTICA versie 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, VS). Een *two-way* ANOVA wordt gebruikt om het effect van de RYGB-operatie na te gaan in verschillende genotypes gevolgd door *planned comparison post hoc testing* met een correctie volgens Bonferroni-Holm. Verschillen worden beschouwd als significant bij een p-waarde kleiner dan 0,05.

4 Onderzoekresultaten

4.1 Lichaamsgewicht en voedselinname

WT en α -gust^{-/-} muizen verkregen 12 weken een hoogvet-hoogsuikerdieet waardoor deze obese werden. De obese muizen werden hierna willekeurig toegewezen aan 1 van de 3 operatiegroepen waarvan één groep een RYGB-operatie onderging, een andere groep een shamoperatie en een laatste groep een shamoperatie waarna de muizen dezelfde hoeveelheid eten kregen als de RYGB muizen aten. Deze laatste groep werd de *sham pair-fed* groep genoemd. De shamoperatie werd uitgevoerd om alle muizen dezelfde hoeveelheid stress van de operatie te geven. De *sham pair-fed* groep gaf een indicatie van hormonale veranderingen en wijzigingen in het nutriëntwaarnemingssysteem veroorzaakt door de restrictie van voedselinname die kenmerkend is voor de RYGB-chirurgie.

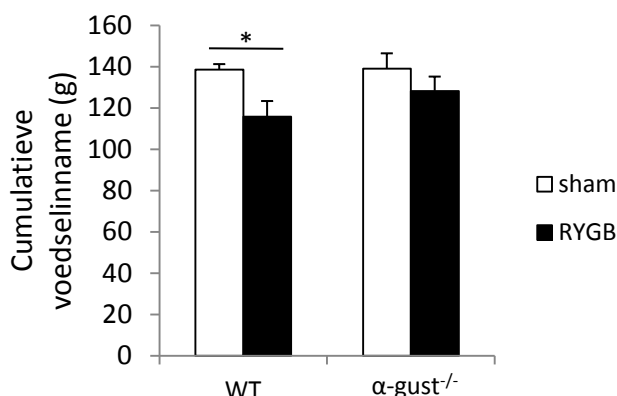
Na de RYGB- of shamoperatie werden de muizen verder op een hoogvet-hoogsuikerdieet gezet waarbij het lichaamsgewicht om de 2 dagen en de voedselinname om de 3 dagen werd opgevolgd. De RYGB-operatie induceerde een significante daling van het lichaamsgewicht in WT en α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van zowel de *sham PF*- ($p < 0,001$) als de shamgroep ($p < 0,001$) (figuur 8). Deze daling in lichaamsgewicht ten opzichte van de shamgroep was afhankelijk van het genotype ($p < 0,05$). In WT muizen, maar niet in α -gust^{-/-} muizen, induceerde *pair-feeding* een daling in lichaamsgewicht ($p < 0,01$).



Figuur 8 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op lichaamsgewicht (g) één dag voor opoffering in WT ($n = 5-8$) en α -gust^{-/-} ($n = 6-8$) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; genotype*operatie effect: # $p < 0,05$).

De cumulatieve voedselinname gemeten gedurende 6 weken na de RYGB-operatie, was significant lager na een RYGB-operatie dan na de shamoperatie in WT muizen ($p < 0,05$) maar

niet in α -gust^{-/-} muizen (figuur 9). Dit kan mogelijk verklaren waarom WT muizen meer gewicht verliezen na een RYGB-operatie dan α -gust^{-/-} muizen.



Figuur 9 Het effect van een RYGB ten opzichte van een shamoperatie op de cumulatieve voedselinname (g) in WT (n = 5-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* p < 0,05).

4.2 Plasmawaardes bij opoffering

4.2.1 Ghreline

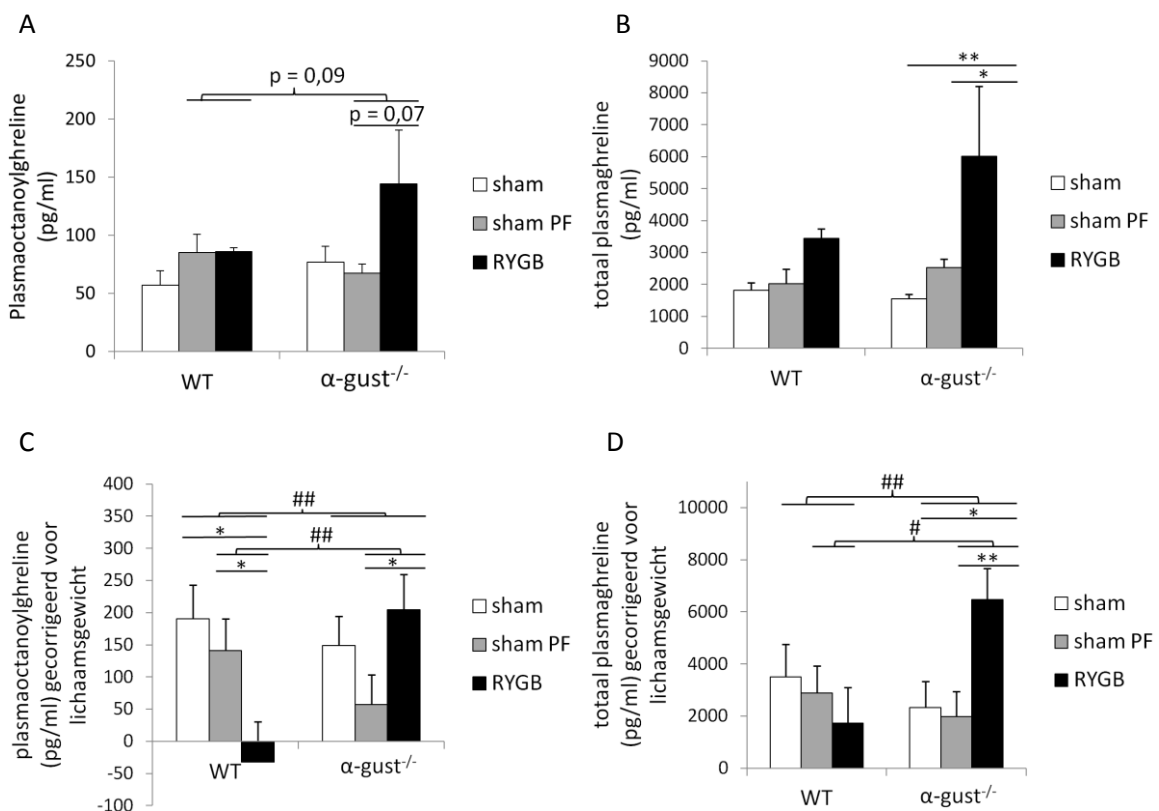
Om te bepalen of een RYGB-operatie de ghrelinwaarden kan beïnvloeden werd de plasmawaarde van ghreline bij opoffering bepaald na een periode van 6 uur vasten, 15 minuten na een gavage van nutridrink®. In WT muizen werden geen significante verschillen van plasmaoctanoylghrelineconcentraties waargenomen tussen de drie groepen (figuur 10 A). De RYGB-operatie induceerde in α -gust^{-/-} muizen een neiging tot hogere concentraties van plasmaoctanoylghreline ten opzichte van de sham PF groep (p = 0,07). De totale plasmaconcentraties van ghreline werden in de drie WT groepen niet beïnvloed (figuur 10 B). De RYGB-operatie veroorzaakte in de α -gust^{-/-} muizen een significante stijging van totale plasmaghrelinwaarden ten opzichte van de sham PF- (p < 0,05) en de shamgroep (p < 0,01).

Plasmaghrelinwaarden waren gecorreleerd aan het lichaamsgewicht, waarbij men typisch lagere plasmaghrelinwaarden terugvond bij personen met een hoger lichaamsgewicht. Aangezien de RYGB-operatie een significant verschil in lichaamsgewicht induceerde werd er nagegaan of deze verandering in lichaamsgewicht verantwoordelijk was voor de wijzigingen in plasmaghrelinwaarden. Met behulp van STATISTICA 12 werd een covariaatanalyse uitgevoerd waaruit bleek dat de plasmaghrelinwaarden afhankelijk waren van het lichaamsgewicht. Hierdoor werden de plasmaghrelinwaarden gecorrigeerd voor de covariaat lichaamsgewicht en opnieuw statistisch geanalyseerd. Deze resultaten geven de veranderingen in ghrelinwaarden, onafhankelijk van de veranderingen in lichaamsgewicht, weer.

Voor de gecorrigeerde geoctanoyleerde plasmaghrelinwaarden induceerde de RYGB-operatie in WT muizen een significante daling ten opzichte van de sham PF- (p < 0,05) en de shamgroep

($p < 0,05$) afhankelijk van α -gustducine ($p < 0,01$) (figuur 10 C). In α -gust^{-/-} muizen vertoonde de RYGB-groep een significante stijging van gecorrigeerd plasmaoctanoylghreline ten opzichte van de sham PF groep ($p < 0,05$) maar niet ten opzichte van de shamgroep.

In tegenstelling tot de effecten op octanoylghreline werden voor de gecorrigeerde totale ghrelinewaardes geen verschillen waargenomen tussen de 3 groepen in de WT muizen (figuur 10 D). In de α -gust^{-/-} muizen daarentegen, werd na RYGB-operatie een stijging in gecorrigeerde totale plasmaghrelinewaardes ten opzichte van de sham PF- ($p < 0,01$) en de shamgroep ($p < 0,05$) waargenomen welke afhankelijk was van het genotype ($p < 0,05$ t.o.v. sham PF; $p < 0,01$ t.o.v. sham).

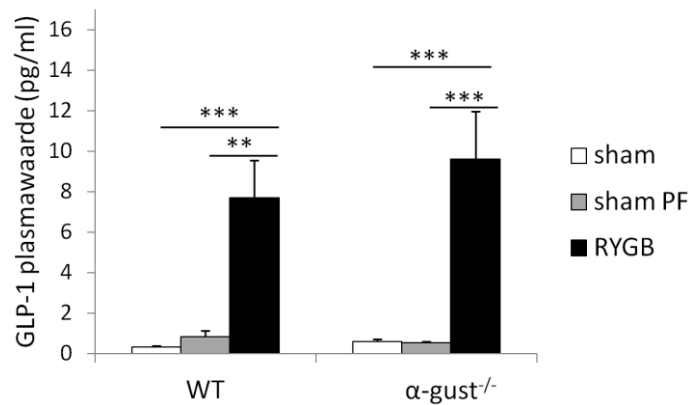


Figuur 10 Het effect van een RYGB-operatie, pair-feeding en een shamoperatie op de plasmaconcentraties van (A) octanoylghreline in WT (n = 6-9) en α -gust^{-/-} (n = 8-9) muizen en (B) totaal ghreline in WT (n = 6) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen in pg/ml en op de plasmaconcentraties, gecorrigeerd voor lichaamsgewicht, voor (C) octanoylghreline in WT (n = 6-9) en α -gust^{-/-} (n = 8-9) muizen en (D) totaal ghreline in WT (n = 6) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen in pg/ml. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; genotype*operatie-effect: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

4.2.2 Glucagon-like peptide-1

Op het moment van opoffering, na een periode van 6 uur vasten en 15 minuten na een gavage van nutridrink[®], werd de som van de actieve vormen (GLP-1₍₇₋₃₆₎ amide en GLP-1₍₇₋₃₆₎) in het plasma gemeten. Een RYGB-operatie induceerde een stijging van GLP-1 plasmawaardes in beide genotypes ten opzichte van zowel de sham PF- als de shamgroep en was onafhankelijk

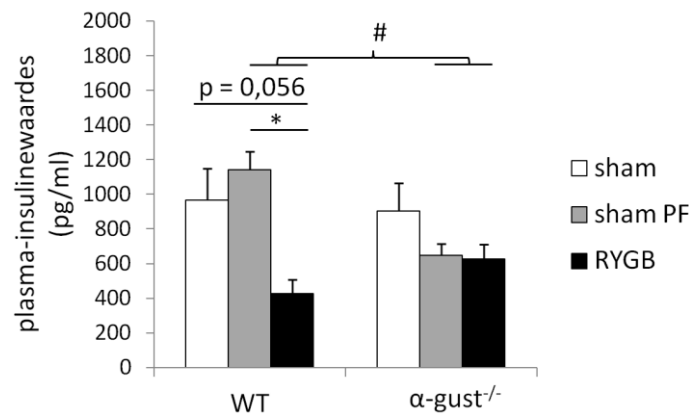
van α -gustducine ($p < 0,001$) (figuur 11). *Pair-feeding* vertoonde geen effect op plasma GLP-1 waarden bij beide genotypes.



Figuur 11 Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de plasmawaarden van GLP-1 (pg/ml) op het moment van opoffering, 15 minuten na een gavage van nutridrink® in WT (n = 5-9) en α -gust^{-/-} (n = 7-9) muizen. De plasmawaarden van GLP-1 is de som van de actieve vormen GLP-1₍₇₋₃₆₎ amide en GLP-1₍₇₋₃₆₎. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (**p < 0,01; *** p < 0,001).

