

Glucoseregulatie na transplantatie van eilandjes van Langerhans in de hond

M.P.M. van der BURG¹, M. FRÖLICH² en H.G. GOOSZEN³

Wij onderzochten de glucoseregulatie 6 maanden na intralienale autotransplantatie van eilandjes bij 8 honden, in vergelijking met 30 controles. De dosis getransplanteerde eilandjes bedroeg ca. 25% van de native eilandmassa, en de maximale insuline-secretie-capaciteit (ISC) tijdens intraveneuze belasting met arginine en 35 mM glucose was eveneens gereduceerd tot ca. 25% van de normale waarde. Daarentegen bleek postprandiaal na transplantatie de insulinerespons 140% toegenomen vs. de controles, alsook hyperglucagonemie, pancreas polypeptide deficiëntie en een milde (gemiddeld 8,5 mM) hyperglycemie, welke correleerde met de ISC. De insulinerespons daalde gemiddeld 45% en correleerde eveneens met de ISC. Postoperatieve infusie van het darmhormoon glucagon-like peptide-1 7-36 amide (GLP-1) verdubbelde de insulinespiegels tijdens een 8,5 mM glucose-clamp, wat de opmerkelijk verschillende insulinerespons op intraveneuze- en orale belasting kan verklaren. De glucosetolerantie lijkt voornamelijk door de eilandmassa te worden bepaald; een grotere dosis eilandjes zou daarom een vrijwel normale glucoseregulatie mogelijk moeten maken.

Trefwoorden: eilandjes van Langerhans; transplantatie; hond; glucoseregulatie; GLP-1

Het doel van transplantatie van de eilandjes van Langerhans is het voorkomen, dan wel verminderen, van de late invaliderende complicaties van insuline-afhankelijke diabetes mellitus (IDDM), ook type-1 diabetes genoemd, en zo een betere kwaliteit van leven voor de patiënt te bewerkstelligen. Ongeveer 0,2-0,4% van de bevolking in de Westerse wereld wordt getroffen door IDDM. De chronisch te hoge bloedglucosespiegels in deze patiënten, als gevolg van een autoimmuun-gemedieerde vernietiging van de insuline-producerende β -cellen van de eilandjes van Langerhans, kunnen gewoonlijk niet voorkomen worden door de traditionele behandeling met dagelijkse insuline injecties, wat na 20-30 jaar kan leiden tot ernstige schade aan ogen, zenuwen en nieren, met als mogelijk gevolg blindheid en uitval van de nierfunctie, waardoor dialyse of nier-

transplantatie nodig wordt. Door deze complicaties is de verwachte levensduur 30% korter dan normaal. Hoewel recent door de Diabetes Control and Complications Trial Research Group bij diabetische proefpersonen duidelijk is aangetoond, dat met een intensieve insulinebehandeling de chronische complicaties grotendeels voorkomen kunnen worden, dienen nieuwe wegen gevonden te worden om een dergelijke strikte glucoseregulatie in iedere patiënt te verwezenlijken (1).

Transplantatie van het gehele pancreas of uitsluitend geïsoleerde eilandjes van Langerhans

Momenteel kan uitsluitend door transplantatie van het pancreas een normale glucoseregulatie bereikt worden (2). Bovendien wordt door een geslaagde transplantatie de voortschrijding van de chronische complicaties tegengegaan of teruggedrongen en vooral de kwaliteit van leven van de patiënt verbeterd, doordat injecties met insuline en metingen van het bloedglucose overbodig worden en de met insuliner therapie gepaard gaande ernstige hypoglycemische incidenten uitblijven (2). Daar pancreastransplantatie een grote chirurgische ingreep is en levenslange immunosuppressie vereist, is deze operatie vrijwel uitsluitend voorbehouden aan de kleine groep van diabetische patiënten die vanwege terminale nierinsufficiëntie niertransplantatie ondergaan. In tegenstelling tot transplantatie van het gehele pancreas, kunnen de eilandjes van Langerhans na enzymatische extractie (isolatie) uit het pancreas en zuivering van de eilandjes, zonder grote risico's getransplanteerd worden. Het normale menselijke pancreas bevat ongeveer 1 miljoen eilandjes, met een individuele diameter tot 0,5 millimeter en een totaal gewicht van ca. 1 gram, zodat bij transplantatie van geïsoleerde eilandjes volstaan kan worden met een enkele intraveneuze injectie van enkele milliliters van een weefselsuspensie. Voorts kunnen geïsoleerde eilandjes ingevroren worden en ook in vitro in kweekmedia langdurig in leven gehouden worden. Hierdoor is het mogelijk om voorafgaande aan een transplantatie, donor en ontvanger beter op elkaar af te stemmen, of eilandjes van meerdere donoren te verzamelen teneinde de eilanddosis te vergroten, en door in vitro manipulatie de immunogeniteit van het weefsel te verminderen, waardoor minder of zelfs geen immunosuppressieve medicatie vereist is (3,4). Na recente verbeteringen van de isolatietechniek in grote proefdieren, is inmiddels ook klinische transplantatie incidenteel succesvol gebleken. Er dienen echter nog

Afdelingen Heelkunde¹ en Klinische Chemie², Universiteit van Leiden en Afdeling Heelkunde, Universiteit van Utrecht³

Correspondentie: Dr. M. P. M. van der Burg, Afdeling Heelkunde K6-R, Academisch Ziekenhuis, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.

Ingekomen: 22.08.96

veel problemen opgelost te worden alvorens deze techniek op grote schaal in IDDM-patiënten, nog voordat de ernstige complicaties optreden, toegepast zou kunnen worden (3). De meeste aandacht is tot op heden vooral uitgegaan naar de verdere ontwikkeling van technieken voor de isolatie en zuivering van eilandjes en naar de immunologische problematiek. De metabole controle door getransplanteerde eilandjes is echter nog maar weinig bestudeerd (4,5). Daar eilandjestransplantatie primair tot doel heeft diabetische complicaties tegen te gaan of te voorkomen door een nauwkeurige glucoseregulatie, is het van essentieel belang om vast te stellen of en hoe eilandjes na isolatie en transplantatie een langdurig bevredigende glucoseregulatie kunnen bewerkstelligen.

