

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 mõju Wolframi sündroomi  
(WS) rotimudeli diabeedi sümptomite leevendamisele ja pankrease  
Langerhansi saarekeste rakulisele ehitusele**

Magistritöö (30 EAP)

Kaia Grete Kukker

Juhendaja PhD Kadri Seppa

Kaasjuhendaja PhD Mario Plaas

TARTU 2022

## INFOLEHT

### **GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 mõju Wolframi sündroomi (WS) rotimudeli diabeedi sümptomite leevendamisele ja pankrease Langerhansi saarekeste rakulisele ehitusele**

Wolframi sündroom (WS) on haruldane geneetiline haigus, mille sümptomiteks on suhkurdiabeet, nägemise ja kuulmise kadu ning neurodegeneratsioon. WS-i jaoks puudub ravi ning pidevalt otsitakse uusi ravimeid, et sümptomeid leevendada ja patsientide eluiga pikendada. DA-CH5 on organismi glükoosiregulatsioonis osalevate retseptorite GLP-1 ja GIP-i koagonist, millel on nii diabeedi sümptomeid leevendav kui ka neuroprotektiivne efekt. Käesoleva töö tulemusena selgus, et DA-CH5 suudab WS-i rotimudelis parandada kasteloomade glükoositolerantsust. Pankrease Langerhansi saarekeste morfoloogilisel analüüsil selgus, et WS-i rotimudelis on vähenenud insuliini tootvate beeta-rakkude hulk ja saarekestes leidub Alzheimeri tõvega seostatud beeta-amüloidi valku.

Märksõnad: diabeet, Langerhansi saarekesed, pankreas, Wolframi sündroom, WFS1  
CERCS kood: B470 Füsioloogia

### **The effects of GLP-1 and GIP receptor co-agonist DA-CH5 on diabetic phenotype and cellular architecture of islets of Langerhans in a Wolfram syndrome (WS) rat model**

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive disorder characterized by diabetes mellitus, blindness, deafness and neurodegeneration. DA-CH5 is a co-agonist of two receptors involved in the regulation of glucose homeostasis – GLP-1 and GIP. DA-CH5 has been shown to improve blood glucose control and has a proven neuroprotective effect. Treatment with DA-CH5 was able to inhibit glucose intolerance in WS rat model. Morphological analysis of islets of Langerhans revealed that the number of insulin producing beta-cells is decreased in WS rat model and amyloid-beta, a protein involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, is found in the islets.

Keywords: diabetes, islets of Langerhans, pancreas, Wolfram syndrome, WFS1  
CERCS code: B470 Physiology

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Diabeet.....	7
1.1.2. Pankreas .....	7
1.1.2. Organismi glükoosiregulatsioon .....	9
1.1.3. Veresuhkru ainevahetushäired .....	11
1.1.4. Diabeet ja Alzheimeri tõbi .....	12
1.2. Diabeet ja Wolframi sündroom .....	14
1.2.1. <i>WFS1</i> geeni roll glükoosi homöostaasis .....	14
1.2.2. Wolframi sündroom (WS) .....	15
1.2.3. Wolframi sündroomiga kaasneva diabeedi ravi.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	19
2.1. Töö eesmärgid .....	19
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Loommudel .....	20
2.2.2. Krooniline ravi DA-CH5-ga .....	20
2.2.3. Kudede ettevalmistus ja pankrease lõikude seeria.....	20
2.2.4. Immunofluorestsents .....	22
2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs ja rakkude loendamine .....	23
2.2.6. Intraperitoneaalne glükoositolerantsi test (IPGTT) .....	24
2.2.7. Hormoonide taseme mõõtmine .....	25
2.2.8. Andmete analüüs.....	25
2.3. Tulemused .....	26

2.3.1. Kehakaal.....	26
2.3.2. IPGTT .....	27
2.3.3. Seerumi insuliini, glükagooni ja C-peptiidi tase.....	29
2.3.4. Beeta- ja alfa-rakkude kvantitatiivne analüüs .....	31
2.3.5. Beeta-amüloid Langerhansi saarekestes .....	35
2.4. Arutelu .....	37
KOKKUVÕTE.....	41
SUMMARY .....	42
TÄNUSÕNAD .....	44
KIRJANDUSE LOETELU .....	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	64
LIHTLITSENTS .....	65

## KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA	dispersioonanalüüs (ingl <i>analysis of variance</i> )
ATP	adenosiintrifosfaat
BSA	veise seerumi albumiin
ER	endoplasmaatiline retiikulum
GABA	gamma-aminovõihape
GIP	glükoosist sõltuv insulintroopne polüpeptiid
GLP-1	glükagoonilaadne peptiid-1
GLUT-2	glükoosi transporter-2
IAPP	saarekeste amüloidpolüpeptiid
IgG	immunoglobuliin
IPGTT	intraperitoneaalne glükoositolerantsi test
IRE1	inositool-sõltuv ensüüm-1
KO	nokaut (ingl <i>knock-out</i> )
PBS	fosfaatpuhverdatud soolalahus
PP rakk	pankrease polüpeptiidrakk
Sal	füsioloogiline lahus (ingl <i>saline</i> )
SEM	standardviga (ingl <i>standard error of the mean</i> )
SERCA	sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca <sup>2+</sup> -ATPaas)
UPR	mittevoltunud valkude vastus (ingl <i>unfolded protein response</i> )
WFS1	wolframiin, valk
<i>WFS1</i>	wolframiini valku kodeeriv geen
WS	Wolframi sündroom
WT	metsiktüüp (ingl <i>wild type</i> )

## SISSEJUHATUS

Diabeet on raske krooniline veresuhkru ainevahetushaigus, mida põeb maailmas üle 500 miljoni inimese. Lisaks 1. tüüpi diabeedile, mis on autoimmuunhaigus, ja 2. tüüpi diabeedile, mida peetakse elustiilihaiguseks, võivad diabeeti põhjustada ka mitmed harvaesinevad geneetilised haigused. Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhjuseks on mutatsioonid *WFS1* geenis. WS-i esimeseks sümptomiks on varajases eas algav suhkurdiabeet, mille tõttu vajavad patsiendid eluaegset insuliini asendusravi.

WS-iga kaasnevat suhkurdiabeeti ei osata ravida ning kõik senised ravistrateegiad suudavad sümptomeid üksnes leevendada. WS-i rotimudeliga tehtud uuringud on näidanud, et diabeedi ravis kasutatav GLP-1 retseptori agonist liraglutiid suudab edukalt parandada katseloomade glükoositolerantsust ja hoiab ära diabeedi sümptomite halvenemist. Käesolevas töös kasutatud WS-i rotimudeliga tehtud eluaegse katse tulemusena selgus, et liraglutiid suudab diabeedi sümptomeid lükata edasi pooltel *WFS1*-puudulikest rottidest. Uute ravisuundadena katsetatakse organismi glükoosiregulatsioonis osaleva kahe retseptori GLP-1 ja GIP-i koagoniste, millel on täheldatud veelgi tugevamat veresuhkrut alandavat toimet. WS-iga kaasnevad ka mitmed teised sümptomid (nt pimedus, kurtus, neuroloogilised häired nagu düsfaagia ja ataksia ning kognitiivsete võimete langus), mille põhjuseks on närvirakkude hävimine. Seetõttu on vaja leida ravimeid, mis oleksid praegu kasutusel olevatest preparaatidest veelgi efektiivsemad, et ravida ja ennetada WS-iga kaasnevat diabeeti ja neurodegeneratsiooni.

Käesoleva töö eesmärk on selgitada välja, milline on GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 efektiivsus WS-iga kaasneva diabeedi sümptomite ärahoidmisel. Töös uuriti, kas DA-CH5 suudab WS-i loomudelil parandada katseloomade glükoositolerantsust ja milline on selle mõju organismi glükoosiregulatsiooni põhiensüümide – insuliini ja glükagooni – tasemele vereseerumis. Lisaks sellele uuriti, milline on *WFS1*-puudulike katseloomade pankrease Langerhansi saarekeste rakuline ehitus võrreldes WT loomadega ja kas 7-päevane ravi DA-CH5-ga avaldas mõju saarekeste beeta- ja alfa-rakkude arvukusele. Ühtlasi vaadeldi, kas Alzheimeri tõvega seostatud beeta-amüloidi valk esineb ka pankrease Langerhansi saarekestes.

Töö koostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Diabeet

### 1.1.2. Pankreas

Pankreas ehk kõhunääre on organ, mis jaotatakse anatoomiliselt kolmeks osaks: pea, keskosa ning saba. Pankreas areneb endodermist moodustunud dorsaalsest ja ventraalsest pankrease pungast, mis ühinevad ja kasvavad lõpuks kokku (Gittes, 2009). Pankreasel on nii eksokriinne kui ka endokriinne funktsioon. Pankrease eksokriinseks funktsiooniks on toota seedeensüüme, endokriinne osa vastutab süsivesikute jm ainevahetuseks vajalike hormoonide sünteesimise ja sekreteerimise eest.

Pankrease endokriinsed rakud moodustavad rakukogumikke, mida nimetatakse nende esmakirjeldaja Paul Langerhansi järgi Langerhansi saarekesteks. Saarekesed koosnevad mitmetest erinevatest rakutüüpidest. Kõige suurema osa saarekeste rakupopulatsioonist moodustavad insuliini tootvad beeta-rakud (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). Arvukuselt teisel kohal on glükagooni tootvad alfa-rakud (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). Vähem leidub saarekestes delta-rakke, epsilon-rakke ja pankrease polüpeptiidrakke (PP rakud), mida nimetatakse ka gamma-rakkudeks (Andralojc *et al.*, 2009; Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006).

Lisaks hormoonidele sekreteeritakse saarekestest mitmeid signaalmolekule, nt atsetüülkoliini (Molina *et al.*, 2014; Rodriguez-Diaz *et al.*, 2011), glutamaati (Cabrera *et al.*, 2008), adenosinotriifosfaati (ATP) (Jacques-Silva *et al.*, 2010) ja gamma-aminovõihapet ehk GABA-t (Purwana *et al.*, 2014). Langerhansi saarekesed on innerveeritud nii sümpaatiliste kui ka parasümpaatiliste närvikiududega (Butterworth *et al.*, 2018). Need on väga tihedalt vaskulariseeritud (Nyman *et al.*, 2008), nii et ligikaudu 10–20% kogu pankrease verevarustusest on suunatud saarekestesse (Meyer *et al.*, 1982).

Varem arvati, et Langerhansi saarekesi paikneb rohkem pankrease sabaosas kui peaosas (Hörnblad *et al.*, 2011; Trimble *et al.*, 1982; X. Wang *et al.*, 2013; Yukawa *et al.*, 1999). Uuemate uuringute tulemusena on selgunud, et saarekesed on ühtlaselt jaotunud üle terve pankrease (Ionescu-Tirgoviste *et al.*, 2015). Inimesel on leitud saarekese keskmiseks läbimõõduks üle 100 µm ja keskmiseks pindalaks 0,037 mm<sup>2</sup> (Ionescu-Tirgoviste *et al.*, 2015). Saarekeste kogupindala on inimesel u 2 cm<sup>3</sup>, mis tähendab, et Langerhansi saarekesed moodustavad pankreasest u 4,5% (Ionescu-Tirgoviste *et al.*, 2015).

Erinevate rakutüüpide paiknemine ja esinemissagedus Langerhansi saarekestes on liigiti erinev. Inimese Langerhansi saarekestes on alfa- ja beeta-rakud jaotunud sporaadiliselt üle terve saarekese (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009) ning beeta-rakkude hulk on võrreldes teiste liikidega väiksem (Cabrera *et al.*, 2006; Ionescu-Tirgoviste *et al.*, 2015; A. Kim *et al.*, 2009). Uuringud on valdavalt leidnud, et hiirtel ja rottidel on beeta-rakud koondunud saarekese keskele ning alfa-rakud paiknevad saarekese ääres (Cabrera *et al.*, 2006; Gannon *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2007; Wiczorek *et al.*, 1998). Närilistel, nt hiirtel ja rottidel, on võrreldes inimesega beeta-rakkude arv suurem (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). Ülejäänud, u 10% Langerhansi saarekese rakkudest moodustavad delta-, epsilon- ja PP rakud sõltumata liigist (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006; Ionescu-Tirgoviste *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2009).

Beeta-rakkude peamine ülesanne on insuliini sünteesimine ja sekretsioon. Insuliini eelühendiks on preproinsuliin, millest saab proteolüütiliste lõikamiste tulemusena proinsuliin, mis koosneb A, B ja C ahelast. A ja B ahelad ühinevad ning nendest moodustub insuliin (Weiss *et al.*, 2000). Järele jäänud C ahelat nimetatakse C-peptiidiks (ingl *Connecting peptide*) ning seda sekreteeritakse koos insuliiniga võrdses koguses (Patzelt *et al.*, 1978). Kõik beeta-rakud ei tooda insuliini sama palju ning on leitud, et enamiku insuliinist toodavad u 20% kõikidest saarekese beeta-rakkudest (Wojtuszczyzn *et al.*, 2008). Närilistega tehtud uuringud on näidanud, et dorsaalsest pankrease pungast arenenud saarekestel on suurem võimekus sünteesida ja sekreteerida insuliini (Meyer *et al.*, 1982; Trimble *et al.*, 1982).