4.2.3 Insuline

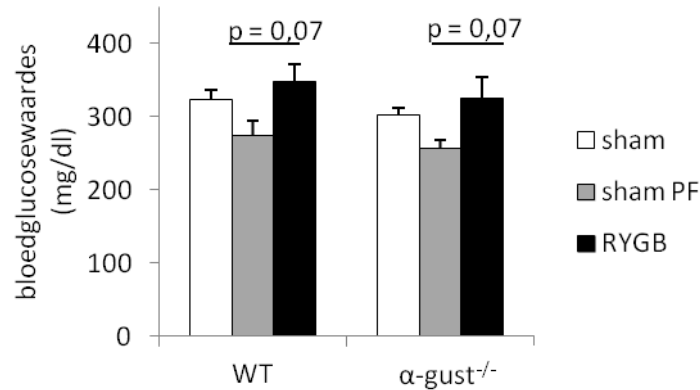
Op het moment van opoffering, na een periode van 6 uur vasten en 15 minuten na een gavage van nutridrink®, werden de plasma-insulinewaarden gemeten (figuur 12). Een RYGB-operatie veroorzaakte in WT muizen lagere plasma-insulinewaarden ten opzichte van de *sham* PF- ($p < 0,05$) en de shamgroep ($p = 0,056$), deze daling van plasma-insulinewaarden was afhankelijk van α -gustducine ($p < 0,05$). *Pair-feeding* veroorzaakte in beide genotypes geen veranderingen in plasma-insulinewaarden.



Figuur 12 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op plasma-insulinewaarden (pg/ml) bij opoffering in WT (n = 5-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (* p < 0,05; genotype*operatie effect: # p < 0,05).

4.2.4 Glucose

Op het moment van opoffering, na een periode van 6 uur vasten en 15 minuten na een nutridrink®-gavage, werden de bloedglucosewaarden gemeten (figuur 13). De bloedglucosewaarden toonden een neiging tot stijging na de RYGB-operatie ten opzichte van de *pair-fed* controles in beide genotypes ($p = 0,07$). *Pair-feeding* veroorzaakte in beide genotypes geen verschil in bloedglucosewaarden.



Figuur 13 Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op bloedglucosewaarden (mg/dl) op het moment van opoffering, 15 minuten na een gavage van nutridrink® in WT (n = 7-9) en α -gust^{-/-} (n = 8-9) muizen. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM.

4.3 Relatieve mRNA expressie van darmhormonen

Aangezien gewijzigde plasmaconcentraties voor ghreline en GLP-1 werden waargenomen werd het effect van de RYGB-operatie nagegaan op de mRNA expressie van ghreline, proglucagon maar ook van PYY. Dit werd in verscheidene weefselsegmenten nagegaan om te kunnen bepalen welk weefselsegment voornamelijk verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de veranderde plasmawaarden. De relatieve expressie van deze genen werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine en werd uitgedrukt in arbitraire units (AU).

4.3.1 Ghreline

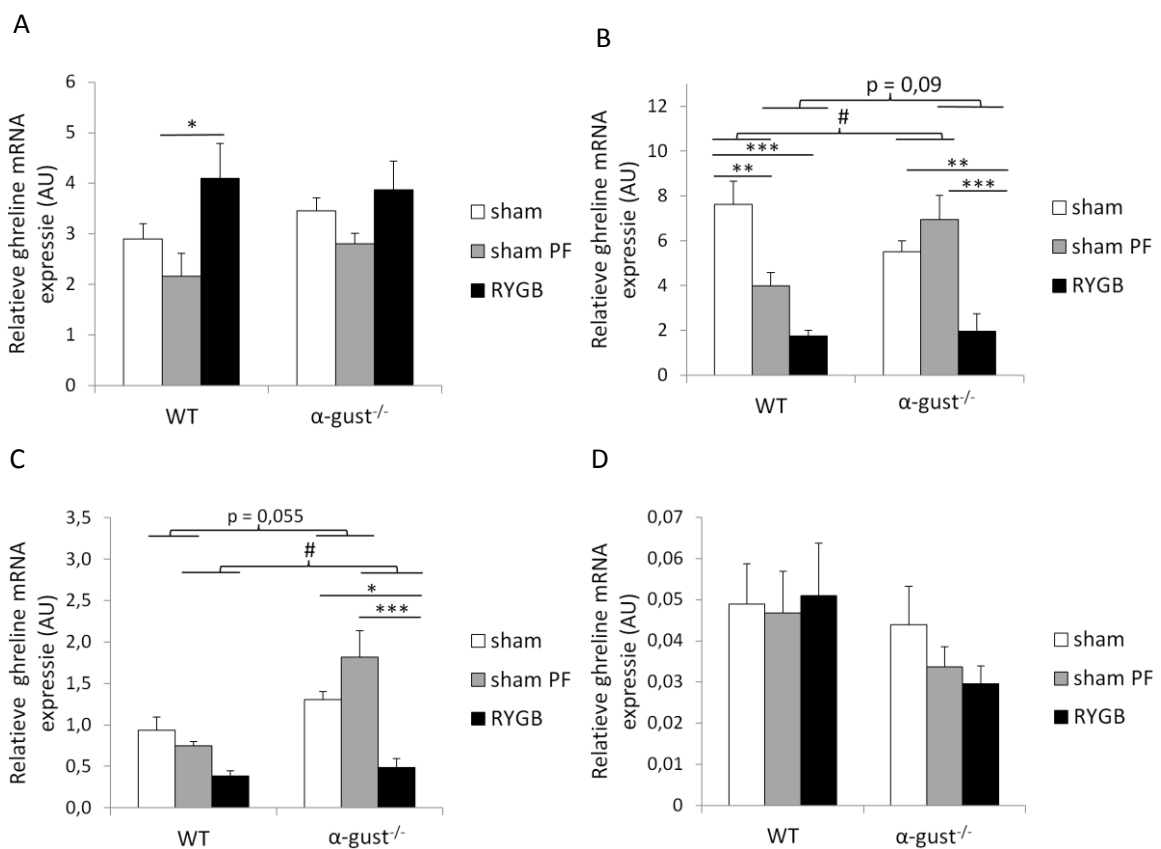
De RYGB-operatie verhoogde de relatieve expressie van ghreline in de maag ten opzichte van de *sham* PF groep ($p < 0,05$) in WT muizen maar niet in de α -gust^{-/-} muizen (figuur 14 A).

De relatieve expressie van ghreline in het biliopancreatische segment daalde significant ten opzichte van de *sham* PF groep in WT muizen na een RYGB-operatie ($p < 0,001$) (figuur 14 B). *Pair-feeding* veroorzaakte in WT muizen een significante daling van ghreline ten opzichte van de shamgroep ($p < 0,01$), deze daling was afhankelijk van het genotype ($p < 0,05$). De RYGB-operatie veroorzaakte in het biliopancreatische segment van α -gust^{-/-} muizen een daling van

de relatieve expressie van ghreline ten opzichte van de *sham* PF- ($p < 0,001$) en shamgroep ($p < 0,01$). De daling, ten opzichte van de *sham* PF groep, leek afhankelijk te zijn van het genotype ($p = 0,09$).

In het Roux-segment veroorzaakte de RYGB-operatie geen verschillen in WT muizen tussen de drie groepen (figuur 14 C). De RYGB-operatie verlaagde daarentegen de relatieve expressie van ghreline in het Roux-segment van α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van de *sham* PF- ($p < 0,01$) en shamgroep ($p < 0,05$). Deze daling, t.o.v. de *sham* PF groep, was afhankelijk van het genotype ($p < 0,05$) en neigde afhankelijk te zijn van het genotype t.o.v. de shamgroep ($p = 0,055$).

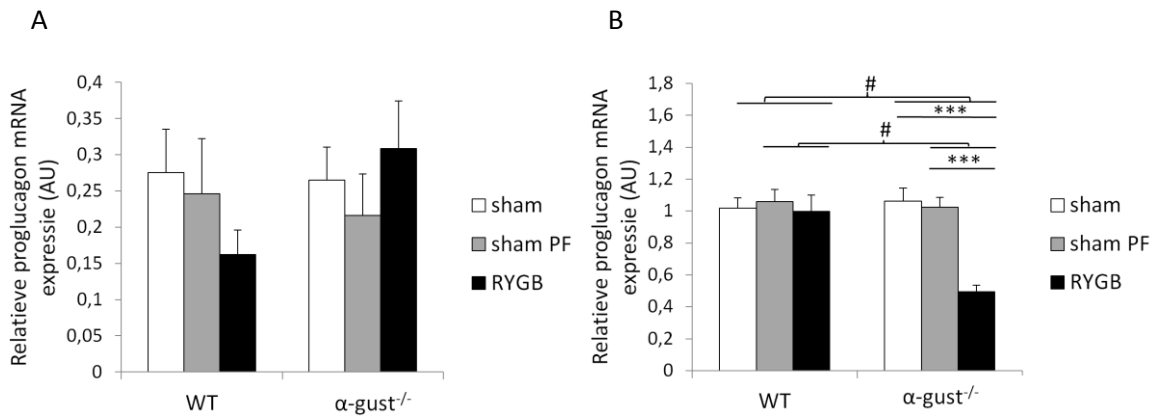
In het distaal colon van beide genotypes werden geen verschillen waargenomen tussen de drie groepen (figuur 14 D).



Figuur 14 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van ghreline in (A) de maag in WT ($n = 6-7$) en α -gust^{-/-} ($n = 5-7$) muizen, (B) het biliopancreatische segment in WT ($n = 6-7$) en α -gust^{-/-} ($n = 7$) muizen, (C) het Roux-segment in WT ($n = 6-7$) en α -gust^{-/-} ($n = 6-8$) muizen en in (D) het distaal colon in WT ($n = 6-8$) en α -gust^{-/-} ($n = 6-7$) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; genotype*operatie effect: # $p < 0,05$).

4.3.2 Proglucagon

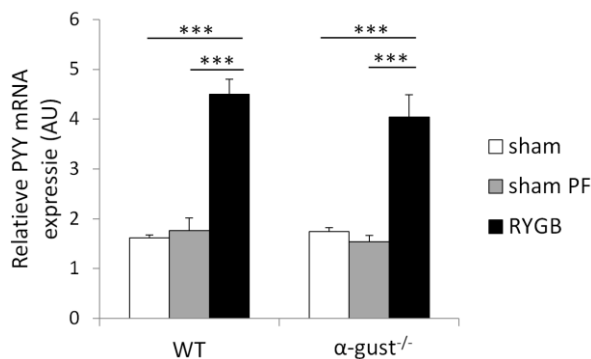
In beide genotypes werden geen verschillen waargenomen tussen de 3 groepen in de relatieve expressie van proglucagon in het Roux-segment (figuur 15 A). De relatieve expressie van proglucagon in het distaal colon van WT muizen werd niet beïnvloed door *pair-feeding* of een RYGB-operatie (figuur 15 B). In het distaal colon van α -gust^{-/-} muizen veroorzaakte de RYGB-operatie een daling in de relatieve expressie van proglucagon ten opzichte van *sham* PF- en de shamgroep ($p < 0,001$), deze daling was afhankelijk van het genotype ($p < 0,05$).



Figuur 15 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van proglucagon in (A) het Roux-segment in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en in (B) het distaal colon in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (***) $p < 0,001$; genotype*operatie effect: # $p < 0,05$).

4.3.3 PYY

De RYGB-operatie induceerde in het distaal colon een significante stijging in de relatieve expressie van PYY in beide genotypes ten opzichte van de *sham* PF- en de shamgroep onafhankelijk van α -gustducine ($p < 0,001$) (figuur 16).



Figuur 16 Effect van een RYGB, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van PYY in het distaal colon in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (***) $p < 0,001$).

4.4 Relatieve mRNA expressie van nutriëntsensoren

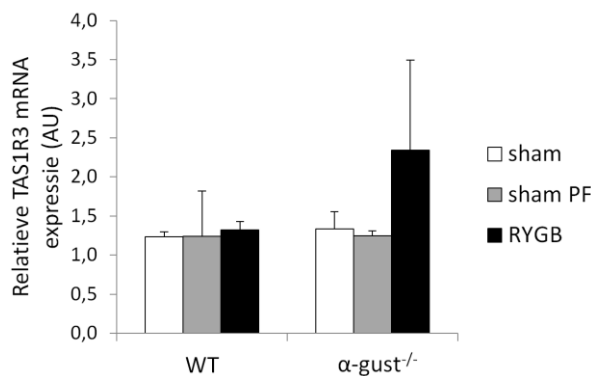
Om de rol van nutriëntsensoren in de effecten van een RYGB na te gaan werd met behulp van RT-PCR de relatieve expressie bepaald van de zoetsmaakreceptor (TAS1R3), de glucosetransporters (GLUT2 en SGLT1) en de vetzurreceptoren (FFAR2 en FFAR3) in de maag, het biliopancreatisch segment, het Roux-segment en in het distaal colon. De relatieve expressie van deze genen wordt berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine en werd uitgedrukt in arbitraire units (AU).

