

2015•2016
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Een vergelijkende studie naar het effect van artificiële en natuurlijke prebiotische zoetstoffen in de preventie van obesitas: rol van gastro-intestinale hormonen en nutriëntsensoren

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
prof. dr. INGE DEPOORTERE

Copromotor :
Apr. SANDRA STEENSELS

Marieke Willems

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

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2015•2016
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Een vergelijkende studie naar het effect van artificiële en natuurlijke prebiotische zoetstoffen in de preventie van obesitas: rol van gastro-intestinale hormonen en nutriëntsensoren

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
prof. dr. INGE DEPOORTERE

Copromotor :
Apr. SANDRA STEENSELS

Marieke Willems

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

Voorwoord

Na een aantal drukke maanden van onderzoek, sluit ik mijn studies van Industrieel Ingenieur, Biochemie aan de UHasselt en KULeuven af met een masterproef. Deze is mede mogelijk gemaakt door een aantal mensen. In dit voorwoord wil ik graag deze mensen bedanken die geholpen hebben om dit mee te realiseren.

Als eerste wil ik Prof. Dr. Depoortere bedanken voor mij de kans te geven om mee te werken aan een onderzoek in haar labo. Gedurende deze korte periode heb ik zeer veel bijgeleerd en ervaring opgedaan in de onderzoekswereld, waar ik in de toekomst zeker op terug kan vallen.

Mijn interne promotor, Ing. Peeters, wil ik ook bedanken voor de hulp en opvolging bij het uitvoeren van mijn masterproef.

Wie ik zeker wil bedanken is Apr. Sandra Steensels. Jij hebt me op korte tijd zeer veel bijgeleerd. Ook wil ik je graag bedanken voor al de tijd en moeite die je in het lezen van mijn thesis hebt gestoken. Dank je wel!

Ook wil ik graag de andere thesisstudenten bedanken voor de leuke momenten in het labo en in het computer lokaal. Dank jullie wel, Florence, Lisa en Merle voor mijn flauwe humor te appreciëren.

Als laatste wil ik graag mijn familie bedanken. Merci Tooke voor alle ontspannende momenten! Mama jou wil ik graag bedanken voor zeer veel dingen, maar zeker voor het verzorgen van Babs als ik op kot was! En dank je wel papa voor het nalezen van mijn thesis. Ook een extra bedankje aan tante Brigy en nonk Stefan voor het repareren van mijn fiets en de leuke attenties!

Dank jullie wel!

Marieke Willems

Februari 2016

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Lijst van tabellen	7
Lijst van figuren	9
Verklarende woordenlijst	11
Abstract	13
Abstract in English	15
1 Inleiding	17
1.1 Situering	17
1.2 Probleemstelling/onderzoeksvraag.....	18
1.3 Doelstelling.....	18
1.4 Methode	18
2 Literatuurstudie	21
2.1 Obesitas	21
2.1.1 Inleiding.....	21
2.1.2 Oorzaken	21
2.1.3 Behandeling van obesitas.....	21
a) Levensstijl aanpassen.....	21
b) Farmacologische behandeling.....	21
c) Chirurgische behandeling.....	22
2.2 Preventie van obesitas: functionele voedingsstoffen (artificiële en natuurlijke zoetstoffen)	23
2.2.1 Artificiële zoetstof: Sucralose	23
a) Karakteristieken.....	23
b) Functie.....	24
c) Effect op lichaamsgewicht	24
2.2.2 Natuurlijke zoetstof: oligofructose	25
a) Karakteristieken.....	25
b) Functie.....	26
c) Effect op lichaamsgewicht	26
2.3 Nutriëntensing	27

2.3.1	Inleiding.....	27
2.3.2	Nutriëntsensing op de tong.....	27
2.3.3	Nutriëntsensing in het GI stelsel.....	28
	a) Enterocyten	28
	b) Borstelcel.....	28
	c) Entero-endocriene cel.....	28
2.3.4	Waarnemen van nutriënten na de maaltijd	29
	a) Maag: de ghrelinecel	30
	b) Dunne darm: de L-cel.....	30
	c) Colon: de L-cel	31
3	Materiaal en methoden	33
3.1	<i>In vivo</i> experimenten	33
	3.1.1 Muizen.....	33
	3.1.2 Opzet experiment	33
	3.1.3 Opoffering	34
3.2	Metten van plasmaoctanoylghreline en plasmadesoctanoylghreline.....	34
	3.2.1 Ghreline-extractie	34
	3.2.2 Radio-immuno-assay (RIA)	34
3.3	Metten van GLP-1 en PYY concentraties in plasma	35
3.4	RNA-extractie uit weefsels van het GI stelsel, cDNA synthese en real-time PCR.....	35
3.5	Immunohistochemie.....	36
	3.5.1 Immunohistochemische bepaling van GLP-1 in het duodenum.....	36
	3.5.2 Immunohistochemische bepaling van GLP-1 en PYY in het colon	37
3.6	Statistische analyse.....	37
4	Onderzoeksresultaten	39
4.1	Lichaamsgewicht en voedselinname	39
4.2	Hormonen	40
	4.2.1 Ghreline.....	40
	a) Plasma.....	40
	b) Relatieve mRNA expressie.....	41
	4.2.2 GOAT	42
	a) Relatieve mRNA expressie.....	42

4.2.3	GLP-1	43
a)	Plasma.....	43
b)	Immunohistochemie (duodenum en colon).....	44
c)	Relatieve mRNA expressie.....	44
4.2.4	PYY	45
a)	Plasma.....	45
b)	Immunohistochemie (colon)	46
c)	Relatieve mRNA expressie.....	46
4.3	Nutriëntensing: relatieve mRNA expressie	47
4.3.1	Maag	47
4.3.2	Duodenum.....	48
4.3.3	Colon	50
5	Discussie en conclusie	53
5.1	Inleiding	53
5.2	Algemene conclusie.....	53
5.3	Effect op lichaamsgewicht en voedselinname	55
5.4	Effect op gastro-intestinale hormonen: ghreline, GLP-1 en PYY.....	55
5.5	Toekomstplannen.....	56
	Literatuurlijst.....	57

Lijst van tabellen

Tabel 1: <i>Forward</i> en <i>reverse</i> primers van genen die onderzocht worden met behulp van RT-PCR.....	36
Tabel 2: Overzichtstabel met de resultaten. ↓/↑: $p < 0,05$; ↓↓/↑↑: $p < 0,01$; ↓↓↓/↑↑↑ : $p < 0,001$	54

Lijst van figuren

Figuur 1: De Roux-en-Y maagbypass grafisch weergegeven [2].....	22
Figuur 2: Structuurformule sucralose [Sigma-Aldrich, België].	24
Figuur 3: Structuurformule oligofructose [31].	26
Figuur 4: Entero-endocriene cel met zoete smaakreceptor: signaaltransductieweg.....	29
Figuur 5: Gastro-intestinaalstelsel.....	29
Figuur 6: Schematische opstelling experiment.	33
Figuur 7: Effect van dagelijkse gavage met sucralose (0.52 mg), FOS (300 mg) of water (330 µl) gedurende acht weken op het lichaamsgewicht (uitgedrukt als % van het oorspronkelijk gewicht) in A) WT en B) α -gust ^{-/-} . * p<0.05, *** p<0.001. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	39
Figuur 8: Cumulatieve voedselinname (g) na dagelijkse gavage met sucralose (0.52 mg), FOS (300 mg) of water (330 µl), gedurende acht weken in A) WT en B) α -gust ^{-/-} muizen. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	40
Figuur 9: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op A, B) plasma octanoylghreline en C, D) plasma totaal ghreline concentraties (pg/ml). * p<0.05. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	41
Figuur 10: Effect van dagelijkse gavage met A, C, E) sucralose (0.52 mg) of B, D, F) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve ghreline mRNA expressie (AU) in A, B) de maag, C, D) het duodenum, E, F) het colon.* p<0.05. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	42
Figuur 11: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve GOAT mRNA expressie (AU) in de maag. \$ p<0.05. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	43
Figuur 12: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op plasma GLP-1 concentraties (pg/ml). *** p<0.001. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	43
Figuur 13: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op het aantal GLP-1 positieve L-cellen in A, B) het duodenum en C, D) het colon. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.....	44
Figuur 14: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve proglucagon mRNA expressie (AU) in A, B) het duodenum en C, D) het colon. * p<0.05. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	45
Figuur 15: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op plasma PYY concentraties (pg/ml). De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	46
Figuur 16: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op het aantal positieve PYY L-cellen in het colon. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	46

Figuur 17: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle op de relatieve PYY mRNA expressie muizen in het colon. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	47
Figuur 18: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressies van FFAR2 en TAS1R3 (AU) in de maag. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	48
Figuur 19: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op de relatieve mRNA expressie (AU) van FFAR2 en TAS1R3 (AU) in het duodenum. * $p < 0.05$, \$ $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	49
Figuur 20: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressie van GLUR2 en SGLT1 (AU) in het duodenum. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, \$ $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	50
Figuur 21: Effect van dagelijkse gavage met A, C, E) sucralose (0.52 mg) of B, D, F) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressies van FFAR2 en FFAR3 (AU) in het colon. *** $p < 0.001$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.	51

Verklarende woordenlijst

-/-	knockout
α -gust ^{-/-}	α -gustducine knockout
ADI	dagelijks aanvaardbare inname
AESF	4-(2-aminoethyl) benzeensulfonylfluoride hydrochloride
ATP	adenosinetrifosfaat
AU	arbitraire eenheden
AUC	oppervlakte onder de curve
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	kalf serum albumine
Ca ²⁺	tweewaardig calciumion
cAMP	cyclisch adenosinemonofosfaat
CaSR	calciumgevoelige receptor
cdNA	complementair DNA
cGMP	cylisch guanosinemonofosfaat
DNA	deoxyribonucleïnezuur
dNTP	deoxynucleotidetrifosfaat
DPPIV	dipeptidyl peptidase IV inhibitor
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
ELISA	<i>enzyme-linked immuno assay</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FOS	fructooligosaccharide/oligofructose
GI	gastro-intestinaal
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GLUT2	glucosetransporter 2
GOAT	ghreline-O-acyltransferase
GPCR	G-proteïnegekoppelde receptor
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Hz	Hertz
IP ₃	inositol trifosfaat
K ⁺	kaliiumion
LAGB	laproscopisch aanpasbare maagband
mRNA	messenger ribonucleïnezuur
Na ⁺	natriumion
NRS	normaal konijnenserum
PLC β 2	fosfolipase C β 2
POMC	pro-opiomelanocortine
PYY	peptide tyrosine tyrosine
RIA	radio-immuno-assay
RNA	ribonucleïnezuur
rpm	rotaties per minuut
Rpl13a	ribosomaal proteïne L13a
RT-PCR	<i>real-time</i> PCR
RYGB	Roux-en-Y maagbypass
SEM	standaardfout
SGLT1	Na ⁺ -glucose cotransporter 1
TAS1R	smaakreceptor familie 1
TAS2R	smaakreceptor familie 2
TFA	trifluorazijnzuur
WT	wildtype

Abstract

Obesitas is een ernstig gezondheidsprobleem. Artificiële zoetstoffen, zoals sucralose, worden toegevoegd aan de voeding om gewichtstoename te verhinderen maar het gunstig effect hiervan blijkt controversieel. Het gebruik van prebiotische zoetstoffen, zoals oligofructose (FOS) blijkt wel gewichtstoename te verminderen.

Zoetstoffen activeren smaakreceptoren, de zoetreceptoren. Deze receptoren zijn gekoppeld aan een smaak G-proteïne, α -gustducine. Ze zijn aanwezig op de tong, maar ook op entero-endocriene cellen in het gastro-intestinaal stelsel. Zo kunnen zoetstoffen het secreteren van honger- en verzadigingshormonen (ghreline, GLP-1 en PYY) beïnvloeden en de energiehuishouding regelen. Deze studie onderzoekt of sucralose of FOS op lange termijn gewichtstoename kunnen verhinderen, door de secretie van darmhormonen te moduleren. Verder wordt nagegaan of zoet- en korteketenvetzurreceptoren hierin een rol spelen door gebruik te maken van wildtype (WT) en α -gustducine knockout (α -gust^{-/-}) muizen.

WT en α -gust^{-/-} muizen, op een hoogvetdieet werden dagelijks gegeven met FOS, sucralose (equizoet) of water gedurende 8 weken. Lichaamsgewicht en voedselinname werden opgevolgd. Elementen van de smaaktransductiecascade en hormonen werden bepaald via RIA, ELISA, immunohistochemie en RT-PCR.

FOS induceert een verminderde gewichtstoename, onafhankelijk van smaakreceptoren gekoppeld aan α -gustducine. In tegenstelling met de hypothese, stijgt ghreline en daalt GLP-1. Deze hormonen spelen dus geen rol in de verminderde gewichtstoename.

Abstract in English

The obesity epidemic is posing a major problem to our society. Artificial sweeteners, such as sucralose, are non-caloric but might not be metabolically inert since they have been shown to increase obesity. In contrast, the use of prebiotic sweeteners, such as oligofructose (FOS) have been shown to reduce weight gain.

These sweeteners can activate the sweet receptors. These receptors are coupled to a taste G-protein, α -gustducin. They are present on the tongue, but also on enteroendocrine cells in the gastro-intestinal system. That's how sweeteners may influence the secretion of hunger and satiety hormones (ghrelin, GLP-1 and PYY) and regulate the energy homeostasis. This study examines whether sucralose or FOS may prevent weight gain from a high-fat diet (HFD), by modulating the secretion of intestinal hormones. Furthermore, we investigated whether sweet or short-chain fatty acid receptors play a role in this regulation through the use of wild-type (WT) and α -gustducin knockout (α -gust^{-/-}) mice.

WT and α -gust^{-/-} mice were gavaged once daily for 8 weeks with 300 mg FOS, 0.52 mg sucralose (equisweet) or water while fed a HFD. Body weight and food intake were monitored. Elements of the taste transduction cascade and gut hormones were determined by RIA, ELISA, immunohistochemistry and RT-PCR.

FOS reduced body weight gain, independent of taste receptors coupled to α -gustducin. In contrast to our hypothesis, FOS increased plasma ghrelin and decreased plasma GLP-1 levels. Therefore these hormones might not play a role in the reduced weight gain.

1 Inleiding

1.1 Situering

Als onderdeel van de opleiding Industriële Ingenieurswetenschappen voer ik een masterproef uit aan KU Leuven, departement Klinische en Experimentele Geneeskunde in het "Gut Peptide Research Lab" van het Translationeel Onderzoekscentrum voor Gastro-intestinale Aandoeningen.

Onder obesitas en overgewicht wordt het opstapelen van abnormaal veel vet verstaan, wat een negatieve invloed op de gezondheid kan hebben. In 2014 werd er wereldwijd bij 1,9 miljard volwassenen overgewicht vastgesteld. Hiervan leden 600 miljoen volwassenen aan obesitas (13% van de globale populatie). Een te hoge body mass index (BMI) verhoogt het risico op onder meer cardiovasculaire aandoeningen en diabetes mellitus type 2. Cardiovasculaire aandoeningen waren de meest voorkomende doodsoorzaak in 2012. Het is dus noodzakelijk om obesitas een halt toe te roepen [1-5].

In de strijd tegen obesitas worden naast het aanpassen van de persoonlijke levensstijl voornamelijk therapeutische en chirurgische technieken gebruikt. Deze behandelingen geven niet altijd het gewenste resultaat of zijn zeer ingrijpend. Het is dus van groot belang dat er naar manieren gezocht wordt om obesitas te voorkomen.

Veel dieetproducten bevatten artificiële zoetstoffen, zoals sucralose. Aangezien deze zoetstoffen niet-calorisch zijn wordt verwacht dat ze gewichtstoename beletten wanneer ze als suikervervanger gebruikt worden. Wetenschappelijke studies hieromtrent geven echter tegenstrijdige resultaten. Een eerste studie toont aan dat er gewichtsverlies is bij het gebruik van artificiële zoetstoffen ten opzichte van de gewone tafelsuiker, terwijl een andere studie geen verschil in lichaamsgewicht toont [6, 7].

Naast artificiële zoetstoffen kunnen ook natuurlijke prebiotische zoetstoffen, zoals oligofructose (FOS) gebruikt worden in de strijd tegen obesitas. Prebiotische zoetstoffen worden door de darmflora gefermenteerd tot korteketenvezuren en kunnen mogelijks de vrijzetting van het hongers hormoon ghreline, en de verzadigingshormonen glucagon-like peptide-1 (GLP-1) en peptide tyrosine tyrosine (PYY) uit het gastro-intestinaal (GI) stelsel beïnvloeden door activatie van zowel de zoetreceptoren en de korteketenvezuurreceptoren die net zoals op de tong ook op endocriene cellen van het GI stelsel voorkomen. Ghreline stijgt vóór de maaltijd en zorgt voor een hongergevoel en stimuleert voedselinname, terwijl de verzadigingshormonen (GLP-1, PYY) na de maaltijd stijgen en verzadiging induceren. Dit maakt dat deze prebiotica nuttig kunnen zijn in de modulatie van de glucose- en energiehomeostase, en eventueel gebruikt kunnen worden als een 'nieuwe dieetsuiker'.