Alfa-rakkudes toodetakse hormooni glükagoon, mille ülesandeks on tõsta veresuhkru taset paastuperioodil ja füüsilise koormuse ajal. Glükagoon aktiveerib maksas organismi peamise glükoositagavara ehk glükogeeni lagundamise ning stimuleerib glükoneogeneesi, et veresuhkru taset tõsta (Wendt ja Eliasson, 2020). Närilistel on leitud, et dorsaalsest pankrease pungast arenenud saarekestes on kümme korda rohkem glükagooni kui ventraalse punga saarekestes (Meyer *et al.*, 1982; Trimble *et al.*, 1982).

Väiksema osa Langerhansi saarekese rakutüüpidest moodustavad delta-, epsilon- ja PP rakud. Delta-rakkudes toodetakse hormooni somatostatiin, mis inhibeerib beeta- ja alfa-rakkude aktiivsust ja ühes sellega vähendab vastavalt insuliini ja glükagooni sekretsiooni nii inimesel kui ka närilistel (Brunicardi *et al.*, 2001; Hauge-Evans *et al.*, 2009). PP rakud toodavad pankrease polüpeptiidi – hormooni, mis vähendab söögiisu (Batterham *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2013) ja inhibeerib glükoosi madalatel kontsentratsioonidel glükagooni vabastamist (Aragón *et al.*, 2015). Ghreliin on hormoon, mida toodetakse peamiselt maos (Tomasetto *et al.*, 2000) ja sellel on oreksigeenne ehk söögiisu tõstev mõju (Esler *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2006).

Pankrease Langerhansi saarkestes leiduvad epsiloni-rakud, mis toodavad samuti ghreliini, avastati alles hiljuti (Kojima *et al.*, 1999; Wierup *et al.*, 2002). Teadaolevalt on inimene ainus liik, kellel on epsiloni-rakud alles ka täiskasvanueas (Andralojc *et al.*, 2009). Epsiloni-rakke on leitud närilistelt vaid pre- ja lühiajaliselt ka postnataalselt (Heller *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2004). Ghreliin stimuleerib somatostatiini sekretsiooni (DiGruccio *et al.*, 2016) ja inhibeerib insuliini sekretsiooni (Lindqvist *et al.*, 2020).

Saarekeste rakulisel ehitusel arvatakse olevat mõju rakkude talitlusele. Närilistel paiknevad beeta-rakud Langerhansi saarekeste keskel ning neid ääristavad alfa-rakud (Cabrera *et al.*, 2006; Elayat *et al.*, 1995; Gannon *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2007; Wieczorek *et al.*, 1998). Säärane rakkude asetus oli muutunud närilistel, kellel olid diabeedi sümptomid ja halvenenud beeta-rakkude funktsioon (Gannon *et al.*, 2000; Starich *et al.*, 1991). Neil oli tõusnud alfa-, delta- ja PP rakkude arvukus ning need rakud paigutusid beeta-rakkude vahele (Gannon *et al.*, 2000; Starich *et al.*, 1991). Ühtlasi on leitud, et beeta-rakkude kontakt teiste beeta-rakkudega suurendab insuliini tootmist, aga kontakt teiste rakutüüpidega sellist mõju ei avaldanud (Bosco *et al.*, 1989). Inimesel on alfa- ja beeta-rakud paigutunud juhuslikult üle terve Langerhansi saarekese (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Arvatakse, et selline rakuline paigutus võimaldab beeta-rakkudel aktiveeruda madalatel glükoosi kontsentratsioonidel, milleks hiire beeta-rakud võimelised ei ole (Cabrera *et al.*, 2006). Viis, kuidas tekib liigiomane Langerhansi saarekeste morfoloogia, on tänaseni selgusetu.

### **1.1.2. Organismi glükoosiregulatsioon**

Organismi glükoosiregulatsiooniga säilitatakse organismi peamise energiaallika – glükoosi – homöostaas. Veresuhkru taset hoitakse kitsastes piirides (3,3–5,5 mmol/L) ning selles osaleb keeruline, paljudest komponentidest koosnev süsteem, kus mängivad rolli hormoonid ja neuropeptiidid, aju, pankreas, maks, soolestik, rasv- ja lihaskude. Glükoosi homöostaasis on võtmeroll kahel pankrease Langerhansi saarekestes toodetaval ensüümil – insuliinil ja glükagoonil.

Glükoos on peamine insuliini sekretsiooni stimuleeriv aine. Pankrease beeta-rakud reageerivad glükoosi kontsentratsiooni tõusule organismis ning hakkavad vastusena tootma insuliini, millel on veresuhkru taset alandav mõju. Insuliini vabastamine beeta-rakkudest on kahefaasiline. Esimeses faasis transporditakse glükoos glükoosi transporter 2 (GLUT-2) retseptorite kaudu beeta-rakkudesse. Beeta-rakkudes glükoos lagundatakse ning selle tulemusena suureneb ATP

kontsentratsioon rakus. ATP taseme tõusust tingituna sulguvad ATP-tundlikud  $K^+$ -kanalid, mis lubavad tavaolekus  $K^+$ -ioonidel rakust väljuda ja hoiavad rakumembraanis puhkepotentsiaali.  $K^+$ -kanalite sulgumisel suureneb rakusisene positiivsete ionide kontsentratsioon ja rakumembraan depolariseerub. Rakumembraani depolariseerumise tõttu avanevad  $Ca^{2+}$ -kanalid ning suureneb kaltsiumi sissevool rakku. Suurenenud  $Ca^{2+}$  tase teeb võimalikuks insuliinigraanulite ja rakumembraanide fuseerumise, mille tulemusena toimub graanulite eksotsütoos ja insuliin vabaneb vereringesse. Esimene faas on kiire ning käivitatakse 5–6 minutit pärast söömist ning selle käigus sekreteeritakse varem sünteesitud insuliinigraanuleid. Insuliini vabastamise teine faas võib kesta mitu tundi ning selle jooksul sekreteeritakse uusi sünteesitud insuliinimolekule (Tups *et al.*, 2017).

Beeta-rakkude töö peab olema korrektselt koordineeritud ja sünkroniseeritud. Hiirtel on beeta-rakkude elektriline aktiivsus terves Langerhansi saarekeses sünkroniseeritud (Quesada *et al.*, 2003; Ravier *et al.*, 2005; Stožer *et al.*, 2013). Sellise rakkude töö samaaegse toimimise teevad võimalikuks rakkudevahelised aukliidused (ingl *gap junction*), mis ühendavad rakkude tsütoplastmat ja võimaldavad molekulide liikumist rakkude vahel (Quesada *et al.*, 2003). Erinevalt närilistest töötavad inimestel ainult mõned beeta-rakud sünkroniseeritult, kuid kõik Langerhansi saarekese beeta-rakud tervikuna mitte (Quesada *et al.*, 2006). Põhjus arvatakse olevat inimese Langerhansi saarekese liigiomases rakulises ehituses (Brissova *et al.*, 2005), mida on kirjeldatud käesoleva töö peatükis 1.1.2.

Teine oluline organismi glükoositasakaalu mõjutav hormoon on glükagoon, mida toodetakse pankrease Langerhansi saarekese alfa-rakkudes. Glükagooni sekreteeritakse paastuperioodil (st söögikordade vahel), mil veresuhkru tase langeb ja füüsilise koormuse ajal. Glükagooni tulemusena algatatakse maksas organismi glükoositagavara ehk glükogeeni lagundamine (glükogenolüüs) ja selle tulemusena vabaneb glükoos vereringesse ning veresuhkru tase tõuseb. Lisaks glükogeeni lagundamisele stimuleerib glükagoon glükoneogeneesi ehk glükoosi biosünteesi mittedahhariidsetest eelühenditest (nt püruvaat, laktaat, mõned aminohapped jm). Sarnaselt beeta-rakkude insuliini sekretsiooniga on ka alfa-rakkudes glükagooni vabastamine kaltsiumist sõltuv, kuid alfa-rakkude puhul pole sünkroniseeritud  $Ca^{2+}$  signaleerimist täheldatud ning rakud töötavad iseseisvalt (Quesada *et al.*, 2006).

Lisaks insuliinile ja glükagoonile osalevad organismi glükoosiregulatsioonis mitmed teised ühendid. Vere rasvhapete (Dobbins *et al.*, 1998) ja aminohapete sisaldusel (Pagliara *et al.*, 1974) on samuti mõju insuliini sekretsioonile. Ühtlasi reguleerivad beeta-rakkude tööd ka mõned maksas toodetavad ensüümid, nt glükagoonilaadne peptiid-1 (GLP-1) ja glükoosist

sõltuv insulinoorne polüpeptiid (GIP), adrenaliin, amüliin ehk saarekeste amüloidpolüpeptiid (IAPP) ja pankrease delta-rakkudes toodetav somatostatiin.

### 1.1.3. Veresuhkru ainevahetushäired

Diabeediks ehk suhkurtõveks nimetatakse kroonilisi veresuhkru ainevahetushäireid, mida iseloomustab hüperglükeemia ehk ülemäärane veresuhkru taseme tõus. Hüperglükeemia põhjuseid on erinevaid: see võib olla põhjustatud häiretest insuliini sekretsioonis või insuliinresistentsusest ning sageli on patsientidel mitmeid vaegusi, mille tõttu kujuneb välja diabeet. Diabeet on väga levinud haigus: Rahvusvahelise Diabeedi Föderatsiooni hinnangul on iga 11. inimene diabeetik.

Inimesel on veresuhkru normväärtus 3,3–5,5 mmol/L. Diabeedi diagnoosimise aluseks on normaalvahemikust kõrgemad glükoosi väärtused glükoositaluvuse proovis ja pärast paastumist. Inimesel diagnoositakse glükoositaluvuse häire, kui vereplasma glükoositase on pärast 75 g glükoosi manustamist  $\geq 11,1$  mmol/L. Kui vereplasma glükoositase on pärast 8–14 h paastu  $\geq 7,0$  mmol/L, osutab see paastuglükoosi häirele.

1. tüüpi diabeet ehk suhkurdiabeet (ld *diabetes mellitus*) on autoimmuunhaigus, mille puhul hävitab immuunsussüsteem pankrease beeta-rakud ning seetõttu ei toodeta organismis insuliini.

1. tüüpi diabeedi puhul on sümptomite väljakujunemine mõjutatud otseselt insuliini tootmisest ning seetõttu nimetatakse seda ka insuliinsõltuvaks diabeediks. Seda haigust kutsutatakse ka juveniilseks suhkurdiabeediks, sest esimesed sümptomid avalduvad valdavalt noorukieas, kuid üha sagedamini on seda hakatud diagnoosima ka täiskasvanutel (Diaz-Valencia *et al.*, 2015). 1. tüüpi diabeedi esinemissagedus on u 5%.

Lisaks veresuhkru väärtuste mõõtmisele, määratakse 1. tüüpi diabeedi puhul ka autoantikehade olemasolu (Notkins ja Lernmark, 2001). 1. tüüpi diabeeti võib nimetada põletikuliseks haiguseks, sest pankrease beeta-rakkude hävimine on tingitud immuunsussüsteemi rakkude ja põletikku soodustavate tsütokiinide sisenemisest rakku (Lu *et al.*, 2020). Haiguse täpne tekkepõhjus pole teada. Haiguse kujunemises mängivad rolli nii geneetilised (Gorodezky *et al.*, 2006) kui ka keskkondlikud (nt mõned viirused) (Hyöty, 2016) põhjused. 1. tüüpi diabeeti ei osata ravida ning patsiendid vajavad eluaegset insuliini asendusravi.

2. tüüpi diabeet on kõige levinum suhkurdiabeedi vorm, moodustades üle 95% kõigist diabeedijuhtudest. Erinevalt 1. tüüpi diabeedist, ei ole haiguse tekkemehhanismid seotud otseselt insuliini tootmisega ning seetõttu nimetatakse seda ka insuliinsõltumatuks diabeediks.

2. tüüpi diabeet pole autoimmuunhaigus, vaid selle väljakujunemises mängivad rolli inimese elustiil ja harjumused. Haigestumise suurimateks riskifaktoriteks on ülekaalulisus, vähene füüsiline aktiivsus, halb toitumine jne (Hu *et al.*, 2001). 2. tüüpi diabeet on samuti päriliku eelsoodumusega ning leitud on mitmeid geene, mida seostatakse suurenenud haigestumiseriskiga (Horikawa *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004).