4.4.1 TAS1R3, GLUT2 en SGLT1

TAS1R3, GLUT2 en SGLT1 kunnen een rol spelen in de glucosegestimuleerde secretie van ghreline, GLP-1 en PYY. De zoetsmaakreceptorgemedieerde secretie is mogelijk afhankelijk van α -gustducine terwijl SGLT1 en GLUT2, onafhankelijk van α -gustducine, een invloed kunnen hebben op de secretie. Op deze manier werd geprobeerd, per weefsel, het effect van nutriëntsensing na een RYGB-operatie na te gaan.

4.4.1.1 Maag

De maag werd verkleind tot een zeer kleine maagpouch en zal bij elke maaltijd zeer snel gevuld worden. De relatieve expressie van TAS1R3 in de maag veranderde niet na een RYGB-operatie of na *pair-feeding* (figuur 17).

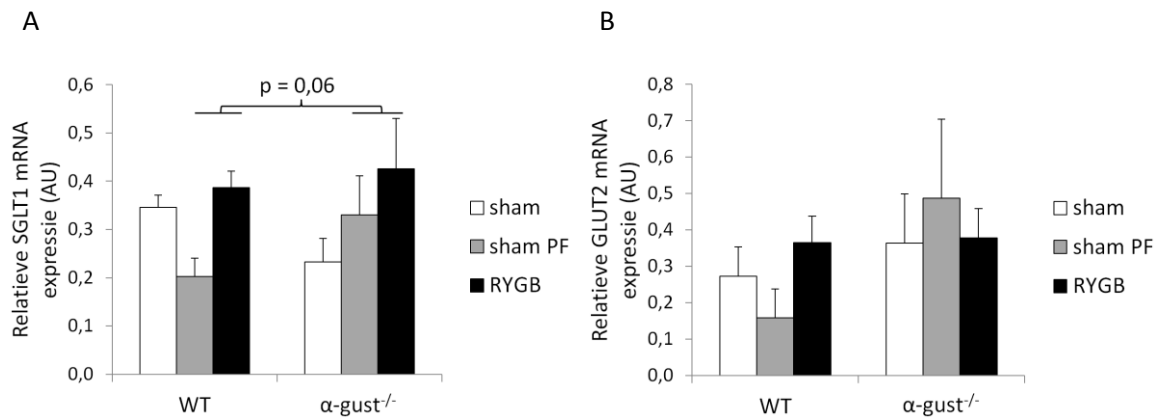


Figuur 17 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units van TAS1R3 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 5-8) muizen in de maag. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.4.1.2 Biliopancreatische segment

Na de RYGB-operatie passeerden er geen voedingsstoffen meer in het biliopancreatische segment waardoor verwacht werd dat de expressie van de glucosetransporters (GLUT2 en

SGLT1) zal dalen. De relatieve expressie van GLUT2 en SGLT1 veranderden niet door een RYGB-operatie noch door pair-feeding (figuur 18 A en figuur 18 B).

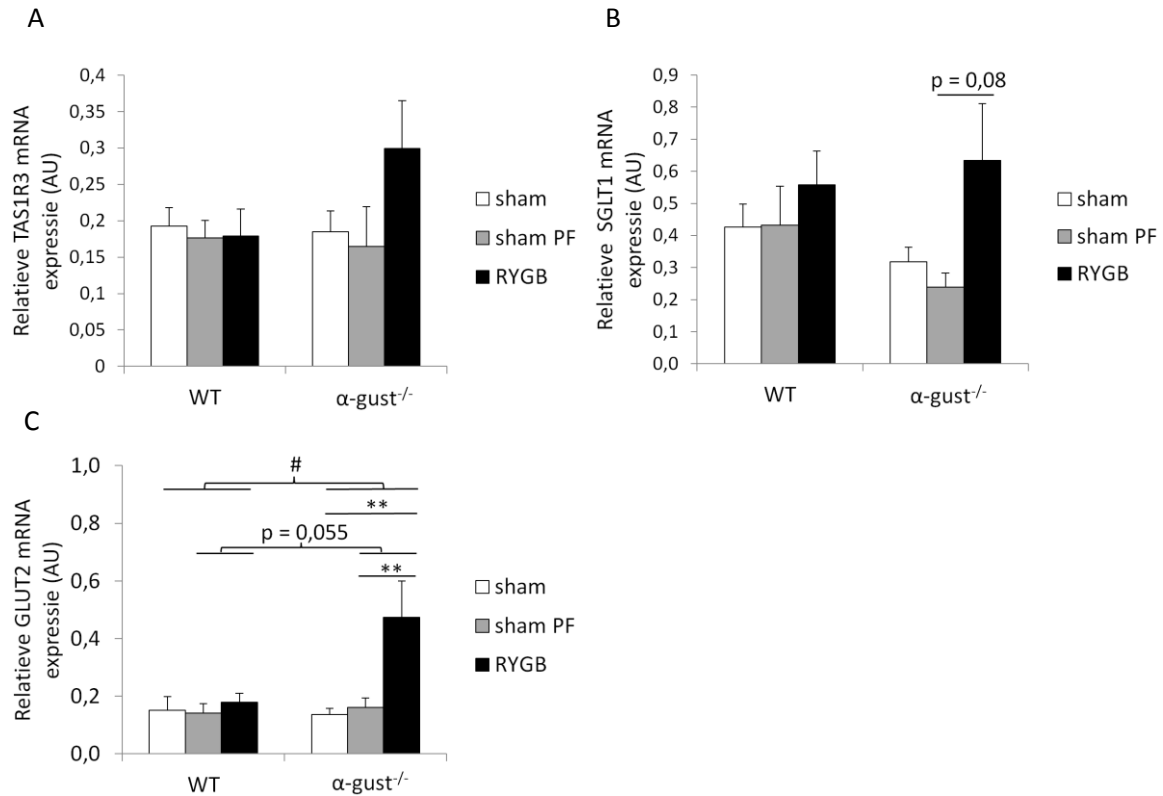


Figuur 18 Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in het biliopancreatisch segment van (A) SGLT1 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en (B) GLUT2 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen (B). De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.4.1.3 Roux-segment

Het Roux-segment werd na een RYGB-operatie blootgesteld aan onverteerde en verhoogde concentraties aan voedingsstoffen waardoor verwacht werd dat de relatieve expressie van de zoetsmaakreceptor (TAS1R3) en de glucosetransporters (SGLT1 en GLUT2) zal stijgen.

Er werden in beide genotypes geen verschillen waargenomen tussen de 3 groepen in de relatieve expressie van TAS1R3 in het Roux-segment (figuur 19 A). In WT muizen werd geen verschil waargenomen tussen de 3 groepen in de relatieve expressie van SGLT1 (figuur 19 B). De RYGB-operatie neigde een verhoging van SGLT1 te veroorzaken in α -gust^{-/-} muizen t.o.v. sham PF (p = 0,08). De relatieve expressie van GLUT2 werd niet beïnvloed in WT muizen (figuur 19C). De relatieve expressie van GLUT2 in α -gust^{-/-} muizen steeg na een RYGB-operatie ten opzichte van de sham PF- (p < 0,01) en de shamgroep (p < 0,01). De stijging t.o.v. van de shamgroep was genotype-afhankelijk (p < 0,05) en neigde afhankelijk te zijn van het genotype t.o.v. sham PF (p = 0,055).



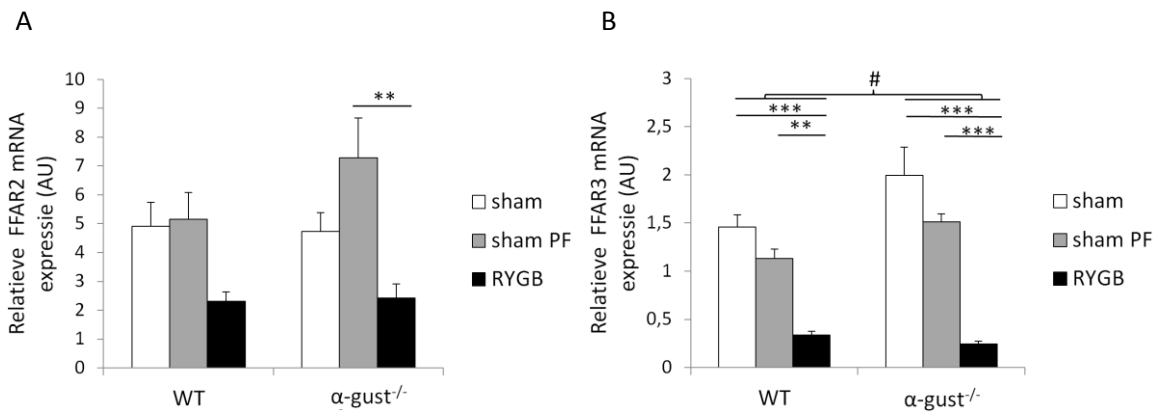
Figuur 19 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in arbitraire units (AU) van (A) TAS1R3 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen, (B) SGLT1 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen en (C) GLUT2 in WT (n = 6-7) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen in het Roux-segment. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 and Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (** p < 0,01; genotype*operatie effect: # p < 0,05).

4.4.2 FFAR2 en FFAR3

De vrije vetzurreceptoren FFAR2 en FFAR3 kunnen belangrijk zijn in de secretie GLP-1 en PYY in het distaal colon. Zoals reeds in de literatuurstudie werd aangehaald veranderen de KKV-concentraties na een RYGB waardoor deze via FFAR3 en FFAR2 een invloed kunnen hebben op de veranderende secretie van GLP-1 en PYY.

4.4.2.1 Distaal colon

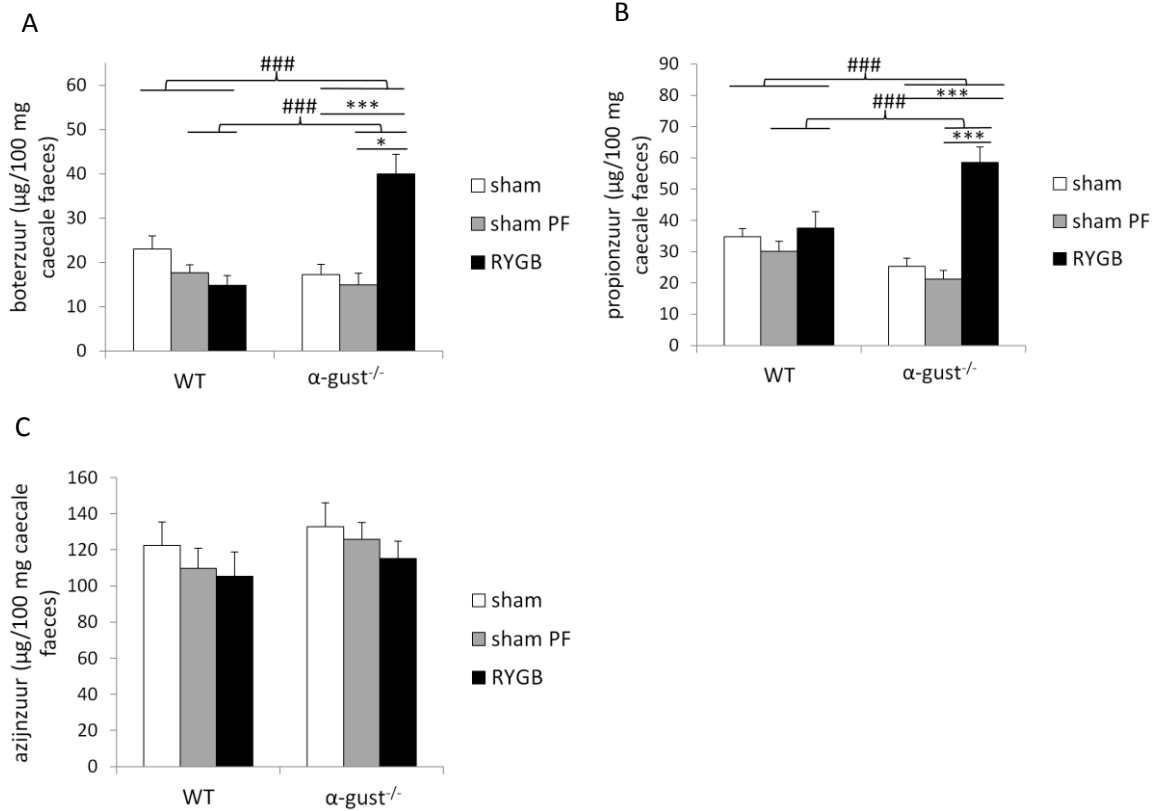
Pair-feeding en de RYGB-operatie vertoonden geen verschillen in de relatieve expressie van FFAR2 in het distaal colon van WT muizen (figuur 20 A). De RYGB-operatie veroorzaakte een downregulatie van FFAR2 in α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van de *sham* PF groep (p < 0,01). De relatieve expressie van FFAR3 was in beide genotypes gedaald na een RYGB-operatie t.o.v. de *sham* PF- (WT: p < 0,01; α -gust^{-/-}: p < 0,001) en shamgroep (WT: p < 0,001; α -gust^{-/-} p < 0,001) (figuur xB), deze daling was meer uitgesproken in de α -gust^{-/-} muizen (p < 0,05) (figuur 20 B).