Sucralose is een artificiële zoetstof die niet wordt afgebroken in het GI stelsel en dus in tegenstelling tot FOS, geen korteketenvezuren levert. Sucralose activeert wel de zoetreceptoren op de entero-endocriene cellen en kan zo de glucose- en energiehomeostase beïnvloeden door de vrijstelling van hormonen zoals GLP-1 en ghreline te reguleren.

Mensen kunnen 5 basismaken onderscheiden: zoet, zout, zuur, bitter en umami. Zout en zuur worden waargenomen door membraankanalen. Zoet, bitter en umami worden door middel van G-proteïne gekoppelde smaakreceptoren (GPCR's) waargenomen. Deze smaakreceptoren bevinden zich ook op specifieke cellen van het GI stelsel. Er bestaan twee families van smaakreceptoren, TAS1R en TAS2R. Gustducine en transducine zijn de twee smaak G-proteïnen.

1.2 Probleemstelling/onderzoeksvraag

Een eerste onderzoeksvraag is of de vrijzetting van darmhormonen gecorreleerd is met verschillen in lichaamsgewicht na toediening van de zoetstoffen. Daarboven is de manier waarop deze zoetstoffen de vrijzetting van darmhormonen beïnvloeden nog niet helemaal opgehelderd.

1.3 Doelstelling

Het doel is het uitklaren van de vrijzetting van de darmhormonen onder invloed van twee verschillende zoetstoffen. Het is nodig om te weten hoe deze zoetstoffen de glucose- en energiehomeostase beïnvloeden om een preventieve oplossing voor obesitas te vinden. Daarom wordt nagegaan hoe lange termijn toediening van sucralose en FOS de vrijstelling van de verzadigingshormonen beïnvloedt in zowel het plasma als op proteïne en transcriptie niveau.

1.4 Methode

Er worden twee soorten muizen gebruikt, namelijk α -gustducine knock-out muizen (α -gust^{-/-}) waarin het gen voor de α -subunit van het smaak G-proteïne (α -gustducine) uitgeschakeld wordt en een groep niet-gemanipuleerde muizen (wildtype muizen; WT).

Deze twee soorten muizen worden in drie groepen verdeeld, die telkens met een andere substantie gegaveerd worden. De eerste groep krijgt FOS (300 mg) toegediend, de tweede groep een equivoete hoeveelheid sucralose (0.52 mg) en een derde groep water. Zo zijn er uiteindelijk zes groepen muizen. De hoeveelheden van FOS en sucralose zijn equivoet en gaan dus de zoetreceptor in dezelfde mate activeren.

Deze muizen worden op een leeftijd van zes weken, gedurende 8 weken op een hoogvetdieet gezet, terwijl ze dagelijks gegaveerd worden met één van de substanties. Tijdens deze acht weken wordt hun voedselinname en lichaamsgewicht opgevolgd.

Na 8 weken van dagelijkse gavage worden de muizen opgeofferd. Bij de opoffering worden er plasma- en weefselstalen genomen. In het plasma worden verschillende hormonen bepaald na een orale glucosegavage: geöctanoyleerd en desoctanoylghreline, GLP-1 en PYY. mRNA wordt uit weefsel van het GI stelsel geëxtraheerd en omgezet tot cDNA. Hiervan kan men via RT-PCR het expressieniveau bepalen van verschillende genen zoals elementen van de smaaktransductiecascade FFAR3, FFAR2, TAS1R2, TAS1R3 en de hormonen ghreline, GLP1 en PYY. De rest van het weefsel wordt gebruikt om met behulp van immunohistochemie het aantal GLP-1- en PYY-positieve L-cellen te bepalen.

Deze thesis is opgebouwd met als eerste een literatuurstudie gebaseerd op de belangrijke elementen van het onderzoek. Als volgende worden de gebruikte materiaal en methoden beschreven. Hierna volgt een opsomming van de onderzoeksresultaten. Waarna een discussie over de bekomen resultaten en een blik naar de toekomst volgt.

2 Literatuurstudie

2.1 Obesitas

2.1.1 Inleiding

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. Als indicator voor overgewicht of obesitas bij volwassenen wordt de body mass index (BMI) gebruikt. De BMI is het gewicht in kilogram gedeeld door het kwadraat van de lengte in meter van deze persoon. Een BMI hoger dan 25 kg/m² wijst op overgewicht. Personen met een BMI hoger dan 30 kg/m² noemt men obees [1, 2]. In 2014 hadden wereldwijd meer dan 1.9 miljard volwassenen overgewicht, waarvan 600 miljoen leden aan obesitas (13% van de globale bevolking). Een te hoge BMI verhoogt het risico op ondermeer cardiovasculaire aandoeningen en diabetes mellitus type 2 [1, 2, 3]. De cardiovasculaire aandoeningen waren de meest voorkomende doodsoorzaak in 2012. Het is dus noodzakelijk om obesitas een halt toe te roepen [3, 4, 5].

2.1.2 Oorzaken

Obesitas wordt veroorzaakt door een onevenwicht in de energiebalans tussen het aantal opgenomen en verbruikte calorieën. Lichaamsgewicht wordt beïnvloed door genetische, psychologische, economische, omgevings- en gedragsfactoren [1, 2]. De gedragsfactoren veroorzaken vaak een verhoogde inname van vetrijk voedsel en een verlaagde fysieke activiteit, wat mogelijk een gevolg is van verschillende maatschappelijke elementen zoals marketing, onderwijs en het politiek beleid [5].

2.1.3 Behandeling van obesitas

a) Levensstijl aanpassen

Een eerste mogelijkheid is het toepassen van ‘life style modifications’, een individueel dieet in combinatie met fysieke activiteit op lange termijn. De persoon dient dan de calorieopname te verminderen en het calorieverbruik te verhogen, zodat een ‘negatieve’ energiebalans wordt bekomen, waarbij de ingenomen energie door voedsel minder is dan de energie nodig voor dagelijkse activiteiten [2, 8]. Vaak duikt er een klassiek patroon op bij patiënten die gewicht willen verliezen door hun levensstijl aan te passen: een maximaal gewichtsverlies treedt op gedurende de eerste 6 maanden, gevolgd door een periode van stabiel lichaamsgewicht en uiteindelijk het terugkeren naar het oorspronkelijk gewicht [2]. Indien veranderen van levensstijl niet het gewenste effect levert, kan er overgegaan worden op een farmacologische behandeling, dit bij patiënten met een BMI hoger dan 30 kg/m² of hoger dan 27 kg/m² met comorbiditeiten.

b) Farmacologische behandeling

In tegenstelling tot het dieet gaat het gebruik van geneesmiddelen gepaard met een uitgebreid nevenwerkingenprofiel. De voordelen van een farmacologische behandeling dienen dus afgewogen te worden tegen de neveneffecten. Momenteel is er slechts één geneesmiddel, orlistat, op de markt dat op lange termijn kan gebruikt worden. Orlistat is een lipase inhibitor en zorgt voor een verminderde vetabsorptie, waardoor ondermeer diarree, flatulentie en

vettig rectaal verlies als nevenwerking kunnen optreden [2, 8]. Recent werden een 4-tal andere geneesmiddelen goedgekeurd door de *U.S. Food and Drug Administration* (FDA): Qysmia (phentermine, topiramate), locaserin (5-HT_{2c} antagonist), Contrave (opiaat antagonist, norepinephrine reuptake inhibitor), liraglutide (GLP-1 agonist). Deze stoffen veroorzaken slechts een beperkt gewichtsverlies en kunnen maar op korte termijn gebruikt worden [9].

Wanneer een farmacologische behandeling onvoldoende resultaat oplevert, wordt er vaak overgegaan op een chirurgische ingreep.

c) Chirurgische behandeling

Patiënten met een BMI hoger dan 40 kg/m² (men spreekt dan van morbide obesitas) en patiënten met een BMI vanaf 35 kg/m² met bijkomende aandoeningen zoals diabetes en verhoogde bloeddruk, komen in aanmerking voor een heelkundige ingreep. Deze behandeling wordt beschouwd als de beste oplossing voor een langdurig gewichtsverlies.

Er zijn twee soorten ingrepen, namelijk de restrictieve en de malabsorptieve ingreep. Een restrictieve ingreep leidt tot het verkleinen van de maaginhoud waardoor de calorie-inname verlaagd wordt. De aanpasbare maagband (laproscopische aanpasbare maagband, LAGB) is hier een voorbeeld van. Hierbij wordt een siliconen band over het bovenste gedeelte van de maag geplaatst, waardoor er een kleinere bovenmaag en een grotere ondermaag ontstaat. Bij de malabsorptieve ingreep wordt een stuk weefsel weggenomen. In combinatie met restrictie zorgt deze ingreep voor een verminderde opname van nutriënten. De Roux-en-Y maagbypass (RYGB) is hier een voorbeeld van. Hierbij wordt een kleine maagpouch gemaakt die verbonden wordt met de dunne darm. De resterende maag en duodenum worden vastgemaakt via een Y-vormige constructie (figuur 1) [2, 6]. De RYGB wordt momenteel als gouden standaard beschouwd maar gaat toch gepaard met een aantal ernstige complicaties zoals ondermeer hypoglycemie, lekken van maagzuur op andere organen en het dumpingsyndroom, waarbij het voedsel te snel van de maag naar de darm gaat.



Figuur 1: De Roux-en-Y maagbypass grafisch weergegeven [2].

Bovengenoemde behandelingen geven niet altijd het gewenste resultaat of zijn zeer ingrijpend. Daarom is het van groot belang dat er naar andere manieren gezocht wordt om obesitas te voorkomen. Ook om de kwaliteit van het leven te verhogen, en de kost aan de

maatschappij te verlagen is het positief indien er preventief een oplossing is voor overgewicht en obesitas. In deze studie wordt er onderzocht of er een manier is om gewichtstoename te verhinderen door het gebruik van verschillende soorten zoetstoffen.

Het effect van artificiële zoetstoffen, zoals sucralose is reeds onderzocht in eerdere studies. Deze vonden tegenstrijdige resultaten met betrekking tot veranderingen in lichaamsgewicht [6,7]. In dit onderzoek wordt het effect van de artificiële zoetstof sucralose op de glucose- en energie homeostase vergeleken met het effect van een natuurlijke prebiotische zoetstof, FOS.

2.2 Preventie van obesitas: functionele voedingsstoffen (artificiële en natuurlijke zoetstoffen)

In het dagelijks leven trachten we gewicht te verliezen of preventief op te treden tegen overgewicht door het consumeren van dieetproducten. Veel van deze producten op de markt bevatten artificiële zoetstoffen, zoals sucralose. Aangezien deze zoetstoffen niet-calorisch zijn wordt verwacht dat ze geen gewichtstoename veroorzaken wanneer ze als suikervervanger gebruikt worden. Wetenschappelijke studies hieromtrent geven echter tegenstrijdige resultaten [6,7].

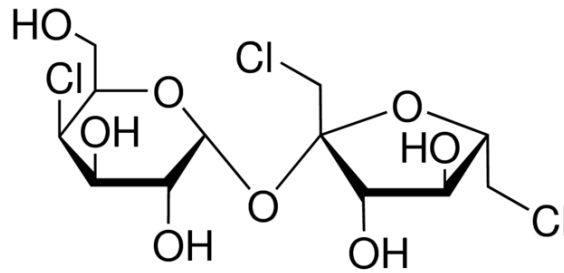
Naast artificiële zoetstoffen kunnen natuurlijke prebiotische zoetstoffen, zoals FOS mogelijk gebruikt worden in de strijd tegen obesitas. Een prebioticum is een niet-verteerbaar nutriënt dat de groei en activiteit van een aantal darmmicro-organismen stimuleert in het colon, wat een positief effect geeft voor de gastheer [10]. Prebiotische zoetstoffen worden door de darmflora gefermenteerd tot korteketenvezuren en kunnen de vrijzetting van het hongershormoon ghreline, en de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY uit het GI stelsel beïnvloeden [11, 12]. Deze hormonen worden besproken per zoetstof in 'c) effect op lichaamsgewicht'. Dit maakt dat deze prebiotica nuttig kunnen zijn in de modulatie van de glucose- en energiehomeostase.

Sucralose is een artificiële zoetstof die niet wordt afgebroken in het GI stelsel en dus in tegenstelling tot FOS, geen korteketenvezuren levert [13]. Door gebruik te maken van deze twee verschillende zoetstoffen, wordt bepaald of hun effecten op de vrijstelling van de honger- en verzadigingshormonen veroorzaakt wordt door de zoetstof op zich of door de geproduceerde korteketenvezuren [8].

2.2.1 Artificiële zoetstof: Sucralose

a) Karakteristieken

Een artificiële zoetstof is een niet-natuurlijk chemisch product wat niet tot de suikers behoort maar wel een zoete smaak geeft door de smaakreceptoren te stimuleren. Sucralose is een artificiële zoetstof met als wetenschappelijke naam: 1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β -D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy- α -D-galactopyranoside (figuur 2), het is een disacharide met 3 chlooratomen. In 1998 werd het gebruik van sucralose in voedsel en drank goedgekeurd door de FDA. In Europa werd het gebruik ervan goedgekeurd in 2004. De dagelijks aanvaardbare inname (ADI) is 15 mg/kg/dag [14, 15].



Figuur 2: Structuurformule sucralose [Sigma-Aldrich, België].

b) Functie

Sucralose heeft een zoetkracht die 385-650 keer hoger is dan de gewone tafelsuiker sacharose/sucrose. Deze zoetstof heeft geen calorische waarde en verlaat het lichaam ongewijzigd. Sucralose wordt daarom gebruikt als zoetvervanger in ondermeer dieetproducten [14, 15].

c) Effect op lichaamsgewicht

Mensen kiezen intuïtief voor niet-calorische producten om hun lichaamsgewicht te behouden of om gewicht te verliezen. Vaak worden deze producten gezien als ‘gezond’, maar werken deze wel zoals we het verwachten [16]? Eerst wordt het effect van artificiële zoetstoffen op het lichaamsgewicht bekeken. Dit wordt deels mee bepaald door de voedselinname die op zijn beurt geregeld wordt door het hongers hormoon ghreline en de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY.

In een chronische carcinogene toxiciteit studie in ratten induceerde 0.3-1-3% sucralose administratie een daling in lichaamsgewicht [17]. Daarnaast toonde een lange termijn gavage met sucralose in ratten (12 weken) een significante stijging in lichaamsgewicht in lage concentraties, de hoge concentraties hadden geen effect [18]. In dieet geïnduceerde obese muizen had vier weken sucralose supplementatie echter geen effect op het lichaamsgewicht, wat suggereert dat het effect van sucralose op lichaamsgewicht anders is in een staat van obesitas [19].

Deze studies leidden tot epidemiologische artikels die de link tussen de inname van zoetstoffen en obesitas bestudeerden. Verschillende studies geven een positieve relatie aan tussen het gebruik van artificiële zoetstoffen en gewichtstoename in mensen. Na een aantal jaren bleek de BMI verhoogd van gezonde volwassenen die drankjes met artificiële zoetstoffen dronken [20, 21]. Men moet er echter rekening mee houden dat deze correlaties gebiased kunnen zijn met cofactoren zoals veranderingen in eetgewoontes en de intentie om gewicht te verliezen, aangezien Vanselow *et al.* in schoolkinderen een positieve relatie tussen zoetstofinname en lichaamsgewicht vond, die verdween na correctie voor deze cofactoren [7].

Als we de relatie tussen zoetstoffen en obesitas echt willen begrijpen moeten we echter teruggrijpen naar gerandomiseerde gecontroleerde studies om de mechanismen en causaliteit te bestuderen. Zo toonde De Ruyter *et al.* aan dat de gewichtstoename bij kinderen door het drinken van niet-calorische drankjes kleiner was dan bij het consumeren van calorische drankjes [6]. Deze observatie werd bevestigd in een studie van Tate *et al* [8].

Bovenstaande studies suggereren dat artificiële zoetstoffen mogelijk een impact kunnen hebben op het lichaamsgewicht.

Het lichaamsgewicht wordt mede bepaald door de hoeveelheid opgenomen energie, dat dan weer bepaald wordt door het honger- en verzadigingsgevoel. Dit honger- en verzadigingsgevoel wordt geïnduceerd door specifieke hormonen. Deze gastro-intestinale hormonen kunnen direct, via de bloedbaan, of indirect, via de nervus vagus, communiceren met de hypothalamus om voedselinname te controleren. Ghreline wordt geassocieerd met het hongergevoel en komt vrij vlak voor de maaltijd en induceert zo het hongergevoel. Het verzadigingsgevoel is het resultaat van het vrijkomen van ondermeer GLP-1 en PYY, de verzadigingshormonen. Deze komen vrij na de maaltijd. Er dient dus gekeken te worden naar het effect van sucralose op deze hormonen [24].

Plasmaghreline concentraties lijken niet te veranderen na een éénmalige toediening van sucralose in gezonde volwassenen. Voor GLP-1 werd er in ratten geen significant verschil van GLP-1-plasmaconcentraties bekomen na sucralose supplementatie [25]. Terwijl sucralose in gezonde vrijwilligers GLP-1 concentraties na een eenmalige orale toediening verhoogde in een studie van Tamizkan *et al.* [26]. In tegenstelling tot de bevindingen van Chang *et al.* die geen verschil zag in concentratie van de hormonen na een toediening rechtstreeks in de maag [27]. Verder werd er geen verschil waargenomen in het verzadigingsgevoel bij kinderen na het drinken van een drankje al dan niet aangereikt met een artificiële zoetstof [28].