2. tüüpi diabeedi puhul toodavad pankrease beeta-rakud insuliini, kuid selle toime on organismis nõrgenenud. Insuliiniresistentsust põhjustavad mitmed tegurid: üleliigsed rasvad ja häirunud rasvhapete oksüdatsioon, põletikumarkerite tõus ja endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stress (Muio ja Newgard, 2008). Insuliini vähenenud mõju tõttu ei saa glükoos rakkudes siseneda ning selle tulemusena suureneb veresuhkru tase. Vastusena veresuhkru tõusule, intensiivistub beeta-rakkudes insuliini sekreteerimine. Väljakujunenud insuliiniresistentsuse korral ei suuda isegi suurenenud insuliinitootmine kompenseerida glükoosi taseme tõusu, sest insuliinil puudub süsteemne toime, ning lõpuks areneb välja krooniline hüperglükeemia.

Lisaks nimetatud diabeeditüüpidele eristatakse veel raseduseaegset ehk gestatsioonidiabeeti, mille põhjuseks on insuliiniresistentsus tulenevalt raseduse ajal toodetavatest ühenditest, mis takistavad insuliinil seondumast insuliini retseptoriga (Plows *et al.*, 2018). Lisaks võib olla diabeet põhjustatud endokrinopaatiatest ehk sisesekretsiooninäärmete haigustest (nt häired kilpnäärme talitluses), patoloogilistest muutustest pankreases (nt pankreatiit), teatud ravimite toimel (nt vererõhku alandavad rohud) ning ka mõnede haruldaste geneetiliste haigustega (nt Wolframi sündroom) kaasnevad diabeedi sümptomid (Banday *et al.*, 2020). Magediabeet (ld *diabetes insipidus*) on haigus, millel on seos teiste kirjeldatud diabeetidega vaid nime kaudu: sõna *diabetes* tuleneb kreekakeelsest verbist “läbi minema” ja viitab suurenenud kuseeritusele, mis on iseloomulik nii mage- kui suhkurdiabeedile. Magediabeedi puhul toodetakse aju hüpotaalamuses liiga vähe antidiureetilist ehk kuseeritust vähendavat hormooni.

#### **1.1.4. Diabeet ja Alzheimeri tõbi**

Neurodegeneratiivsete haiguste hulka kuuluvat Alzheimeri tõbe seostatakse pigem muutustega ajus kui organismi glükoosiregulatsioonis. Alzheimeri tõbe iseloomustavad beeta-amüloidi ja/või tau-valgu kuhjumine ajus (Tiwari *et al.*, 2019). Uuringud on näidanud, et diabeediga patsientidel on mitu korda kõrgem risk haigestuda neurodegeneratiivsetesse haigustesse (Ott *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 2019) ja häired insuliini tootmises süvendavad Alzheimeri tõvega

kaasnevaid patoloogilisi muutusi ajus (Hascup *et al.*, 2019; Mehla *et al.*, 2014). Kuna Alzheimeri tõve tekkepõhjusteks peetakse hüperglükeemiat ja insuliiniresistentsust nimetatakse seda vahel ka 3. tüüpi diabeediks (Burillo *et al.*, 2021).

Amüloidoosideks nimetatakse valguainevahetushäireid, mida iseloomustab lahustumatute valkude ehk amüloidide ladestumine kudedesse. Alzheimeri tõve üheks tekkemehhanismiks on beeta-amüloidi nimelise valgu agregeerumine ja kuhjumine ajus. Beeta-amüloidi sekreeritakse ekstratsellulaarsesse ruumi pärast eelühendi, amüloidi prekursorvalgu (APP) proteolüütilist lõikamist (O'Brien ja Wong, 2011). Beeta-amüloid mängib olulist rolli neuronite arengus ja ellujäämises (O'Brien ja Wong, 2011). Muutused beeta-amüloidi tootmises ja lagundamises võivad tekitada hüdrofoobseid beeta-amüloidi agregate (nn amüloidnaastud) (Cras *et al.*, 1991), mille tõttu on häiritud neuronite töö ja tekivad neurodegeneratiivsetele haigustele iseloomulikud kognitiivsed vaegused nagu mälu- ja õppimishäired.

2. tüüpi diabeediga patsientidel on kirjeldatud amüloidagregaatide kuhjumist pankreases (Guardado-Mendoza *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2004). Langerhansi saarekestes toodetakse amüliini ehk saarekete amüloidpolüpeptiidi (IAPP), mida sekreteeritakse beeta-rakkudest koos insuliiniga (Moore ja Cooper, 1991). IAPP kuhjumine pankreases on 2. tüüpi diabeediga patsientidel väga sage leid ning seda seostatakse beeta-rakkude hävimisega (Höppener ja Lips, 2006). IAPP läbib ka veri-aju barjääri (Banks *et al.*, 1995). Uuringud on näidanud, et IAPP suurendab beeta-amüloidi agregeerumist ning võib seega süvendada Alzheimeri tõve kulgu (Ge *et al.*, 2018; Moreno-Gonzalez *et al.*, 2017). Lisaks IAPP-le on 2. tüüpi diabeediga patsientide pankreastest leitud ka Alzheimeri tõvele iseloomulikke beeta-amüloidi agregate (Miklossy *et al.*, 2010). Loomudelites on näidatud, et diabeediga katseloomadel on omakorda suurenenud beeta-amüloidi kontsentratsioon ajus (Mehla *et al.*, 2014; S. Takeda *et al.*, 2010). Kõrget veresuhkru taset seostatakse ka neurodegeneratiivsete häiretega kaasneva kognitiivse võimekuse alanemisega (Cukierman-Yaffe *et al.*, 2009; Manschot *et al.*, 2007; Spauwen *et al.*, 2013).

Ravimid, mida on diabeedi puhul edukalt kasutatud veresuhkru alandamiseks ja glükoositolantsi suurendamiseks (Kondo *et al.*, 2018; Sedman *et al.*, 2016; Toots *et al.*, 2018), avaldavad soodsat mõju ka neurodegeneratiivsete häirete puhul. GLP-1 retseptorid, mille funktsioon on pankreases glükoosi stimuleeritud insuliini vabastamine (Drucker *et al.*, 1987), on ekspresseeritud ka ajus (Hamilton ja Hölscher, 2009). Uuringud on näidanud, et GLP-1 retseptori agonistidel on soodne toime rakkude proliferatsioonile (Perfetti *et al.*, 2000) ning sellel on tõestatud neuroprotektiivne toime (Seppa *et al.*, 2019). GLP-1 agonistid on suutnud parandada katseloomade sooritust mälu katsetes (During *et al.*, 2003) ja vähendada beeta-amüloidi hulka ajus (Perry *et al.*, 2003).

## 1.2. Diabeet ja Wolframi sündroom

### 1.2.1. *WFS1* geeni roll glükoosi homöostaasis

*WFS1* geen paikneb inimesel neljanda kromosoomi väikese õla positsioonis 16.1 (Collier *et al.*, 1996). Selle geeni produktiks on wolframiini nimeline valk (*WFS1*), mille puhul on tegemist ER-i transmembraanse glükoproteiiniga (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). *WFS1* on ekspresseeritud terves organismis: ajus, kopsudes, pankreases, südames ja mujal (Inoue *et al.*, 1998; Luuk *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2016). Pankrease Langerhansi saarekeste rakkudes leidub *WFS1* kõige rohkem beeta-rakkude sekretoorsetes graanulites (Philbrook *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009). Väga vähesel määral on leitud *WFS1* ka alfa-rakkudest, kuidas pankrease eksokriinsetest osadest (juhad ja aatsinused) seda valku leitud ei ole (Osman *et al.*, 2003).

*WFS1*-l on oluline roll organismi glükoosi homöostaasis, osaledes insuliini sekreteerimiseks vajaliku kaltsiumi töös. Glükoosi stimuleeritud insuliini vabastamiseks transporditakse glükoos pankrease beeta-rakkudesse ja metaboliseeritakse, mille tõttu avanevad  $\text{Ca}^{2+}$ -kanalid ja suureneb kaltsiumi sissevool raku. Selle tulemusena aktiveeritakse eksotsütoos ja insuliin vabastatakse vereringesse. *WFS1* on seotud ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi eest vastutava transportvalgu SERCA-ga (sarko/endoplasmaatilise retiikulumi  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaas) ja reguleerib selle tööd (Zatyka *et al.*, 2015). *WFS1* ekspressiooniga suureneb  $\text{Ca}^{2+}$  sissevooluga raku ning seega tõuseb rakusisene kaltsiumikontsentratsioon (Takei *et al.*, 2006). Loommudelis on näidatud, kuidas muutused kaltsiumi homöostaasis põhjustavad beeta-rakkude apoptoosi ja sellega ka suhkurdiabeedi sümptomite teket (Ahn *et al.*, 2015).

*WFS1* roll on kaitsta rakke ER-i stressi eest (Fonseca *et al.*, 2005; Takei *et al.*, 2006). ER-i stressiks nimetatakse olukorda, kus raku on hakanud kuhjuma voltumata või valesti voltunud valgud ning raku talitus on seetõttu häiritud. *WFS1* funktsiooniks on käivitada ER-i stressi korral UPR (ingl *unfolded protein response*) (Fonseca *et al.*, 2005). UPR on signaalirada, mille aktiveerimise tulemusena intensiivistub valkude korrektseks voltumiseks vajalike šaperonide töö, suurendatakse ER-i mõõtmeid, inhibeeritakse valgusünteesi ja lagundatakse valesti voltunud valke (Ron ja Walter, 2007). UPR on vajalik, et vähendada valgusünteesi koormust ER-is ja taastada raku homöostaas (Ron ja Walter, 2007).

Insuliini hulk on beeta-rakkudes pidevalt muutuv. Beeta-rakud tunnetavad pidevalt organismi veresuhkru taset ja peavad suutma kiiresti reguleerida transkriptsiooni, et vajadusel kas tõsta või langetada insuliini tootmist ja sekretsiooni. Kuna beeta-rakkudes toimub väga aktiivne

valgusüntees, on ka valkude valesti voltumise tõenäosus suurem ja seega ka kõrgem risk ER-i stressiks. Kõrgenenud ER-i stressi on täheldatud ülekaalulistel (Ozcan *et al.*, 2004) ning ülekaalulisus on üks peamisi diabeeti haigestumise riskifaktoreid. UPR-i signaalirajas osalev rakustressi tunnetava Inositol-sõltuva ensüümi-1 (IRE1) ekspressioon suureneb ER-i stressi korral ja viib omakorda omakorda ER-i stressivastuse geenide aktiveerimiseni (Calton *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001). Üks UPR-i funktsioonidest on valgusünteesi vähendamine ning on näidatud, et vastusena pidevalt kõrgenenud glükoositasemele intensiivistub IRE1 ekspressioon, mis hakkab lagundama insuliini mRNA-d, et leevendada koormust valgusünteesile ja leevendada sellega ER-i stressi (Pirot *et al.*, 2007). IRE1 kõrgenenud tasemest tingitud insuliini tootmise vähenemine võib olla üks mehhanism, mille tõttu toodetakse 2. tüüpi diabeediga patsientidel insuliini vähem, kuigi pankrease beeta-rakkude arvukus langenud ei ole (Lipson *et al.*, 2008).

Diabeetikutel on kirjeldatud beeta-rakkude apoptoosi ja pankrease väiksemaid mõõtmeid. Kui ER-i stressi ei suudeta rakkudes maandada, võidakse suunata rakud apoptoosi (Sano ja Reed, 2013). Uuringud on näidanud, et häiretest WFS1 funktsionaalsuses ja sellest tingitud ER-i stress on üks mehhanism, mis mängib rolli pankrease beeta-rakkude hävimises (Fonseca *et al.*, 2010; Ishihara *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2006). ER-i stressimarkereid on leitud 2. tüüpi diabeediga patsientidel ning see arvatakse olevat üks põhjustest, mis tekitab häireid beeta-rakkude töös (Laybutt *et al.*, 2007; Shrestha *et al.*, 2021).

### **1.2.2. Wolframi sündroom (WS)**

Mutatsioonid *WFS1* geenis võivad põhjustada Wolframi sündroomi (WS) (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). WS on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mida kirjeldati esimest korda 1938. a (Wolfram ja Wagener, 1938). Selle haiguse sümptomiteks on suhkurdiabeet, nägemise kadu, kurtus, magediabeet ja neuroloogilised häired (Barrett *et al.*, 1995; Wolfram ja Wagener, 1938). Sündroomi esinemissageduseks on Suurbritannias 1:770 000 (Barrett *et al.*, 1995), Põhja-Ameerikas 1:100 000 (Fraser ja Gunn, 1977) ja Liibanonis 1:68 000 (Medlej *et al.*, 2004). Haiguse kandjaid ehk mutatsioonide suhtes heterosügootseid inimesi arvatakse olevat Suurbritannia populatsioonis u 1:354 (Barrett *et al.*, 1995).

*WFS1* geenist on leitud üle 200 mutatsiooni, millest enamik paiknevad 8. eksonis (de Heredia *et al.*, 2013; Rigoli ja Di Bella, 2012). 8. ekson kodeerib *WFS1* valgu transmembraanset ja C-terminaalset osa ning mutatsioonide tõttu selle geenis ei ole sünteesitav valk funktsionaalne või

ei toodeta seda üldse (Barrett *et al.*, 1995). Puudulikust või mittefunktsionaalsest WFS1 valgust põhjustatud vaegused on põhjuseks, miks kujuneb välja WS-i iseloomustav sümptomaatika.