Figuur 20 Het effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op de relatieve expressie in het distaal colon van (A) FFAR2 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 7-8) muizen en (B) FFAR3 in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-7) muizen. De resultaten zijn genormaliseerd ten opzichte van het geometrisch gemiddelde van β -actine, Hprt1 en Rpl13a en zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (** p < 0,01; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: # p < 0,05).

4.5 KKV-bepaling in het caecum

Boterzuur-, azijn- en propionzuur werden gemeten in de caecale faeces. In WT muizen werden geen verschillen in boterzuurconcentraties waargenomen tussen de 3 groepen (figuur 21 A). De RYGB-operatie induceerde een stijging van boterzuur in de caecale faeces van α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van de *sham* PF- (p < 0,05) en shamgroep (p < 0,001). Deze stijging was ten opzichte van beide groepen afhankelijk van het genotype (p < 0,001). In WT muizen werden geen verschillen in propionzuurconcentraties waargenomen tussen de 3 groepen (figuur 21 B). De RYGB-operatie induceerde eveneens een stijging van propionzuurconcentraties in α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van *sham* PF- (p < 0,001) en shamgroep (p < 0,001). Deze stijging was afhankelijk van het genotype (p < 0,001). De RYGB-operatie en *pair-feeding* vertoonden geen effect op de azijnzuurconcentraties (figuur 21 C). De RYGB-operatie verhoogde aldus enkel in de α -gust^{-/-} muizen de concentraties van propion- en boterzuur in het caecale faeces ten opzichte van de *sham* PF- en shamgroep.



Figuur 21 Effect van een RYGB-operatie, *pair-feeding* en een shamoperatie op (A) boterzuurconcentraties in WT (n = 6- 8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen, (B) propionzuurconcentraties in WT (n = 6-8) en α -gust^{-/-} (n = 6-8) muizen en (C) acetaatconcentraties in WT (n = 7-9) en α -gust^{-/-} (n = 7) muizen in μ g/100 mg caecale faeces. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM (*p < 0,05; *** p < 0,001; genotype*operatie effect: ### p < 0,001).

5 Discussie

Deze masterproef onderzocht of de veranderde verteringsroute van het voedsel na een RYGB-operatie effecten veroorzaakt in het waarnemen van nutriënten in de darm door smaakreceptoren op de entero-endocriene cellen. Dit kan een belangrijke impact hebben op de vrijzetting van darmhormonen die belangrijk zijn in het behouden van de effecten van RYGB-operatie op de energie- en glucosehomeostase.

5.1 Effect van RYGB op lichaamsgewicht en cumulatieve voedselinname

De RYGB-operatie induceerde in WT muizen een gewichtsverlies ten opzichte van zowel de *sham* PF- als de shamgroep. Het gewichtsverlies na een RYGB-operatie werd door andere studies beaamd. Bueter *et al.* toonden een gewichtsverlies van 25 % aan, ten opzichte van het initieel lichaamsgewicht, in ratten 70 dagen na een RYGB-operatie [79]. Butte *et al.* toonden aan dat 12 maanden na de RYGB-operatie obese patiënten een gewichtsverlies van 30 ± 11 % vertoonden ten opzichte van hun initieel lichaamsgewicht [108].

Naast de RYGB-operatie induceerde ook *pair-feeding* gewichtsverlies ten opzichte van de shamgroep in WT muizen. Dit verklaarde de resultaten van de voedselinname waarbij een gedaalde voedselinname van de WT muizen, na een RYGB-operatie werd waargenomen. Deze resultaten zijn in overeenstemming met een studie van Bueter *et al.* die aantoonde dat ratten na een RYGB-operatie significant minder aten dan *sham* geopereerde ratten [79]. Le Roux *et al.* toonden alsook een daling van voedselinname na een RYGB op ratten aan [82].

Het gewichtsverlies van de RYGB-geopereerde groep ten opzichte van de *sham* PF groep toonde aan dat een verminderde voedselinname niet voldoende is voor het gewichtsverlies geïnduceerd door een RYGB-operatie, aangezien muizen die evenveel voedsel kregen als de RYGB-groep, minder gewichtsverlies vertoonden dan de RYGB-groep. Naast een verminderde voedselinname waren er aldus andere factoren die zorgden voor gewichtsverlies na de RYGB-operatie. Verhoogde plasmawaardes van GLP-1 speelden hier waarschijnlijk geen rol in aangezien Mokadem *et al.*, door gebruik te maken van GLP-1^{-/-} muizen, aantoonde dat gestegen plasmawaardes van GLP-1 waarschijnlijk niet verantwoordelijk zijn voor de veranderingen in lichaamsgewicht na een RYGB-operatie [83].

α -gust^{-/-} muizen vertoonden na de RYGB-operatie gewichtsverlies ten opzichte van de *sham* PF- en de shamgroep terwijl *pair-feeding* geen gewichtsverlies veroorzaakte ten opzichte van de shamgroep. Het feit dat *pair-feeding* geen gewichtsverlies induceerde werd bevestigd door de cumulatieve voedselinname die na een RYGB-operatie in α -gust^{-/-} muizen niet gewijzigd was. Mokadem *et al.* toonden daarentegen een daling van 18 % aan in de voedselinname bij α -gust^{-/-} muizen ten opzichte van de shamgroep 5 weken na de RYGB [83]. In de studie van Mokadem *et al.* werden dezelfde soort muizen gebruikt maar deze werden op een hoogvetdieet gezet en niet op een hoogvet-hoogsuikerdieet, waardoor het

koolhydraatgehalte van het dieet mogelijk een rol speelt in de voedselinname na een RYGB-operatie.

Gewichtsverlies na een RYGB-operatie was minder uitgesproken in α -gust^{-/-} muizen dan in WT muizen en ging gepaard met een gedaalde voedselinname in WT muizen maar niet in α -gust^{-/-} muizen. Dit duidde aan dat α -gust^{-/-} een rol speelde in de regulatie van het lichaamsgewicht en de voedselinname.

Er zijn twee mogelijke hypothesissen om het verschil in voedselinname te verklaren. Een eerste hypothese steunt op het feit dat deze daling in voedselinname mogelijks kan verklaard worden door de plasmaoctanoylghrelinewaardes. Deze neigden te stijgen na een RYGB-operatie ($p = 0,07$) in α -gust^{-/-} muizen maar niet in WT muizen, wat mogelijk kan lijden tot een gestegen hongergevoel in de α -gust^{-/-} muizen (zie verder).

Ten tweede werd in de literatuur beschreven dat WT muizen na een RYGB-operatie een veranderde voedselpreferentie vertoonden, waardoor deze minder eten. Saeidi *et al.* toonden dit aan met ratten die na een RYGB-operatie minder zin hadden in suikers en vetten ten opzichte van *sham* geopereerde ratten [84]. Bij α -gust^{-/-} muizen kon deze voedselpreferentie afwezig zijn aangezien zij hun smaak verloren door de afwezigheid van α -gust^{-/-} [30]. Volgens Lowe *et al.* wordt het eetgedrag bepaald door homeostatische honger en hedonistische honger. Homeostatische honger is het resultaat van een tekort aan voedsel terwijl hedonistische honger de honger is die sterk wordt beïnvloed door de beschikbaarheid en de smakelijkheid van voedsel in de directe omgeving [109]. Ullrich *et al.* toonden aan dat een RYGB-operatie de hedonistische honger verlaagde in obese patiënten [110]. Aangezien het mogelijk is dat de hedonistische honger bij α -gust^{-/-} muizen afwezig is kan gesuggereerd worden dat hierdoor α -gust^{-/-} muizen toch evenveel als de shamgroep bleven eten na een RYGB.

5.2 Effect van RYGB op plasmaghrelinewaardes

De geoctanoyleerde en totale plasmaghrelinewaardes bleven onveranderd in WT muizen na *pair-feeding* en na de RYGB-operatie. De wijzigingen in voedselinname zijn aldus niet veroorzaakt door veranderingen in plasmaoctanoylghrelinewaardes. Om na te gaan welk orgaan verantwoordelijk was voor de verkregen plasmawaardes werd de relatieve mRNA expressie van ghreline onderzocht in de maag, het biliopancreatische segment, het Roux-segment en het distaal colon. Voor het bepalen van deze relatieve expressie werd het deel van de maag gebruikt dat geen voedsel meer kreeg. De maag zat aldus voortdurend in gevaste conditie waardoor het logisch zou zijn dat de relatieve mRNA expressie steeg na de RYGB-operatie. Maar, deze stijging werd niet opgemerkt in de totale plasmaghrelinewaardes van WT RYGB muizen.

De RYGB-operatie en *pair-feeding* veroorzaakte in het biliopancreatische segment van WT muizen een gedaalde expressie van ghreline ten opzichte van shamgroep. Dit was onverwacht

aangezien er minder voedsel door dit segment kwam, waardoor initieel een stijging van de relatieve expressie van ghreline verwacht werd. Er kan gepostuleerd worden dat door atrofie de ghrelinecellen niet meer normaal kunnen functioneren, wat de daling in expressie van ghreline kan verklaren. Verder onderzoek dient uitgevoerd te worden om deze hypothese te bevestigen.

De RYGB-operatie en *pair-feeding* veroorzaakte in het Roux-segment van WT muizen een trend tot verlaagde ghreline-expressie maar dit was niet significant. In het Roux-segment arriveerden verhoogde concentraties aan onverteerde voedingsstoffen waardoor men initieel een verlaagde mRNA expressie van ghreline verwacht. In het distaal colon van WT muizen veranderde de relatieve expressie van ghreline niet.

In α -gust^{-/-} muizen vertoonden de geoctanoyleerde plasmaghrelinewaardes een neiging tot stijging t.o.v. de *sham* PF groep ($p = 0,07$) na een RYGB-operatie, terwijl de totale plasmaghrelinewaardes t.o.v. zowel de *sham* als de *sham* PF groep stegen. Dit kan deels, zoals eerder uitgelegd, verklaren waarom α -gust^{-/-} muizen evenveel bleven eten na een RYGB-operatie aangezien verhoogde geoctanoyleerde plasmaghrelinewaardes corresponderen met meer honger.

De gestegen plasmaghrelineniveaus zijn niet afkomstig van de maag, aangezien hier geen veranderde ghreline-expressie waargenomen werd. We kunnen hieruit postuleren dat de maag niet meer de grootste producent is van ghreline na een RYGB-operatie.

De RYGB-operatie vertoonde in het biliopancreatische segment en in het Roux-segment van α -gust^{-/-} muizen een daling t.o.v. de *sham* PF- en *sham* groep. Deze daling in α -gust^{-/-} muizen leek meer uitgesproken te zijn dan in de WT muizen. Dit wijst erop dat de expressie van ghreline gereguleerd wordt door α -gust^{-/-}. Afwezigheid van het sensingmechanisme leidde tot een verstoorde ghrelinehuishouding. In het distaal colon van α -gust^{-/-} muizen veranderde de relatieve expressie van ghreline niet.

De tegenstrijdige stijging in de maag en daling in het biliopancreatische- en Roux-segment kan eventueel verklaard worden door het feit dat ghrelinecellen bestaan uit open- en gesloten types. De maag bevat vooral geslotentypecellen terwijl het biliopancreatische- en het Roux-segment vooral opentypecellen bevatten. De gesloten- en opentypecellen worden gereguleerd door verschillende stimuli en kunnen aldus een verschillend fysiologisch effect induceren [111]. In het algemeen kunnen we concluderen dat de verschillen in ghreline-expressie sterker aanwezig zijn in de darmsegmenten dan in de maag en afwezig zijn in het colon, waaruit we hypothiseren dat na een RYGB-operatie de plasmaghrelinewaardes voornamelijk beïnvloed gaan zijn door de darmsegmenten en minder door de maag die nu niet meer in contact komt met voedsel.

De plasmaghrelinewaardes waren afhankelijk van het lichaamsgewicht. Dit kwam overeen met studies van Shiiya *et al.* die aantoonde dat plasmaghrelinewaardes omgekeerd evenredig zijn

met de BMI [112]. Dit klinkt tegenstrijdig aangezien obese mensen, met lagere ghrelinewaardes, theoretisch minder snel honger krijgen en dus minder zouden eten. Maar, de ghreline-expressie is opgereguleerd bij een negatieve energiebalans en wordt downgereguleerd bij een positieve energiebalans en lijkt op deze manier een negatief feedbackmechanisme te vormen om de energiehomeostase te behouden [112].