Het functioneren van eilandjes van Langerhans binnen de gastro-entero-pancreatische as

Het natuurlijk functioneren van natieve eilandjes wordt bepaald door anatomische, neurale, en hormonale interrelaties op verscheidene niveaus binnen de gastro-entero-pancreatische as: (i) de architectuur van het eilandje is van belang voor de interactie van de insuline-, glucagon-, pancreas polypeptide- (PP) en somatostatine producerende eilandcellen; (ii) het intrapancreatische neurale web coördineert de pulsatiele hormoonsecretie op het niveau van de eilandjespopulatie, wat met name van belang is voor een optimale werking van het insuline (de gevoeligheid van de lever en het perifere spier- en vetweefsel voor insuline); en (iii) maagdashormonen en (lokale) zenuwverbindingen coördineren het functioneren van de eilandjes en de andere gastrointestinale organen (6-8). Theoretisch leidt isolatie en transplantatie van eilandjes tenminste tot een verbreking of verstoring van anatomische en neurale interrelaties, de hormonale tak van de gastro-entero-insulaire as zou echter mogelijk grotendeels gespaard kunnen blijven en als mogelijk enig regulatiemechanisme, zelfs aan belang kunnen winnen.

Fysiologische effecten van darmhormonen na isolatie van eilandjes

Ons eerdere functieonderzoek suggereerde dat de hormonale tak van de gastro-entero-insulaire as mogelijk grotendeels intact kan blijven na een speciale techniek van pancreastransplantatie, waarbij door opspuiten van het pancreas via de afvoergang met een uithardende kunststof het exocriene pancreas atrofieert en slechts clusters van eilandcellen ingebed in lidtekenweefsel restereren (9). Ook ons pilot-onderzoek na transplantatie van geïsoleerde eilandjes in de hond, suggereerde dat insulintropische darmhormonen ('incretins') zoals "glucose dependent insulintropic polypeptide" (GIP) en "glucagon-like peptide-1 7-36 amide" (GLP-1), welke normaal na een maaltijd tot ca. 50% bijdragen aan de stimulatie van de insuline-afgifte (6,10), na transplantatie grotendeels (voor 80 tot 90%) de postprandiale insuline-afgifte zou kunnen verzorgen (11). Dit zou veroorzaakt kunnen worden door versterking van de insulintropische werking van deze incretins onder hyperglycemische omstandighe-

den. Recent werd door ons in vitro aangetoond, dat ook vers geïsoleerde eilandjes in minikamertjes reageren met een verhoogde insuline-afgifte tijdens perifusie met fysiologische concentraties van de incretins GIP en vooral GLP-1 en dat het potentiërend effect van deze darmhormonen toeneemt bij stijging van de heersende glucosespiegel in het perifusie-medium (12). Dergelijk onderzoek na transplantatie van geïsoleerde eilandjes is nog niet gepubliceerd.

De maximale insuline-secretie-capaciteit, de insulinerwerking, en het fysiologisch functioneren van geïsoleerde eilandjes na transplantatie

In dit onderzoek bestudeerden wij de metabole controle 6 maanden na succesvolle autotransplantatie van geïsoleerde eilandjes in de milt bij 8 honden, in vergelijking met 30 normale controle-dieren. Naast bepaling van de insulinerespons tijdens de conventionele intraveneuze glucosetolerantie test (IVGTT) werd de insuline-secretie-capaciteit bepaald door maximale, intraveneuze stimulatie met een argininebolus tijdens een variabele glucose-infusie, waarbij de bloedglucosespiegel op 35 mM gehouden werd (hyperglycemische clamp). Na een maaltijd werd de glucose-, insuline-, glucagon- en PP-respons bepaald. De insulinerwerking werd gemeten tijdens intraveneuze infusie van insuline, met handhaving van de nuchtere bloedglucosewaarde door een variabel glucose-infuus en registratie van de glucose-infusiesnelheid als maat voor de insulinegevoeligheid (hyperinsulinemische, euglycemische clamp). Ter bepaling van eventuele cholinergische reïnnervatie van het transplantaat werd de PP-respons gemeten tijdens hypoglycemie na een intraveneuze bolus insuline; een vagaal (cholinergisch) gemedieerde stimulus (13). Postoperatief werd ook de entero-insulaire as onderzocht door een vrijwel fysiologische infusie van GIP en GLP-1 tijdens een 8,5 mM glucose-clamp ter nabootsing van de gemiddeld ca. 8,5 mM postprandiale glycemie, welke na transplantatie werd waargenomen.