Bovendien kan GLP-1 (een incretine hormoon, wat inwerkt op de pancreas), de secretie van insuline bevorderen en zo kan het de glucosehomeostase beïnvloeden. Ghreline inhibeert de vrijzetting van insuline en speelt daardoor ook een rol in de regulatie van de glucosehomeostase [29].

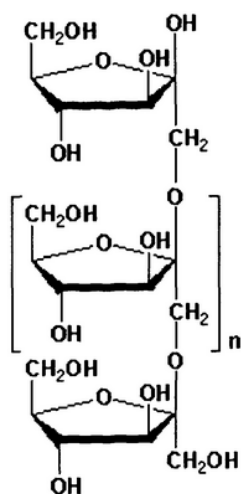
Uit de beschreven studies blijkt dat er veel tegenstrijdige resultaten zijn over het effect van sucralose op lichaamsgewicht en op de hormonen die hierbij een rol spelen. Er dienen meer eenduidige studies uitgevoerd te worden op lange termijn.

Of de artificiële zoetstoffen zoals sucralose de glucosehomeostase verbeteren is niet volledig bewezen. Een recente studie toont zelfs aan dat artificiële zoetstoffen glucose intolerantie induceren [30]. Momenteel heeft de literatuur nog geen consensus bereikt. Recent wordt er meer onderzoek gedaan naar de natuurlijke prebiotische suikers, die beter zouden zijn als alternatief voor een dieetsuiker.

2.2.2 Natuurlijke zoetstof: oligofructose

a) Karakteristieken

FOS is een onverteerbaar en oplosbaar inuline-type fructose, met prebiotische eigenschappen, en is te vinden in cichorei, tarwe, ui en look. Het is een lineair fructose polymeer met een β -(2→1)-glycosidische binding (figuur 3) [31]. De zoetkracht van FOS is ongeveer 30-35% van sucrose. Er is geen ADI beschikbaar maar bij een inname van 16-21g treedt flatulentie en abdominale pijn op [32].



Figuur 3: Structuurformule oligofructose [33].

b) Functie

Oorspronkelijk werd FOS gezien als een voedselingrediënt met de capaciteit om ondermeer de glucosehomeostase en het vetmetabolisme te verbeteren [31, 34]. Momenteel wordt er veel onderzoek gedaan op basis van de hypothese dat FOS een effect heeft op het lichaamsgewicht. FOS zou de secretie van de gastro-intestinale hormonen beïnvloeden, al is het mechanisme nog niet helemaal opgehelderd [34, 35]. De tweede belangrijke eigenschap van FOS is de prebiotische eigenschap; het beïnvloedt de darmflora. Prebiotische zoetstoffen worden door de darmflora gefermenteerd tot korteketenvezuren en kunnen de vrijzetting van het hongers hormoon ghreline en de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY uit het GI stelsel beïnvloeden. Dit maakt dat deze prebiotica nuttig kunnen zijn in de modulatie van de glucose- en energiehomeostase, en eventueel gebruikt kunnen worden als een 'nieuwe dieetsuiker'.

c) Effect op lichaamsgewicht

Ratten die gedurende een aantal weken leefden op een hoog vet- hoog sucrose dieet gesupplementeerd met 10% FOS hadden een lager lichaamsgewicht en minder vetmassa ten opzichte van controle ratten [35, 36]. Daarnaast toonden een studie op kinderen geen BMI daling na supplementatie met 15 g/dag FOS gedurende twaalf weken [9]. Studies op gezonde vrijwilligers geven tegenstrijdige resultaten [38, 39]. Een eerste studie op volwassenen met overgewicht en obesitas wees op geen gewichtsverandering na zes weken gesupplementeerd te zijn met 30 g/dag FOS [10]. Dit wordt tegengesproken door Parnell *et al.*, waar er wel een vermindering in lichaamsgewicht werd vastgesteld, bij een dosage van 21 g/dag gedurende twaalf weken [11]. Er zijn nog onvoldoende eenduidige studies op lange termijn uitgevoerd om een conclusie te kunnen trekken [31].

Het lichaamsgewicht wordt mee bepaald door de hoeveelheid opgenomen energie. De energie-inname bij ratten op een hoog vet dieet met 10% FOS was beduidend lager dan bij de controle groep [12]. Verder vermindert FOS het hongergevoel, de motivatie om te eten en de zin in hartig, vetzig en gezouten voedsel na supplementatie van FOS bij gezonde personen. Desondanks werd geen effect op het verzadigingsgevoel of energieopname waargenomen

[10]. Een studie van Verhoef *et al.*, toonde dat het effect van FOS dosisafhankelijk is; 16 g/dag FOS induceerde een vermindering van energie opname maar 10 g/dag niet [13].

Het honger- en verzadigingsgevoel wordt geïnduceerd door het hongerhormoon ghreline en de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY.

Plasmaghrelineconcentraties daalden in ratten na supplementatie van FOS [42]. Het effect van FOS blijkt in staat van obesitas verschillend te zijn aangezien Cluny *et al.* geen verandering zag in obese ratten [43]. Dit wordt niet gezien in studies op volwassenen. Zowel de obese als de niet-obese volwassenen gaven een daling van plasmaghreline na supplementatie met FOS [44, 45].

Voor GLP-1 werd een verhoging van GLP-1 gezien in de dikke darm van ratten na supplementatie van FOS. Dit is mogelijks het gevolg van de geproduceerde korteketenvetzuren [12]. Dit wordt tevens gezien in een korte termijn studie op gezonde volwassenen waar FOS een stijging van GLP-1 veroorzaakte na een testmaaltijd [46]. Verhoef *et al.* zag een verhoging van de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY bij gezonde volwassenen na een dagelijkse inname van 16g/dag FOS, maar niet bij 10/dag. Bij volwassenen met overgewicht of obesitas werd geen effect op GLP-1 vrijstelling waargenomen terwijl plasma-PYY-waarden wel verhoogd waren [38]. Hier uit blijkt ook dat het effect van FOS in staat van obesitas verschillend kan zijn.

Daarboven kunnen GLP-1 en ghreline ook de glucosehomeostase beïnvloeden, zoals besproken in 2.2.1.c. Hoe deze zoetstoffen de vrijzetting van darmhormonen beïnvloeden is echter nog niet helemaal opgehelderd. In het GI stelsel zitten entero-endocriene cellen (secreteert hormonen) die smaakreceptoren bevatten, deze kunnen mogelijks de zoetstoffen detecteren en de hormoonvrijstelling regelen. In een volgend deel wordt er hier meer informatie over gegeven.

2.3 Nutriëntsensing

2.3.1 Inleiding

Bij inname van voedsel start er een reeks van processen om dat voedsel te verwerken, onder andere in het lumen van het maagdarmstelsel. Aangezien geen enkele afferente zenuw direct in contact met het lumen van het GI stelsel staat, worden nutriënten waargenomen via een indirect proces, namelijk via gespecialiseerde cellen in de intestinale epitheellaag [47-49]. Deze cellen zijn de connectie tussen het voedsel in het lumen en de afferente zenuwen. Ze kunnen de nutriëntsamenstelling waarnemen via smaakreceptoren.

2.3.2 Nutriëntsensing op de tong

Op de tong is smaak een sensorische manier om informatie te geven over de kwaliteit van het voedsel. Mensen kunnen vijf basissmaken onderscheiden: zoet, zout, zuur, bitter en umami. Zout en zuur worden waargenomen door membraankanalen. Zoet, bitter en umami worden door middel van G-proteïne gekoppelde smaakreceptoren (GPCR's) waargenomen. Er bestaan twee families van smaakreceptoren, TAS1R en TAS2R. Detectie van de overige drie basissmaken gebeurt via deze smaakreceptoren: zoet (TAS1R2 en TAS1R3), bitter (25 subtypen van TAS2R) en umami (TAS1R1 en TAS1R3) [50, 51, 52]. Vet zou een 6^{de} basissmaak zijn, aangezien de aanwezigheid van vrijvetzurreceptoren (FFAR2, FFAR3, GPR40 en GPR120) [53,

54]. GPCR's bestaan uit drie subeenheden, de α - β - en γ -subunit. Gustducine en transducine zijn de twee smaak G-proteïnen. α -Gustducine knockout muizen (α -gust^{-/-}) toonden een verlaagde respons voor zoet, bitter en umami ten opzichte van de WT muizen, wat bewijst dat α -gustducine een rol speelt in de detectie van deze drie smaken [55]. De stimulatie van deze receptoren zorgt tevens voor een eerste vertering en het voorbereiden van het GI stelsel door vrijzetting van enzymen en hormonen [56].

2.3.3 Nutriëntsensing in het GI stelsel

Smaakreceptoren bevinden zich echter niet enkel op de tong maar ook verder in het GI stelsel [48, 57]. De maag en darmen kunnen dus ook de nutriëntsamenstelling waarnemen via deze smaakreceptoren.

In de epitheellaag van het GI stelsel zijn er drie type cellen: enterocyten, borstelcellen en entero-endocriene cellen. Deze laatste twee cellen kunnen verschillende soorten nutriënten (suikers, vetten en andere) detecteren via ondermeer smaakreceptoren.

a) Enterocyten

Enterocyten zijn de meest voorkomende epitheelcellen in het GI stelsel en hun functie bestaat erin om nutriënten en ionen op te nemen, via transporteiwitten. Door kleine uitstulpingen, de microvilli, wordt er een groot oppervlak gecreëerd voor maximale absorptiecapaciteit [50, 58, 59]. Er bestaan specifieke transporters voor zoet (SGLT1 en GLUT2), aminozuren (ATB^{0,+}, ASC, X_{AG}, ...) en vetzuren (MCT1) [60, 61].

b) Borstelcel

Een borstelcel heeft grote langere microvilli ten opzichte van de enterocyten en staat hiermee in contact met het lumen. Volgens Hass *et al.* bevatten deze cellen elementen van de smaaktransductiecascade, zoals α -gustducine, wat bewijst dat dit type cel de nutriënten kan detecteren [14]. De borstelcel bevat echter geen granulen voor opslag van signaalmoleculen of hormonen, maar deze cel kan wel informatie doorgeven naar naburige cellen via secundaire signaalmoleculen [59].

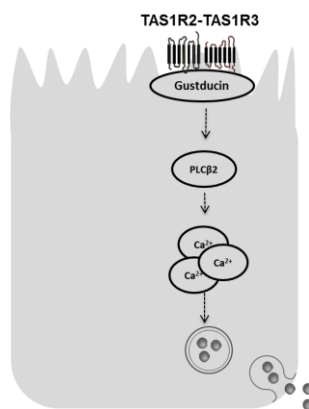
c) Entero-endocriene cel

De entero-endocriene cellen vormen maar een klein percentage van alle epitheelcellen in het GI stelsel. Er zijn meer dan tien verschillende types, die specifieke hormonen uitscheiden. Doorheen het GI stelsel verschilt het type en het aantal cellen. Zo bevindt de X/A-cel, ook wel ghrelinecel genoemd, zich voornamelijk in de maag waar deze cel het hongerhormoon ghreline secreteert. De L-cel bevindt zich voornamelijk in de dunne darm en dikke darm en secreteert GLP-1 en PYY, de verzadigingshormonen [59,62].

Er zijn twee soorten entero-endocriene cellen die verschillen van vorm en locatie in het weefsel. Een eerste type cel, de 'open type' cel, kan direct de luminale inhoud detecteren via microvilli. Door detectie van het nutriënt wordt de cel geactiveerd om gastro-intestinale hormonen vrij te zetten. Deze hormonen kunnen direct, via de bloedbaan, of indirect via afferente zenuwen, informatie doorgeven aan de hersenen of aan andere cellen om zo het honger- en verzadigingsgevoel te reguleren.

Het tweede type cel, de ‘gesloten type’ cel maakt geen direct contact met het lumen, en wordt indirect geactiveerd door secundaire signaalmoleculen [50, 59]. Op deze manier beïnvloeden verschillende nutriënten de secretie van gastro-intestinale hormonen, waardoor honger en verzadiging gecontroleerd worden [62].

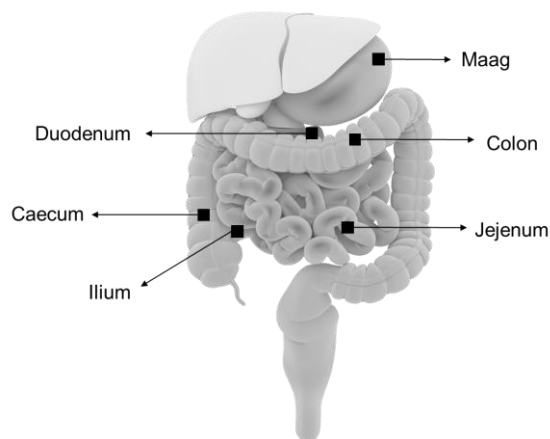
Het activeren van de receptoren tot het vrijzetten van de darmhormonen, gebeurt volgens een signaalcascade: een zoetstof bindt aan de GPCR en zorgt ervoor dat α -gustducine loskomt van de $\beta\gamma$ -subunit. α -Gustducine beïnvloedt de cAMP en cGMP-concentraties terwijl de $\beta\gamma$ -subunit het PLC β 2 activeert wat leidt tot een IP $_3$ -gemedieerde vrijstelling van Ca $^{2+}$ (figuur 4). Dit zorgt voor een verhoogde intracellulaire Ca $^{2+}$ -concentratie. Hierdoor kunnen granulen die een darmhormoon bevatten, zoals GLP-1 fuseren met het membraan en op deze manier het darmhormoon secreteren [63].



Figuur 4: Entero-endocriene cel met zoete smaakreceptor: signaaltransductieweg.

2.3.4 Waarnemen van nutriënten na de maaltijd

Voedsel, gegeten tijdens de maaltijd, wordt verteerd doorheen verschillende organen van het GI stelsel, om het lichaam te voorzien van de nodige nutriënten voor energie en celopbouw. Het GI stelsel detecteert verschillende nutriënten (proteïnen, koolhydraten en vetten) via smaakreceptoren, en zorgt voor een specifieke regeling van de vertering en de opname van deze nutriënten [64]. Omdat deze studie gaat over het gebruik van zoetstoffen, wordt er hierover dieper ingegaan.



Figuur 5: Gastro-intestinaal stelsel.

a) Maag: de ghrelinecel

Voedsel arriveert eerst in het proximale gedeelte van het GI stelsel, de maag, waar voornamelijk X/A cellen zitten, ook wel ghrelinecellen genoemd. Deze cellen komen vooral voor in de maag en in mindere mate in de dunne en dikke darm [65]. Deze cellen in de maag, zijn gesloten cellen en staan mogelijks in contact met de borstelcellen of met het bloed. Het belangrijkste hormoon dat deze cellen secreteren is het hongerhormoon ghreline. Dit is een peptide dat bestaat uit 28 aminozuren [66]. Ghreline is pas biologisch actief na een post-translationale modificatie, uitgevoerd door het ghreline O-acyltransferase (GOAT) die een octanoylgroep inbouwt op het derde aminozuur van ghreline [67]. De plasmaconcentratie van ghreline stijgt vlak voor de maaltijd en zorgt voor een hongergevoel. Na de maaltijd daalt het ghrelinegehalte weer. De daling na de maaltijd is afhankelijk van de samenstelling van de maaltijd. Zo onderdrukken koolhydraten de ghrelinesecretie sterker dan proteïnen en vetten. Dit wijst erop dat smaakreceptoren op de ghreline cel nutriënten waarschijnlijk kunnen waarnemen om de ghrelinesecretie te reguleren [68]. De aanwezigheid van smaakreceptoren op de ghreline cel werd reeds bevestigd in verschillende studies.

Zoetdetectie op de tong gebeurt door GPCR's: TAS1R2 en TAS1R3. Deze zoetreceptoren detecteren een hele reeks van natuurlijke en artificiële zoetstoffen, zoals FOS en sucralose [69]. Het mRNA wat codeert voor deze receptoren is gevonden in entero-endocriene cellijnen, wat bewijst dat er zoetdetectie gebeurt in het GI stelsel [70]. In de ghrelinecel komt TAS1R3 tot expressie, dat zorgt voor de detectie van zoet en umami. Sucralose en FOS zijn beide zoet en zullen de zoetreceptoren dus activeren [71].

De ghrelinecel detecteert indirect de luminale inhoud op proteïnen, hun afbraakproducten en aminozuren via reeks van speciale peptide/aminozuur smaakreceptoren: GPR92/93, CaSR, GPRC6a [59, 62, 72-75].

In de maag veroorzaken vetten een verhoging van de gastro-intestinale hormonen en een inhibitie van het ledigen van de maag, wat bewijst dat vetten gedetecteerd worden door cellen in het GI stelsel [76]. Er zijn verschillende vetreceptoren voor zowel lange, mediumlange en korte vetzuren, overwegend GPCR's. Op de ghreline cel bevinden zich voornamelijk de receptoren voor detectie van medium en lange vetzuren, GPR40 en GPR120 [77].

b) Dunne darm: de L-cel

Wanneer de maag geledigd wordt, kan er vertering en absorptie in de dunne darm gebeuren. De dunne darm wordt opgedeeld in drie delen, het duodenum, het jejunum en het ileum (figuur 5). Vetten, koolhydraten en aminozuren stimuleren hier ondermeer de L-cel, die GLP-1 secreteert. GLP-1 is een verzadigingshormoon, het zorgt voor een verzadigingsgevoel en het vertragen van de maaglediging. L-cellen beschikken over smaakreceptoren om zoetstoffen (TAS1R2, TAS1R3), proteïnen (TAS1R3, GPRC6A, CaSR en GPR92/93) en vetten (FFAR2, FFAR3, GPR40 en GPR120) te detecteren. Koolhydraten zorgen extra voor het vrijzetten van GLP-1 door de L-cel, wat de insulinesecretie verhoogt en zorgt voor een constante glucoseconcentratie in het bloed. In het volgend deel wordt er dieper ingegaan op het effect van suikers en andere zoetstoffen.