Het gedaalde lichaamsgewicht van de RYGB-muizen kon aldus voor een *overshoot* van ghreline zorgen waardoor we niet zien wat het effect van een RYGB, buiten het effect van het gedaalde lichaamsgewicht, effectief op ghreline was. Hierdoor werden de plasmaghrelinewaardes gecorrigeerd voor het lichaamsgewicht. Deze resultaten gaven de veranderingen in ghrelinewaardes, onafhankelijk van de veranderingen in lichaamsgewicht weer en konden ons meer vertellen over het mechanisme van de ghrelinesecretie.

In WT muizen daalden de gecorrigeerde geoctanoyleerde plasmaghrelinewaardes na een RYGB-operatie t.o.v. de *sham* PF- en shamgroep. De gecorrigeerde totale plasmaghrelinewaardes worden in WT muizen niet beïnvloed door een RYGB-operatie of *pair-feeding*. Bij α -gust^{-/-} muizen stegen daarentegen de gecorrigeerde geoctanoyleerde plasmaghrelinewaardes ten opzichte van de *sham* PF groep. De onderdrukking van gecorrigeerde plasmaoctanoylghrelinewaardes was aldus afhankelijk van α -gustducine. Janssen *et al.* beschreven al eerder dat de octanoylatie van ghreline afhankelijk was van α -gustducine. Dit werd bewezen met behulp van α -gust^{-/-} muizen die 2 weken gevoed werden met glyceryl trioctanoaat dat de secretie van ghreline via α -gustducinegekoppelde receptoren FFAR1 en FFAR4 verlaagde [46]. De totale gecorrigeerde plasmaghrelinewaardes waren niet beïnvloed in WT muizen, maar vertoonden in α -gust^{-/-} muizen een stijging ten opzichte van *sham* PF- en shamgroep.

Deze studies suggereren dat α -gust^{-/-} muizen niet beschikken over het mechanisme om nutriënten waar te nemen en aldus ghrelinesecretie te onderdrukken en het hongergevoel te doen afnemen. Dit kan mogelijk verklaren waarom de α -gust^{-/-} muizen ondanks de RYGB-operatie evenveel bleven eten als de WT muizen. Verschillende studies vertoonden reeds onsamenhangende resultaten van plasmaghrelinewaardes na een RYGB-operatie bij zowel ratten als mensen waardoor het onwaarschijnlijk lijkt dat ghreline een grote rol speelt in gewichtsverlies na een RYGB-operatie. Cummings *et al.* toonden bij obese patiënten een daling van plasmaghrelinewaardes na een RYGB-operatie [42]. Stoeckli *et al.* toonden dan weer aan dat er bij obese patiënten geen significanten verschillen waren van plasmaghrelinewaardes na een RYGB-operatie [113]. RYGB ratten vertoonden in de ene studie onveranderde waardes van totaal- en octanoylghreline 7 maanden na de operatie [114] terwijl een andere studie verlaagde waardes aantoonde 3 maanden na de operatie [115].

5.3 Effect van RYGB op plasmawaardes van GLP-1, insuline en glucose

De RYGB-operatie veroorzaakte een post-prandiale stijging van GLP-1 in beide genotypes, onafhankelijk van α -gustducine. Dit kwam deels overeen met andere onderzoeken waar WT muizen verhoogde plasma GLP-1 waarden vertoonden na een RYGB-operatie ten opzichte van de shamgroep [93].

De stijging van GLP-1 in α -gust^{-/-} muizen was echter onverwacht en wijst erop dat GLP-1 geen rol speelde voor het verschil in voedselinname tussen WT en α -gust^{-/-} muizen. Deze muizen bevatten het smaak G-proteïne, α -gustducine niet, dat volgens Kokrashvili *et al.* essentieel is voor de signaaltransductie van de zoetsmaakreceptor en de daaropvolgende secretie van GLP-1 [116]. Hierdoor werd initieel gedacht dat deze geen verhoogde GLP-1 secretie konden moduleren. Mokadem *et al.* toonden aan dat de glucose-geïnduceerde GLP-1 piek verdween bij α -gust^{-/-} muizen terwijl WT muizen een duidelijke GLP-1 stijging vertoonden [83].

Er kan gesuggereerd worden dat de GLP-1 secretie ook gemoduleerd kan worden via transducine, het ander smaak G-proteïne, die de rol van α -gustducine overneemt in de zoetsmaakreceptor ter compensatie [117]. De snelle stijging van GLP-1 kan dan mogelijk toch verwezenlijkt worden door een snelle levering van onverteerde voedingsstoffen in het Roux-segment waardoor smaakreceptoren massaal geactiveerd kunnen worden waarna GLP-1 secretie wordt gestimuleerd. De verhoogde secretie van GLP-1 kan alsook toe te wijzen zijn aan de hyperplasie van L-cellen na een RYGB-operatie. Hansen *et al.* toonden met behulp van GLP-2 immunohistochemie aan dat er in het Roux-segment een verdubbeling van het aantal L-cellen waar te nemen was na een RYGB-operatie ten opzichte van de shamgroep. In het Roux-segment werd ook het grootste aantal L-cellen teruggevonden terwijl deze voor de RYGB-operatie vooral in het ileum en colon aanwezig waren. Door de verdubbeling van het aantal cellen en verhoogde concentraties aan glucose in het Roux-segment kan dit mogelijk zorgen voor verhoogde plasma GLP-1 waarden [96].

Daarnaast kan de glucose gestimuleerde secretie van GLP-1 ook verlopen via glucosetransporters (SGLT-1 en GLUT2), onafhankelijk van de zoetsmaakreceptor. Verhoogde concentraties van voedingsstoffen in het Roux-segment kunnen zorgen voor een verhoogde opname van glucose via SGLT1 en GLUT2 aan de apicale zijde van de cel. Via deze weg kan mogelijk de secretie van GLP-1, onafhankelijk van α -gustducine, alsook gestimuleerd worden. Dit kan mede verklaren waarom α -gust^{-/-} muizen een verhoogde GLP-1 secretie vertoonden. De rol van SGLT1 in de glucosegestimuleerde GLP-1 secretie werd aangetoond door middel van studies met SGLT1^{-/-} muizen. Deze vertoonden, vijf minuten na een gavage van glucose, lagere GLP-1 concentraties ten opzichte van de WT muizen [59]. Deze hypothese wordt door dit onderzoek versterkt door een stijging van de relatieve expressie van GLUT2 en een neiging tot stijging ($p = 0,08$) van SGLT1 in het Roux-segment van α -gust^{-/-} muizen. Als α -gust^{-/-} muizen niet via de smaakreceptor gemedieerde signaalweg GLP-1 konden secreteren, kon eventueel een compensatiemechanisme optreden, waarbij een verhoogde expressie van glucosetransporters een verhoogde GLP-1 secretie konden veroorzaken [118].

De muizen in dit onderzoek vertoonden T2DM en werden hierdoor gecorreleerd met een onvoldoende of een te lage insulineafscheiding of gedaalde insulinegevoeligheid in de perifere weefsels. De RYGB-operatie veroorzaakte in WT muizen lagere plasma-insulinewaardes ten opzichte van *sham* PF muizen. Dit stond in contrast met een verhoogde GLP-1 respons in beide genotypes aangezien GLP-1 een incretinehormoon is dat insulievrijstelling stimuleert. Men kan postuleren dat de insulinerespons trager op gang kwam na de RYGB-operatie door de afwezigheid van voedsel in de maag, die nu de pancreas niet kon verwittigen op de aankomst van een maaltijd, waardoor plasma-insulinewaardes beter op latere tijdstippen kunnen gemeten worden. De vroege meting kan wel een idee geven over de basale plasmawaardes van insuline. Deze zijn lager in WT muizen en bleven onveranderd in α -gust^{-/-} muizen na een RYGB-operatie t.o.v. de *sham* PF groep waardoor de daling in de WT muizen α -gustducine afhankelijk was. Mogelijks wordt de daling in insuline niet gemedieerd door GLP-1 maar door het incretine GIP dat ook gekoppeld is aan α -gustducine.

Na een RYGB-operatie veranderden de post-prandiale glucoseniveaus niet, 15 minuten na een gavage van nutridrink®, bij beide genotypes. Er was een neiging tot stijging ($p = 0,07$) ten opzichte van de *sham* PF groep waargenomen. Dit duidde op een stijging van de piekglucosewaarde. De scherpere piek in glucose kon een verhoogde secretie van insuline veroorzaken wat echter niet het geval was bij de WT muizen en kon wijzen op een wijziging in insulinegevoeligheid. Dit werd in andere studies bevestigd waar de glucosehomeostase, 15 minuten post-gavage, niet verbeterde maar op 30 en 60 minuten post-gavage wel een verbetering werd waargenomen [88]. Meirelles *et al.* toonden bijvoorbeeld een reductie van 29 % in de oppervlakte onder de curve aan voor bloedglucosewaardes ten opzichte van de *sham* PF ratten 90 minuten na een gavage van 25 % dextrose terwijl na 15 minuten nog geen verschil in bloedglucosewaardes waarneembaar was [88].

Om na te gaan welk weefsel hoofdzakelijk verantwoordelijk was voor de stijging van de GLP-1 werd met behulp van RT-PCR de relatieve mRNA expressie van proglucagon onderzocht. In de literatuur werd het grootste aantal L-cellen, na een RYGB-operatie, in het Roux-segment teruggevonden [96]. Hierdoor werd initieel een verhoogde relatieve expressie van proglucagon verwacht aangezien verhoogde glucoseconcentraties in het Roux-segment smaakreceptoren meer kunnen activeren met als gevolg dat er meer proglucagon zou worden aangemaakt in de L-cel [97]. Maar, in deze studie bleef het relatief mRNA expressieniveau van proglucagon in het Roux-segment onveranderd in beide genotypes. Hansen *et al.* toonden gelijkaardige resultaten waar ook geen stijging in de relatieve mRNA expressie van proglucagon waargenomen was in het Roux-segment van RYGB geopereerde ratten [96]. Immunochemische studies moeten uitwijzen, in tegenstelling tot de mRNA expressie, of de proteïne-expressie van GLP-1 verhoogd is.

In het distaal colon verlaagde de RYGB-operatie de relatieve expressie van proglucagon in de α -gust^{-/-} muizen maar niet in WT muizen en was dus afhankelijk van α -gustducine. Plasmawaardes toonden daarentegen een stijging van GLP-1 na een RYGB-operatie, in beide genotypes. Het proglucagon-gen codeert voor verschillende hormonen zoals bijvoorbeeld ook

GLP-2 [53]. De veranderingen van de relatieve mRNA expressie geven een globaal beeld van de optelsom van de verschillende hormonen. Het kan zijn dat bijvoorbeeld GLP-1 stijgt terwijl GLP-2 daalt en we daarom niets zien op het relatief mRNA-niveau van proglucagon van WT muizen. Gilor *et al.* gaven ons een beter idee over de distributie van GLP-1 en GLP-2 in het GI stelsel en hebben aangetoond met behulp van immunohistochemie op weefsels van katten dat GLP-2 bijna volledig afwezig was in het duodenum en half zo frequent aanwezig was in het jejunum ten opzichte van GLP-1. In het ileum en colon zijn GLP-1 en GLP-2 in gelijke mate aanwezig [119].

5.4 Effect van RYGB op relatieve mRNA expressie van PYY

De RYGB-operatie induceerde een significante, α -gustducine onafhankelijke, stijging in de relatieve expressie van PYY in het distaal colon. Een verhoogde expressie van PYY kan een indicatie zijn van verhoogde plasma PYY₃₋₃₆ waarden en kan op deze manier de voedselinname inhiberen en gewichtsverlies induceren. Aangezien de verhoging in PYY na RYGB zowel bij WT als bij α -gust^{-/-} muizen werd waargenomen kan dit ook niet verantwoordelijk zijn voor de gewijzigde voedselinname in beide genotypes. Batterham *et al.* hebben bijvoorbeeld aangetoond dat obesitaspatiënten minder eetlust vertoonden na een infusie van PYY₃₋₃₆ [55].