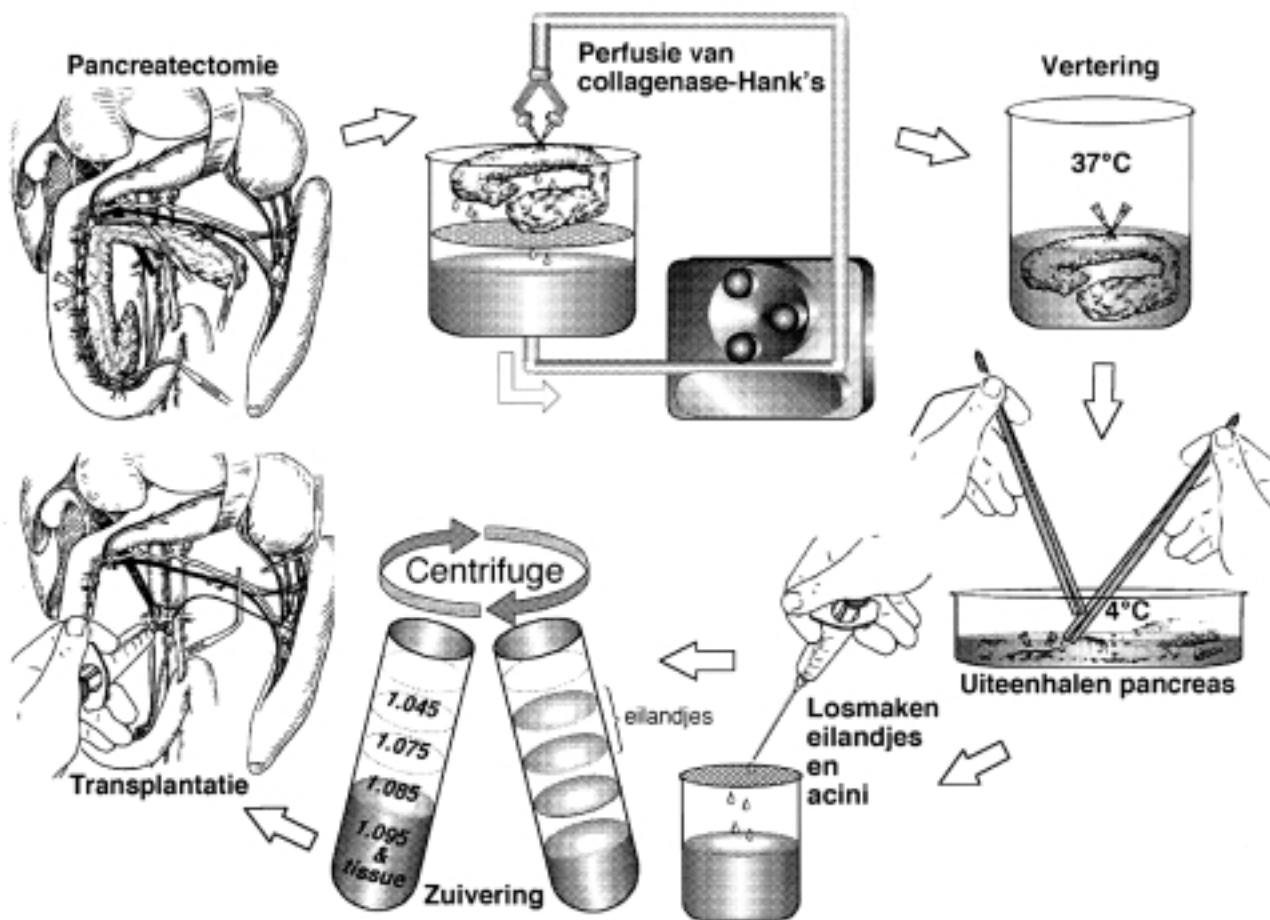
MATERIAAL en METHODEN

Dieren

De experimenten werden verricht in 38 volwassen, beagle teven (Harlan CPB, Zeist, Nederland) met een gewicht van 8-18 kg. Bij acht honden werd een totale pancreatectomie en intralieuale autotransplantatie van eilandjes verricht; de andere honden dienden als controles. De dieren werden gehouden op een dieet van tweemaal daags half-vast hondenvoer (50 energie% koolhydraten, 20 energie% vetten en 30 energie% eiwitten; Compleet Hondenvoer D-B, Hope Farms, Woerden, Nederland) en onbepikt drinkwater. Na eilandstransplantatie werd het dieet aangevuld met 2 g/dag protease-lipase-amylase tabletten (Pancreas-pellets, Organon, Oss, Nederland).

Transplantatie

Na 24 uur vasten werd een totale pancreatectomie verricht en de ductus gecannuleerd voor isolatie en



Figuur 1. Schematische weergave van pancreatectomie in de hond, gevolgd door isolatie en zuivering van de eilandjes van Langerhans en autotransplantatie van de eilandjes in de milt van het dier.

autotransplantatie van eilandjes in de milt van de geanaesthetiseerde dieren ($n = 8$), zoals schematisch aangegeven in figuur 1. Eilandjes werden geïsoleerd uit het pancreas door retrograde intraductale perfusie van een Hanks' oplossing (Flow Laboratories, Irvine, U.K.) met 1600 U/ml collagenase Sigma type V of XI (St. Louis, MO, USA), vertering gedurende 8-20 minuten bij 37°C en dispersie van het weefsel door rustige trituratie via een 14 gauge canule bij 4°C. Het weefsel werd geresuspendeerd in de bodemlaag van een discontinue dichtheidsgradient (1,095, 1,085, 1,075, en 1,045 g/ml) van ca. 70.000-Mr dextraan (Sigma) in Hanks' oplossing en na centrifugering bij 500 g gedurende 20 minuten werden de gezuiverde eilandjes verzameld van de twee bovenste lagen. Het totale volume geïsoleerde eilandjes en de zuiverheid (relatieve volume van het eilandweefsel) werden bepaald door morfometrie zoals eerder beschreven (14) in meerdere monsters met een totaal volume van 0,05% van de gezuiverde suspensie. Uitgaande van een standaard eilanddiameter van 150 μm werd het equivalente aantal eilandjes ("islet equivalent": IEq) door conversie van het totale volume geïsoleerde eilandjes berekend (15). De eilandjes werden geautotransplanteerd in de milt van het dier door retrograde infusie via twee kleine miltvenen tijdens afklemmen van de hilus van de milt en de korte maagvenen.

Functietesten

Functie-onderzoek in de normale controle groep en 6 maanden na transplantatie in de experimentele groep werd verricht na 18 uur overnacht vasten. Tijdens intraveneuze testen stonden de dieren ondersteund in Pavlov mitella's. Via teflon canules in venen van de voorpoten werd bloed afgenomen en werden bolus-injecties toegediend. Infusies werden gegeven via canules in de venen van achterpoten. Bloedmonsters werden op ijs opgevangen in buizen met ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) en voor glucagon-bepalingen, 1000 kallikreïne remmings-eenheden aprotinine (Trasyolol, Bayer, Leverkusen, Duitsland). Plasma werd binnen 15 minuten bij 4°C gescheiden en opgeslagen bij -70°C voor radioimmunologische bepaling van insuline (met hondeninsuline als standaard), glucagon en PP zoals eerder beschreven (9). Glucose werd bepaald met de glucose-oxidase methode in de Beckman Glucose Analyser 2 (Brea, CA, USA). IVGTT werd verricht door infusie binnen 30 seconden van 0,5 g/kg glucose als een 40% oplossing. Monsters voor insuline werden genomen op 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60 minuten ter bepaling van de insulinerespons boven het nuchtere niveau van 0-3 minuten (acute respons) en van 0-60 minuten. Ter bepaling van de insuline-secretie-capaciteit werd een 2 g arginine-hydrochloride bolus toegediend, 50 minuten na aanvang van infusie van een 40%-glucose-