In cellijnen van de L-cel verhoogde de GLP-1 concentratie door stimulatie van suikers en niet-calorische zoetstoffen. Deze verhoging werd niet gezien na het toevoegen van de

zoetreceptorantagonist lactisol, wat de rol van deze receptoren bewijst in het GI stelsel [78]. De rol van de zoetreceptor wordt echter in de vraag gesteld aangezien artificiële zoetstoffen zowel in knaagdieren als in mensen geen GLP-1 vrijzetting veroorzaken [79, 80]. Er moet dus ook een ander mechanisme zijn dat suikers detecteert. Deze vaststelling wijst op het belang van de *sodium-dependent* glucosetransporter (SGLT1), één van de twee voornaamste glucosetransporters in ondermeer de enterocyten [81]. Deze bevinden zich in het duodenum.

Duodenum

De rol van SGLT1 in de glucosegestimuleerde-GLP-1 secretie wordt aangetoond door studies met SGLT1^{-/-} muizen. De knockout muizen vertonen een lagere GLP-1 concentratie na gavage met glucose ten opzichte van de WT muizen. SGLT1^{-/-} muizen hebben dus een langere glucosegeïnduceerde GLP-1 secretie, wat bewijst dat SGLT1 belangrijk is voor de absorptie van glucose en de glucosegeïnduceerde secretie van GLP-1 [82].

De glucose transporter2 (GLUT2) speelt ook een rol in het vrijzetten van de gastro-intestinale hormonen. Het lijkt er op dat er directe (receptoren) en indirecte (transportmoleculen) mechanisme bestaan in de glucose detectie in het GI stelsel.

SGLT1 en GLUT2, worden opgereguleerd in enterocyten als respons op de aanwezigheid van zoetstoffen en downgereguleerd in TAS1R3^{-/-} [83]. Er is dus een sterke correlatie tussen smaakreceptoractivatie in L-cellen en het veranderen van de expressie van glucosetransporters in enterocyten [84]. De rol van de transporters kunnen dus ook van belang zijn bij de glucosehomeostase, en zo dus op het lichaamsgewicht.

Artificiële zoetstoffen reageren enkel met de zoetreceptoren en worden niet opgenomen door de transportmoleculen. Activatie van de zoetreceptoren door artificiële zoetstoffen leidt tot een verhoging van SGLT1 en de invoer van GLUT2 in het membraan van de enterocyten, wat samen zorgt voor een verhoging van glucoseabsorptie [84, 85]. Is dit het bewijs dat artificiële zoetstoffen geen voordelen hebben op de glucosehomeostase en dus op het behouden van het lichaamsgewicht? Er zijn te weinig langdurige studies om deze vraag eenduidig te kunnen beantwoorden.

c) Colon: de L-cel

De grootste populatie van microbiotica bevindt zich in het caecum. Hier wordt FOS door micro-organisme gefermenteerd tot korteketenvetzuren.

Tot slot komen de voedselresten in het colon terecht. Hier bevinden zich voornamelijk L-cellen, deze bevatten hier geen glucosetransporters (GLUT2 en SGLT1) meer. De L-cellen in het distaal colon bevatten, in tegenstelling tot die van het jejunum zowel GLP-1 als PYY. K⁺-ATP kanalen worden hier als glucosesensor gepostuleerd. CaSR en GPR93 zijn hier aanwezig voor detectie van proteïnen en aminozuren.

FFAR3 en FFAR2 zijn verantwoordelijk voor de detectie van korteketenvetzuren zoals boterzuur, propionzuur en azijnzuur, wat eindproducten zijn van microbiologische fermentatie van niet-verteerbare koolhydraten zoals FOS [86]. Deze vetreceptoren verhogen de vrijzetting van de verzadigingshormonen GLP-1 en PYY [87, 88]. Het gebruik van natuurlijke prebiotische

zoetstoffen, zoals FOS zou dus een betere optie zijn dan artificiële zoetstoffen om obesitas te voorkomen, door de extra verhoging van de verzadigingshormonen [11, 12].

3 Materiaal en methoden

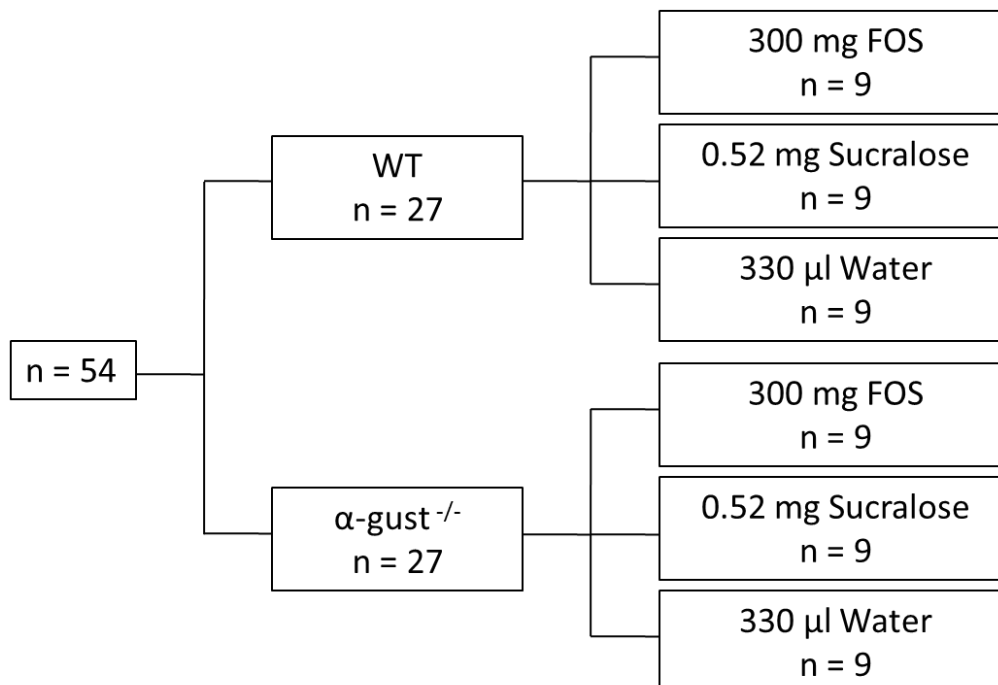
3.1 *In vivo* experimenten

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 (Prof. R. Margolskee, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, V.S.). Deze knockout muizen bevatten het smaak G-proteïne α -gustducine niet, waardoor de rol van de nutriëntsensing in de effecten van de twee zoetstoffen kan worden nagegaan. Alle experimenten zijn goedgekeurd door de ethische commissie voor proefdieren van de Katholieke Universiteit van Leuven (projectnummer P176/2013).

3.1.2 Opzet experiment

Muizen van 6 weken oud worden in een temperatuur gecontroleerde omgeving (20-22 °C) in een 12 uur licht/12 uur donker cyclus gehuisd. De muizen hebben vrije toegang tot een hoogvetdieet (60%, Open Source Diets, D12492, Research Diets Inc, New Brunswick, VS) en water. De muizen worden willekeurig toegewezen aan 1 van de 6 groepen zoals weergegeven in figuur 5. Elke groep, 9 muizen, wordt onderworpen aan een dagelijkse gavage van ofwel 330 μ l water, 300mg FOS (oligofructose, Beneo orafti, België) of een equivoete hoeveelheid van 0.52 mg sucralose (Sigma-Aldrich, Diegem, België) gedurende 8 weken. De muizen worden om de 2 dagen gewogen en voedsel inname wordt elke 3 dagen gemeten.



Figuur 6: Schematische opstelling experiment.

3.1.3 Opoffering

Na 8 weken gavage worden de muizen opgeofferd. Het opofferen gebeurt na zes uur vasten gevolgd door een gavage van 2 g D-glucose/kg lichaamsgewicht 10 minuten voor de opoffering. De muizen worden geïnjecteerd met 400 µl 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, Sigma-Aldrich, België), 4-(2-aminoethyl) benzeensulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF, 1/20, Sigma-Aldrich, België) wordt toegevoegd aan de bloedstalen 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. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor (DPP4, 1/100, Millipore, België) wordt toegevoegd aan plasma voor GLP-1 en PYY bepalingen.

De muizen worden gedissecteed en de maag, duodenum, en het 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 worden bewaard op -80 °C voor verdere bepalingen.

3.2 Meten van plasmaoctanoylghreline en plasmadesoctanoylghreline

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 Radio-immuno-assay (RIA)

Plasmaconcentraties van desoctanoylghreline en octanoylghreline worden bepaald met behulp van een radio-immuno-assay 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 desoctanoylghrelineconcentraties 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 desoctanoylghreline 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 desoctanoylghreline (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 Meten van GLP-1 en PYY concentraties in plasma

GLP-1 wordt geanalyseerd met behulp van de actieve GLP-1 kit (MSD, Gaithersburg, VS). Deze Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) wordt uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant MSD. PYY wordt geanalyseerd met behulp van een PYY kit (EIA kit, Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany)

3.4 RNA-extractie uit weefsels van het GI stelsel, 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 interplaat variaties.

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

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

Gen	<i>Forward</i> primer	<i>Reverse</i> primer
β-actine	GATCTGGCACCACACCTTCTAC	TGGATGGCTACGTACATGGCTG
Ghreline	CCAGAGGACAGAGGACAAGC	ACATCGAAGAGCATTGAA
GOAT	ACCCGGGCCAGGTACCT	ACCCATGGCAGCAAAAGC
GLUT2	TCTTACGGCTGTCTCTGTG	AATCATCCCGGTTAGGAACA
FFAR3	TGTTCAATACTCTGCATCTGT	AGGTCCGAAATGGTCAGGTT
FFAR2	CCCTGTGCACATCCTCTGC	GCGTTCATGCTGATGCCCG
Hprt1	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
Proglucagon	GAGGAGAACCCAGATCATTCC	GTGGCGTTTGTCTTCATTCATC
Rpl13a	GATCTGGCACCACACCTTCTAC	GCAGGCATGAGGCAAACAGTC
SLGT1	CGGAAGAAGGCATCTGAGAA	AATCAGCACGAGGATGAACA
TAS1R2	AAGCATCGCCTCCTACTCC	ATTGCTAATGTAGGTCAGCCTCGTC
TAS1R3	CAGGCAGTTGTGACTCTGTTG	TGCGATGCAGATACCTCGTG
Transducine	AATCGCATGCACGAGTCTTTG	AGAGCCCACAGTCCTTGAGG

3.5 Immunohistochemie

3.5.1 Immunohistochemische bepaling van GLP-1 in het duodenum

Segmenten van het duodenumweefsel worden gefixeerd met 4% paraformaldehyde gedurende 2 uur (4°C) gevolgd door een cryoprotectie van 24 uur in 30% sucrose (4°C). Coupes (8 µm) worden gesneden met een cryostaat en 2 uur geïncubeerd op kamertemperatuur met 50µl/weefselcoupe preïncubatiebuffer (PBS met 10% ezel serum). Vervolgens worden de coupes geïncubeerd met een primair antilichaam voor GLP-1 (host geit, anti mens/muis/rat, 1/150, SC-7782, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) op 4°C voor 24 uur. Na deze 24 uur worden de coupes 3 keer 5 minuten gewassen met 0,1 M PBS. Het secundair gelabeld antilichaam (Host ezel, anti geit, Alexa 594 rood, 1/1000, Molecular Probes, Waltham, VS) wordt toegevoegd, na 2 uur incuberen op kamertemperatuur wordt er 3 keer gewassen. Van deze coupes worden nadien foto's gemaakt met een fluorescentiemicroscoop (rood: 600-660 nm, Olympus U-CMAD3, T2, Tokyo), om de positieve cellen te tellen.

3.5.2 Immunohistochemische bepaling van GLP-1 en PYY in het colon

Segmenten van het colonweefsel worden gefixeerd met 4% paraformaldehyde gedurende 2 uur (4°C) gevolgd door een cryoprotectie van 24 uur in 30% sucrose (4°C). Coupes (8 µm) worden eerst 2 uur geïncubeerd op kamertemperatuur met 50µl/weefselcoupe preïncubatiebuffer (PBS met 10% ezel serum). Vervolgens worden de coupes geïncubeerd met het eerste primair antilichaam (PYY; host konijn, anti-varken/muis/rat, 1/1000, ab22663, abcam, cambridge, UK) op 4°C voor 24 uur. Na deze 24 uur worden de coupes 3 keer 5 minuten gewassen met 0,1 M PBS. Het secundair gelabeld antilichaam (Host ezel, anti konijn, Amca blauw, 1/250, Jackson immuno labs, suffolk, UK) wordt toegevoegd, na 2 uur incuberen op kamertemperatuur wordt er 3 keer gewassen. Nadien gebeuren dezelfde stappen met het 2^{de} primair- en secundair antilichaam voor GLP-1 (host geit, anti mens/muis/rat, 1/150, SC-7782, Santa Cruz, Heidelberg, Germany; Host ezel, anti geit, Alexa 594 rood, 1/1000, Molecular Probes, Waltham, VS). Van deze coupes worden nadien foto's gemaakt met een fluorescentiemicroscop (20x, rood: 600-660 nm, blauw: 435-485 nm, Olympus BX41, Tokyo) , om de PYY-en GLP-1 positieve cellen te tellen.

3.6 Statistische analyse

Alle resultaten worden weergegeven als gemiddelde ± 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 behandeling (FOS en sucralose) na te gaan in verschillende genotypes gevolgd door *planned comparison post hoc testing* met een correctie volgens Bonferroni. Verschillen worden beschouwd als significant bij een p-waarde kleiner dan 0,05.

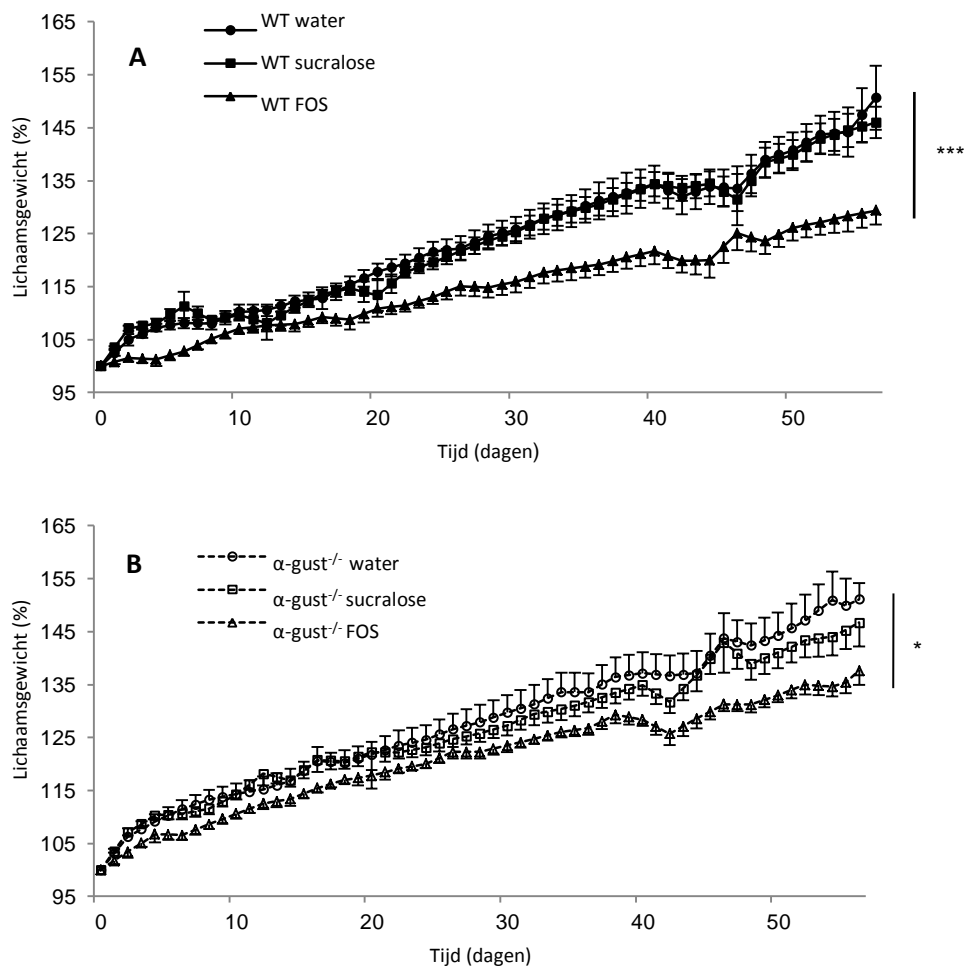
4 Onderzoeksresultaten

4.1 Lichaamsgewicht en voedselinname

WT en α -gust^{-/-} muizen van zes weken oud, werden op een hoogvetdieet gezet terwijl ze gedurende acht weken dagelijks gegaveerd werden met equivoete oplossingen van FOS (300 mg), sucralose (0.52 mg) of water (330 μ l) als controle. Lichaamsgewicht werd elke twee dagen opgevolgd, voedselinname om de drie dagen.