WS-iga patsientide kõige esimeseks sümptomiks on varakult algav suhkurdiabeet (Barrett *et al.*, 1995). *WFS1* geen on ekspresseeritud pankrease beeta-rakkudes (Inoue *et al.*, 1998), kus toimub insuliini tootmine ja sekretsioon. WFS1 roll on vastutada rakusisese  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni eest (Zatyka *et al.*, 2015), mis on vajalik selleks, et beeta-rakkudest insuliini sekreteeritaks. Vähenenud kaltsiumisisaldus beeta-rakkudes võib aga viia nende hävimiseni (Hara *et al.*, 2007). WFS1 tase tõuseb rakkudes ER-i stressi korral (Fonseca *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2004). WS-i puhul on aga beeta-rakkudes vähenenud WFS1 tase, mistõttu ei suudeta neis ER-i stressi leevendada ja see võib omakorda käivitada rakkudes apoptoosiraja (Fonseca *et al.*, 2005). WS-iga patsientide häired veresuhkru regulatsioonis ei ole põhjustatud pankrease beeta-rakkude autoimmuunsest hävimisest nagu 1. tüüpi diabeedi puhul (Cano *et al.*, 2007). WS-iga kaasneva suhkurdiabeedi sümptomite aluseks on puudulikust WFS1 valgust tulenev beeta-rakkude talitluse halvenemine, mille tõttu on häiritud organismi insuliini sekretsioon ja mis võib põhjustada beeta-rakkude apoptoosi (Cano *et al.*, 2007). Seega võib pidada WS-iga kaasnevat diabeeti mitte-autoimmuunseks insuliinsõltuvaks suhkurdiabeediks.

Lisaks suhkurdiabeedile kaasneb WS-iga nägemise ja kuulmise kadu. WFS1 on ekspresseeritud optilises närvis, reetinas ja visuaalkoores (Schmidt-Kastner *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2006). WS-iga patsientidel on täheldatud mitmeid muutusi nägemissüsteemis: atroofia silmanärvis ja nägemisnärvide kiasmis (Barrett *et al.*, 1997; Hilson *et al.*, 2009), silma võrkkesta ganglionirakkude hävimine (Hilson *et al.*, 2009) ja vähenenud aju visuaalkoores ruumala (Lugar *et al.*, 2016). Lisaks kaasneb WS-iga sensorineuraalne kurtus ning tavaliselt halveneb esimesena madalate sageduste kuulmine (Eiberg *et al.*, 2006; Rendtorff *et al.*, 2011).

WS-iga patsientidel on kirjeldatud magediabeeti ja neerutrakti laienemist, millega kaasnevad sagedased kuseteede infektsioonid (Barrett *et al.*, 1995; Rohayem *et al.*, 2011). *WFS1* on ekspresseeritud ka ajus: hipokampuses, mandeltuumas, haistesibulates ja ajukoos (Takeda *et al.*, 2001). WS-iga patsientidel on ka täheldatud mitmeid neuroloogilisi sümptomeid (ataksia, düsfaagia, uneapnoe ja kognitiivsete võimete langus) ning psühhiaatrilisi häired, nt meelelohäired nagu depressioon, ja dementsus (Rohayem *et al.*, 2011; Swift *et al.*, 1990). WS-iga patsientide keskmine eluiga on 30 aastat ning nende peamiseks surmapõhjuseks peetakse hingamispuudulikkust, mis on tingitud ajutüve hingamiskeskuse neuronite hävimisest (Barrett *et al.*, 1995; Hilson *et al.*, 2009; Urano, 2016)

### 1.2.3. Wolframi sündroomiga kaasneva diabeedi ravi

WS-i jaoks puudub ravi ning praegused ravistrateegiad keskenduvad sümptomite leevendamisele, et patsientide eluiga pikendada. WS-i uurimiseks ja võimalike ravimpreparaatide väljatöötamiseks on Tartu Ülikooli katseloomakeskuses aretatud WFS1-puudulik rotimudel. WFS1-puudulikel rottidel ilmnevad alates 3. elukuust järk-järgult süvenevad diabeedi sümptomid: insuliini sekretsiooni vähenemine, glükoositalumatus, kõrgnenud ER-i stressimarkerite tase pankreases, Langerhansi saarekeste massi vähenemine ja glükosuuria. Lisaks muutustele organismi glükoosiregulatsioonis esineb WFS1-puudulikel rottidel katarakt, silmanärvi atroofia, piklikaju neurodegeneratsioon ja ajutüve ruumala kahanemine. WS-i rotimudelis esinevad samad sümptomid, mis WSiga patsientidel ning seega sobib see loomudel WS-i uurimiseks (Plaas *et al.*, 2017).

Inkretiinid on maos toodetavad hormoonid, mida sekreteeritakse pärast sööki ning millel on mõju insuliini sekretsioonile (Kim ja Egan, 2008). Nende hulka kuuluvaid GLP-1 retseptori agoniste kasutatakse 2. tüüpi diabeedi ravis, et parandada patsientide glükoositolerantsi ja suurendada kaalulangust (Dahiya *et al.*, 2020). GIP (ingl *gastric inhibitory polypeptide*) on teine oluline inkretiin, millel on samuti insuliini sekretsiooni suurendav mõju (Vasu *et al.*, 2014). Lisaks on GIP-i funktsioon ennetada insuliini taseme tõusust tingitud hüperglükeemiat (Christensen *et al.*, 2011).

WS-i esimeseks haigusilminguks on suhkurdiabeet, mis esineb pea kõigil WS-iga patsientidel ning sümptomid algavad keskmiselt 6. eluaastal (de Heredia *et al.*, 2013; Pallotta *et al.*, 2019; Rigoli *et al.*, 2018; Urano, 2016). Inkretiinid on suutnud tõsta WS-i loomudelites katseloomade glükoositolerantsi (Kondo *et al.*, 2018; Sedman *et al.*, 2016). Liraglutiid on GLP-1 retseptori agonistide hulka kuuluv inkretiin, mis parandas 2. tüüpi diabeediga patsientide glükeemilist kontrolli (Buse *et al.*, 2009; W.-H. Feng *et al.*, 2019; Marre *et al.*, 2009; Pratley *et al.*, 2010; Russell-Jones *et al.*, 2009). 5 kuud kestnud ravi liraglutiidiga hoidis ära WS-i loomudelisel glükoositalumatuse tekke ja suurendas insuliini sekretsiooni (Toots *et al.*, 2018). Ravi liraglutiidiga oli ühel WSiga patsiendil niivõrd efektiivne, et ta ei vajanud enam insuliini asendusravi (Scully ja Wolfsdorf, 2020).

Uuemate suundadena katsetatakse farmakonide kombinatsioone, millel oleks kõik diabeedi ravis kasutatavate preparaatide soovitud omadused: efektiivne ja kiire veresuhkru taseme langus, kaalukaotuse suurendamine ja väiksem oht insuliini suurenenud sekretsioonist tingitud

hüpopglükeemiaks. Otsitakse ravimeid, millel oleks veelgi tugevam toime WS-iga kaasneva suhkurdiabeedi ravimiseks ja ennetamiseks. Tirzepatide on koagonist, mis aktiveerib nii GLP-1 kui ka GIP-i retseptori ja sellel on märkimismäärne mõju 2. tüüpi diabeediga patsientide glükeemilise kontrolli parandamisele ja kehakaalu langusele (Willard *et al.*, 2020). Kusjuures ravimite kombinatsiooni mõju oli tugevam kui GLP-1 retseptori agonistil üksinda (Frias *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2021).

WS-i nimetatakse neurodegeneratiivseks haiguseks, sest mitmed kaasuvad sümptomid (nt pimedaks jäämine ja neuroloogilised häired) on tingitud närvirakkude hävimisest. GLP-1 ja GIP-i retseptorid on laialdaselt ekspresseeritud ka ajus ning nende aktiveerimine vähendab ER-i stressi ja neuronite põletikku (Duffy ja Hölscher, 2013). Valdavalt diabeedi ravis kasutataval GLP-1 retseptori agonistil liraglutiidil on ka neuroprotektiivne toime (Jagomäe *et al.*, 2021; Seppa *et al.*, 2019 ja 2021) ja ER-i stressi vähendav mõju (Toots *et al.*, 2018; Yusta *et al.*, 2006). Võrreldes liraglutiidiga oli DA-CH5-1, mis toimib kui GLP-1 ja GIP-i koagonist, suurem neuroprotektiivne ja põletikuvastane efekt (Feng *et al.*, 2018). Lisaks on näidatud, et DA-CH5 parandab katseloomade sooritust mälu katsetes ja hoiab ära Alzheimeri tõvele iseloomulike muutuste teket ajus (Cao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Seega võiksid ravimid, mis avaldavad mõju nii GLP-1 kui ka GIP-i retseptorile, olla tugevama toimega, et hoida ära WS-i sümptomite teket ja progresseerumist.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

WS-i jaoks puudub ravi ning praegused ravistrateegiad keskenduvad patsientide sümptomite leevendamisele. Seetõttu on oluline leida ravimeetodeid, mis suudaksid ennetada sümptomite ilmnemist või lükata edasi nende väljakujunemist. Varasem uuring on näidanud, et eluaegne ravi GLP-1 retseptori agonisti liraglutiidiga suudab WS-i loomudelil lükata edasi diabeedi sümptomite teket, kuid seda pooltel katseloomadest (Jagomäe *et al.*, 2021). Seetõttu on oluline leida ravimeetodeid, mis oleksid veelgi efektiivsemad, et WS-iga kaasnevat diabeeti ära hoida. Lisaks diabeedile kaasneb WS-iga palju teisi vaegusi, nt nägemise ja kuulmise kadu ning neuroloogilised häired, mis on põhjustatud närvirakkude hävimisest, mistõttu on oluline leida ravimeid, mis suudaksid leevendada ka WS-iga kaasnevat neurodegeneratsiooni. DA-CH5 on uudne GLP-1 ja GIP-i koagonist, millel on näidatud nii diabeedi sümptomeid leevendav kui ka neuroprotektiivne toime. Seega on käesoleva töö eesmärk selgitada välja, kas DA-CH5 on sarnaselt liraglutiidiga võimeline taastama WS-iga katseloomade glükoositaluvust ja takistada diabeedi sümptomite väljakujunemist. Ühtlasi uuriti, milline on WS-i loomudeli pankrease Langerhansi saarekeste morfoloogia ja kas ravi DA-CH5-ga mõjutab saarekeste rakulist ehitust.

Uurimistöö eesmärgid:

1. Viia läbi 7-päevane krooniline ravi DA-CH5-ga
2. Ravi mõju hindamiseks viia läbi intraperitoneaalne glükoositaluvuse test (IPGTT)
3. Ravi mõju hindamiseks mõõta katseloomade vereseerumist glükagooni, insuliini ja C-peptiidi tase
4. Teostada pankrease Langerhansi saarekeste beeta- ja alfarakkude kvantitatiivne analüüs
5. Hinnata beeta-amüloidi esinemist pankrease Langerhansi saarekestes

## 2.2. Materjal ja meetoodika

### 2.2.1. Loomudel

WFS1-puudulike (*WFS1* geeni 5. eksoni nokaut (KO)) rottide aretust ja fenotüüpi on kirjeldanud Plaas *et al.*, 2017. Katseloomade aretus ning genotüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuse vivaariumis. Käesolevas töös kasutati 5-kuuseid isaseid homosügootseid WFS1-puudulikke (KO) ja kontrollgruppi kuuluvaid metsiktüüpi (WT) rotte. Katseloomad olid puurides kahe- kuni neljakaupa ning neid hoiti 12-tunnises hele/pime tsükliis, kus hele tsükkel algas kl 07.00. Katseloomade toitmiseks kasutati Sniffi universaalset hiire- ja rotisööta ning joogiveena pöördosmoosiga puhastatud vett. Katseloomad said väljaspool katseid tarbida sööki ja jooki piiramatult (*ad libitum*). IPGTT ajal ei antud katseloomadele süüa, aga juua said nad tarbida ilma piiranguteta. Loomkatseid viisid läbi vastava kategooria luba omavad isikud ning käesoleva töö autor tegutses koostöös juhendajatega. Loomkatsete protokollid on kinnitanud loomkatseprojekti loakomisjon (nr 195, 27. aprill 2021) ja kõik katsed on vastavuses 2010. aasta septembris vastu võetud Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga (2010/63/EL).