oplossing met variabele snelheid, ter handhaving van 35 mM glycemie op geleide van "on-line" glucosemetingen iedere 5 minuten. De (secundaire) insuline-respons op 35 mM glucose werd uitgedrukt in de gemiddelde stijging bij 45 en 50 minuten boven het nuchtere niveau en de insuline-secretie-capaciteit werd uitgedrukt in de gemiddelde toename op 52, 53, 54 en 55 minuten boven de gemiddelde pre-stimulus-spiegel bij 45-50 minuten. Voor een testmaaltijd werd de dieren, in afzondering, 500 ml van de normale half vaste maaltijd aangeboden, teneinde verorboring van de maaltijd binnen 15 minuten te waarborgen. Bloedmonsters werden door punctie van de externe vena jugularis genomen op -5, 15, 30, 60, 90 en 120 minuten ter bepaling van de geïntegreerde respons boven de basale glucose-, insuline-, glucagon- en PP-spiegel gedurende twee postprandiale uren. De weefselgevoeligheid voor insuline werd gemeten met een tweestaps hyperinsulinemische (ca. 160 en ca. 750 pM insuline), euglycemische clamp. Na afname van de basale monsters voor glucose- en insulinebepaling op -15, -10, -5 en 0 minuten, werd insuline (Actrapid, Novo, Kopenhagen, Denemarken) geïnfundeerd vanaf 0 minuten met 10 mU/min en van 90-180 minuten met 50 mU/min, waarbij het plasmagluucose op de gemiddelde nuchtere waarde werd gehouden door variabele glucose-infusie (20% oplossing) op geleide van "on-line" analyse van glucose zoals boven. Iedere 10 minuten van 60 tot 90 min en van 150 tot 180 min, werden monsters voor insulinebepaling genomen, ter berekening van de insuline-sensitiviteits-index, S_i ($10^2 \cdot L \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ per pM), zoals eerder beschreven door Finegood et al. (16). De plasma PP-respons op insuline-geïnduceerde hypoglycemie werd getest door intraveneuze infusie van een insulinebolus (0,15 U/kg, Actrapid, Novo, Kopenhagen, Denemarken). Bloedmonsters werden genomen op 0, 10, 20, 30, 45 en 60 minuten ter bepaling van PP en glucose in plasma. De piek PP-respons werd uitgedrukt in de maximale toename boven het nuchtere niveau. Ter bepaling van de insulintrope effecten van GIP en GLP-1 werden bij ieder dier drie hyperglycemische experimenten op verschillende dagen verricht, een zonder infusie van hormonen en de anderen met gelijktijdige infusie van synthetisch varkens-GIP (code 7192, Peninsula, Merseyside, St. Helens, Engeland) of synthetisch humaan "glucagon-like peptide-1 7-36 amide" (code 7168, Peninsula) opgelost in een 0,9% zoutoplossing met 0,1 % runder serum albumine. Het netto peptide-gewicht, in plaats van het bruto gewicht, werd gebruikt voor berekening van de dosis. Na afname van de nuchtere monsters werd een variabele infusie van 40% glucose gestart met 20 ml/uur om het plasma-glucose te verhogen en te houden op $8,5 \pm 0,2$ mM, op geleide van on-line glucose analyse zoals boven. Van 50 tot 80 minuten werd $1,75 \text{ pmol} \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ GIP of GLP-1 geïnfundeerd in de contralaterale achterpoot, en iedere 5 minuten een bloedmonster voor plasma-insuline genomen. Eventuele insulintrope effecten van de peptiden werden onderzocht door vergelijking van de gemiddelde insulinespiegel en glucose-infusiesnelheid van 65-80 minuten.

Stereologie van het eilandvolume in het pancreas

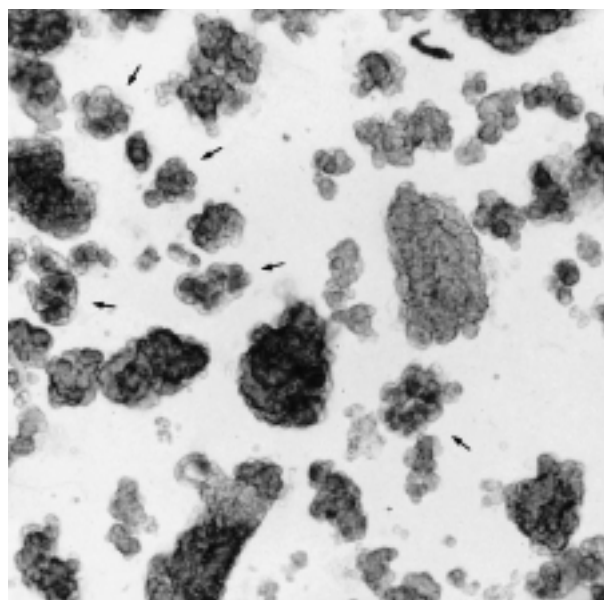
Bij 14 controle dieren werden 3 wigvormige biopsieën genomen van respectievelijk de staart, het lichaam en de kop van het pancreas voor morfometrische bepaling van het relatieve eilandvolume van het normale pancreas, zoals eerder beschreven (17). Na Bouin-fixatie en inbedden van de pancreasmonsters in paraffine, werden met intervallen van 150 μm , 10 opeenvolgende 5- μm coupes genomen, gekleurd met hematoxyline-eosine, en onderzocht met een 400-punts raster bij een vergroting van x200 ter bepaling van de verhouding van het aantal punten op endocrien - en nonendocrien weefsel. Het relatieve eilandvolume van het pancreas werd uitgedrukt in het gemiddelde van de drie regionale volumina. De gemiddelde waarde in deze controlegroep diende als een referentiewaarde ter schatting van de natieve eilandmassa in de experimentele dieren door vermenigvuldiging van deze referentiewaarde met het verse gewicht van de uitgenomen organen, uitgaande van een dichtheid van pancreasweefsel van 1,000 g/ml.