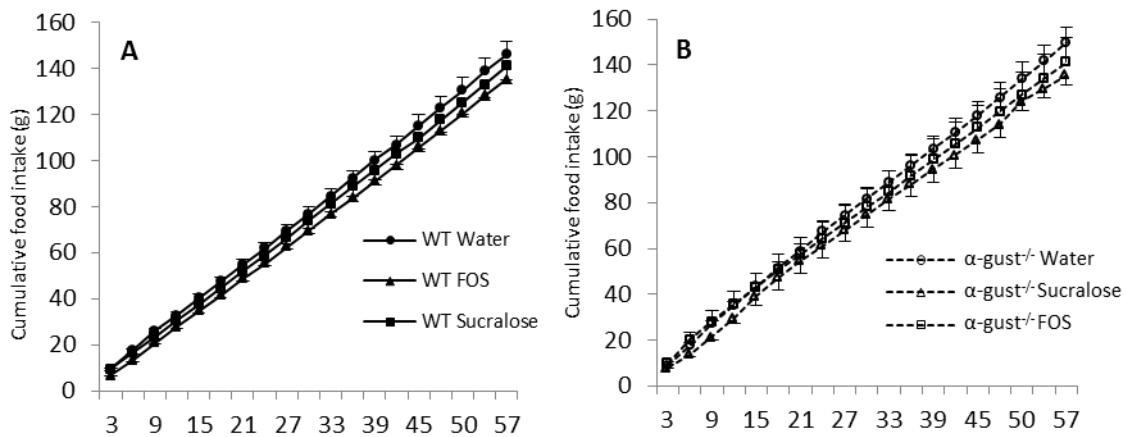
Sucralose veroorzaakte geen vermindering in gewichtstoename in de WT muizen in vergelijking met de controle muizen. Bij de α -gust^{-/-} muizen werd een vermindering van gewichtstoename geobserveerd in de laatste week (week 8; $p < 0.05$).

FOS veroorzaakte een significante vermindering in gewichtstoename in beide genotypen ten opzichte van de controle muizen (WT: $p < 0.001$; α -gust^{-/-}: $p < 0.05$) (figuur 7).



Figuur 7: Effect van dagelijkse gavage met sucralose (0.52 mg), FOS (300 mg) of water (330 μ l) gedurende acht weken op het lichaamsgewicht (uitgedrukt als % van het oorspronkelijk gewicht) in A) WT en B) α -gust^{-/-}. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

De voedselinname werd cumulatief opgeteld. Er bleek geen significant verschil in voedselinname tussen de verschillende groepen (figuur 8). Dit wijst er op dat het verschil in lichaamsgewicht onafhankelijk is van de voedselinname.



Figuur 8: Cumulatieve voedselinname (g) na dagelijkse gavage met sucralose (0.52 mg), FOS (300 mg) of water (330 μ l), gedurende acht weken in A) WT en B) α -gust^{-/-} muizen. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

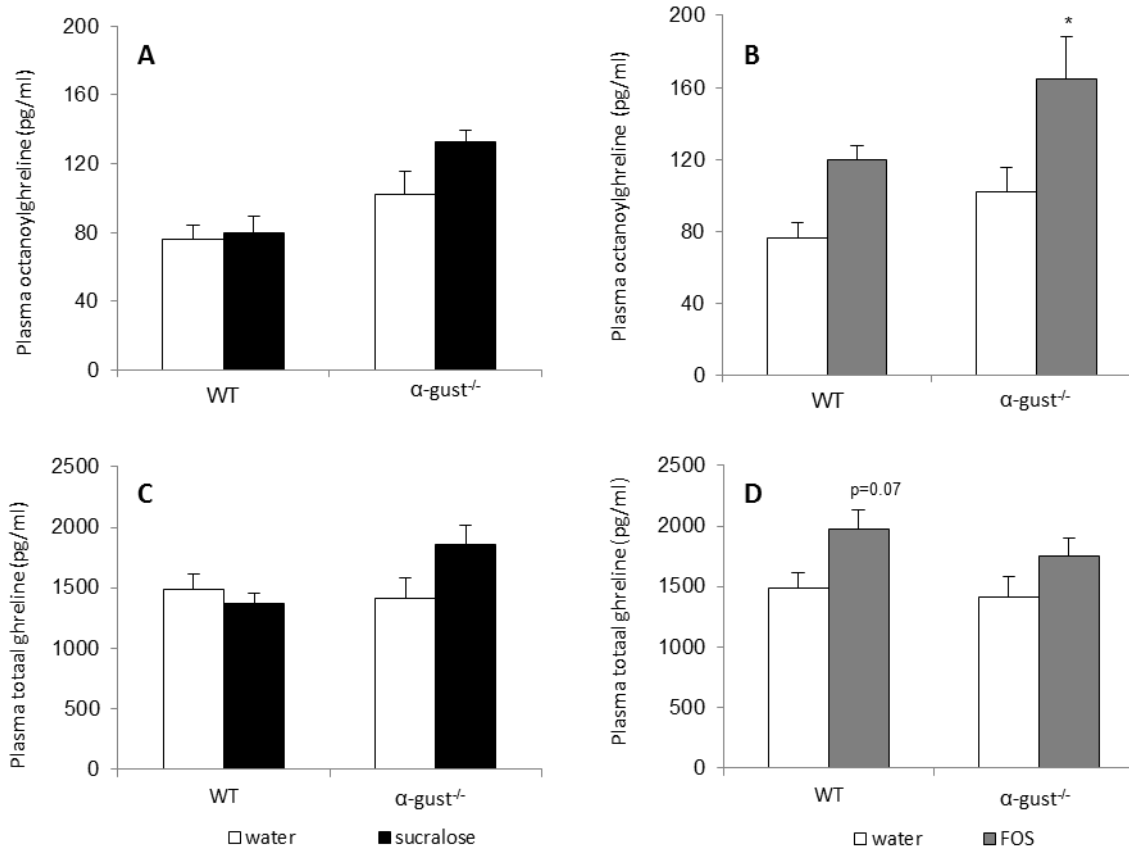
4.2 Hormonen

4.2.1 Ghreline

a) Plasma

Om te bepalen of de zoetstoffen de glucosegeïnduceerde ghrelinesecretie kunnen beïnvloeden werd de plasmawaarde van ghreline bij opoffering bepaald, 10 minuten na een gavage met glucose (2 g/kg).

Sucralose had geen significant effect op totaal ghreline noch plasma octanoylghreline concentraties in beide genotypen (figuur 9: A, C). FOS verhoogde significant de plasma octanoylghreline concentraties in α -gust^{-/-} muizen ($p < 0.05$), maar niet in de WT muizen. Op plasma totaal ghreline concentraties had FOS geen effect (Figuur 9: B, D).

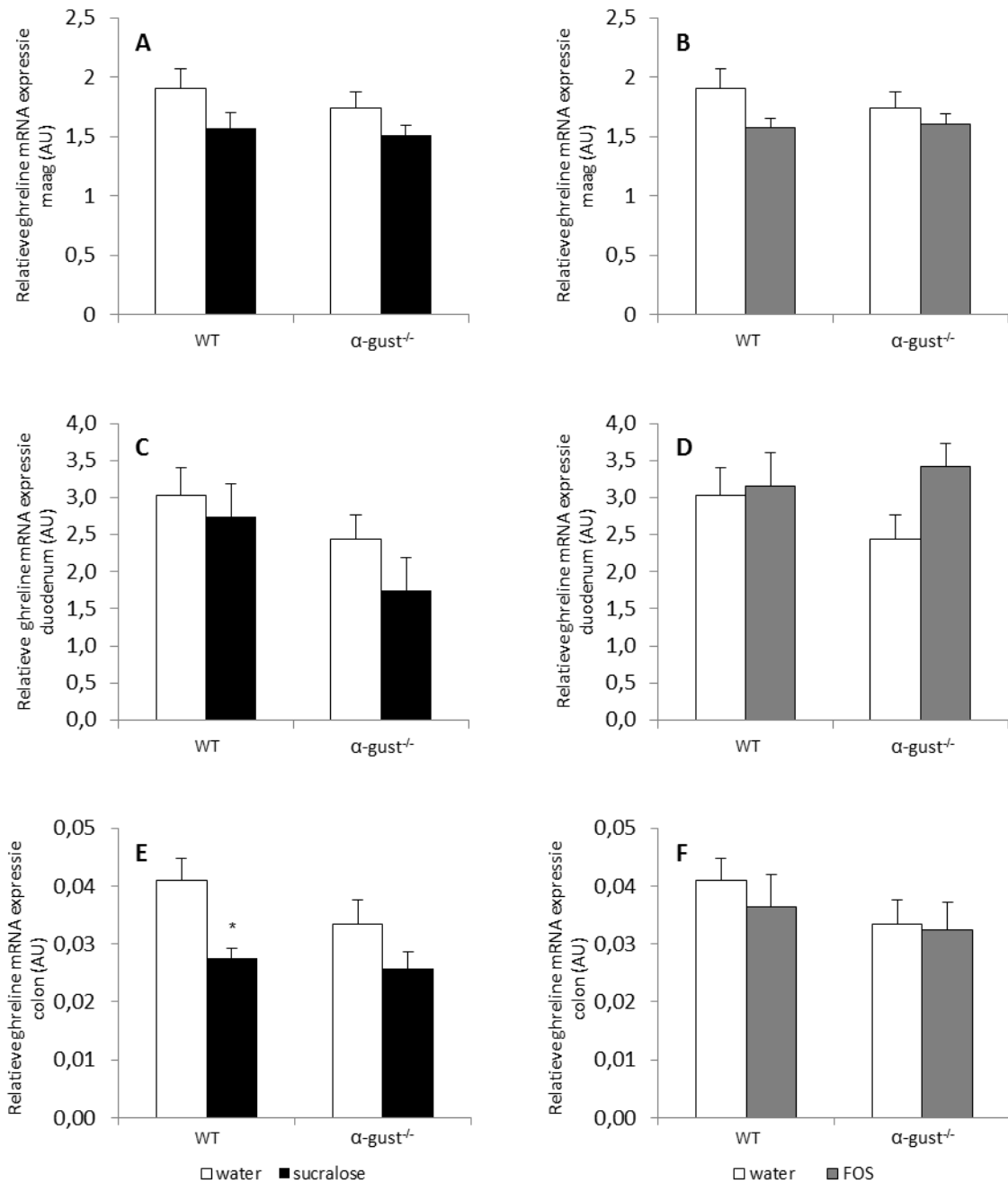


Figuur 9: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op A, B) plasma octanoylghreline en C, D) plasma totaal ghreline concentraties (pg/ml). * $p < 0.05$. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

b) Relatieve mRNA expressie

Het effect van de twee zoetstoffen op ghreline werd ook nagegaan op mRNA expressieniveau in de verschillende weefselsegmenten om te kunnen bepalen welk weefselsegment voornamelijk verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de veranderde plasmawaardes.

Sucralose had geen effect op de relatieve mRNA expressie gehalten van ghreline in maag en duodenum, in beide genotypen (figuur 10: A, C). Terwijl sucralose de ghreline mRNA expressie in het colon enkel in de WT muizen deed dalen ($p < 0.05$) (figuur 10: E). FOS had geen significant effect op de relatieve ghreline mRNA expressie in zowel maag, duodenum als colon (figuur 10: B, D, F).

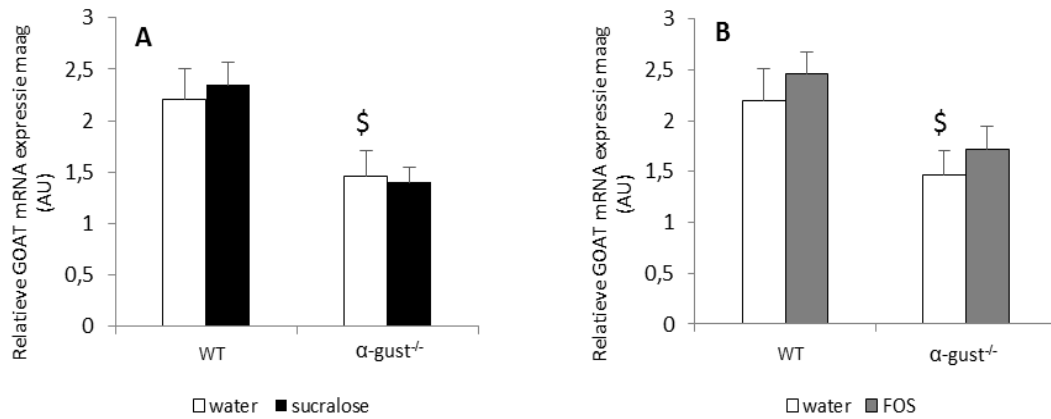


Figuur 10: Effect van dagelijkse gavage met A, C, E) sucralose (0.52 mg) of B, D, F) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve ghreline mRNA expressie (AU) in A, B) de maag, C, D) het duodenum, E, F) het colon.* $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.2.2 GOAT

a) Relatieve mRNA expressie

Relatieve mRNA expressie van GOAT, het enzym dat de octanoylatie van ghreline katalyseert, werd eveneens nagegaan. Sucralose en FOS hadden geen effect op de relatieve GOAT mRNA expressie gehalten in de maag. De basale GOAT mRNA expressie gehalte bleek wel lager in water behandelde α -gust^{-/-} muizen in vergelijking met WT muizen ($p < 0.05$) (figuur 11: A, B).

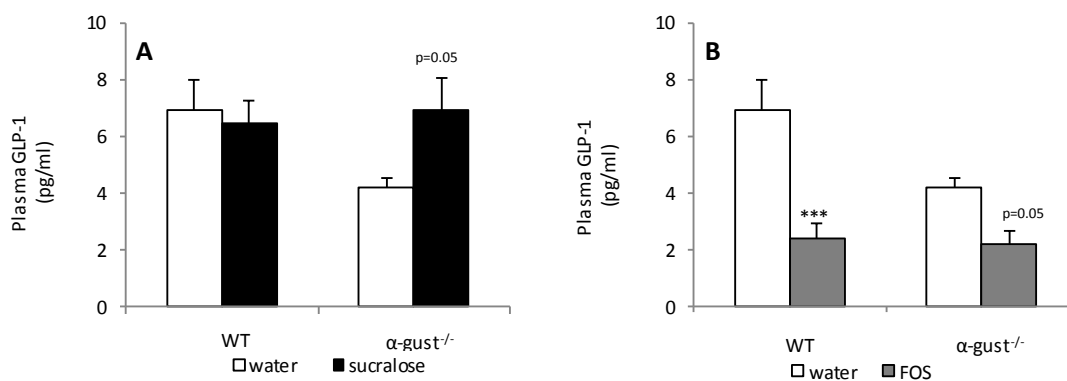


Figuur 11: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve GOAT mRNA expressie (AU) in de maag. \$ p<0.05. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.2.3 GLP-1

a) Plasma

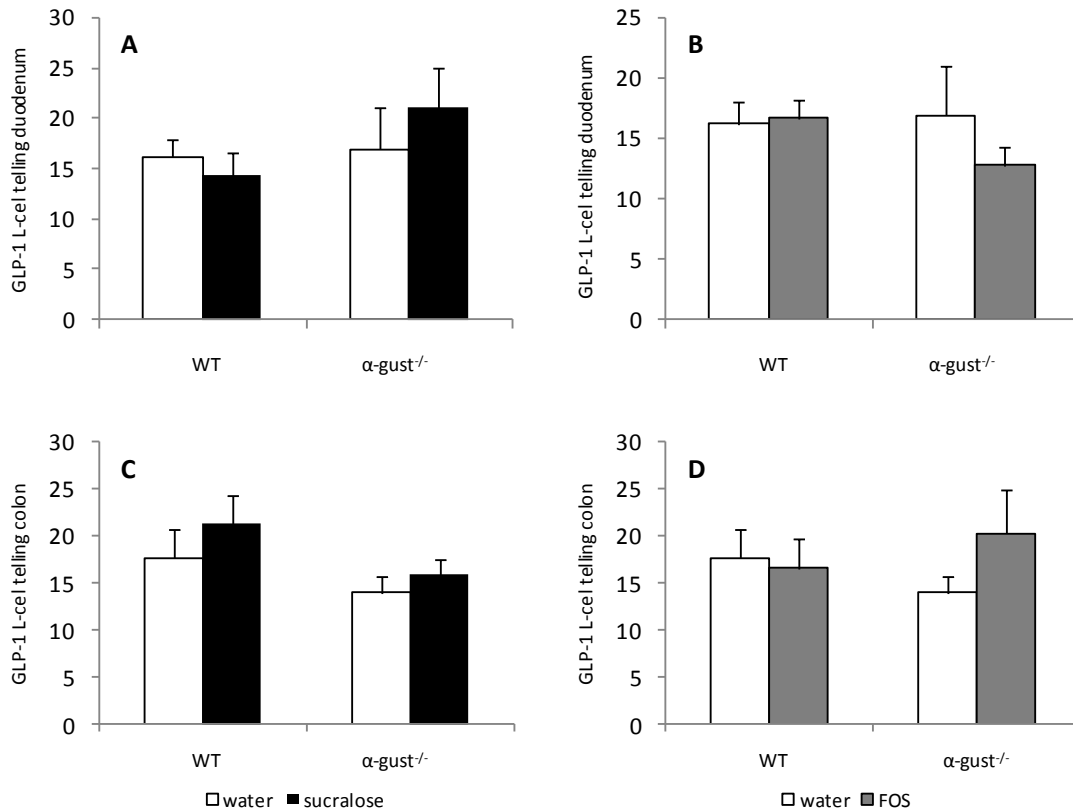
Om te bepalen of de zoetstoffen de glucosegeïnduceerde GLP-1 secretie kunnen beïnvloeden, werd de plasmawaarde van GLP-1 bij opoffering bepaald, 10 minuten na een gavage met glucose (2 g/kg). Sucralose had geen significant effect op de plasma GLP-1 concentraties in tegenstelling tot FOS supplementatie, die een significante (p<0.001) daling in GLP-1 waarden veroorzaakte in de WT muizen. In de α -gust^{-/-} muizen neigde sucralose de GLP-1 concentraties te doen stijgen en FOS supplementatie de GLP-1 concentraties te doen dalen (p=0.05) (figuur 12: A, B).