### 2.2.2. Krooniline ravi DA-CH5-ga

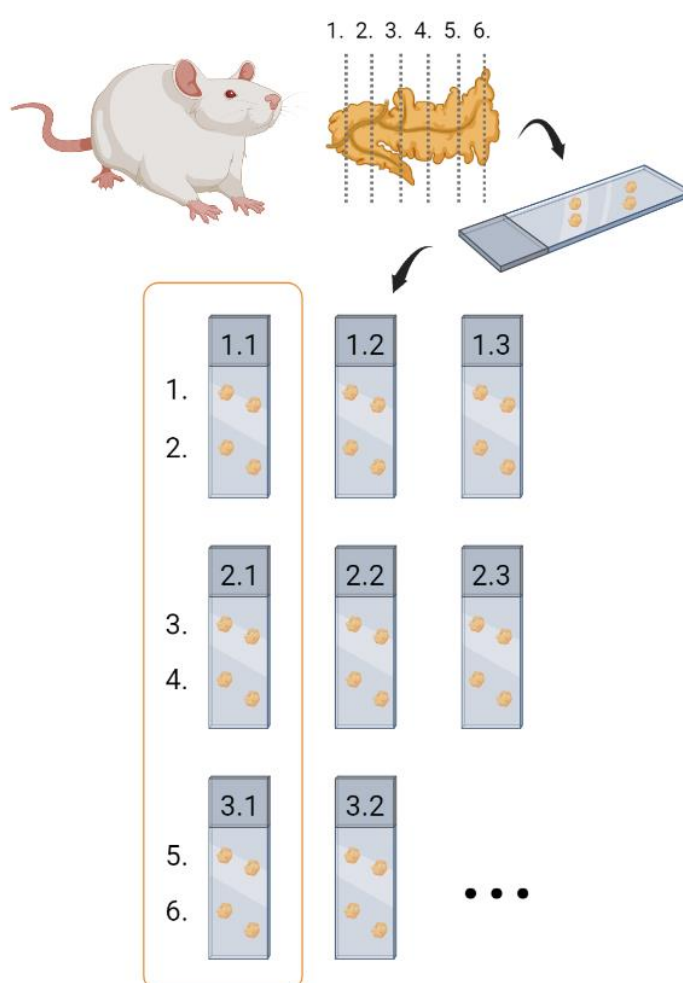
Katset alustati 5 kuu vanuste rottidega, kes jaotati juhuslikult kontrollgruppi ja ravimigruppi (WT Sal, n = 10; KO Sal, n = 8; WT DA-CH5, n = 8; KO DA-CH5, n = 9). Ravimigruppi kuulunud loomadele süstiti iga päev seitse päeva järjest nahaaluselt ehk subkutaanselt DA-CH5. Ravimit süstiti loomadele kontsentratsiooniga 25 nmol/kg. Ravim lahustati enne süstimist fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS) ja viidi ruumalani 1 ml/kg. Kontrollgruppi loomadele süstiti katse toimumise perioodil iga päev subkutaanselt 0,9% füsioloogilist lahust ruumalaga 1 ml/kg.

### 2.2.3. Kudede ettevalmistus ja pankrease lõikude seeria

Katse lõpus hukati loomad dekapitatsiooniga. Pankreas dissekteeriti kogu ulatuses ning fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (Acros Organics, CAS nr 30525-89-4) ja fosfaatpuhvri (137 mM NaCl/27 mM KCl/10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.1% NaN<sub>3</sub>, lahuse pH 7,2) lahuses 24–48 h +4°C juures. Seejärel pesti kudesid fosfaatpuhvris (0.1% NaN<sub>3</sub>, AppliChem, CAS nr 26628-22-8, lahuse pH 7,4). Selleks, et kaitsta rakke külmutamisel tekkivate kahjustuste eest,

jäeti koetükid kaheks päevaks 30% sahharoosi (Fisher S/P770/63) ja fosfaatpuhvri lahusesse. Seejärel mätsiti pankreas külmutusgeeli (FSC 22 Blue, Leica) sisse ning kudesid hoiti kuni edasiste protseduurideni alumiiniumfooliumi sees -80°C juures.

Pankreas lõigati külmutus- ehk krüomikrotoomiga (CM1520, Leica, Saksamaa) -20 °C juures 20 µm paksusteks koelõikudeks, mis asetati alusklaasile (Superfrost Plus, ThermoScientific). Klaasidel olevatest koelõikudest moodustus seeria, mis kattis pankrease kogu ulatuses. Pankrease koelõikude seeria moodustamise protokoll on kirjeldatud joonisel 1. Klaase hoiustati -20°C juures sügavkülmas.



Joonis 1. **Pankrease lõikude seeria moodustamise protokoll.** Külmutatud ja külmutusgeeli mässitud pankreas kinnitati krüomikrotoomi proovihoidja külge ning pankreast lõigati, kuni kogu koetükk oli mikrotoomi tera suhtes samal tasapinnal ja tera lõikas korraga läbi terve proovi. Seejärel hakati lõikama alusklaasidele pandavaid koelõike. Alusklaasile nr 1.1 asetati kaks järjestikku lõigatud 20 µm paksust koelõiku. Kaks järgmist üksteise järel lõigatud 20 µm paksust koelõiku asetati uuele klaasile nr 1.2. Seejärel võeti kolmas klaas nr 1.3, millele asetati järgmised kaks 20 µm paksust lõiku. Seejärel lõigati koetükist maha 1000 µm ehk 1 mm ning järgnevad kaks 20 µm paksust koelõiku pandi uuesti klaasile 1.1 kahe olemasoleva lõigu kõrvale. Järgmised kaks lõiku pandi klaasile 1.2 ning

järgmised kaks klaasile 1.3. Nii oli valminud 3 mikroskoobiklaasi, millest igatüüel 4 koelõiku ning paariliste ehk ühel klaasil olevate üksteise järel lõigatud koelõikude vahe ligikaudu 1000 µm. Seejärel lõigati koetükist maha maha 1000 µm ning järgmised kaks järjestikku lõigatud lõiku asetati uuele klaasile nr 2.1. Edasi korrati sama lõikamise protsessi, kuni valmis said klaasid nr 2.1, 2.2, 2.3. Pärast 1000 µm maha lõikamist, võeti uus klaas nr 3.1 ning pankreast lõigati järgides eelnevalt kirjeldatud protsessi, kuni klaaside 3.1, 3.2 ja 3.3 valmimiseni. Niiviisi lõigates moodustus klaasidest kolm seeriat X.1, X.2 ja X.3, kus teine number indikeerib, millisesse seeriasse klaas kuulub. Iga seeria klaasidel olevad koelõigud katavad pankrease täies ulatuses. Seeriaid moodustati senikaua, kuni pankreas oli tervenisti lõigatud. Immunofluorestsentsiks ja analüüsimiseks valiti kolmest seeriast välja üks (nt joonisel 1 oranži kastiga märgistatud seeria X.1, mis koosneb kolmest klaasist tähistega 1.1, 2.1 ja 3.1). Iga seeria igal klaasil olevast kahest üksteise järel lõigatud koelõigust valiti välja üks, mida edasi analüüsida. Seega analüüsiti iga klaasi kohta kaks koelõiku. Klaase hoiustati mikroskoobi preparaatilede mõeldud karbis -20°C juures. Joonise tegemiseks kasutati veebisaiti BioRender.com.

#### **2.2.4. Immunofluorestsents**

Pankrease Langerhansi saarekeste visualiseerimiseks ja analüüsimiseks kasutati immunofluorestsentsmeetodit. Katses kasutati aluklaasidel olevaid pankrease lõike, mille lõikamise protseduuri on kirjeldatud peatükis 2.2.3. Töid teostati toatemperatuuril ja niiskuskambris välja arvatud juhtudel, kui on täpsustatud teisiti. Kõigepealt pesti klaase 15 min 1x PBS-is. Selleks, et rakumembraanid muutuksid antikehadele läbilaskvaks, permeabiliseeriti koelõike 45 min 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)/PBS lahuses. Antikehade mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks hoiti koelõike 2 h blokeerimislahuses, mis koosnes 0,3M glütsiin/10% eesli seerum (Jackson ImmunoResearch Lab)/1% veise seerumi albumiin (BSA, Sigma-Aldrich)/0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich)/PBS. Primaarsed antikehad kanti klaasidele 1% veise seerumi albumiini/0,1% Tween 20/PBS lahuses, koelõigud kaeti kuivamise vältimiseks parafilmiga (Bemis) ning klaase inkubeeriti niiskuskambris +4°C juures vähemalt 72 h. Inkubeerimise ajal hoiti katteklase otsese valguse eest, et takistada fluorofooride tuhmumist. Käesolevas töös kasutatud primaarsed antikehad ja nende lahjendused on toodud välja tabelis 1. Pärast vähemalt 72 h kestnud inkubeerimist pesti seondumata primaarsed antikehad klaasidelt välja 0,1% Tween-20/PBS lahusega. Sekundaarsete antikehadena kasutati immunoglobuliin (IgG) vastaseid ja fluorofooriga märgistatud antikehi, mis on toodud välja tabelis 2. Sekundaarsed antikehad lisati 0,1% BSA/0,1 Tween-20/PBS lahusesse lahjendusega 1:1000, kanti klaasidele ning neil lasti inkubeerida niiskuskambris ja toatemperatuuril vähemalt 2 h. Seondumata antikehad pesti välja 0,1% Tween 20/PBS lahusega. Rakutuumade värvimiseks kasutati bisbensimiid H33258 (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich)/PBS segu, lahjendusega 1:2500 ning klaasidel lasti seista 1-2

minutit. Seejärel pesti klaase 1x PBS lahusega. Klaasid kuivatati üleliigsest vedelikust, neile tilgutati sulundusvedelikku (Fluoromount, Sigma Aldrich) ning asetati peale 0,17 mm paksune katteklaas (Deltalab). Klaase hoite kuni edasiste analüüsideni -20°C juures. Sekundaarsete antikehade spetsiifilisuse kontrollimiseks (nn negatiivne kontroll) kanti ühele klaasile primaarse antikeha lahus (1% veise seerumi albumiini/0,1% Tween-20/PBS) ilma primaarsete, kuid koos sekundaarsete antikehadega.

Tabel 1. Töös kasutatud primaarsed antikehad ja nende lahjendused

Sihimärkvalk	Peremeesorganism	Lahjendus	Tootja
Insuliin	Merisiga	1:100	Thermo Fisher Scientific Cat# PA1-26938, RRID:AB_794668
Glükagoon	Hiir	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# ABS 033-04-02, RRID:AB_1074636
Beeta-amüloid	Hiir	1:50	Abcam Cat# ab11132, RRID:AB_297770

Tabel 2. Töös kasutatud sekundaarsed antikehad ja nende lahjendused

Sihimärkvalk	Peremeesorganism	Lahjendus	Tootja
Merisea IgG	Kits	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Cat# A-21435, RRID: AB_2535856.
Hiire IgG	Kits	1:1000	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-605-003, RRID: AB_2338902
Hiire IgG	Kits	1:1000	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-515-008, RRID:AB_2338821

## 2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs ja rakkude loendamine

Katses kasutati aluklaasidel olevaid pankrease lõike, mille lõikamise ja lõikude seeria moodustamise protokoll on kirjeldatud peatükis 2.2.3. Pankrease koelõikude pildistamiseks kasutati automaatset mikroskoobiklaaside skännerit ehk nn slaidiskännerit Aperio VERSA 8

(Leica, Saksamaa), mis on varustatud Leica DM6 B mikroskoobiga ja integreeritud kaameraga, et mikroskoobipilti jäädvustada. Fotode kuvamiseks kasutati Aperio VERSA tarkvara versiooni 1.0.4.125 (Leica Biosystems Imaging, Inc.). Kõigepealt pildistati heleväljamikroskoopi kasutades 1,5x suurendusega tervet mikroskoobi klaasi. Seejärel valiti klaasil olevast kahest järjestikku lõigatud pankrease lõigust üks, mida pildistati tumeväljamikroskoopi kasutades 5x suurendusega. 5x suurendusega pildistamisel valgustati lõike 555 nm lainepikkusega laseriga, et ergastada insuliinimolekulide küljes oleva antikehaga seotud fluorofoor ja muuta nähtavaks pankrease insuliini sisaldavad beeta-rakud ning ühes nendega ka Langerhansi saarekesed. Pankrease Langerhansi saarekese morfoloogiat on kirjeldatud peatükis 1.1.2. Kõik fotodel olevad pankrease Langerhansi saarekesed otsiti üles manuaalselt ning neid pildistati tumeväljamikroskoobiga 20x suurendusega. Saarekete pildistamisel ergastati insuliinimolekuli küljes olevat fluorofoori lainepikkusega 555 nm, glükagooni molekuliga seotud fluorofoori lainepikkusega 647 nm ja beeta-amüloidiga seondunud fluorofoori lainepikkusega 594 nm.