Berekeningen en statistische analyse

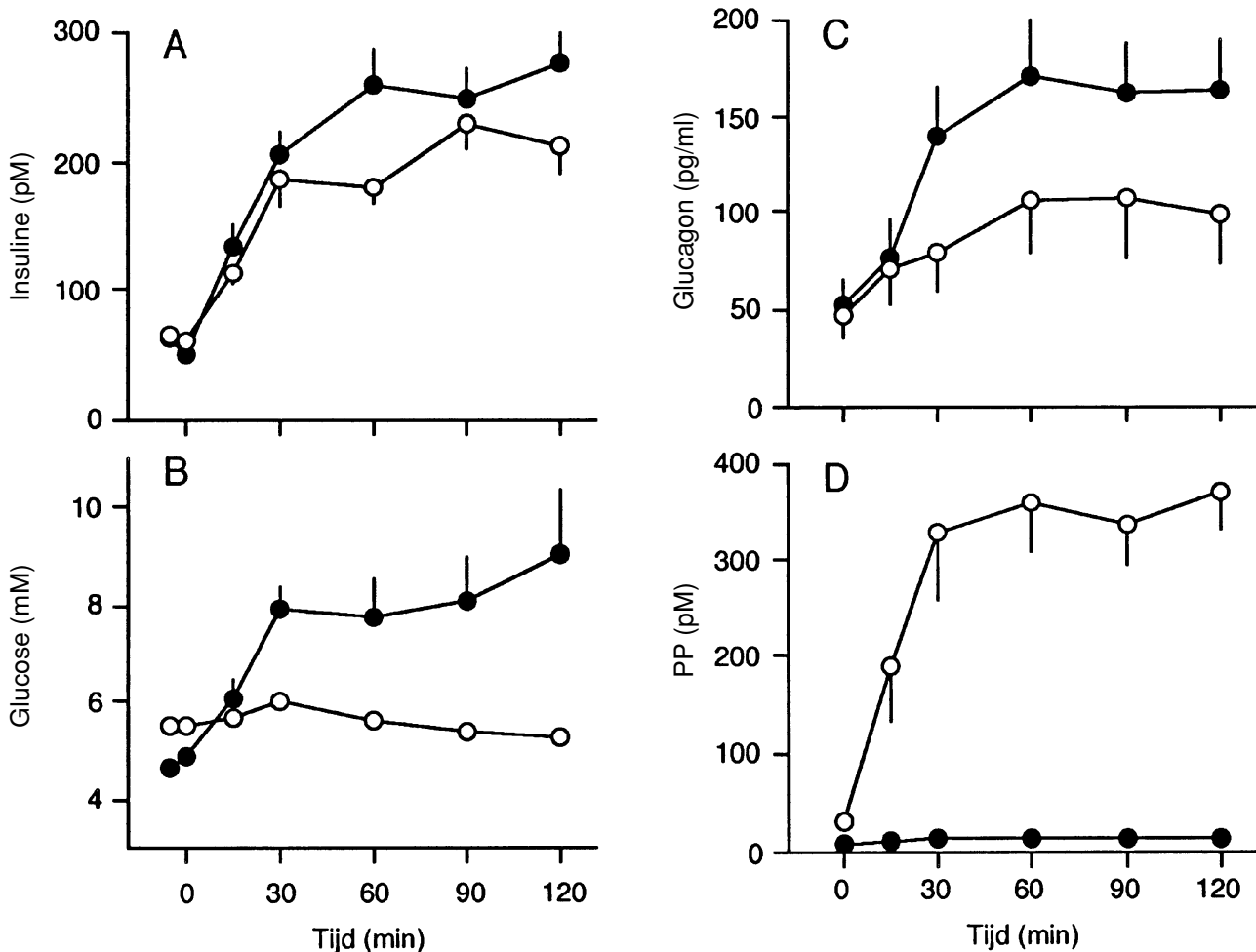
Geïntegreerde responsen werden berekend met behulp van de trapeziumregel, en gewogen door deling door de corresponderende tijdsintervallen. Logaritmische transformatie van data werd zonedig gebruikt om de verdeling van de data te normaliseren. Resultaten worden uitgedrukt als gemiddelde \pm S.E. en verschillen werden geanalyseerd met de Student t-toets voor gepaarde en ongepaarde data en niet-significant beschouwd bij $p > 0,05$.

RESULTATEN

De dosis eilandjes per kg lichaamsgewicht bedroeg gemiddeld 3679 ± 849 eiland-equivalenten (IEq; genormaliseerd eilandje met een diameter van 150 μm).



Figuur 2. Suspensie van gezuiverde hondeneilandjes, supravitaal rood gekleurd met dithizone. Geringe verontreiniging met acini (bruin) wordt in deze zwart-wit weergave met pijltjes aangegeven.



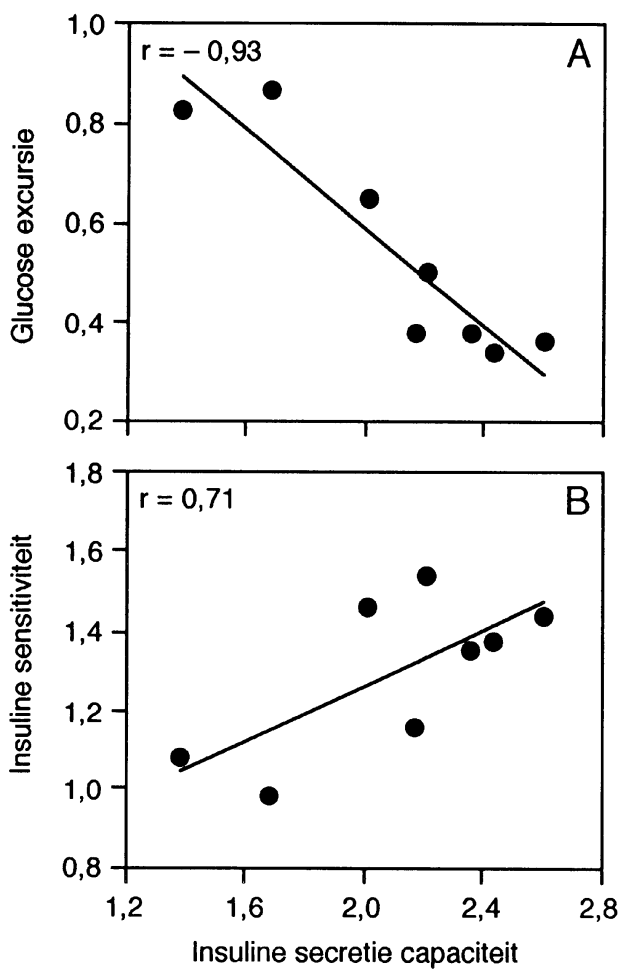
Figuur 5. Plasma insuline-, glucose-, glucagon- en PP-respons na de maaltijd in normale honden (open symbolen) en 6 maanden na autotransplantatie van eilandjes in de milt (gesloten symbolen). Data zijn gemiddelden \pm S.E.

een hyperinsulinemische euglycemische clamp (figuur 3) was gereduceerd tot 55% van de normale waarde ($p < 0,05$). De insuline-secretie-capaciteit in de getransplanteerde dieren correleerde significant ($p < 0,001$) met de postprandiale glucose-excursie (figuur 6A) en ofschoon marginaal ($p < 0,05$), met de index voor de insulinegevoeligheid (figuur 6B) in de getransplanteerde dieren. Na transplantatie werd geen PP-respons waargenomen op de i.v. insuline-geïnduceerde hypoglycemie (met dalglucosespiegels $< 3,0$ mM), wat wijst op uitblijven van cholinergische reïnnervatie (figuur 7). GIP-infusie in de getransplanteerde dieren had geen significant effect (data niet getoond), maar infusie van GLP-1 versterkte de insulinerespons 175% gedurende de 8,5 mM glucose-clamps (figuur 8).