In het distaal colon was de relatieve mRNA expressie van PYY onafhankelijk van α -gustducine terwijl die van proglucagon wel afhankelijk van α -gustducine was. Dit was onverwacht aangezien GLP-1 en PYY in dezelfde cel teruggevonden worden. We kunnen hieruit suggereren dat PYY en GLP-1 mogelijks niet in dezelfde cel aanwezig waren in het distaal colon, of eventueel in verschillende verhoudingen aanwezig kunnen zijn afhankelijk van hun lokalisatie in het GI stelsel. Ze kunnen ook in verschillende vesikels aanwezig zijn in dezelfde cel en gestimuleerd worden door verschillende receptoren. Dit werd reeds bevestigd door Cho *et al.*, zij hebben reeds aangetoond dat in zowel mens, varken, rat en muis sommige L-cellen meer GLP-1 bevatten terwijl andere meer PYY bevatten [120]. Maar hier is controversie rond. Habib *et al.* hebben met humane weefsels van het colon aangetoond dat GLP-1 en PYY in dezelfde cel en in de zelfde vesikel aanwezig waren. Er was geen enkel geval waargenomen waarbij cellen enkel PYY maar geen GLP-1 bevatten [121]. Pyarokhil *et al.* toonden op vee aan dat PYY vooral in het rectum aanwezig was en zeer weinig in de dunne darm [122].

Als conclusie kunnen we stellen dat voor muizen L-cellen specifiek kunnen zijn voor GLP-1 en PYY, terwijl hier bij andere species nog controversie rond bestaat.

5.5 Effect van RYGB op mRNA expressie van nutriëntsensoren

5.5.1 TAS1R3, SGLT1 en GLUT2

De relatieve expressie van een subunit van de zoetreceptor, TAS1R3, in de maag, werd niet beïnvloed door een RYGB-operatie. Widmayer *et al.* toonden daarentegen dat de relatieve

expressie van TAS1R3 nochtans daalde in de maag van obese patiënten ten opzichte van gezonde personen. Dit kon te wijten zijn aan een aanhoudende blootstelling van suikers resulterend in een desensitisatie van de cel [63].

In het biliopancreatische segment hadden noch *pair-feeding*, noch RYGB effect op de relatieve expressie van SGLT1 en GLUT2 in beide genotypes. Dit werd bevestigd door andere studies. Taqi *et al.* hebben in het biliopancreatische segment van ratten geen verschillen van de glucosetransporters na een RYGB-operatie waargenomen [103]. Initieel werd verwacht dat de relatieve expressie van deze glucosetransporters, na een RYGB-operatie, zou verlagen aangezien er geen glucose meer doorheen het biliopancreatische segment kwam.

In het Roux-segment van WT muizen was de relatieve expressie van SGLT1 en GLUT2 ongewijzigd na een RYGB-operatie. Na een RYGB-operatie werd het Roux-segment blootgesteld aan onverteerde en een verhoogde concentratie aan voedingsstoffen. Er werd een verhoging van de glucosetransporters verwacht om malabsorptie van glucose te voorkomen. Taqi *et al.* toonden een daling van SGLT1 en een stijging van GLUT2 aan in het Roux-segment bij ratten na een RYGB [103]. Het is echter onduidelijk waarom WT muizen deze verhoging niet vertoonden.

In α -gust^{-/-} muizen neigde de relatieve expressie van SGLT1 te stijgen na een RYGB-operatie terwijl de relatieve expressie van GLUT2 in het Roux-segment steeg in α -gust^{-/-} muizen en afhankelijk van α -gustducine was. Dit klinkt logisch aangezien er verhoogde glucoseconcentraties aanwezig zijn in het Roux-segment na de RYGB-operatie waardoor er meer glucosetransporters nodig zijn om malabsorptie te voorkomen. α -gust^{-/-} muizen beschikten niet over functionele smaakreceptoren en vertoonden waarschijnlijk geen smaakreceptorgemedieerde secretie van bijvoorbeeld GLP-1. We kunnen veronderstellen dat er een compensatiemechanisme optrad in α -gust^{-/-} muizen waarbij GLUT2 en SGLT1 werden opgereguleerd om alsnog te zorgen voor een signaaltransductie om darmhormonen te secreteren.

5.5.2 FFAR2 en FFAR3

De relatieve expressie van FFAR2 in het distaal colon van WT muizen veranderde niet na een RYGB-operatie of na *pair-feeding*. De relatieve expressie van FFAR3 daarentegen daalde na een RYGB-operatie in WT muizen. In het caecale faeces van WT muizen werden geen verhoogde concentraties van KKV waargenomen maar toch veranderde de relatieve expressie van FFAR3. Het is onduidelijk welke factor hier invloed op heeft.

In α -gust^{-/-} muizen daalde de relatieve expressie van FFAR2 en FFAR3 na een RYGB-operatie waarbij de daling van FFAR3 meer uitgesproken was dan bij de WT muizen. Margolskee *et al.* hebben reeds aangetoond dat FFAR2 en FFAR3 gekoppeld zijn aan gustducine.

In het caecale faeces van α -gust^{-/-} muizen maar niet in die van WT muizen werden verhoogde concentraties van boter- en propionzuur waargenomen. Er kan gesuggereerd worden dat deze

vetzuren geabsorbeerd werden in het caecum en mogelijk via de circulatie de relatieve expressie van FFAR2 en FFAR3 in het distaal colon beïnvloeden. Dit kan mogelijk gebeuren door de monocarboxylaate transporter isoform-1 (MCT-1) die betrokken is in de absorptie van KKV in het caecum. Als deze transporter een verhoogde expressie vertoont kan dit wijzen op een verhoogde absorptie van KKV in het caecum.

Door de verhoogde concentraties van boter- en propionzuur in α -gust^{-/-} muizen is het mogelijk dat FFAR2 en FFAR3 minder tot expressie moeten komen om alles waar te nemen (zie verder).

5.6 Effect van RYGB op caecale KKV gehalten

De RYGB-operatie vertoonde geen effect in concentraties van de KKV in de caecale faeces van WT muizen. Initieel werden verhoogde KKV-concentraties verwacht aangezien de microbiota na een RYGB-operatie verandert en door een verhoogde glucosetoevoer in het colon een verhoogde microbiële fermentatie plaats kon vinden. Liou *et al.* vertoonden gelijkaardige resultaten waar propionzuurconcentraties stegen, maar azijnzuurconcentraties daalden en boterzuurconcentraties niet veranderden na een RYGB-operatie op ratten [104].

De RYGB-operatie verhoogde in α -gust^{-/-} muizen de concentraties van propion- en boterzuur in het caecale faeces. Liou *et al.* hebben aangetoond dat de RYGB-operatie een verandering van de microbiota kan veroorzaken waardoor propion- en boterzuur meer geproduceerd kunnen worden [104]. Het is onverwacht dat deze stijging afhankelijk is van α -gustducine.

Verder is het mogelijk dat FFAR2 en FFAR3 door de verhoogde concentraties van propion- en boterzuurconcentraties meer gestimuleerd kunnen worden waardoor de secretie van onder andere GLP-1 en PYY stijgt na een RYGB-operatie. Maar deze FFAR's zijn gekoppeld via α -gustducine waardoor ook hier de hypothese ontstaat dat eventueel transducine de rol van α -gustducine overneemt ter compensatie [65]. Het is onwaarschijnlijk dat deze KKV al na 15 minuten een effect kunnen veroorzaken op de waargenomen GLP-1 waardes. Zij kunnen mogelijks wel belangrijk zijn voor de voordelige langetermijneffecten op GLP-1 na een RYGB-operatie.

5.7 Algemene conclusie

Het gewichtsverlies geïnduceerd door een RYGB-operatie is afhankelijk van α -gustducine en wordt deels gemedieerd door een daling in voedselinname. Dit verschil in voedselinname kan veroorzaakt worden door plasmaoctanoylghrelinwaardes die neigen te stijgen in α -gust^{-/-} muizen ($p = 0,07$). De RYGB-operatie induceerde een stijging van plasma GLP-1 onafhankelijk van α -gustducine ($p < 0,001$). Maar, na een RYGB-operatie werden plasma-insulinewaardes verkregen die enkel in WT muizen daalden t.o.v. *sham* PF ($p < 0,05$). Dit wil zeggen dat er naast GLP-1 er nog andere factoren zijn die invloed hebben op de insulinerespons. De RYGB-operatie vertoonde een neiging tot verhoogde bloedglucosewaardes ($p = 0,07$) in beide genotypes t.o.v.

sham PF, 15 minuten na een gavage van nutridrink®. Het Roux-segment vertoonde een verhoogde expressie van glucosetransporters die de GLP-1 secretie mogelijk kunnen verhogen. Verder bleek dat er ook belangrijke wijzigingen optreden in het distaal colon waar een gewijzigde fermentatie in de α -gust^{-/-} muizen leidde tot een hoger gehalte aan bepaalde korte keten vetzuren die een daling veroorzaakten in de expressie van FFAR2 en FFAR3 die de vrijstelling van GLP-1 en PYY in het distaal colon reguleren. Alhoewel de expressie van proglucagon ongewijzigd bleef was er een duidelijke verhoging van PYY in het colon van beide genotypes. We kunnen besluiten dat α -gustducine een belangrijke rol speelt in het effect van een RYGB-operatie op veranderingen in lichaamsgewicht, voedselinname en nutriëntsensing.

5.8 Toekomstige onderzoeksplannen

Door de hypothese dat de insulinerespons trager op gang kan komen door de afwezigheid van de maag kunnen plasma-insulinewaardes beter na 30 of 60 minuten gemeten worden. Dit geeft een beter beeld over het verloop van de insulinerespons. Om te bevestigen of de glucosehomeostase uiteindelijk verbeterd is kan een orale glucose tolerantietest uitgevoerd worden. De relatieve mRNA expressie van GOAT kan in de maag bepaald worden om het verschil tussen de totale- en octanoylghrelinewaardes te verklaren. Een hogere of lagere expressie kan duiden op een hogere of lagere activatie van ghreline tot octanoylghreline. In het caecum kan de relatieve mRNA expressie van FFAR2 en FFAR3 bepaald worden om de invloed van KKV op deze vrije vetzuurreceptoren na te gaan. Zo kan men deze resultaten correleren met deze in het distaal colon. Met behulp van een relatieve mRNA expressie van MCT-1 kan gecontroleerd worden of er meer KKV worden geabsorbeerd in het caecum of niet. Om een beter beeld te krijgen van het sensingmechanisme kan men in het biliopancreatisch segment de relatieve expressie van proglucagon, SGLT3, TAS1R2 en TAS1R3 bepalen. In het Roux-segment kan het relatief expressieniveau van TAS1R2 en SGLT3 verder bepaald worden. Naast effecten op mRNA expressie kan met behulp van immunohistochemie ook de expressie van darmhormen en nutriëntsensoren op proteïneniveau nagegaan worden. In het vet kunnen FFAR2 en FFAR3 expressieniveaus nagegaan worden, om te bekijken of circulerende KKV via deze receptoren werken om de daling in vetmassa te induceren.

Literatuurlijst

- [1] A. H. Mokdad, B. A. Bowman, E. S. Ford, F. Vinicor, J. S. Marks, and J. P. Koplan, "The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States," *JAMA*, vol. 286, pp. 1195-200, Sep 2001.
- [2] P. G. Kopelman, "Obesity as a medical problem," *Nature*, vol. 404, pp. 635-43, Apr 2000.
- [3] L. Angrisani, A. Santonicola, P. Iovino, G. Formisano, H. Buchwald, and N. Scopinaro, "Bariatric Surgery Worldwide 2013," *Obes Surg*, Apr 2015.
- [4] K. J. Neff, T. Olbers, and C. W. Le Roux, "Bariatric surgery: the challenges with candidate selection, individualizing treatment and clinical outcomes," *BMC Med*, vol. 11, p. 8, 2013.
- [5] S. Manning and R. L. Batterham, "The role of gut hormone peptide YY in energy and glucose homeostasis: twelve years on," *Annu Rev Physiol*, vol. 76, pp. 585-608, 2014.
- [6] H. J. Jang, Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B. J. Kim, J. Zhou, *et al.*, "Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 15069-74, Sep 2007.
- [7] G. Mingrone, S. Panunzi, A. De Gaetano, C. Guidone, A. Iaconelli, L. Leccesi, *et al.*, "Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes," *N Engl J Med*, vol. 366, pp. 1577-85, Apr 2012.
- [8] E. A. Finkelstein, J. G. Trogdon, J. W. Cohen, and W. Dietz, "Annual medical spending attributable to obesity: payer- and service-specific estimates," *Health Aff (Millwood)*, vol. 28, pp. w822-31, 2009 Sep-Oct 2009.
- [9] F. H. Messerli, H. O. Ventura, E. Reisin, G. R. Dreslinski, F. G. Dunn, A. A. MacPhee, *et al.*, "Borderline hypertension and obesity: two prehypertensive states with elevated cardiac output," *Circulation*, vol. 66, pp. 55-60, Jul 1982.
- [10] O. G. Kolterman, J. Insel, M. Saekow, and J. M. Olefsky, "Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects," *J Clin Invest*, vol. 65, pp. 1272-84, Jun 1980.
- [11] J. Park, T. S. Morley, M. Kim, D. J. Clegg, and P. E. Scherer, "Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 10, pp. 455-65, Aug 2014.
- [12] T. A. Wadden, V. L. Webb, C. H. Moran, and B. A. Bailer, "Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy," *Circulation*, vol. 125, pp. 1157-70, Mar 2012.
- [13] R. L. Leibel, M. Rosenbaum, and J. Hirsch, "Changes in energy expenditure resulting from altered body weight," *N Engl J Med*, vol. 332, pp. 621-8, Mar 1995.
- [14] A. P. Shukla, W. I. Buniak, and L. J. Aronne, "Treatment of obesity in 2015," *J Cardiopulm Rehabil Prev*, vol. 35, pp. 81-92, 2015 Mar-Apr 2015.
- [15] J. Korner and L. J. Aronne, "The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment," *J Clin Invest*, vol. 111, pp. 565-70, Mar 2003.
- [16] S. M. Ahn, H. Kim, E. Ji, N. Han, and J. M. Oh, "The effect of orlistat on weight reduction in obese and overweight Korean patients," *Arch Pharm Res*, vol. 37, pp. 512-9, Apr 2014.
- [17] R. B. Rothman, M. H. Baumann, C. M. Dersch, D. V. Romero, K. C. Rice, F. I. Carroll, *et al.*, "Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin," *Synapse*, vol. 39, pp. 32-41, Jan 2001.
- [18] L. M. Kaplan, "Pharmacologic therapies for obesity," *Gastroenterol Clin North Am*, vol. 39, pp. 69-79, Mar 2010.