20x suurendusega jäädvustatud fotosid Langerhansi saarekestest analüüsiti arvutiprogrammiga Visiopharm (Hørsholm, Taani), kasutades selle tarkvara versiooni 2021.02.5.10297. Iga katselooma puhul analüüsiti 40% kõikidest leitud, pildistatud ja analüüsimist võimaldavatest Langerhansi saarekestest. 40% saarekestest, mida analüüsida, valiti juhuslikult. Huvipakkuvad regioonid ehk Langerhansi saarekesed piiritleti manuaalselt. Seejärel lasti arvutiprogrammil moodustada loendamisraamid (ingl *counting frame*), mis katsid huvipakkuva regiooni pindala 20% ulatuses, ja üles loeti kõik nägemisväljas olevad ja lugemisraami piiridesse jäävad alfa- ja beeta-rakud. See tähendab, et iga katselooma mikroskoobiklaaside seeria kohta analüüsiti 40% kõikidest leitud Langerhansi saarekestest ja igas saarekeses loendati rakud 20% saarekese pindalal.

Piltide järeltöötamiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshopi versiooni 21.1.0 ja Adobe Illustratori versiooni 26.2.1.

#### **2.2.6. Intraperitoneaalne glükoositolerantsi test (IPGTT)**

Kolm tundi enne IPGTT algust hoiti katseloomi ilma söögita. Enne katset ja katse toimumise ajal võisid katseloomad tarbida vett piiramatult (*ad libitum*). Katse alguses mõõdeti iga katselooma veresuhkru baastase. Seejärel manustati igale katseloomale 0,9% füsioloogilises lahuses lahustatud D-glükoosi (Sigma-Aldrich) doosiga 2 g/kg kohta. Ravimit süstiti

katseloomadele kõhuõõnesiseselt ehk intraperitoneaalselt, kasutades 22 G ehk 0,7 mm jämedust nõela. Katseloomade veresuhkrut mõõdeti rottide sabaveenist võetud verest viis korda: 30, 60, 90, 120 ja 180 minutit pärast glükoosilahuse süstimist. Kõiki veresuhkru mõõtmisi teostati kaasskantava glükomeetriga (Accu-Check Go, Roche, Saksamaa).

Selleks, et mõõta katseloomade insuliini, glükagooni ja C-peptiidi taset, võeti IPGTT toimumise ajal katseloomade sabaveenist verd vahetult enne ja 30 minutit pärast glükoosi süstimist. Vereproovidel lasti 30 minutit toatemperatuuril seista ning seejärel tsentrifuugiti proove tsentrifuugis (5424R mikrotsentrifuug, Eppendorf) +4°C juures 15 minutit kiirusega 1000 g. Seejärel eraldati vereproovidest seerum, mida hoiti kuni järgmiste analüüside tegemiseni -80°C juures.

### **2.2.7. Hormoonide taseme mõõtmine**

Hormoonide taseme mõõtmiseks kasutati rottide vabaveeniverest eraldatud seerumit, mille võtmise protseduuri on kirjeldatud peatükis 2.2.6. Seerumi insuliinitaseme mõõtmiseks kasutati komplekti Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA (Crystal Chem, kat 90060). Glükagooni taseme mõõtmiseks kasutati komplekti Rat Glucagon ELISA (CrystalChem kat 81519). C-peptiidi taseme mõõtmiseks kasutati komplekti Rat C-peptide ELISA (CrystalChem, kat 90055). Kõiki komplekte kasutati vastavalt tootja koostatud protokollile.

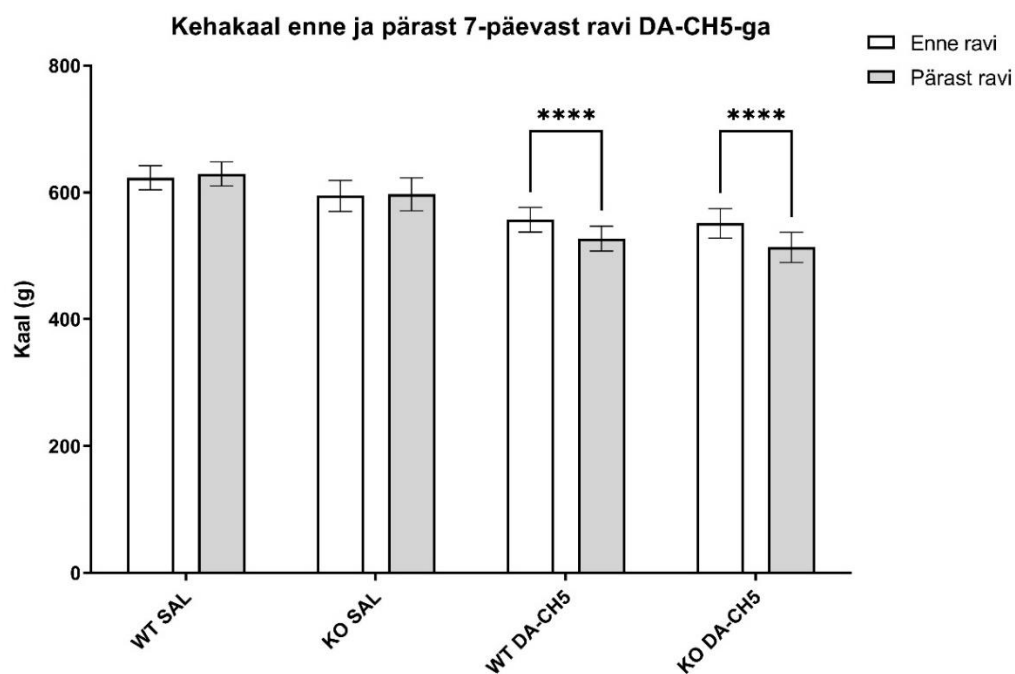
### **2.2.8. Andmete analüüs**

Katsetes mõõdetud andmete analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 9. versiooni tarkvara (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistiliselt oluliseks loeti tulemused, mille p-väärtus on väiksem kui 0,05 ( $p < 0,05$ ). Katseandmed on töös esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM (standardviga, ingl *Standard Error of the Mean*). Katsegruppide keskmiste võrdlemiseks kasutati erinevaid kordusuuringu dispersioonanalüüsi ja *post hoc* teste. Täpsem info kasutatud analüüside kohta on toodud välja käesolevas töös esitatud jooniste all. Statistilist olulisust võrreldi genotüüpide ja ravimeetodi vahel.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Kehakaal

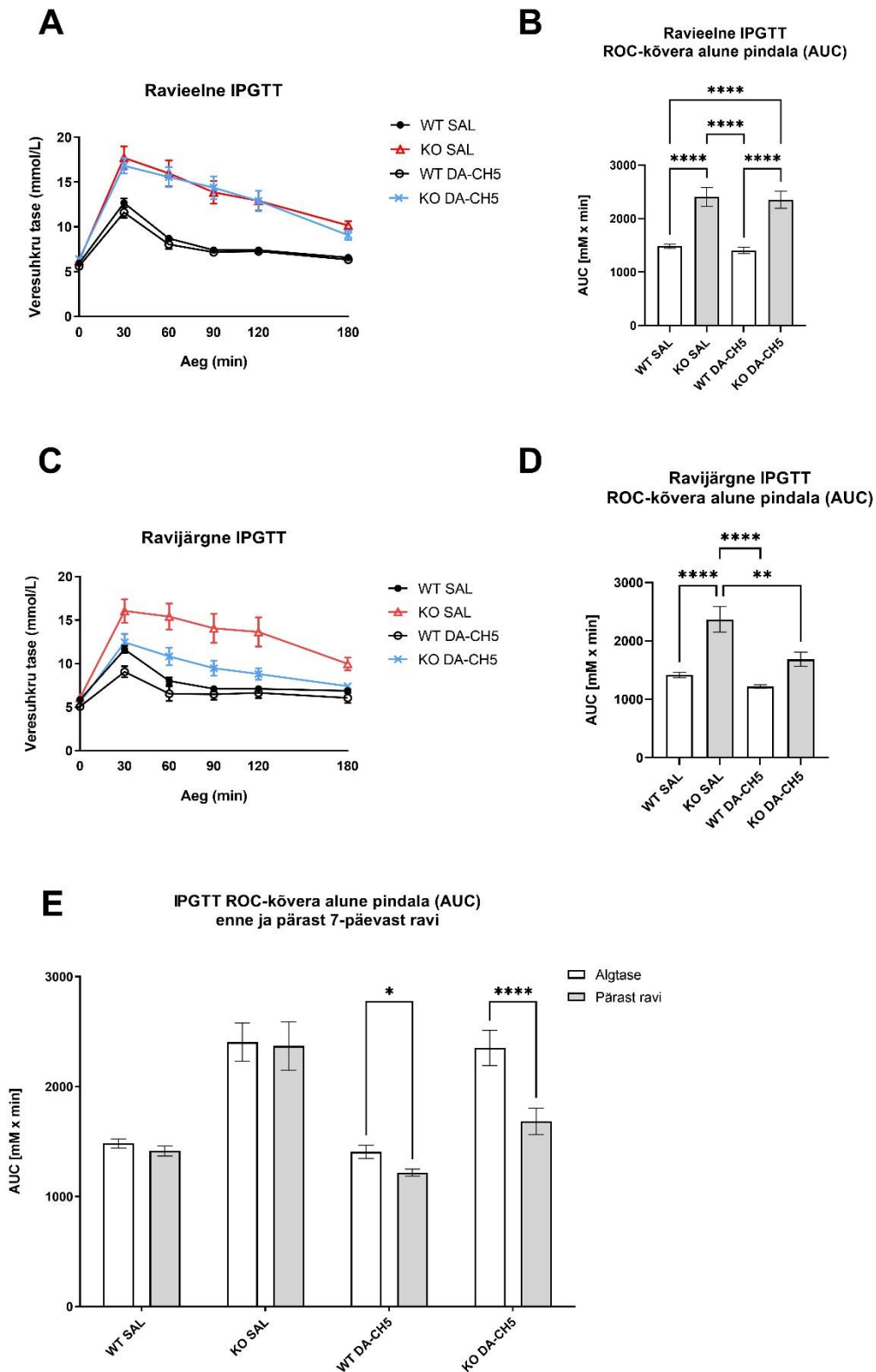
Katseloomi kaaluti enne katse algust ja pärast 7 päeva kestnud ravi DA-CH5-ga. Ravimigrupi kuulunud loomade kehakaal oli võrreldes kontrollgruppi loomadega väiksem, kuid erinevused gruppide vahel ei olnud statistiliselt olulised (joonis 2). Seitse päeva kestnud ravi tulemusena alanes kehakaal mõlemas ravimigrupis, nii WT kui ka KO loomadel, ning muutused olid statistiliselt olulised ( $p < 0,0001$ ). Ravi DA-CH5-ga ei avaldanud mõju ei kontrolligrupi kuulunud WT ega KO loomade kehakaalule.



Joonis 2. **Katseloomade kehakaal enne ja pärast 7-päevast ravi DA-CH5-ga (25 nmol/kg).** Katse alguses olid ravimigrupi kuulunud WT ja KO loomad võrreldes kontrollgruppi kuulunud WT ja KO loomadega kergemad, kuid erinevused ei olnud statistiliselt olulised. WT ja KO kontrollgruppi loomade kehakaalud olid nii enne kui ka pärast ravi sarnased. Pärast 7-päevast ravi DA-CH5-ga ei toimunud kontrollgruppi kuulunud WT ega KO loomade kehakaalus muutusi. 7-päevane ravi DA-CH5-ga alandas kehakaalu nii WT kui ka KO loomadel (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Andmete analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist dispersioonanalüüsi (*Two-way ANOVA*) ja *post hoc* testina Bonferroni testi, kus \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Katseandmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM. Katses kasutati isaseid 5-kuuseid rotte ning valimimahud on järgmised: WT Sal,  $n = 10$ ; KO Sal,  $n = 8$ ; WT DA-CH5,  $n = 8$ ; KO DA-CH5,  $n = 9$ .

### 2.3.2. IPGTT

Enne IGPTT testi tehti platseebo IPGTT, mille vältel süstiti katseloomadele nädal aega järjest subkuntaanselt füsioloogilist lahust (1 ml/kg). Katseloomade glükoositolerantsuse mõõtmiseks viidi läbi IPGTT enne ravikuuri algust ja pärast 7 päeva kestnud ravi DA-CH5-ga. Kõigepealt mõõdeti katseloomade sabaveeniverest võetud veresuhkru baastaase ning seejärel süstiti igale katseloomale glükoosi kontsentratsiooniga 2 g/kg kohta. Nii ravieelse kui ka -järgse IPGTT ajal mõõdeti katseloomade veresuhkru taset 30, 60, 90, 120 ja 180 minutit pärast glükoosi süstimist. Enne ravi algust oli nii kontroll- kui ka ravimigrupi kuulunud KO loomade glükoositolerantsus halvem kui mõlema katsegrupi WT loomadel, mis viitab sellele, et KO loomadel oli kujunenud välja glükoositalumatus (joonis 3 A ja B). 7-päeva kestnud ravi DA-CH-ga suutis parandada KO loomade glükoositolerantsust ning muutused veresuhkru tasemes olid võrreldes KO kontrollgrupi loomadega statistiliselt olulised (\*\*  $p < 0,01$ ) (joonis 3 C ja D). Lisaks parandas ravi ka WT loomade glükoositolerantsust (joonis 3 C ja D). Muutused WT kontroll- ja ravimigrupi veresuhkru tasemes olid võrreldes KO kontrollgrupi loomadega statistiliselt olulised (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) (joonis 3 E).