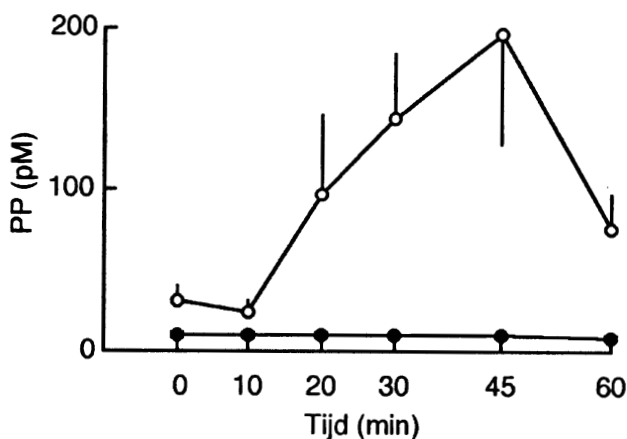
DISCUSSIE

Wij onderzochten de glucoseregulatie in honden na langdurig succesvolle intralieuale autotransplantatie van eilandjes, d.w.z. in nuchter-normoglycemische ontvangers. Zowel de eilanddosis als de locatie van implantatie worden beschouwd als belangrijke factoren voor succesvolle transplantatie in het autotransplantatiemodel. De langdurige nuchter-normoglycemie na transplantatie van meer dan ca. 2000 IEq per kg lichaamsgewicht bevestigt eerdere publicaties

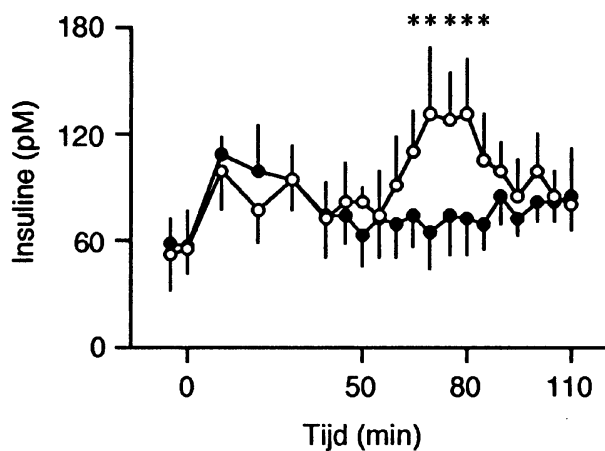
over de noodzakelijke drempeldosis eilandjes voor succesvolle autotransplantatie in de hond (4). Van de vele plaatsen welke verkend zijn voor transplantatie van eilandjes, zijn de beste resultaten verkregen na infusie in de milt en intraportaal naar de lever. De lever wordt om technische redenen vrijwel steeds verkozen bij klinische transplantatie (3). In dit onderzoek werd de milt verkozen boven de lever om fysiologische portale drainage van de eilandhormonen te waarborgen, daar intraportale transplantaten in feite gedeeltelijk direct op de systemische bloedbaan kunnen draineren (5,18,19). De matige β -cel respons tijdens intraveneuze belasting in de getransplanteerde dieren ondersteunt eerder onderzoek na autotransplantatie in de hond (5,18). Het is bekend dat de intraveneuze argininetest onder vergelijkbare hyperglycemische omstandigheden een vrijwel maximale stimulatie van de β -cel bewerkstelligt (20,21) en dat de insuline-secretie-capaciteit bij deze test ook een gevoelige parameter is voor de reductie van de β -cel massa na experimentele partiële pancreatetectomie en bij diabetische patiënten (20,22). De gemiddeld vergelijkbare afname van de eilandmassa na autotransplantatie en de insuline-secretie-capaciteit tot ca. 25% van normale waarden, wees erop, dat de insuline-secretie-capaciteit ook een goede indicatie van de eilandmassa in ons model geeft. De insuline-respons tijdens de ISC- en maaltijdttest was vergelijkbaar na



Figuur 6. Correlatie in de getransplanteerde dieren van de insuline-secretie-capaciteit, zoals bepaald door intraveneuze arginestimulatie tijdens ca. 35 mM glycemie vs. de postprandiale glucose-excursie boven de nuchtere waarde (A) en de insulinesensitiviteit tijdens euglycemische clamps (B) na logaritmische transformatie van de data.



Figuur 7. Plasma PP-respons op hypoglycemie ($< 3\text{mM}$ plasmaglucose) geïnduceerd door een intraveneuze insulinebolus in normale dieren (open symbolen) en 6 maanden na autotransplantatie van eilandjes in de milt (gesloten symbolen). Afwezigheid van een PP-respons na eilandtransplantatie wees op uitblijven van (cholinergische) reïnnervatie. Data zijn gemiddelden \pm S.E.



Figuur 8. Plasma insulinerespons tijdens intraveneuze ca. 8,5 mM glucose-clamps met (open symbolen) of zonder (gesloten symbolen) coïnfusie gedurende 50-80 minuten van GLP-1 ($1,75 \text{ pmol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) 6 maanden na eilandtransplantatie in 4 dieren. Data zijn gemiddelden \pm S.E. Significante verschillen tussen de insulinespiegels staan aangegeven met een asterisk.

transplantatie, wat er op wijst, dat de getransplanteerde β -cellen ook vrijwel maximaal werden gestimuleerd na de maaltijd. Bij correlatie analyse van de individuele data in de getransplanteerde dieren bleek bovendien een (negatieve) correlatie van de insuline-secretie-capaciteit versus de postprandiale glucosetoe name. De postprandiale hyperinsulinemische respons, in tegenstelling tot een ca. 75% gereduceerde insulinerespons bij intraveneuze belasting met glucose en arginine in de autotransplantaten, kan waarschijnlijk verklaard worden door de postprandiale bijdrage van de entero-insulaire as. Onze recente in vitro perifusiétudes toonden aan, dat fysiologische spiegels, zoals die in plasma worden gemeten, van de insulintrope darmhormonen GIP en vooral GLP-1 de glucose-gestimuleerde insulinesecretie potentiëren tijdens perifusie van geïsoleerde hondeneilandjes (12). Bovendien bleek bij stijging van de heersende glucosespiegel tijdens deze in vitro experimenten het insulintrope effect van deze peptiden te worden versterkt. In die in vitro experimenten verhoogde GIP de insuline-respons op 7,5 mM glucose met slechts 48%, terwijl GLP-1-stimulatie resulteerde in een toename met 331% boven de prestimulusspiegel. Hierbij dient te worden opgemerkt dat een vergelijking van de invloed van deze peptiden beperkt wordt door speciesverschillen tussen hondeneilandjes en varkens-GIP, dat verschilt van honden-GIP (23) en humaan GLP-1, wat waarschijnlijk niet verschilt van honden-GLP-1, daar de structuur van GLP-1 identiek is gebleken in alle zoogdieren welke tot op heden bestudeerd zijn (24). De afwezigheid van een significant effect van GIP in dit onderzoek ondersteunt onze eerdere in vitro bevindingen, en de duidelijke stimulatie van de insulinesecretie bij infusie van een vrijwel fysiologische dosis GLP-1 (7) in dit onderzoek, gaf aan dat het incretin-effect ook na langdurige transplantatie van geïsoleerde eilandjes behouden blijft. De insulinespiegels verdubbelden bijna tijdens infusie van het peptide en eerder onderzoek heeft aangetoond dat