Figuur 12: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op plasma GLP-1 concentraties (pg/ml). *** p<0.001. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

b) Immunohistochemie (duodenum en colon)

GLP-1 wordt gesecreteerd door L-cellen in zowel het duodenum als het colon. Het aantal L-cellen is een maatstaf voor de GLP-1 secretie. Sucralose en FOS hadden geen significant effect op het aantal GLP-1 positieve L-cellen in het duodenum en het colon (figuur 13: A, B, C, D). De colocalisatie is 71,9% met een SEM van 2,3.

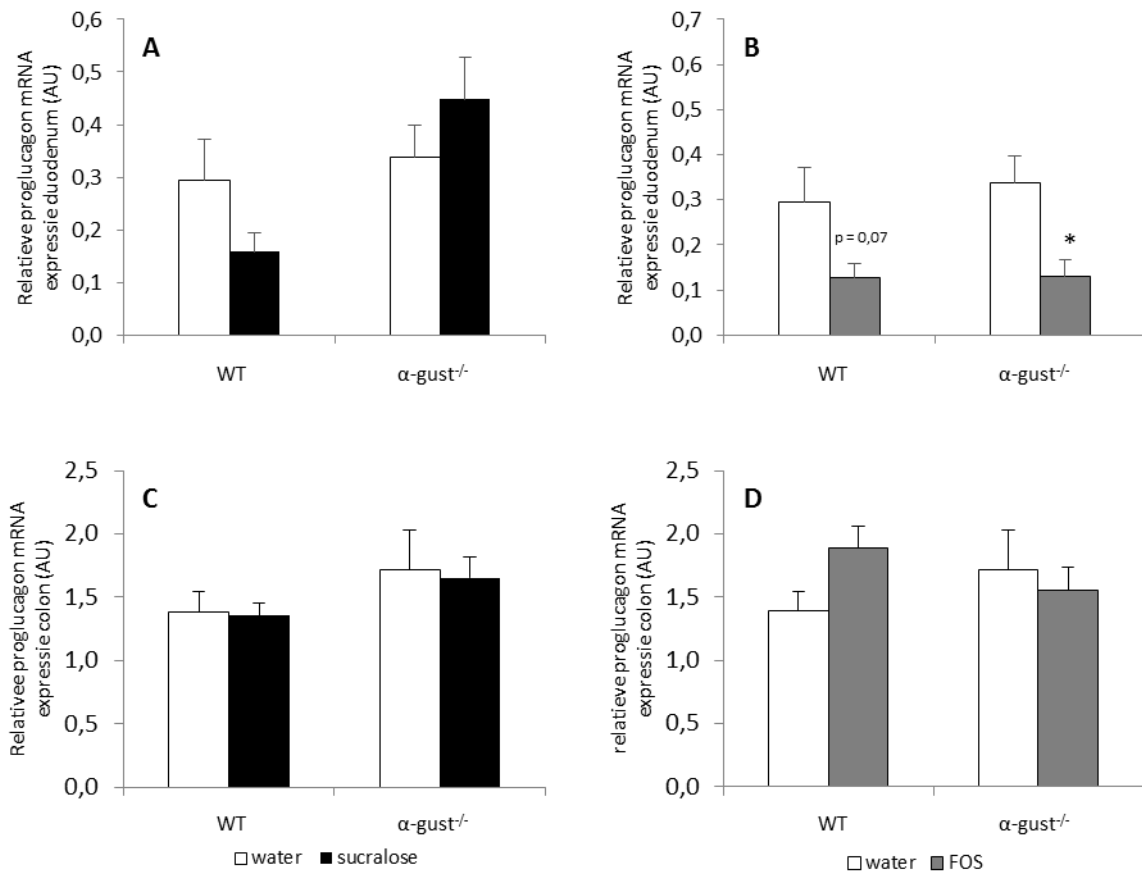


Figuur 13: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op het aantal GLP-1 positieve L-cellen in A, B) het duodenum en C, D) het colon. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM

c) Relatieve mRNA expressie

Het effect van de twee zoetstoffen op GLP-1 werd ook nagegaan op mRNA expressieniveau. Dit werd in verscheidene weefselsegmenten nagegaan om te kunnen bepalen welk weefselsegment voornamelijk verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de veranderde plasmawaardes.

Sucralose veranderde de relatieve proglucagon mRNA expressie in zowel het duodenum als het colon niet (figuur 14: A, C). FOS induceerde een significante daling ($p < 0.05$) van de relatieve proglucagon mRNA expressie in het duodenum van α -gust^{-/-} muizen. In de WT muizen was er een neiging ($p = 0.07$) tot daling (figuur 14: B). FOS had geen effect op de relatieve proglucagon mRNA expressie in het colon van beide genotypen (figuur 14: D).

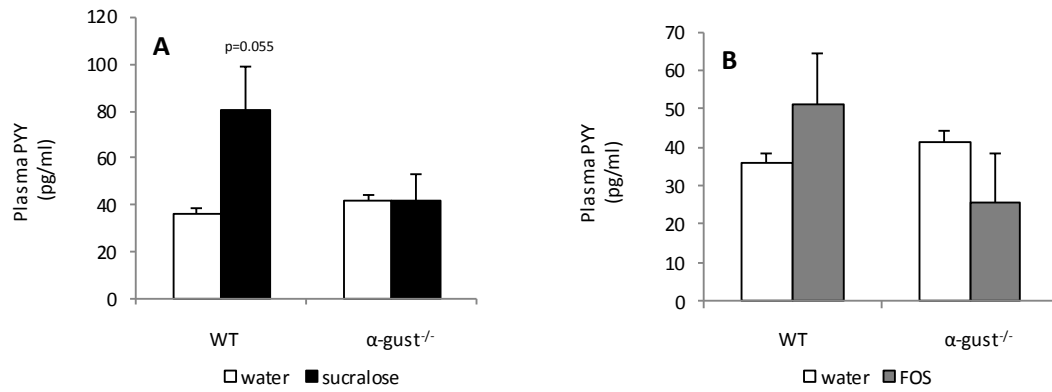


Figuur 14: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve proglucagon mRNA expressie (AU) in A, B) het duodenum en C, D) het colon. * $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.2.4 PYY

a) Plasma

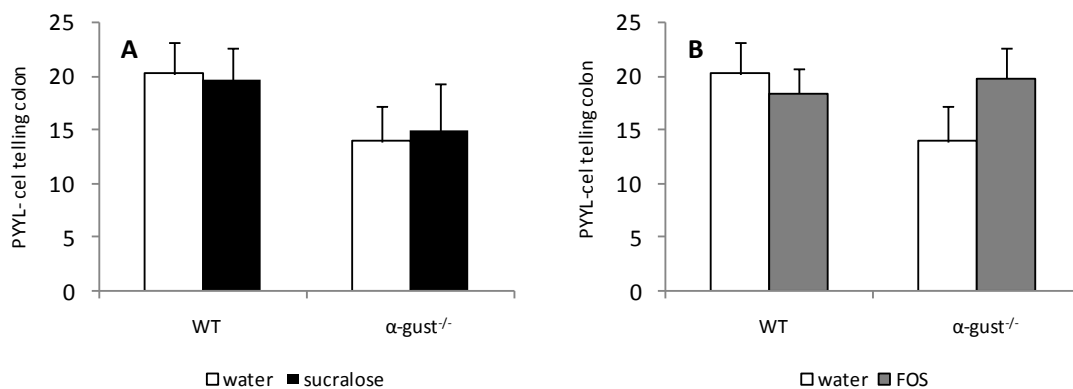
Sucralose veroorzaakte geen significant effect op plasma PYY concentraties in α -gust^{-/-} muizen, maar sucralose supplementatie neigde wel tot een stijging in de WT muizen ($p=0.055$) (figuur 15: A). FOS supplementatie had geen significant effect op plasma PYY concentraties (figuur 15: B).



Figuur 15: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op plasma PYY concentraties (pg/ml). De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

b) Immunohistochemie (colon)

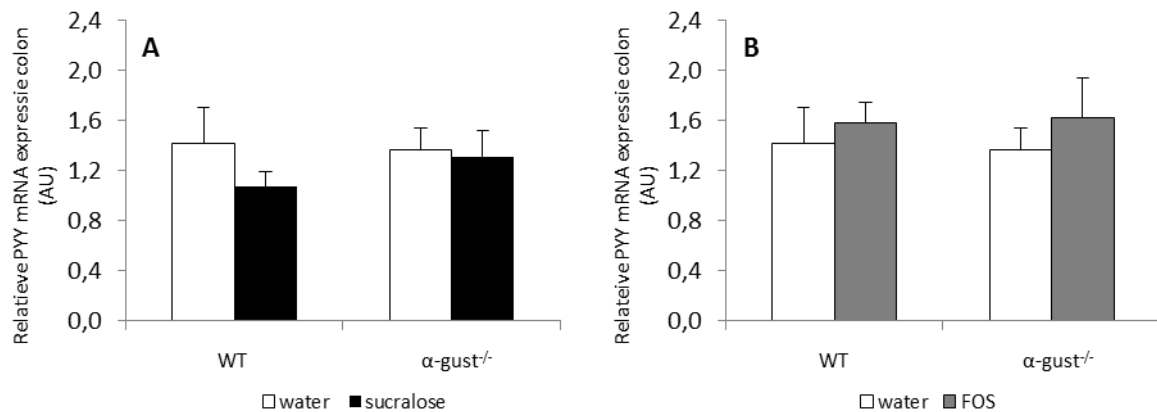
PYY wordt gesecreteerd door L-cellen in het colon. Sucralose en FOS hadden geen significant effect op het aantal PYY positieve L-cellen in het colon (figuur 16: A, B). De colocalisatie is 71,2% met een SEM van 3,2.



Figuur 16: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op het aantal positieve PYY L-cellen in het colon. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

c) Relatieve mRNA expressie

Het effect van de twee zoetstoffen op PYY werd ook nagegaan op mRNA expressieniveau. Sucralose en FOS hadden geen significant effect op de relatieve PYY mRNA expressie in het colon (figuur 17: A en B).



Figuur 17: Effect van dagelijkse gavage met A) sucralose (0.52 mg) of B) FOS (300 mg) in vergelijking met controle op de relatieve PYY mRNA expressie muizen in het colon. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.3 Nutriëntsensing: relatieve mRNA expressie

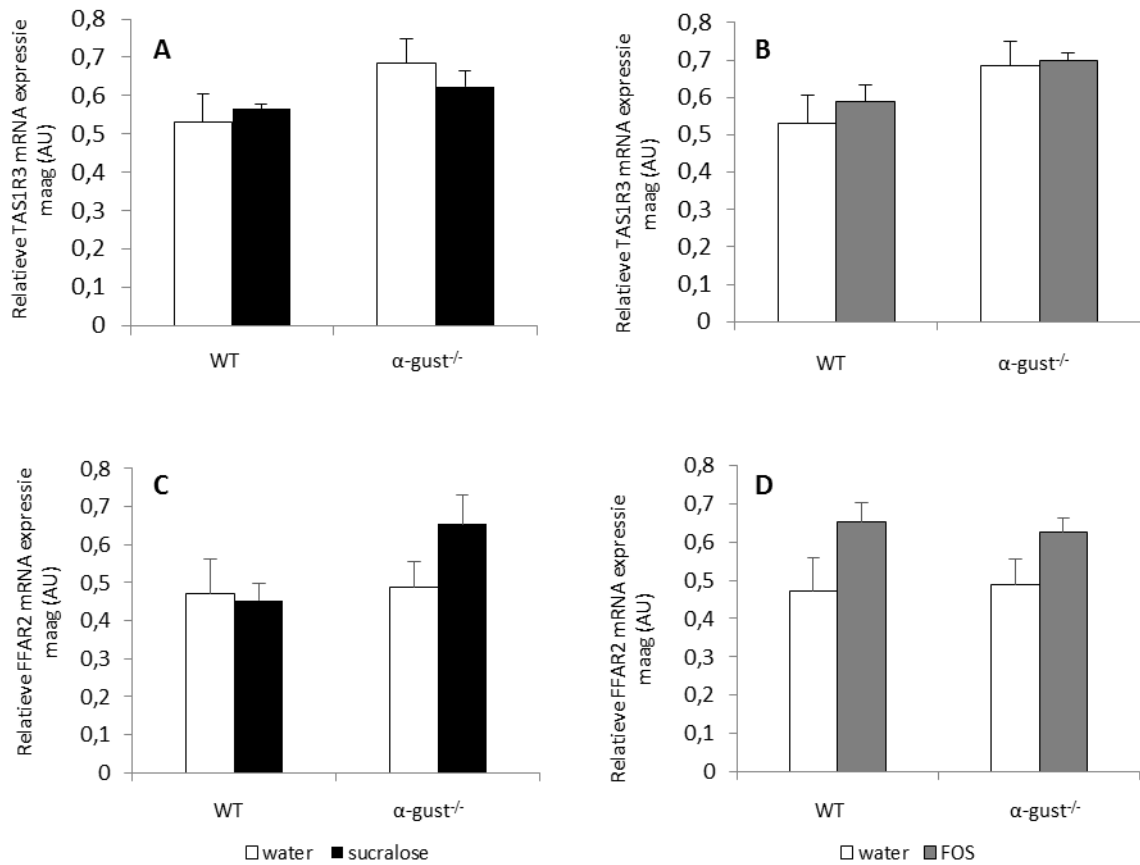
Om de rol van nutriëntsensoren in de effecten van een de twee zoetstoffen na te gaan werd met behulp van RT-PCR de relatieve mRNA expressie bepaald van de zoetsmaakreceptoren (TAS1R3 en TAS1R2), de glucosetransporters (GLUT2 en SGLT1) en de vetzuurreceptoren (FFAR2 en FFAR3) in de maag, het duodenum en in het colon.

TAS1R3, TAS1R2, GLUT2 en SGLT1 kunnen een rol spelen in de glucosegestimuleerde secretie van ghreline, GLP-1 en PYY. De zoetsmaakreceptorgemedieerde secretie van hormonen is mogelijks gemedieerd via α -gustducine terwijl SGLT1 en GLUT2, onafhankelijk van α -gustducine werken. Per weefsel, werd het effect van supplementatie van de twee zoetstoffen op de mRNA expressie van deze receptoren/transporters nagegaan.

De vrije vetzuurreceptoren FFAR2 en FFAR3 op de endocriene cellen kunnen een belangrijke rol spelen in de secretie van GLP-1 en PYY in het colon. Zoals reeds in de literatuurstudie werd aangehaald worden er in het colon korteketenvezuren geproduceerd na supplementatie van FOS waardoor deze via FFAR3 en FFAR2 een invloed kunnen hebben op de secretie van GLP-1 en PYY.

4.3.1 Maag

Sucralose en FOS hadden geen effect op de relatieve mRNA expressies van TAS1R3 en FFAR2 in beide genotypen (figuur 18: A, B, C, D). TAS1R2 en FFAR3 mRNA expressie gehalte werden niet kwantificeerbaar gedetecteerd in de maag.