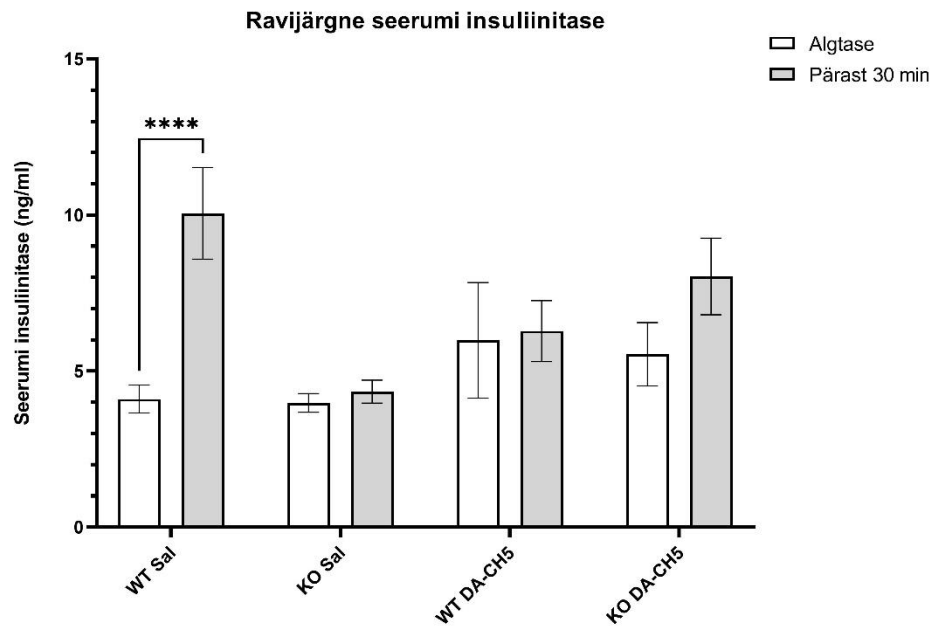
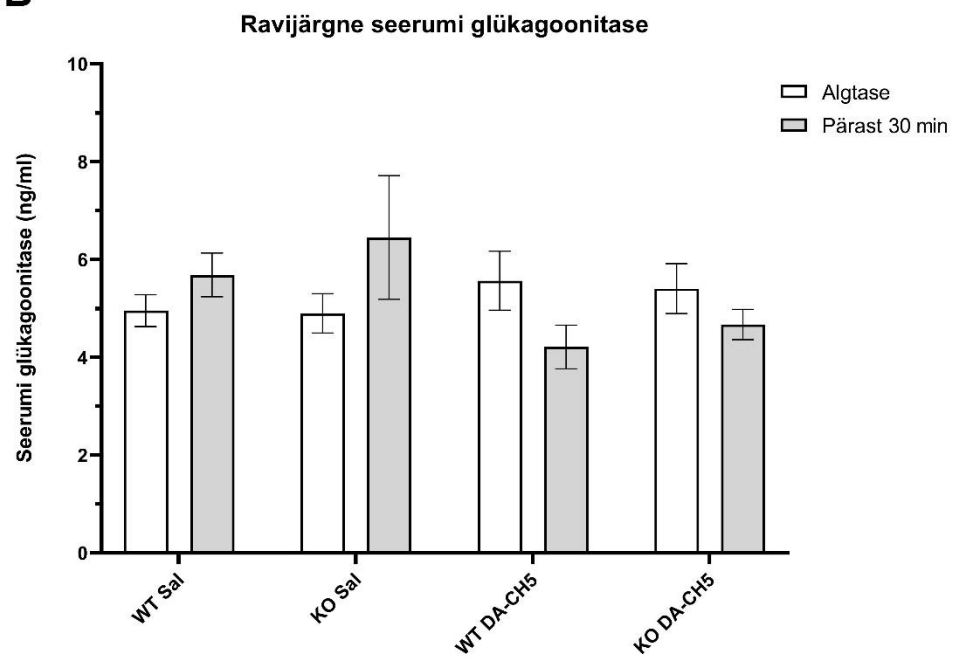


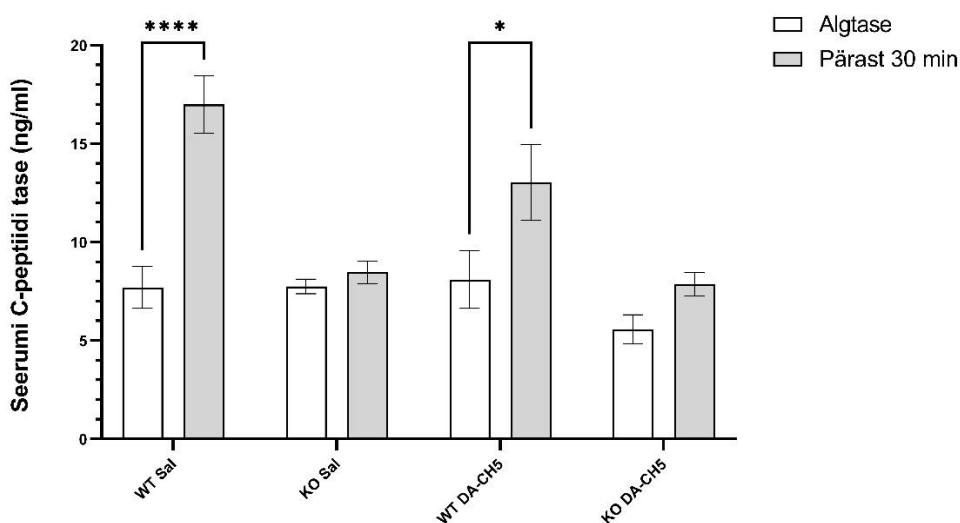
Joonis 3. Katseloomade intraperitoneaalse glükoositolerantsi testi (IPGTT) tulemused enne ravikuuri ja pärast 7-päeva kestnud ravi DA-CH5-ga (25 nmol/kg). IPGTT jaoks mõõdeti kõigepealt katseloomade veresuhkru baastase ning seejärel süstiti igale katseloomale intraperitoneaalselt 0,9% füsioloogilises lahuses lahustatud glükoosi kontsentratsiooniga 2 g/kg. Katseloomade veresuhkru taset mõõdeti 30, 60, 90, 120 ja 180 minutit pärast glükoosi süstimist. Ravieelselt oli nii ravimi- kui ka kontrollgruppi kuulunud KO katseloomade

glükoositalumatus (A ja B). Pärast 7-päeva kestnud ravi DA-CH5-ga paranes ravimigrupi kuulunud KO loomade glükoositalumatus (C ja D). Ravieelne ja – järgne katsegruppide ROC-kõvera aluse pindala (AUC, ingl *area under the ROC curve*) võrdlemine näitab, et muutused ravimigrupi kuulunud WT ja KO loomadel kehakaaludes olid statistiliselt olulised (E). Andmete analüüsimiseks kasutati ühesuunalist dispersioonanalüüsi (*One-way ANOVA*) ning *post hoc* testina Bonferroni testi, kus \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  ja \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Katseandmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM. Katses kasutati isaseid 5-kuuseid rotte ning valimimahud on järgmised: WT Sal,  $n = 10$ ; KO Sal,  $n = 8$ ; WT DA-CH5,  $n = 8$ ; KO DA-CH5,  $n = 9$ .

### 2.3.3. Seerumi insuliini, glükagooni ja C-peptiidi tase

Insuliini ja glükagooni taset mõõdeti IPGTT ajal katseloomade sabaveenivere seerumist enne testi algust ja 30 minutit pärast glükoosi süstimist. Insuliini kontsentratsioon tõusis 30 minutit pärast glükoosi süstimist kõikide katsegruppide loomade vereseerumis (joonis 4 A). Kontrollgrupi WT loomade vereseerumi insuliinitaseme tõus oli statistiliselt oluline (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Võrreldes kontrollgrupi WT loomadega, oli 7 päeva pikkust DA-CH5 ravi saanud WT ja KO loomade insuliinitaseme tõus väiksem. Kontrollgrupi KO loomade insuliinitase tõusis võrreldes teiste katsegruppidega kõige vähem. Pärast glükoosi süstimist tõusis WT ja KO kontrollgrupi loomade seerumi glükagoonitase, kuid ükski tulemus ei olnud statistiliselt oluline (joonis 4 B). 30 minutit pärast glükoosi süstimist langes ravimigrupi kuulunud WT ja KO loomade glükagooni tase, kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. Seerumi C-peptiidi tase tõusis pärast glükoosi süstimist nii WT ravimigrupi kui ka kontrollgrupi loomadel (joonis 4 C). DA-CH5 ravi saanud KO loomadel tõusis samuti C-peptiidi tase, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline.

**A****B**

**C****Ravijärgne seerumi C-peptiidi tase**

Joonis 4. **Katseloomade insuliini, glükagooni ja C-peptiidi tase vereseerumis enne ja pärast 2 g/kg glükoosi süstimist.** Katse lõpus tehtud IPGTT ajal mõõdeti katseloomade insuliini, glükagooni ja C-peptiidi tase enne ja 30 minutit pärast glükoosi süstimist (doosiga 2 g/kg kohta) võetud sabaveeniverest eraldatud seerumist. 30 minutit pärast glükoosi süstimist tõusis insuliini tase kõigis katsegruppides, kuid enim kontrollgrupi WT loomadel, kelle insuliinitaseme suurenemine oli statistiliselt oluline (A). Glükagooni tase langes pärast glükoosi süstimist ravimit saanud WT ja KO loomadel, kuid tulemused ei olnud statistiliselt olulised (B). C-peptiidi tase tõusis nii kontrollkui ka ravimigrupi WT loomadel ning on näha tendents, et C-peptiidi tase tõusis ka DA-CH5 ravi saanud KO loomadel (C). Andmete analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist dispersioonanalüüsi (*Two-way ANOVA*) ning *post hoc* testina Bonferroni testi, kus \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Katseandmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM. Katses kasutati isaseid 5-kuuseid rotte ning valimimahud on järgmised: WT Sal,  $n = 10$ ; KO Sal,  $n = 8$ ; WT DA-CH5,  $n = 8$ ; KO DA-CH5,  $n = 9$ .

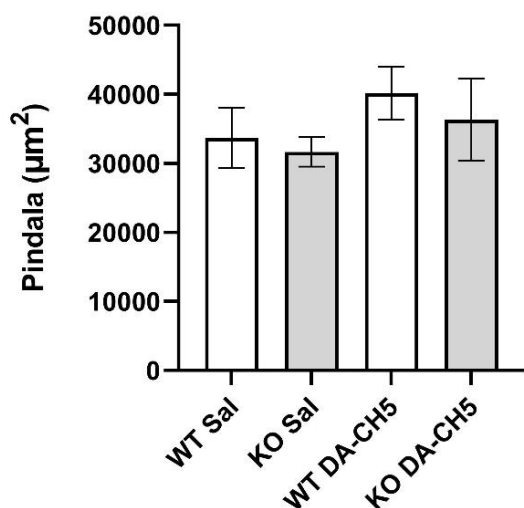
**2.3.4. Beeta- ja alfa-rakkude kvantitatiivne analüüs**

Katseloomade pankrease Langerhansi saarte immunofluorestsentsanalüüsiks kasutatud meetodikat on kirjeldatud peatükkides 2.2.3, 2.2.4 ja 2.2.5. Beeta- ja alfa-rakud paiknevad pankrease Langerhansi saarekestes. Kõikide katsegrupi analüüsitud saarekeste pindalade keskmiste erinevused ei olnud statistiliselt olulised (joonis 5). Alfa- ja beeta-rakke loetleti 20% saarekese pindalal. Loetletud alfa-rakkude keskmiste vahelised erinevused ei olnud statistiliselt olulised (joonis 6 A). Võrreldes WT loomadega oli nii ravimi- kui ka kontrollgrupi KO loomadel vähem beeta-rakke (joonis 6 B). Suurim erinevus oli kontrollgrupi KO loomade ja 7 päeva DA-CH5 ravi saanud WT loomade vahel (\*\*  $p < 0,01$ ). Jagades loetletud rakkude arvu saarekese pindalaga, selgus, et KO loomadel on pindalaühiku kohta keskmisest rohkem alfa-rakke kui WT loomadel, kuid need erinevused polnud statistiliselt olulised (joonis 6 C).