eenzelfde GLP-1-dosis minder insulinoatroop is onder milder hyperglycemische omstandigheden in normale honden (25). Hieruit kan worden afgeleid, dat een hyperglycemisch versterkt insulinoatroop effect van GLP-1 en waarschijnlijk eveneens andere insulino-trope hormonen zoals GIP, grotendeels de hyperinsulinemische respons op de maaltijd na eilandtransplantatie kunnen verklaren. Postprandiale hyperglycemie kan, zoals boven aangegeven, de postprandiale insulinemie verklaren. Vervolgens dienen wij nog een verklaring te vinden voor het feit dat de insulinesecretie nochtans onvoldoende bleek om normale glucosespiegels te bewerkstelligen. Het is duidelijk dat een afgenomen insulinerwerking heeft bijgedragen aan de postprandiale hyperglycemie. Echter bij correlatie-analyse van de individuele postoperatieve data, bleek met een geringere insuline-secretie-capaciteit, ook de insulinerwerking geringer. En de correlatie van de insuline-secretie-capaciteit met zowel de postprandiale glucosetoename en de insulinerwerking in de getransplanteerde dieren, suggereerde dat de β -cel massa van de transplantaten de meest bepalende factor voor de glucose-intolerantie was. Deze data steunen eerder onderzoek in dieren met een gedeeltelijk verwijderd pancreas en patiënten met recent vastgestelde insuline-afhankelijke diabetes, dat suggereert dat een verminderde insuline-secretie-capaciteit gepaard gaat met insulineresistentie en dat de resistentie zelfs toeneemt met een verdere afname van de secretiecapaciteit (22,26,27). Naast een verminderde insuline-secretie-capaciteit, kan ook een veranderd insuline-secretie-patroon als gevolg van het ontbreken van de fijne neurale regeling van de afgifte van insuline door de geïsoleerde eilandjes geleid hebben tot een verslechterde glucosetolerantie en insulineresistentie in de getransplanteerde dieren. Bekend is dat een cholinergisch gemedieerde pre-absorptieve insulinerespons belangrijk is voor de postprandiale glucosetolerantie (6) en afwezigheid van een PP-respons op hypoglycemie in de getransplanteerde dieren, toonde geen cholinergische reïnnervatie van de transplantaten. Voorts is in eerdere publicaties een abnormale periodiciteit van de pulsatiele insulinesecretie door geïsoleerde eilandjes beschreven (28) en bekend is, dat kleine afwijkingen in de periodiciteit van de insulinesecretie tot insulineresistentie en glucose-intolerantie leidt (29). Ook de hyperglucagonemie en het PP-gebrek na eilandtransplantatie kunnen tot een verminderde glucosetolerantie geleid hebben. Hyperglucagonemie en een hiermee gepaard gaande afname van de molaire verhouding van insuline en glucagon zou aan de postprandiale hyperglycemie kunnen bijdragen via een buitensporige hepatische glucose-afgifte, zoals recent bij IDDM en NIDDM is gevonden (30,31). Een analyse van de individuele data in de autotransplantaten toonde in overeenstemming met deze hypothese een negatieve correlatie van de postprandiale glucosetoename met de verhouding van de (gewogen gemiddelde) insuline- en glucagonspiegel ($r = 0,99$; $p < 0,001$). Eerder onderzoek suggereert ook een fysiologische rol voor PP bij de remming van de glucose-afgifte door de lever (32,33). PP-deficiëntie in

deze studies was geassocieerd met een relatieve insulineresistentie in de lever en exogene PP-suppletie normaliseerde de insulinerwerking en verbeterde de glucosetolerantie. De PP-deficiëntie, als gevolg van denervatie en reductie van de PP-celmasse na pancreatectomie en eilandtransplantatie in onze dieren, kan zo waarschijnlijk ook hier een rol gespeeld hebben bij de verminderde glucosetolerantie. Samenvattend concluderen wij, dat zowel een gereduceerde, suboptimale eilandmasse en ook een kwalitatief geringere insulinesecretie kunnen hebben bijgedragen aan insulineresistentie en een milde postprandiale hyperglycemie na eilandtransplantatie. De verminderde eilandmasse leek de belangrijkste oorzaak van deze afwijkingen. De insulino-trope effecten van GLP-1 en waarschijnlijk ook andere darmhormonen lijken grotendeels verantwoordelijk voor het opmerkelijke verschil van de insulinerespons na intraveneuze en orale belasting. Na transplantatie van een suboptimale dosis eilandjes wordt een stijging van het postprandiale bloedglucose waarschijnlijk voornamelijk beperkt door een, met een stijgende glucosespiegel, tevens actiever wordende entero-insulaire as, wat tot chronische, vrijwel maximale stimulatie van de postprandiale insulinesecretie leidt en uiteindelijk mogelijk tot definitief falen van het transplantaat kan leiden. Naast een verminderde insuline-secretie-capaciteit, kunnen ook insulineresistentie en een buitensporige hepatische glucose-afgifte als mogelijk gevolg van (i) het ontbreken van de fijne neurale regeling van de insulinesecretie, (ii) hyperglucagonemie en (iii) PP deficiëntie geleid hebben tot de verminderde glucosetolerantie. Reductie van de insuline-secretie-capaciteit lijkt een belangrijke gemeenschappelijke oorzaak te zijn van zowel de postprandiale hyperglycemie als insulineresistentie. Transplantatie van een grotere eilandmasse zou daarom een langdurige vrijwel normale glucose-regulatie mogelijk moeten maken.

Dankbetuiging

Wij danken Mw G.M. van Brakel, H. Dudart, Mw J.M.H. Heilen, Mw H.A.M. Holtslag, Mw K.H. van der Nat-van der Mey, Mw A.A. Rasser-van der Mey, I. van Starckenburg en C. Wester voor assistentie bij de operaties, functietesten en voor de toegewijde zorg voor de dieren en J.P. Giliams, Mw W.M. Kloosterman-Boele en Mw M.G. van Schie-Troost voor de radioimmunologische bepalingen. De medische tekenaars S.B. Blankevoort en Mw J. Wetselaar-Whittaker verzorgden de anatomische illustraties van de pancreatectomie en de transplantatie (delen van deze illustraties werden door de auteurs, gemodificeerd, in overige illustraties toegepast). Financiële steun voor het onderzoek werd ontvangen van het Diabetes Fonds Nederland.

Literatuur

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
2. Robertson RP. Pancreatic and islet transplantation for diabetes. Cures or curiosities? *N Engl J Med* 1992; 327: 1861-1868.