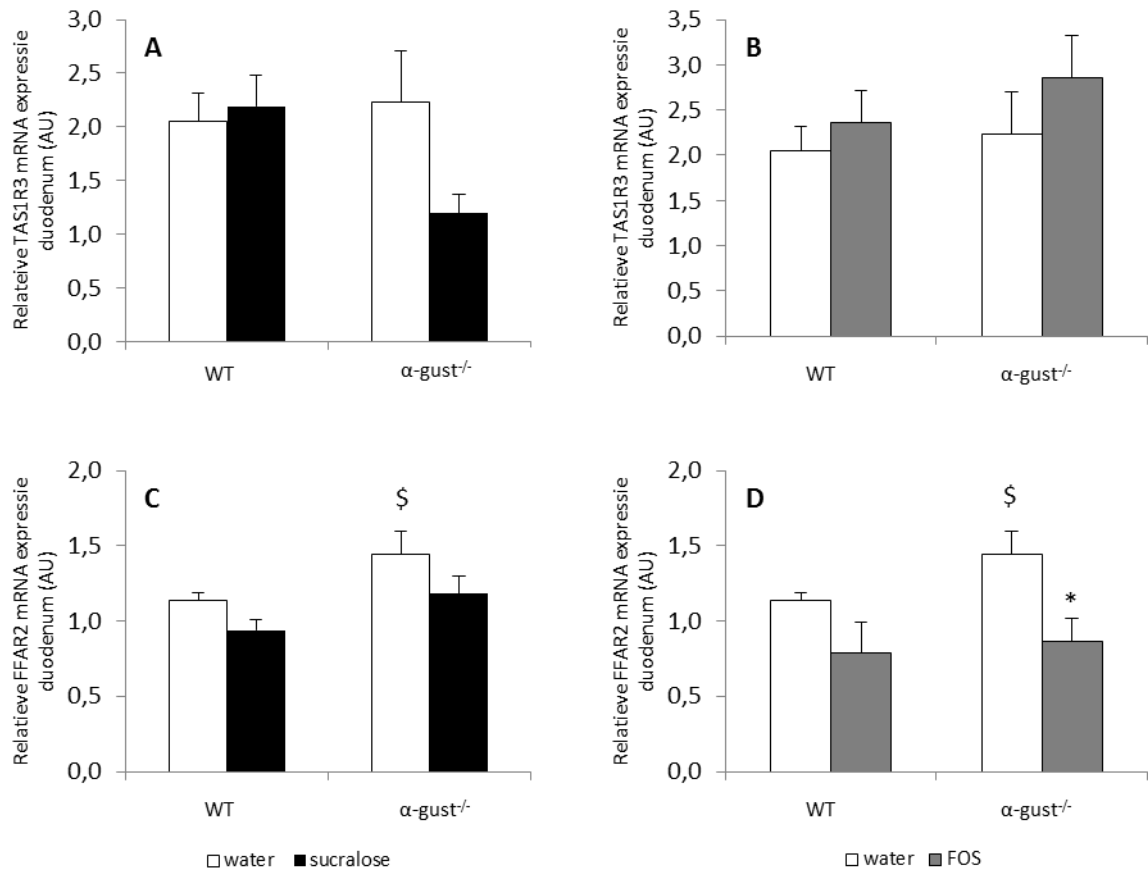


Figuur 18: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressies van FFAR2 en TAS1R3 (AU) in de maag. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.3.2 Duodenum

Water behandelde α -gust^{-/-} muizen vertonen een verhoogde ($p < 0.05$) basale relatieve duodenale FFAR2 mRNA expressie, vergeleken met water behandelde WT muizen (figuur 19: C, D).

Sucralose en FOS hadden geen significant effect op de relatieve TAS1R3 mRNA expressie in beide genotypen (figuur 19: A, B). FOS veroorzaakte een significante daling ($p < 0.05$) van de relatieve duodenale FFAR2 mRNA expressie in de α -gust^{-/-} muizen (figuur 19: D). TAS1R2 en FFAR3 mRNA expressie gehalten werden niet kwantificeerbaar gedetecteerd in het duodenum.

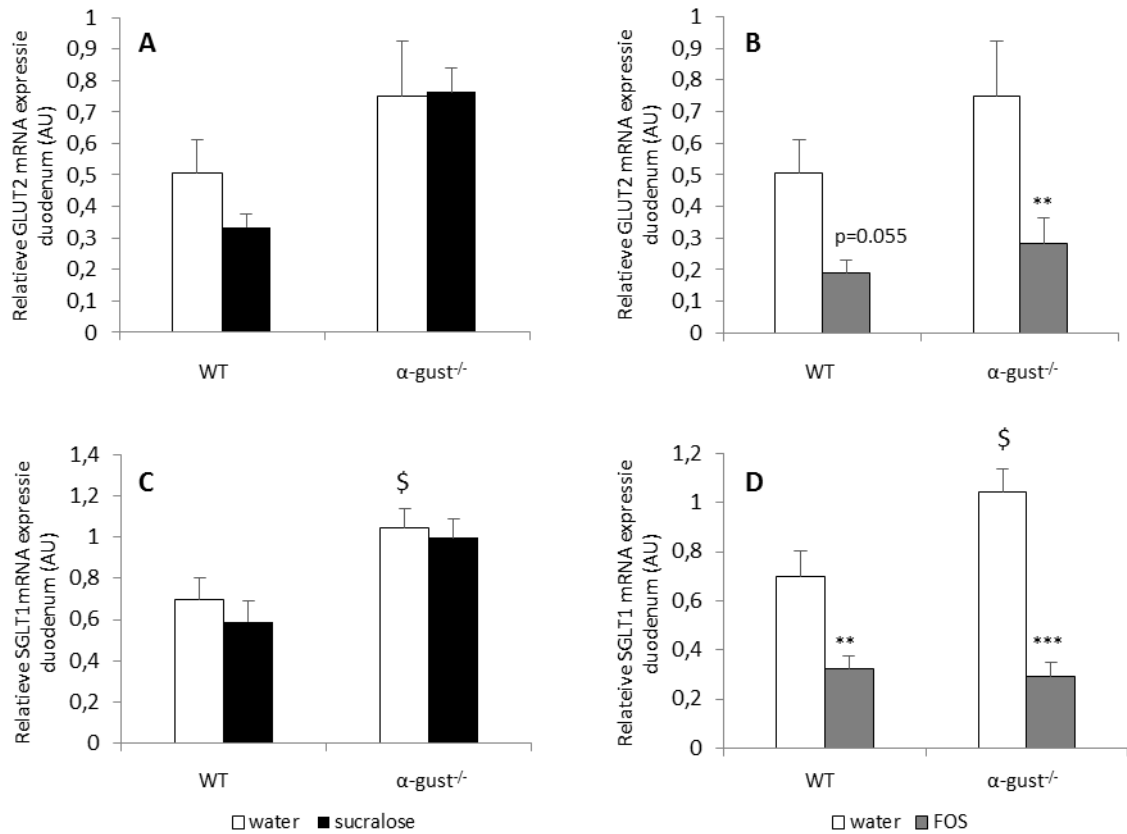


Figuur 19: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op de relatieve mRNA expressie (AU) van FFAR2 en TAS1R3 (AU) in het duodenum. * $p < 0.05$, \$ $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

Glucosetransporters

De relatieve mRNA expressies van de glucosetransporters werd bepaald om hun functie en het effect van de zoetstoffen hierop te analyseren. Water behandelde α -gust^{-/-} muizen vertonen een verhoogde basale relatieve SGLT1 mRNA expressie, in vergelijking met water behandelde WT muizen ($p < 0.05$; figuur 20: C, D).

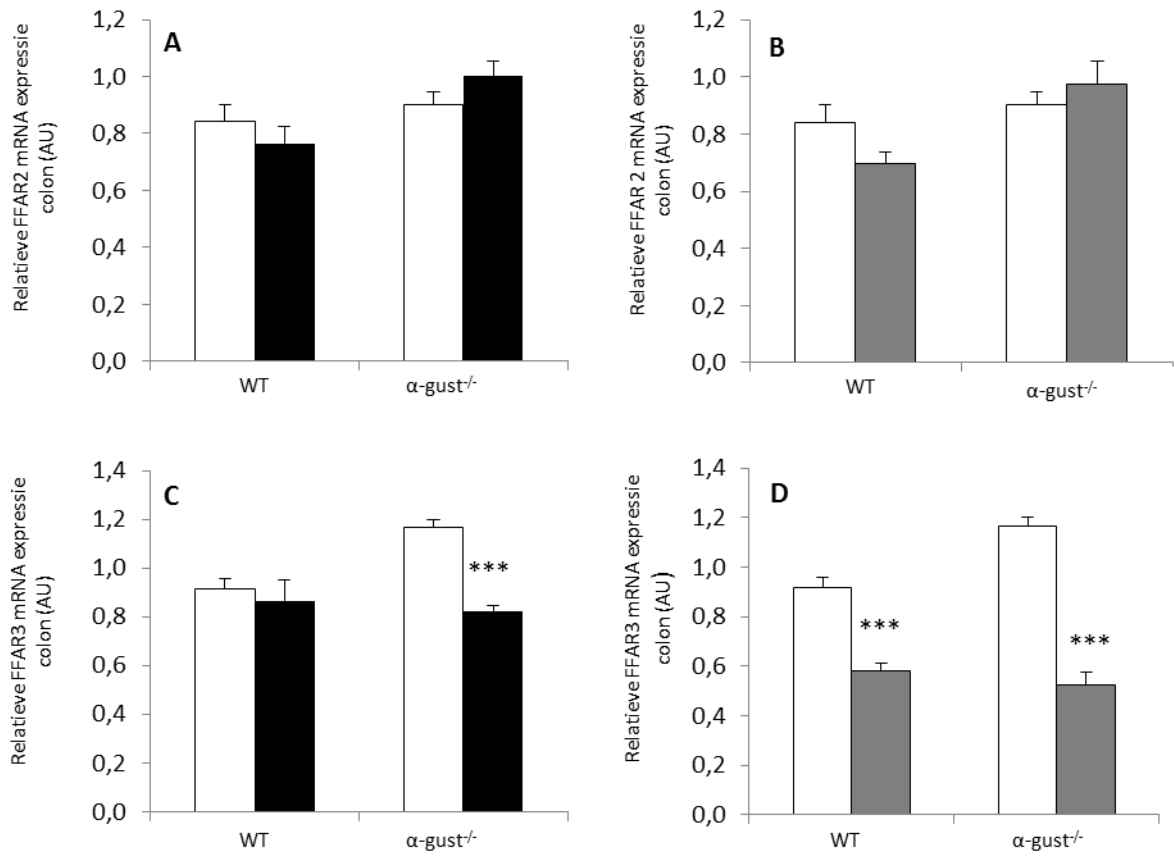
Sucralose had geen effect op de relatieve GLUT2 mRNA expressie (figuur 20: A). FOS veroorzaakte een significante daling ($p < 0.01$) van de relatieve GLUT2 mRNA expressie in de α -gust^{-/-} muizen. In de WT muizen zorgde FOS voor een neigende daling ($p = 0.05$) van de relatieve GLUT2 mRNA expressie (figuur 20: B). FOS veroorzaakte ook een significante daling van de relatieve SGLT1 mRNA expressie in beide genotypen (WT; $p < 0.01$ en α -gust^{-/-}; $p < 0.001$) (figuur 20: D).



Figuur 20: Effect van dagelijkse gavage met A, C) sucralose (0.52 mg) of B, D) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressie van GLUT2 en SGLT1 (AU) in het duodenum. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, \$ $p < 0.05$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

4.3.3 Colon

Sucralose en FOS hebben geen invloed op de relatieve mRNA expressie van FFAR2 in het colon van beide genotypen (figuur 21: A, B). Sucralose had wel een effect op de relatieve FFAR3 mRNA expressie. Zo daalde ($p < 0.001$) de relatieve mRNA expressie enkel bij de α -gust^{-/-} muizen (figuur 21: C). FOS induceerde een significante daling ($p < 0.001$) in de relatieve FFAR3 mRNA expressie in beide genotypen (figuur 21: D).



Figuur 21: Effect van dagelijkse gavage met A, C, E) sucralose (0.52 mg) of B, D, F) FOS (300 mg) in vergelijking met controle muizen op relatieve mRNA expressies van FFAR2 en FFAR3 (AU) in het colon. *** $p < 0.001$. De relatieve mRNA expressie werd berekend ten opzichte van de huishoudgenen Rpl13a, Hprt1 en β -actine. De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde \pm SEM.

5 Discussie en conclusie

5.1 Inleiding

Deze studie onderzocht of artificiële of natuurlijke zoetstoffen in de preventie tegen obesitas gebruikt kunnen worden. In het GI stelsel zijn er entero-endocriene cellen met smaakreceptoren (α -gustducine als smaak G-proteïne). Deze cellen zetten hormonen vrij. Zoetstoffen activeren de zoetreceptoren op entero-endocriene cellen en kunnen zo de vrijzetting van honger- en verzadigingshormonen moduleren.

Naast activatie van de zoetreceptoren, kan FOS als natuurlijke prebiotische zoetstof worden gefermenteerd tot korteketenvezuren door micro-organismen in de dikke darm. Sucralose verlaat het lichaam ongewijzigd, en activeert dus enkel de zoetreceptoren.

Door gebruik te maken van WT en α -gust^{-/-} muizen wordt er nagegaan of de activatie van de smaakreceptoren een rol speelt in het effect van de zoetstoffen op lichaamsgewicht en vrijstelling van darmhormonen.

5.2 Algemene conclusie

FOS induceert een verminderde gewichtstoename, onafhankelijk van smaakreceptoren gekoppeld aan α -gustducine.

Sucralose aan een equizoete concentratie heeft geen effect op de gewichtstoename wat erop wijst dat de bekomen effecten van FOS gemedieerd worden door de fermentatieproducten van FOS (korteketenvezuren) en niet door activatie van de zoetreceptoren.

In tegenstelling met onze hypothese, doet FOS supplementatie de plasmaghrelineniveaus stijgen, en de plasma-GLP-1-gehalten dalen. Het is dus onwaarschijnlijk dat deze hormonen een belangrijke rol spelen in de verminderde gewichtstoename na FOS supplementatie. Sucralose had geen effect op de darmhormonen.

FOS-supplementatie wijzigt de mRNA expressie niveaus van zowel de duodenale glucosetransporters als een korteketenvetzuurreceptor (FFAR3) in het colon. De zoetreceptoren hebben waarschijnlijk geen rol in de gewijzigde GLP-1 secretie.

De daling van plasma GLP-1 na FOS supplementatie kan te wijte zijn aan de gewijzigde productie van korteketenvezuren, aangezien er na FOS-supplementatie een daling in lichaamsgewicht werd geobserveerd, maar niet na supplementatie met sucralose.

Tabel 2: Overzichtstabel met de resultaten. ↓/↑: p<0,05; ↓↓/↑↑: p<0,01 ; ↓↓↓/↑↑↑ : p<0,001

Parameter	FOS		Sucralose	
	WT	α-gust ^{-/-}	WT	α-gust ^{-/-}
Lichaamsgewicht en voedselinname				
Lichaamsgewicht	↓↓↓	↓↓↓	-	↓
Cumulatieve voedselinname	-	-	-	-
Hormonen				
Ghreline				
Plasma octanonyl ghreline	-	↑	-	-
Plasma totaal ghreline	(↑)	-	-	-
Maag ghreline mRNA expressie	-	-	-	-
Maag GOAT mRNA expressie	-	-	-	-
Duodenum ghreline mRNA expressie	-	-	-	-
Duodenum GOAT mRNA expressie	-	-	-	-
GLP-1				
Plasma GLP-1	↓↓↓	(↓)	-	(↑)
Duodenum proglucagon mRNA expressie	(↓)	↓	-	-
Colon proglucagon mRNA expressie	-	-	-	-
Duodenum aantal GLP-1 positieve L-cellen	-	-	-	-
Colon aantal GLP-1 positieve L-cellen	-	-	-	-
PYY				
Plasma PYY	-	-	(↑)	-
Colon PYY mRNA expressie	-	-	-	-
Colon aantal PYY positieve L-cellen	-	-	-	-
Nutriëntsensing				
Maag				
TAS1R3 mRNA expressie	-	-	-	-
FFAR2 mRNA expressie	-	-	-	-
Duodenum				
TAS1R3 mRNA expressie	-	-	-	-
FFAR2 mRNA expressie	-	↓	-	-
SGLT1mRNA expressie	↓↓	↓↓↓	-	-
GLUT2 mRNA expressie	(↓)	↓↓	-	-
Colon				
FFAR2 mRNA expressie	-	-	-	-
FFAR3 mRNA expressie	↓↓↓	↓↓↓	-	↓↓↓

5.3 Effect op lichaamsgewicht en voedselinname

FOS, maar niet sucralose, verminderde gewichtstoename onafhankelijk van α -gustducine en zonder enig effect op de voedselinname. Dit bevestigt de resultaten van de studie van Dewulf *et al.* [89].

Op basis van onze resultaten kunnen we concluderen dat artificiële zoetstoffen zoals sucralose niet gebruikt kunnen worden in de preventie van obesitas. Daarnaast speelt α -gustducine geen rol in de effecten van FOS, mogelijks worden deze gemedieerd door activatie van FFAR's die niet gebonden zijn aan dit smaak G-proteïne.

Om het verschil in lichaamsgewichttoename te verklaren, hebben we gekeken naar de honger- en verzadigingshormonen op plasma, proteïne en transcriptieniveau.

5.4 Effect op gastro-intestinale hormonen: ghreline, GLP-1 en PYY

In deze studie werd een daling van GLP-1, geen effect op PYY en een stijging van ghreline geobserveerd na FOS supplementatie. Dit is in tegenstelling met de opgestelde hypothese en met de studie van Cani *et al.*, waar een stijging van GLP-1 werd bekomen [90]. In tegenstelling met deze studie werden de zoetstoffen toegediend via gavage en niet via het dieet. Op die manier werd de hoeveelheid en het tijdstip van toediening gecontroleerd en werd een ander farmacologisch profiel verkregen.

L-cellen van zowel de dunne darm als het colon bevatten GLP-1, wat aangeeft dat dit hormoon uit beide weefsel vrijgezet kan worden [91, 92]. Het aantal L-cellen in het duodenum en colon bleef constant na FOS supplementatie maar de proglucagon expressie in het duodenum maar niet in het colon, daalde. Dit wijst erop dat de daling in plasma GLP-1 waarden te wijten is aan een verminderde productie van GLP-1 in het duodenum. De L-cel in het duodenum bevat α -gustducine, TAS1R3 en TAS1R2 [92]. De L-cel in het colon bevat α -gustducine, FFAR2 en FFAR3 [93, 94]. Om te bepalen of de zoete smaakreceptoren in het duodenum of de korteketenvetzuurreceptoren in het colon een belangrijke rol spelen werd getracht de bron van de gewijzigde GLP-1 secretie te achterhalen.