- [19] D. E. Cummings, J. Overduin, and K. E. Foster-Schubert, "Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 89, pp. 2608-15, Jun 2004.
- [20] B. L. Fisher and P. Schauer, "Medical and surgical options in the treatment of severe obesity," *Am J Surg*, vol. 184, pp. 9S-16S, Dec 2002.
- [21] M. Piché, A. Auclair, J. Harvey, S. Marceau, and P. Poirier, "How to choose and use bariatric surgery in 2015," *Can J Cardiol*, vol. 31, pp. 153-66, Feb 2015.
- [22] L. Sjöström, K. Narbro, C. D. Sjöström, K. Karason, B. Larsson, H. Wedel, *et al.*, "Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects," *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 741-52, Aug 2007.
- [23] J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. Ryba, and C. S. Zuker, "The receptors and cells for mammalian taste," *Nature*, vol. 444, pp. 288-94, Nov 2006.
- [24] C. Carboni, K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, *et al.*, "Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120," *J Neurosci*, vol. 30, pp. 8376-82, Jun 2010.
- [25] N. Chaudhari and S. D. Roper, "The cell biology of taste," *J Cell Biol*, vol. 190, pp. 285-96, Aug 2010.
- [26] D. M. Lawton, D. N. Furness, B. Lindemann, and C. M. Hackney, "Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds," *Eur J Neurosci*, vol. 12, pp. 3163-71, Sep 2000.
- [27] D. L. Bartel, S. L. Sullivan, E. G. Lavoie, J. Sévigny, and T. E. Finger, "Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds," *J Comp Neurol*, vol. 497, pp. 1-12, Jul 2006.
- [28] G. Dvoryanchikov, M. S. Sinclair, I. Perea-Martinez, T. Wang, and N. Chaudhari, "Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds," *J Comp Neurol*, vol. 517, pp. 1-14, Nov 2009.
- [29] Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, *et al.*, "Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways," *Cell*, vol. 112, pp. 293-301, Feb 2003.
- [30] G. T. Wong, K. S. Gannon, and R. F. Margolskee, "Transduction of bitter and sweet taste by gustducin," *Nature*, vol. 381, pp. 796-800, Jun 1996.
- [31] C. J. Ruiz, K. Wray, E. Delay, R. F. Margolskee, and S. C. Kinnamon, "Behavioral evidence for a role of alpha-gustducin in glutamate taste," *Chem Senses*, vol. 28, pp. 573-9, Sep 2003.
- [32] C. L. Yee, R. Yang, B. Böttger, T. E. Finger, and J. C. Kinnamon, ""Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin," *J Comp Neurol*, vol. 440, pp. 97-108, Nov 2001.
- [33] N. Mei, "Intestinal chemosensitivity," *Physiol Rev*, vol. 65, pp. 211-37, Apr 1985.
- [34] S. Janssen and I. Depoortere, "Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics?," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 24, pp. 92-100, Feb 2013.
- [35] N. Hass, K. Schwarzenbacher, and H. Breer, "A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells," *Histochem Cell Biol*, vol. 128, pp. 457-71, Nov 2007.
- [36] J. B. Furness, W. A. Kunze, P. P. Bertrand, N. Clerc, and J. C. Bornstein, "Intrinsic primary afferent neurons of the intestine," *Prog Neurobiol*, vol. 54, pp. 1-18, Jan 1998.
- [37] H. Breer, J. Eberle, C. Frick, D. Haid, and P. Widmayer, "Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cells in the alimentary tract," *Histochem Cell Biol*, vol. 138, pp. 13-24, Jul 2012.
- [38] Y. Date, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, *et al.*, "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a

- distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans," *Endocrinology*, vol. 141, pp. 4255-61, Nov 2000.
- [39] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa, "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach," *Nature*, vol. 402, pp. 656-60, Dec 1999.
- [40] J. Yang, M. S. Brown, G. Liang, N. V. Grishin, and J. L. Goldstein, "Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone," *Cell*, vol. 132, pp. 387-96, Feb 2008.
- [41] C. K. Cheung and J. C. Wu, "Role of ghrelin in the pathophysiology of gastrointestinal disease," *Gut Liver*, vol. 7, pp. 505-12, Sep 2013.
- [42] D. E. Cummings, D. S. Weigle, R. S. Frayo, P. A. Breen, M. K. Ma, E. P. Dellinger, *et al.*, "Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery," *N Engl J Med*, vol. 346, pp. 1623-30, May 2002.
- [43] K. E. Foster-Schubert, J. Overduin, C. E. Prudom, J. Liu, H. S. Callahan, B. D. Gaylinn, *et al.*, "Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, pp. 1971-9, May 2008.
- [44] N. Hass, K. Schwarzenbacher, and H. Breer, "T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach," *Cell Tissue Res*, vol. 339, pp. 493-504, Mar 2010.
- [45] S. Janssen, J. Laermans, P. J. Verhulst, T. Thijs, J. Tack, and I. Depoortere, "Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, pp. 2094-9, Feb 2011.
- [46] S. Janssen, J. Laermans, H. Iwakura, J. Tack, and I. Depoortere, "Sensing of fatty acids for octanoylation of ghrelin involves a gustatory G-protein," *PLoS One*, vol. 7, p. e40168, 2012.
- [47] M. S. Engelstoft, W. M. Park, I. Sakata, L. V. Kristensen, A. S. Husted, S. Osborne-Lawrence, *et al.*, "Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells," *Mol Metab*, vol. 2, pp. 376-92, 2013.
- [48] M. Tschöp, D. L. Smiley, and M. L. Heiman, "Ghrelin induces adiposity in rodents," *Nature*, vol. 407, pp. 908-13, Oct 2000.
- [49] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, *et al.*, "A role for ghrelin in the central regulation of feeding," *Nature*, vol. 409, pp. 194-8, Jan 2001.
- [50] B. Avau, F. Carbone, J. Tack, and I. Depoortere, "Ghrelin signaling in the gut, its physiological properties, and therapeutic potential," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 25, pp. 720-32, Sep 2013.
- [51] F. Broglio, E. Arvat, A. Benso, C. Gottero, G. Muccioli, M. Papotti, *et al.*, "Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 86, pp. 5083-6, Oct 2001.
- [52] R. E. Steinert, A. C. Gerspach, H. Gutmann, L. Asarian, J. Drewe, and C. Beglinger, "The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY)," *Clin Nutr*, vol. 30, pp. 524-32, Aug 2011.
- [53] J. J. Holst, "The physiology of glucagon-like peptide 1," *Physiol Rev*, vol. 87, pp. 1409-39, Oct 2007.
- [54] G. W. Moran, C. O'Neill, and J. T. McLaughlin, "GLP-2 enhances barrier formation and attenuates TNF α -induced changes in a Caco-2 cell model of the intestinal barrier," *Regul Pept*, vol. 178, pp. 95-101, Oct 2012.

- [55] R. L. Batterham, M. A. Cohen, S. M. Ellis, C. W. Le Roux, D. J. Withers, G. S. Frost, *et al.*, "Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36," *N Engl J Med*, vol. 349, pp. 941-8, Sep 2003.
- [56] I. Depoortere, "Taste receptors in the gut tune the release of peptides in response to nutrients," *Peptides*, vol. 66, pp. 9-12, Feb 2015.
- [57] I. Depoortere, "Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease," *Gut*, vol. 63, pp. 179-90, Jan 2014.
- [58] N. Rozengurt, S. V. Wu, M. C. Chen, C. Huang, C. Sternini, and E. Rozengurt, "Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 291, pp. G792-802, Nov 2006.
- [59] V. Gorboulev, A. Schurmann, V. Vallon, H. Kipp, A. Jaschke, D. Klessen, *et al.*, "Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion," *Diabetes*, vol. 61, pp. 187-96, Jan 2012.
- [60] F. Reimann and F. M. Gribble, "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells," *Diabetes*, vol. 51, pp. 2757-63, Sep 2002.
- [61] R. F. Margolskee, J. Dyer, Z. Kokrashvili, K. S. Salmon, E. Ilegems, K. Daly, *et al.*, "T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 15075-80, Sep 2007.
- [62] M. S. Hussein, M. M. Abushady, S. Refaat, and R. Ibrahim, "Plasma level of glucagon-like peptide 1 in obese Egyptians with normal and impaired glucose tolerance," *Arch Med Res*, vol. 45, pp. 58-62, Jan 2014.
- [63] P. Widmayer, M. Küper, M. Kramer, A. Königsrainer, and H. Breer, "Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients," *Int J Obes (Lond)*, vol. 36, pp. 1353-9, Oct 2012.
- [64] A. Hirasawa, K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, *et al.*, "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120," *Nat Med*, vol. 11, pp. 90-4, Jan 2005.
- [65] Y. Li, Z. Kokrashvili, B. Mosinger, and R. F. Margolskee, "Gustducin couples fatty acid receptors to GLP-1 release in colon," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 304, pp. E651-60, Mar 2013.
- [66] A. J. Brown, S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, *et al.*, "The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 11312-9, Mar 2003.
- [67] A. Ichimura, S. Hasegawa, M. Kasubuchi, and I. Kimura, "Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes," *Front Pharmacol*, vol. 5, p. 236, 2014.
- [68] G. Tolhurst, H. Heffron, Y. S. Lam, H. E. Parker, A. M. Habib, E. Diakogiannaki, *et al.*, "Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2," *Diabetes*, vol. 61, pp. 364-71, Feb 2012.
- [69] K. R. Freeland and T. M. Wolever, "Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha," *Br J Nutr*, vol. 103, pp. 460-6, Feb 2010.
- [70] C. D. Dotson, L. Zhang, H. Xu, Y. K. Shin, S. Vignes, S. H. Ott, *et al.*, "Bitter taste receptors influence glucose homeostasis," *PLoS One*, vol. 3, p. e3974, 2008.
- [71] M. Oya, T. Kitaguchi, R. Pais, F. Reimann, F. Gribble, and T. Tsuboi, "The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells," *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 4513-21, Feb 2013.
- [72] Y. Nakagawa, M. Nagasawa, S. Yamada, A. Hara, H. Mogami, V. O. Nikolaev, *et al.*, "Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and

- cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion," *PLoS One*, vol. 4, p. e5106, 2009.
- [73] M. Oya, H. Suzuki, Y. Watanabe, M. Sato, and T. Tsuboi, "Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells," *Genes Cells*, vol. 16, pp. 608-16, May 2011.
- [74] K. Fujiwara, F. Maekawa, K. Dezaki, M. Nakata, T. Yashiro, and T. Yada, "Oleic acid glucose-independently stimulates glucagon secretion by increasing cytoplasmic Ca^{2+} via endoplasmic reticulum Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx in the rat islet alpha-cells," *Endocrinology*, vol. 148, pp. 2496-504, May 2007.
- [75] J. L. Halaas, C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton, and J. M. Friedman, "Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 8878-83, Aug 1997.
- [76] K. El-Haschimi, D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjørbaek, and J. S. Flier, "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity," *J Clin Invest*, vol. 105, pp. 1827-32, Jun 2000.
- [77] B. R. Simon, S. D. Parlee, B. S. Learman, H. Mori, E. L. Scheller, W. P. Cawthorn, *et al.*, "Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors," *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 32475-89, Nov 2013.
- [78] Y. Xiong, N. Miyamoto, K. Shibata, M. A. Valasek, T. Motoike, R. M. Kedzierski, *et al.*, "Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 1045-50, Jan 2004.
- [79] M. Bueter, C. Löwenstein, T. Olbers, M. Wang, N. L. Cluny, S. R. Bloom, *et al.*, "Gastric bypass increases energy expenditure in rats," *Gastroenterology*, vol. 138, pp. 1845-53, May 2010.
- [80] W. J. Pories, J. F. Caro, E. G. Flickinger, H. D. Meelheim, and M. S. Swanson, "The control of diabetes mellitus (NIDDM) in the morbidly obese with the Greenville Gastric Bypass," *Ann Surg*, vol. 206, pp. 316-23, Sep 1987.
- [81] H. Zheng, A. C. Shin, N. R. Lenard, R. L. Townsend, L. M. Patterson, D. L. Sigalet, *et al.*, "Meal patterns, satiety, and food choice in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 297, pp. R1273-82, Nov 2009.
- [82] C. W. le Roux, S. J. Aylwin, R. L. Batterham, C. M. Borg, F. Coyle, V. Prasad, *et al.*, "Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters," *Ann Surg*, vol. 243, pp. 108-14, Jan 2006.
- [83] M. Mokadem, J. F. Zechner, R. F. Margolskee, D. J. Drucker, and V. Aguirre, "Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency," *Mol Metab*, vol. 3, pp. 191-201, Apr 2014.
- [84] N. Saeidi, E. Nestoridi, J. Kucharczyk, M. K. Uygun, M. L. Yarmush, and N. Stylopoulos, "Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass exhibit differential effects on food preferences, nutrient absorption and energy expenditure in obese rats," *Int J Obes (Lond)*, vol. 36, pp. 1396-402, Nov 2012.
- [85] P. S. MacLean, J. A. Higgins, G. C. Johnson, B. K. Fleming-Elder, W. T. Donahoo, E. L. Melanson, *et al.*, "Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 287, pp. R1306-15, Dec 2004.
- [86] S. K. Das, S. B. Roberts, M. A. McCrory, L. K. Hsu, S. A. Shikora, J. J. Kehayias, *et al.*, "Long-term changes in energy expenditure and body composition after massive weight loss induced by gastric bypass surgery," *Am J Clin Nutr*, vol. 78, pp. 22-30, Jul 2003.
- [87] S. L. Faria, O. P. Faria, C. Buffington, M. de Almeida Cardeal, and H. Rodrigues de Gouvêa, "Energy expenditure before and after Roux-en-Y gastric bypass," *Obes Surg*, vol. 22, pp. 1450-5, Sep 2012.

- [88] K. Meirelles, T. Ahmed, D. M. Culnan, C. J. Lynch, C. H. Lang, and R. N. Cooney, "Mechanisms of glucose homeostasis after Roux-en-Y gastric bypass surgery in the obese, insulin-resistant Zucker rat," *Ann Surg*, vol. 249, pp. 277-85, Feb 2009.
- [89] S. C. Smith, C. B. Edwards, and G. N. Goodman, "Changes in Diabetic Management After Roux-en-Y Gastric Bypass," *Obes Surg*, vol. 6, pp. 345-348, Aug 1996.
- [90] W. J. Pories, M. S. Swanson, K. G. MacDonald, S. B. Long, P. G. Morris, B. M. Brown, *et al.*, "Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus," *Ann Surg*, vol. 222, pp. 339-50; discussion 350-2, Sep 1995.
- [91] N. B. Jørgensen, C. Dirksen, K. N. Bojsen-Møller, S. H. Jacobsen, D. Worm, D. L. Hansen, *et al.*, "Exaggerated glucagon-like peptide 1 response is important for improved β -cell function and glucose tolerance after Roux-en-Y gastric bypass in patients with type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 62, pp. 3044-52, Sep 2013.
- [92] R. L. Atkinson and E. L. Brent, "Appetite suppressant activity in plasma of rats after intestinal bypass surgery," *Am J Physiol*, vol. 243, pp. R60-4, Jul 1982.
- [93] A. C. Shin, H. Zheng, R. L. Townsend, D. L. Sigalet, and H. R. Berthoud, "Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery," *Endocrinology*, vol. 151, pp. 1588-97, Apr 2010.
- [94] C. W. le Roux, R. Welbourn, M. Werling, A. Osborne, A. Kokkinos, A. Laurenus, *et al.*, "Gut hormones as mediators of appetite and weight loss after Roux-en-Y gastric bypass," *Ann Surg*, vol. 246, pp. 780-5, Nov 2007.
- [95] M. Sundbom, C. Holdstock, B. E. Engström, and F. A. Karlsson, "Early changes in ghrelin following Roux-en-Y gastric bypass: influence of vagal nerve functionality?," *Obes Surg*, vol. 17, pp. 304-10, Mar 2007.
- [96] C. F. Hansen, M. Bueter, N. Theis, T. Lutz, S. Paulsen, L. S. Dalbøge, *et al.*, "Hypertrophy dependent doubling of L-cells in Roux-en-Y gastric bypass operated rats," *PLoS One*, vol. 8, p. e65696, 2013.
- [97] H. E. Parker, K. Wallis, C. W. le Roux, K. Y. Wong, F. Reimann, and F. M. Gribble, "Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion," *Br J Pharmacol*, vol. 165, pp. 414-23, Jan 2012.
- [98] P. D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, *et al.*, "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice," *Diabetes*, vol. 57, pp. 1470-81, Jun 2008.
- [99] T. F. Teixeira, M. C. Collado, C. L. Ferreira, J. Bressan, and M. o. C. Peluzio, "Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability," *Nutr Res*, vol. 32, pp. 637-47, Sep 2012.
- [100] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, *et al.*, "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance," *Diabetes*, vol. 56, pp. 1761-72, Jul 2007.
- [101] C. X. Dong, W. Zhao, C. Solomon, K. J. Rowland, C. Ackerley, S. Robine, *et al.*, "The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function," *Endocrinology*, vol. 155, pp. 370-9, Feb 2014.
- [102] A. Casselbrant, E. Elias, L. Fändriks, and V. Wallenius, "Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery," *Surg Obes Relat Dis*, vol. 11, pp. 45-53, 2015 Jan-Feb 2015.
- [103] E. Taqi, L. E. Wallace, E. de Heuvel, P. K. Chelikani, H. Zheng, H. R. Berthoud, *et al.*, "The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model," *J Pediatr Surg*, vol. 45, pp. 987-95, May 2010.

- [104] A. P. Liou, M. Paziuk, J. M. Luevano, S. Machineni, P. J. Turnbaugh, and L. M. Kaplan, "Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity," *Sci Transl Med*, vol. 5, p. 178ra41, Mar 2013.
- [105] B. T. Layden, A. R. Angueira, M. Brodsky, V. Durai, and W. L. Lowe, "Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets," *Transl Res*, vol. 161, pp. 131-40, Mar 2013.
- [106] E. N. Bergman, "Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species," *Physiol Rev*, vol. 70, pp. 567-90, Apr 1990.
- [107] F. Seyfried, M. Lannoo, W. Gsell, J. L. Tremoleda, M. Bueter, T. Olbers, *et al.*, "Roux-en-Y gastric bypass in mice--surgical technique and characterisation," *Obes Surg*, vol. 22, pp. 1117-25, Jul 2012.
- [108] N. F. Butte, M. L. Brandt, W. W. Wong, Y. Liu, N. R. Mehta, T. A. Wilson, *et al.*, "Energetic adaptations persist after bariatric surgery in severely obese adolescents," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 23, pp. 591-601, Mar 2015.
- [109] M. R. Lowe and M. L. Butryn, "Hedonic hunger: a new dimension of appetite?," *Physiol Behav*, vol. 91, pp. 432-9, Jul 2007.
- [110] J. Ullrich, B. Ernst, B. Wilms, M. Thurnheer, and B. Schultes, "Roux-en Y gastric bypass surgery reduces hedonic hunger and improves dietary habits in severely obese subjects," *Obes Surg*, vol. 23, pp. 50-5, Jan 2013.
- [111] I. Sakata, K. Nakamura, M. Yamazaki, M. Matsubara, Y. Hayashi, K. Kangawa, *et al.*, "Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract," *Peptides*, vol. 23, pp. 531-6, Mar 2002.
- [112] T. Shiiya, M. Nakazato, M. Mizuta, Y. Date, M. S. Mondal, M. Tanaka, *et al.*, "Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 87, pp. 240-4, Jan 2002.
- [113] R. Stoeckli, R. Chanda, I. Langer, and U. Keller, "Changes of body weight and plasma ghrelin levels after gastric banding and gastric bypass," *Obes Res*, vol. 12, pp. 346-50, Feb 2004.
- [114] A. P. Chambers, H. Kirchner, H. E. Wilson-Perez, J. A. Willency, J. E. Hale, B. D. Gaylenn, *et al.*, "The effects of vertical sleeve gastrectomy in rodents are ghrelin independent," *Gastroenterology*, vol. 144, pp. 50-52.e5, Jan 2013.
- [115] N. Stylopoulos, P. Davis, J. D. Pettit, D. W. Rattner, and L. M. Kaplan, "Changes in serum ghrelin predict weight loss after Roux-en-Y gastric bypass in rats," *Surg Endosc*, vol. 19, pp. 942-6, Jul 2005.
- [116] Z. Kokrashvili, B. Mosinger, and R. F. Margolskee, "T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1170, pp. 91-4, Jul 2009.
- [117] W. He, V. Danilova, S. Zou, G. Hellekant, M. Max, R. F. Margolskee, *et al.*, "Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin," *Chem Senses*, vol. 27, pp. 719-27, Oct 2002.
- [118] Z. Kokrashvili, K. K. Yee, E. Ilegems, K. Iwatsuki, Y. Li, B. Mosinger, *et al.*, "Endocrine taste cells," *Br J Nutr*, vol. 111 Suppl 1, pp. S23-9, Jun 2014.
- [119] C. Gilor, S. Gilor, T. K. Graves, L. B. Borst, P. Labelle, T. K. Ridge, *et al.*, "Distribution of K and L cells in the feline intestinal tract," *Domest Anim Endocrinol*, vol. 45, pp. 49-54, Jul 2013.
- [120] H. J. Cho, E. S. Robinson, L. R. Rivera, P. J. McMillan, A. Testro, M. Nikfarjam, *et al.*, "Glucagon-like peptide 1 and peptide YY are in separate storage organelles in enteroendocrine cells," *Cell Tissue Res*, vol. 357, pp. 63-9, Jul 2014.
- [121] A. M. Habib, P. Richards, G. J. Rogers, F. Reimann, and F. M. Gribble, "Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells," *Diabetologia*, vol. 56, pp. 1413-6, Jun 2013.

- [122] A. H. Pyarokhil, M. Ishihara, M. Sasaki, and N. Kitamura, "Immunohistochemical study on the ontogenetic development of the regional distribution of peptide YY, pancreatic polypeptide, and glucagon-like peptide 1 endocrine cells in bovine gastrointestinal tract," *Regul Pept*, vol. 175, pp. 15-20, Apr 2012.

Bijlagen

Bijlage A: samenstelling nutridrink®	78
--	----

Bijlage A: samenstelling nutridrink®

Nutridrink Compact			samenstelling	
gemiddeld gehalte per 100 ml*:				
Energie	240/1010 kcal/kJ		Spoorelementen	
Vetten (35 En%)	9,3	g	Fe	3,8 mg
verzadigd vet	0,9	g	Zn	2,9 mg
enkelv. onverz. vet	5,7	g	Cu	0,43 mg
meerv. onverz. vet	2,7	g	Mn	0,8 mg
- linolzuur	2,1	g	F	0,2 mg
- α-linoleenzuur	0,4	g	Mo	24 µg
AA	-	mg	Se	14 µg
DHA	-	mg	Cr	16 µg
EPA	-	mg		32 µg
Koolhydraten (49 En%)	29,7	g	Vitamines	
glucose	0,3	g	A	240 µg-RE
fructose		g	carotenoiden	- mg
lactose	<0,5	g	D	1,8 µg
maltose	14,6	g	E	3 mg α-TE
sacharose	0	g	K	13 µg
polysachariden	14,3	g	thiamine	0,4 mg
overig	0,4	g	riboflavine	0,4 mg
Vezels (0 En%)	-	g	niacine	4,3 mg NE
			pantotheenzuur	1,3 mg
			B6	0,4 mg
Eiwitten (16 En%)	9,6	g	foliumzuur	64 µg
caseïne	8,8	g	B12	0,7 µg
wei-eiwit	0,8	g	biotine	9,6 µg
			C	24 mg
Zout	0,24	g	Overige	
			camitine	- mg
Vocht	64	ml	choline	88 mg
			taurine	- mg
Mineralen			Osmolariteit	790 mOsmol/l
Na	96	mg		
K	236	mg		
Cl	91	mg		
Ca	174	mg		
P	174	mg		
Mg	33	mg		

* Gemiddelde analyse van de reeks

aug-14

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Impact van nutriëntsensoren in het maagdarmstelsel in de metabole herprogrammering na maagbypasschirurgie

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2015**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Swennen, Thomas

Datum: **10/06/2015**