3. Hering BJ, Browatzki CC, Schultz A, Bretzel RG, Federlin KF. Clinical islet transplantation-registry report, accomplishments in the past and future research needs. *Cell Transplant* 1993; 2: 269–282.
4. Warnock GL, Ao Z, Catral MS, Dabbs KD, Rajotte RV. Experimental islet transplantation in large animals. In: Ricordi C, editor. *Pancreatic islet cell transplantation*. Austin, Landes Company, 1992: 261–278.
5. Burg MPM van der, Gooszen HG. The metabolic efficiency of islet grafts: an overview. In: Hesse UJ, Pichlmaier H, editors. *Islet transplantation-current status of clinical application and experimental results*. Lengerich, Germany, Wolfgang Pabst Verlag, 1992: 93–99.
6. Strubbe JH, Steffens AB. Neural control of insulin secretion. *Horm metab Res* 1993; 25: 507–512.
7. Ørskov C, Wettergren A, Holst JJ. Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7–36 amide and glucagonlike peptide-1 7–37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes* 1993; 42: 658–661.
8. Ebert R. Gut signals for islet hormone release. *Eur J Clin Invest* 1990; 20, Suppl 1: S20–S26.
9. Burg MPM van der, Gooszen HG, Guicherit OR, Jansen JBMJ, Frölich M, Haastert FA, Lamers CBHW. Contribution of partial pancreatectomy, systemic hormone delivery and duct obliteration to glucose regulation in canine pancreas: Importance in pancreas transplantation. *Diabetes* 1989; 38: 1082–1089.
10. Nauck MA, Bartels E, Ørskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7–36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 912–917.
11. Burg MPM van der, Guicherit OR, Ploeg RJ, Frölich M, Bruijn JA, Scherft JP, Gooszen HG. Metabolic control after autotransplantation of highly purified canine pancreatic islets isolated in UW-solution. *Transplant Proc* 1991; 23: 785–786.
12. Burg MPM van der, Guicherit OR, Frölich M, Gooszen HG. Insulinotropic effects of cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide, and glucagon-like peptide-1 during perfusion of short-term cultured canine isolated islets. *Regul Peptides* 1995; 60: 61–67.
13. Schwartz TW. Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control. *Gastroenterology* 1983; 85: 1411–1425.
14. Burg MPM van der, Guicherit OR, Frölich M, Scherft JP, Prins FA, Bruijn JA, Gooszen HG. Assessment of islet isolation efficacy in dogs. *Cell Transplant* 1994; 3: 91–101.
15. Ricordi C, Gray DWR, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta diabetol lat* 1990; 27:185–195.
16. Finegood DT, Pacini C, Bergman RN. The insulin sensitivity index: Correlation in dogs between values determined from the intravenous glucose tolerance test and the euglycemic glucose clamp. *Diabetes* 1984; 33:362–68.
17. Burg MPM van der, Guicherit OR, Frölich M, Scherft JP, Bruijn JA, Gooszen HG. Impact of donor-related variables on islet isolation outcome in dogs. *Diabetologia* 1994; 37: 111–114.
18. Scharp DW, Marchetti P, Swanson C, Newton M, McCullough CS, Olack B. The effect of transplantation site and islet mass on long-term survival and metabolic and hormonal function of canine purified islet autografts. *Cell Transplant* 1992; 1: 245–254.
19. Suylichem PTR van, Strubbe JH, Houwing H, Wolters GHJ, Schilfgaarde R van. Insulin secretion by rat islet isografts of a defined endocrine volume after transplantation to three different sites. *Diabetologia* 1992; 35: 917–923.
20. Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984; 74: 1318–1328.
21. Nauck MA, Siegel EG, Creutzfeldt W. Prolonged maximal secretion of insulin secretion in healthy subjects does not provoke preferential release of proinsulin. *Pancreas* 1991; 6: 645–652.
22. Ward WK, Wallum BJ, Beard JC, Taborsky J, Porte D. Reduction of glycemic potentiation: Sensitive indicator of β -cell loss in partially pancreatectomized dogs. *Diabetes* 1988; 37: 723–729.
23. Alam MJ, Buchanan KD. Conflicting gastric inhibitory polypeptide data: possible causes. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 19: 93–101.
24. Ørskov C. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia* 1992; 35: 701–711.
25. Kawai K, Suzuki S, Ohashi S, Mukai H, Murayma Y, Yamashita K. Effects of truncated glucagon-like peptide-1 on pancreatic hormone release in normal conscious dogs. *Acta Endocrinol* 1990; 123: 661–667.
26. Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 1987; 79: 1510–1515.
27. Yki-Järvinen H, Koivisto VA. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. *N Engl J Med* 1986; 315: 224–230.
28. Alejandro R, Mintz DH. Persistence of oscillatory insulin secretion in denervated islet cell autografts. *Transplantation* 1991; 52: 574–576.
29. Paolisso G, Salvatore T, Sgambato S, Torella R, Varricchio M, D'Onofrio F. Metabolic effects of pulsatile insulin infusion in the elderly. *Acta Endocrinol* 1990; 123: 19–23.
30. Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycemia in IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 337–343.
31. Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, et al. Role of suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 1992; 326: 22–29.
32. Gettys TW, Garcia R, Savage K, Whitcomb DC, Kanayama S, Taylor IL. Insulin-sparing effects of pancreatic polypeptide in congenitally obese rodents. *Pancreas* 1991; 6: 46–53.
33. Seymour NE, Brunicardi FC, Chaiken RL, et al. Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic polypeptide administration in man. *Surgery* 1988; 104: 119–129.

Summary

Glucoregulation after transplantation of islets of Langerhans in dogs. Burg MPM van der, Frölich M and Gooszen HG. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 20-28.

We studied metabolic control in 8 dogs at 6 months after intrasplenic islet autotransplantation, compared with 30 controls. The autografts comprised about 25% of the native islet mass, and the insulin secretion capacity (ISC) at intravenous stimulation with arginine and 35 mM glucose likewise averaged approximately 25% of the control value. Postprandially, in contrast, the insulin response increased 140% vs. controls. Further mild postprandial hyperglycemia (8.5 mM), hyperglucagonemia, and a virtually absent pancreatic polypeptide response were observed in the grafted animals. Insulin action declined by 45% posttransplant. The posttransplant ISC correlated both with the postprandial glucose increment and insulin action. Infusion, posttransplant, of the gut hormone glucagon-like peptide-1 7-36 amide (GLP-1) doubled the insulin level at a 8.5 mM glucose clamp, which may account for the marked difference in the insulin response to the intravenous and oral challenges. Since the islet mass appears to be the main determinant of glucoregulation, larger grafts should allow near-normal metabolic control.

Key words: islet of Langerhans; transplantation; dog; glucose regulation; GLP-1