Noch sucralose, noch FOS hadden een effect op de zoetreceptor mRNA expressie. Ook het feit dat er geen verschil was tussen WT en α -gust^{-/-} muizen bevestigt dat zoetreceptoractivatie geen belangrijke rol speelt in de gewijzigde GLP-1 secretie. De relatieve mRNA expressie niveaus van de glucosetransporters, GLUT2 en SGLT1, bleken echter gedaald na FOS supplementatie. Er is een sterke correlatie tussen smaakreceptoractivatie in L-cellen en het veranderen van de expressie van glucosetransporters in enterocyten [84]. Dit verklaart echter niet waarom de mRNA expressie niveaus van de glucosetransporters enkel gewijzigd is na FOS supplementatie, maar niet na sucralose supplementatie.

Aangezien de daling in gewichtstoename en verandering in darmhormonen enkel waargenomen werd na FOS supplementatie, en niet na sucralose supplementatie werden de effecten op korteketenvetzuren in meer detail onderzocht.

Korteketenvetzuren kunnen de korteketenvetzuurreceptoren activeren de L-cel in het colon om zo de vrijzetting van GLP-1 en PYY te beïnvloeden [93,94]. FOS veroorzaakt een daling van de relatieve FFAR3 mRNA expressie in het colon. Deze daling kan mee verantwoordelijk zijn

voor de daling in plasma GLP-1 niveaus. Verbazingwekkend is sucralose supplementatie ook in staat om FFAR3 mRNA expressie niveaus in α -gust^{-/-} muizen te doen dalen [43].

Buiten het direct activeren van de receptoren in het colon kunnen de korteketenvezuren na opname door MCT1 in het bloed, korteketenvezurreceptoren op andere weefsels, bijvoorbeeld in de maag of het duodenum activeren. Dit dient als verklaring voor de daling van de relatieve FFAR2 mRNA expressie daling in het duodenum na FOS supplementatie. Een gedaalde duodenale korteketenvezurengeïnduceerde GLP-1 secretie is dus niet uit te sluiten. In de maag werd er geen effect op FFAR2 ondervonden, wat erop wijst dat de ghrelinwaarden onafhankelijk zijn van gewijzigde FFAR stimulatie.

De gestegen plasma ghrelinwaarden, in de α -gust^{-/-} muizen kunnen niet verklaard worden, deze zijn niet gecorreleerd met veranderingen in ghreline of smaakreceptor mRNA expressie in de maag.

Zo komen we tot de conclusie dat de stijging van ghreline en de daling van GLP-1 niet de verklaring is voor de verminderde gewichtstoename na FOS supplementatie, en dat de korteketenvezuren en glucosetransporters, maar niet de zoetreceptoren een rol spelen in de verandering in darmhormonen.

5.5 Toekomstplannen

Western blots zullen uitgevoerd worden om de dalingen op transcriptieniveau van de glucosetransporters te bevestigen. Verder zullen western blots gebruikt worden om de gewijzigde FFAR2/3 expressieniveaus in het colon en duodenum na te gaan.

Een uitgebreider onderzoek dient uitgevoerd te worden over het effect van de korteketenvezuren op het lichaamsgewicht. Zo kan het rechtstreekse effect van de korteketenvezuren op vetzuurdifferentiatie en lipolysis nagegaan worden.

Literatuurlijst

- [1] P. G. Kopelman, „Obesity as a medical problem,” *nature*, vol. 35, pp. 635-43, 2000.
- [2] A. P. Shukla, „Treatment of obesity in 2015,” vol. 35, pp. 81-92, april 2015.
- [3] Pi-Sunyer, „the medical risks of obesity,” *Postgrad Med.*, vol. 121, pp. 21-33, 2009.
- [4] Sharma, „Meta-analysis of the relation of body mass index to all-cause and cardiovascular mortality and hospitalization in patient with chronic heart failure,” *Am J Cardiol*, vol. 115, pp. 1429-34, 2015.
- [5] „world health organisation,” januari 2015. [Online]. Available: www.who.int. [Geopend oktober 2015].
- [6] J. C. D. Ruyter, „a trial of sugar-free of sugar-sweetened beverages and body weight in children,” vol. 367, pp. 1397-406, okt 2012.
- [7] S. Fowler, „fueling the obesity epidemic? Artificial sweetened beverage use and long-term weight gain,” *Obesity*, vol. 16, pp. 1894-1900, 2008.
- [8] G. Bray, „medications for weight reduction,” vol. 37, pp. 923-942, dec 2008.
- [9] Butsch WS., „Obesity medications: what does the future look like?,” *Curr. Opin. Endoc. Diabetes Obes.*, vol.22, pp. 360-6, 2015.
- [10] M. B. Roberfroid, „Dietary modulation of the human colonie microbionota: introducing the concept of prebiotics,” *J. Nutr.*, vol. 125, pp. 1401-12, 1995.
- [11] K. I., „Density distribution of free fatty acid receptor 2 (FFA2) expressing and GLP-1 producing enteroendocrine L cells in human and rat lower intestine, and increased cell numbers after ingestion of fructo-oligosaccharide,” *J. Mol Histol*, vol. 42, pp. 27-38, 2011.
- [12] N. D. a. P. Cani, „Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data,” *J Nutr*, vol. 137, pp. 2547-51, 2007.
- [13] L. O. a. N. Forouhi, „Prospective associations and population impact of sweet beverages intaken and type 2 diabetes, and effect of substitution with alternative and beverages,” *diabetologie*, vol. 58, pp. 1474-1483, juli 2015.
- [14] A. Roberts, „Sucralose Metabolism and Pharmacokinetics in Man,” *Food and chemical toxicology*, vol. 38, pp. 31-41, 2000.
- [15] Rothe, S. S. Schiffman¹ en K. I., „Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues,” *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, vol. 16, pp. 399-451, 2013.
- [16] „Gain weight by going diet,” *Yale J Biol Med.*, vol. 83, pp. 101-108, juni 2010.
- [17] Mann, „Food Chem Toxicol,” *A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in rats*, 2000.

- [18] A.-D. MB, „Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats,” *J Toxicol Environ Health*, vol. 71, pp. 1415-1429, 2008.
- [19] Mitsutomi, „metabolism,” *Effects of a non-nutrive sweetner on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity*, 2014.
- [20] S. Fowler, „fueling the obesity epidemic? Artificial sweetened beverage use and long-term weight gain.,” *Obesity*, vol. 16, pp. 1894-1900, 2008.
- [21] C. GA, „Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy woman.,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 51, pp. 1100-1105, 1990.
- [22] Vanselow, „Am J Clin Nutr.,” *Adolescent beverage habits and changes in weight over time: findings front project EAT*, 2009.
- [23] Tate, „Replacing caloric beverages with water or diet beverages for weight loss in adults: Main results of the CHOICE randomized clinical trials,” *Am J Clin nutr.* , 2012.
- [24] Miquel-Kergoat S. et al., “Effects of chewing on appetite, food intake and gut hormones: a systematic review and meta-analysis.,” *Physiol. Behav.*, vol.151, pp. 88-96, 2015.
- [25] F. Y., „Incretin release from gut is acutely enchanced by sugar but not by sweeteners in vivo.,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 296, pp. 473-479, 2009.
- [26] T. S., „Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes.,” *Eur J Clin Nutr.*, vol. 69, pp. 162-166, Feb 2015.
- [27] M. J en C. J, „Effects of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects.,” *Br j Nutr*, vol. 104, pp. 803-806, 2010.
- [28] J. d. Ruyter, „The effect of sugar-free versus sugar-sweetened beverages on satiety, liking and wanting: An 18 month randomized double-blind trial in children,” *PONE*, vol. 8, p. 78039, okt 2013.
- [29] F. Broglio, „Ghrelin, a natur GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 86, pp. 5083-5086, Oct 2001.
- [30] Suez J., “Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota.,” *Nature*, vol.514, pp. 181-6, 2014.
- [31] A. Liber en H. Szajewska, „Effects of inulin-type fructans on appetite, energy intake and body weight in children and adults,” *Annals of nutrition and metabolism*, vol. 63, pp. 42-54, 2013.
- [32] „Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status.,” *J. Nutr.*, vol. 129, pp. 1412-1417, Jul 1999.

- [33] R. E. Steinert, „Effect of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides,” *British journal of nutrition*, vol. 105, pp. 1320-1328, Jan 2011.
- [34] B. M, „Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and animal models,” *British journal of nutrition*, vol. 3, pp. 163-168, 2005.
- [35] C. PD1, „Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1,” *Obes Res.*, vol. 13, pp. 1000-1007, Jun 2005.
- [36] C. NL, „Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats,” *Obesity (Silver Spring)*, vol. 23, pp. 769-778, Apr 2015.
- [37] Szajewska, A. Liber en Hania, „Effect of oligofructose supplementation on body weight in overweight and obese children: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial,” *British Journal of Nutrition*, vol. 112, pp. 2068-2074, 2014.
- [38] N. M. Daud, „The impact of oligofructose on stimulation of gut hormones, appetite regulation and adiposity,” *Obesity*, vol. 22, pp. 1430-1438, 2014.
- [39] Reimer, J. A. Parnell en R. A, „Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 89, p. 1751, Jun 2009.
- [40] P. D. Cani, „Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: Involvement of glucagon-like peptide-1,” *Obesity Research*, vol. 13, pp. 1000-1007, Jun 2005.
- [41] V. SP, „Effects of oligofructation on appetite profile,” *British Journal of Nutrition*, 2011.
- [42] Miquel-Kergoat S. et al., “Effects of chewing on appetite, food intake and gut hormones: a systematic review and meta-analysis,” *Physiol. Behav.*, vol.151, pp. 88-96, 2015.
- [43] Suez J., “Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota.,” *Nature*, vol.514, pp. 181-6, 2014.
- [44] Bröer S., “Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia.,” *Phys Rev.*, vol.88, pp. 249-286, 2006.
- [45] Sepponen K., Ruusunen M., “Expression of CD147 and monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine small intestine and colon.,” *Vet J.*, vol.147, pp.122-8, 2006.
- [46] C. PD, „Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide productionwith consequences for appetite sensation and glucose response after a meal.,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 90, pp. 1236-1243, 2009.
- [47] B. HR, K. M en N. WL, „Vagal afferent innervation of rat abdominal paraganglia as revealed by anterograde Dil-tracing and confocal microscopy.,” *Acta Anat*, vol. 152, pp. 127-132, 1995.

- [48] W. Bayliss, „The mechanism of pancreatic secretion,” *The journal of physiology*, vol. 28, 1902.
- [49] D. GJ, „Luminal sensing in the gut: an overview.,” *J Pgysiol Pharmacol*, vol. 54, pp. 9-17, 2003.
- [50] D. I en S. J. , „Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics?,” *Trends Endocrinol Metab*, vol. 24, pp. 92-100, Feb 2013.
- [51] R. F. Margolskee, „The biochemistry and molecular biology of taste transduction,” *Current opinion in Neurobiology*, vol. 3, pp. 526-531, aug 1993.
- [52] M. A. Hoon, „Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity.,” *Cell*, vol. 96, pp. 541-551, 1999.
- [53]F. Laugerette, „CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous dat preference, and digestive secretions,” *Journal of Clinical investigation*, vol. 115, pp. 3177-3184, 2005.
- [54] C. Cartoni, „Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120,” *J Neurosci*, vol. 30, pp. 8376-8382, Jun 2010.
- [55] G. T. Wong, K. S. Gannon en R. F. Margolskee, „Transduction of bitter and sweet taste by gustducin,” *Nature*, vol. 381, pp. 796-800, Jun 1996.
- [56] N. Chaudhari, „The cell biology of taste,” *The journal of cell biology*, vol. 190, pp. 285-296, Aug 2010.
- [57] N. Hass, K. Schwarzenbacher en 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. 457-471, 2007.
- [58] N. Hass, K. Schwarzenbacher en 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. 457-471, 2007.
- [59] B. h., „Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cell in the alimentary tract,” *Histochem Cell Biol*, vol. 138, pp. 13-24, 2012.
- [60] Bröer S., “Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia.,” *Phys Rev.*, vol.88, pp. 249-286, 2006.
- [61] Sepponen K., Ruusunen M., “Expression of CD147 and monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine small intestine and colon.,” *Vet J.*, vol.147, pp.122-8, 2006.
- [62] I. Depoortere, „Taste receptors in the gut tune the release of peptides in response to nutrients,” *Peptides*, vol. 66, pp. 9-12, Apr 2015.
- [63] I. Depoortere, „Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease,” *Gut*, vol. 63, pp. 179-190, Jan 2014.

- [64] M.-A. I, „Nerveless and gutsy: intestinal nutrient sensing from invertebrates to humans.,” *Semin Cell Dev Biol*, 2012.
- [65] C. L. Yee, „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.
- [66] M. Kojima, „Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach,” *Nature*, vol. 402, pp. 656-660, Dec 1999.
- [67] J. Yang, „Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone.,” *Cell*, vol. 132, pp. 387-396, Feb 2008.
- [68] K. E. Foster-Schubert, „Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, pp. 1971-1979, May 2008.
- [69] N. Get, „Mammalian sweet taste receptors.,” *Cell*, vol. 106, pp. 381-390, 2001.
- [70] D. J, „Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells.,” *Biochem Soc Trans*, vol. 33, pp. 302-205, 2005.
- [71] Hass N., „T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cell of murine stomach.,” *Cell Tissue Res.*, vol.339, pp. 493-504, 2010.
- [72] K. K, „Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes.,” *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 318, pp. 619-628, 2006.
- [73] W. P, „The rat GPRC6A: cloning and characterization.,” *Gene*, vol. 396, pp. 257-267, 2007.
- [74] C. AD en H. DR, „Broad-spectrum ...-amino acid sensing by class 3 G-protein-coupled receptors.,” *Trends Endocrinol Metab*, vol. 17, pp. 398-407, 2006.
- [75] Vancleef L. et al., „Chemosensory signalling pathways involved in sensing of amino acids by the ghrelin cell.,” *Sci. Rep.*, vol.29, pp. 15725, 2015.
- [76] L. TJ en F.-B. C, „Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity-oral and gastrointestinal sensory contributions.,” *Physiol Behav*, vol. 104, pp. 613-620, 2011.
- [77] M. S, „New frontiers in gut nutrient sensor research: free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract.,” *J Pharmacol Sci*, vol. 112, pp. 19-24, 2010.
- [78] H. Jang, „Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, pp. 15069-15074, 2007.
- [79] F. Y., „Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo.,” *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab*, vol. 296, pp. 473-479, 2009.
- [80] R. Steinert, „Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides.,” *Br. J. Nutr.*, vol. 105, pp. 1320-1328, 2011.

- [81] S.-B. SP, „Molecular events involved in glucose-induced intestinal ...-glucose co-transporter (SGLT1) expression.,” *Biochem. Soc Trans*, vol. 25, pp. 958-962, 1997.
- [82] V. Gorboulev, „Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion,” *Diabetes*, vol. 61, pp. 187-196, Jan 2012.
- [83] F. R. Gribble en F. M., „Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells,” *Diabetes*, vol. 51, pp. 2757-2763, Sep 2002.
- [84] R. F. Margolskee, „T1R3 and gustducin gut sense sugars to regulate expression of Na+ - glucose cotransporter,” *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, vol. 104, pp. 15075-15080, 2007.
- [85] M. OJ, „Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2.,” *J Physiol*, vol. 582, pp. 379-392, 2007.
- [86] A. Brown, „The orphan G protein-coupled receptors FFAR3 and FFAR2 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids.,” *J. Biol. Chem*, vol. 278, pp. 11312-11319, 2003.
- [87] G. Tolhurst, „Short-chain fatty acids stimulate glucagonlike peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2,” *Diabetes*, vol. 61, pp. 364-371, 2012.
- [88] B. Samuel, „Effects of the gut microbiota on host adiposity ara modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, FFAR3.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, pp. 16767-16772, 2008.
- [89] Butsch WS., “Obesity medications: what does the future look like?,” *Curr. Opin. Endoc. Diabetes Obes.*, vol.22, pp. 360-6, 2015.
- [90] P. D. Cani, „Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: Involvement of glucagon-like peptide-1,” *Obesity Research*, vol. 13, pp. 1000-1007, Jun 2005.
- [91] Gorboulev V., “Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion.,”*Diabetes*, vol. 61, pp. 187-96, 2012.
- [92] Jang HJ., Margolskee RF., “Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of GLP-1.,” *PNAS.*, vol. 104, pp. 15069-74, 2007.
- [93] Li Y., “Gustducin couples fatty acid receptors to GLP-1 release in colon.,” *Am. J. Phys. Endo. Metab.*, vol.304, pp. 651-60, 2013.
- [94] Tolhurst G., “Short-chain fatty acids stimulate GLP-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2.,” *Diabetes*, vol. 61, pp. 364-71, 2012.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Een vergelijkende studie naar het effect van artificiële en natuurlijke prebiotische zoetstoffen in de preventie van obesitas: rol van gastro-intestinale hormonen en nutriëntsensoren

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

Jaar: **2016**

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,

Willems, Marieke

Datum: **19/01/2016**