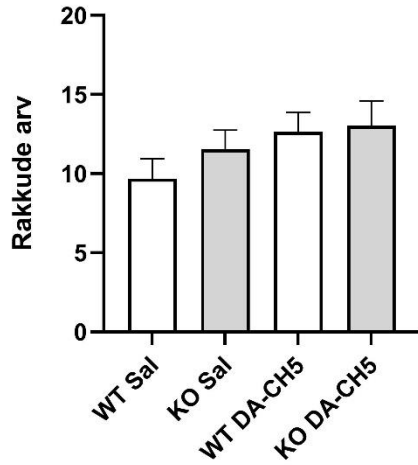
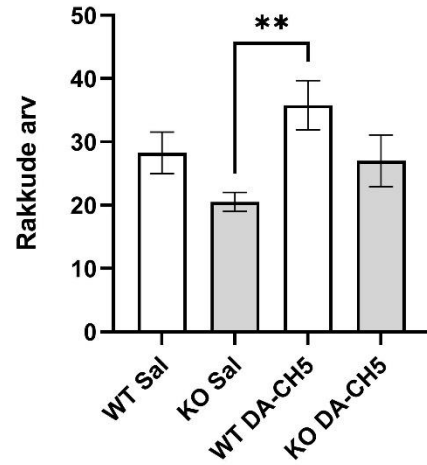
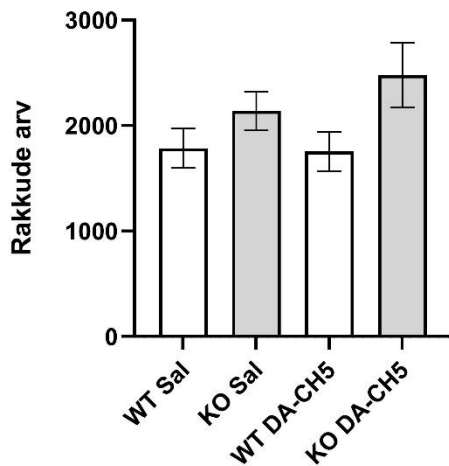
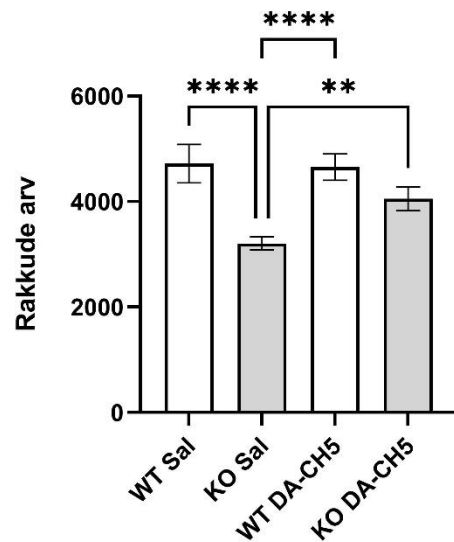
Pindalaühiku kohta oli keskmine beeta-rakkude arv kontrollgrupi KO loomadel oluliselt väiksem kui kõikidel teistel katsegruppidel (joonis 6 D). 7-päeva DA-CH5 ravi saanud KO loomadel oli keskmiselt rohkem beeta-rakke kui ravimit mittesaanud kontrollgrupi KO loomadel (\*\*  $p < 0,01$ ).

Kõikide katsegrupi Langerhansi saarekesed on alfa-ja beetarakkude paiknemise koha pealt morfoloogiliselt sarnased (joonis 7). Langerhansi saarekeste morfoloogiline analüüs näitab, et alfa-rakud paiknevad saarekese perifeerias ning beeta-rakud keskosas. Visuaalselt on kontrollgrupi KO loomadel võrreldes kõikide teiste katsegruppidega näha rohkem alfa-rakke (joonis 8).

### Langerhansi saarekese pindala



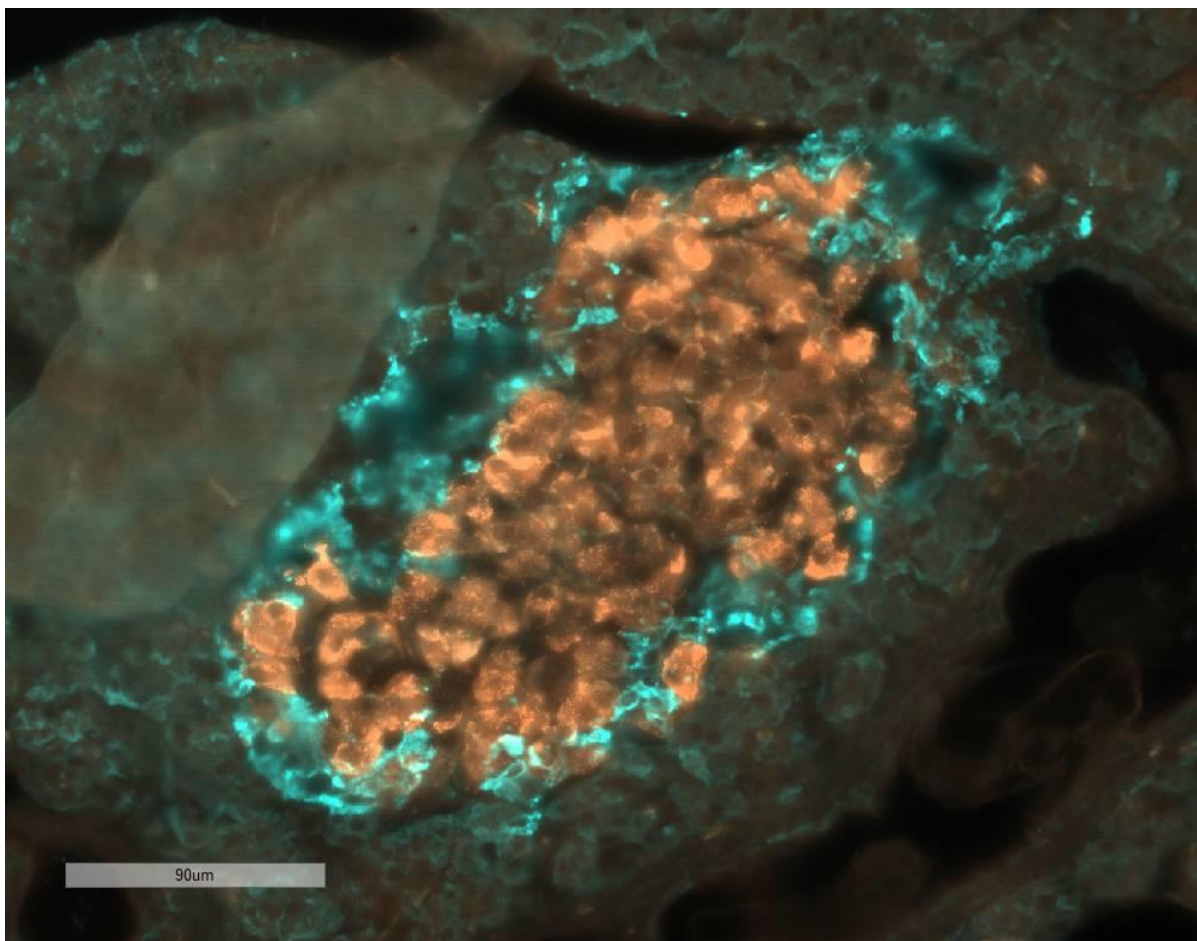
Joonis 5. **Pankrease Langerhansi saarekeste keskmine pindala.** Kõikides katsegruppides oli analüüsitud saarekeste keskmine pindala suurem kui 30 000 μm<sup>2</sup> ehk 0,03 mm<sup>2</sup>. Katsegruppide vahelised Langerhansi saarekeste keskmiste pindalade erinevused ei olnud statistiliselt olulised. Andmete analüüsimiseks kasutati ühesuunalist dispersioonanalüüsi (*One-way ANOVA*), kus statistiliseks oluliseks loeti  $p$ -väärtus  $< 0,05$ . Andmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM. Analüüsideks kasutati 5-kuuste isaste rottide pankreasi ning valimimahud on järgmised: WT Sal,  $n = 4$ ; KO Sal,  $n = 4$ ; WT DA-CH5,  $n = 4$ ; KO DA-CH5,  $n = 4$ .

**A****Alfa-rakkude arv 20% saarekese pindalal****B****Beeta-rakkude arv 20% saarekese pindalal****C****Alfa-rakkude arv / 20% saarekese pindalast (mm<sup>2</sup>)****D****Beeta-rakkude arv / 20% saarekese pindalast (mm<sup>2</sup>)**

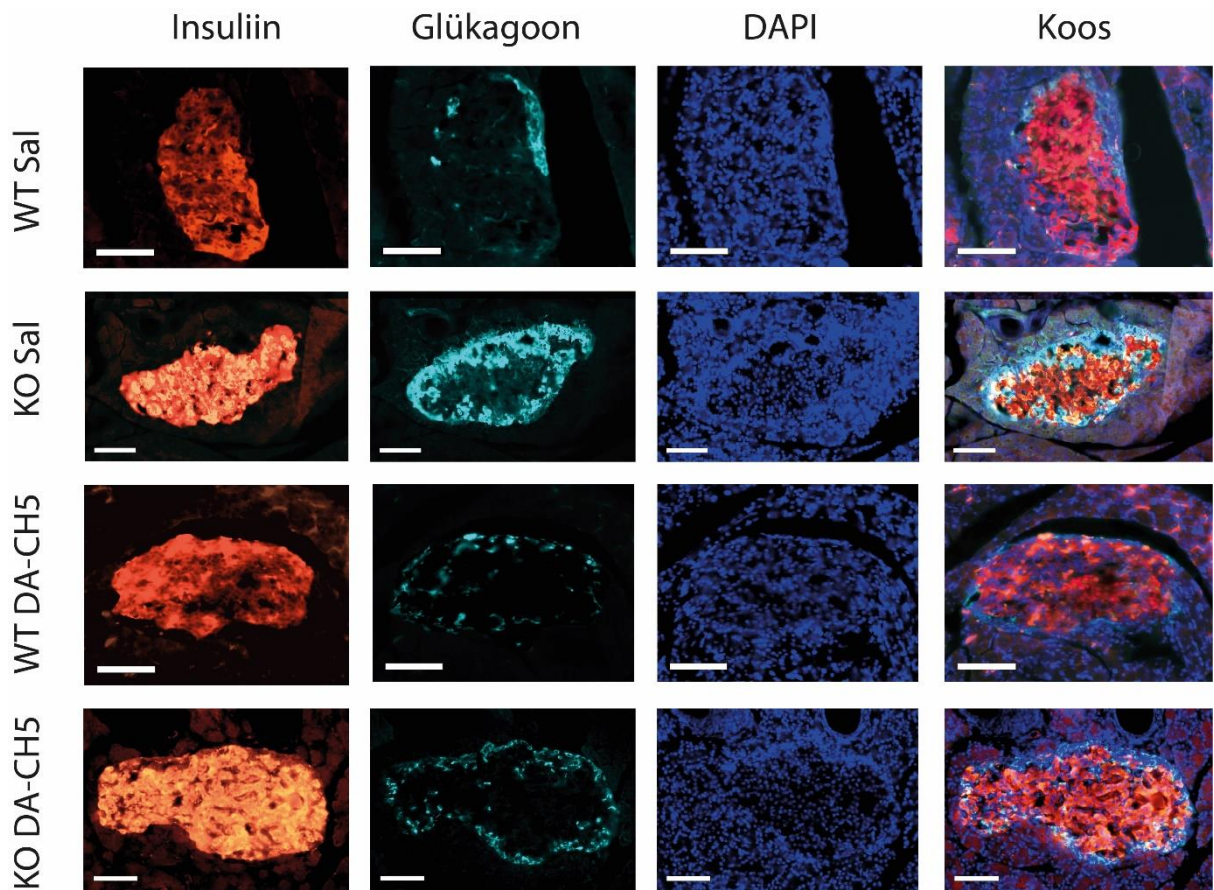
Joonis 6. Pankrease Langerhansi saarekete alfa- ja beeta-rakkude keskmine arv erinevates katsegruppides.

Analüüsideks kasutati 40% iga looma leitud ja analüüsimest võimaldavatest Langerhansi saarekestest. Alfa- ja beeta-rakke loetleti 20% iga saarekese pindalast. Alfa-rakkude kvantitatiivne analüüs näitas, et alfa-rakkude keskmises arvus ei ole katsegruppide vahel erinevusi (A). Võrreldes WT loomadega oli KO loomadel beeta-rakke vähem ning KO kontrollgrupi loomade keskmine beeta-rakkude arv oli väiksem kui 7-päeva pikkust DA-CH5 ravi saanud WT loomade beeta-rakkude keskmine arv (\*\* p < 0,0001) (B). Pindalaühiku kohta oli ravimit saanud ja

kontrollgrupi KO loomade keskmine alfa-rakkude arv suurem kui mõlema grupi WT loomadel (**C**). Beeta-rakkude keskmine arv oli KO kontrollgrupi loomadel võrreldes kõikide katsegruppidega vähenenud ning ravimit saanud KO loomade beeta-rakkude keskmine arv pindalaühiku kohta oli suurem kui kontrollgrupi omadel (**D**). Andmete analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist dispersioonanalüüsi (*Two-way ANOVA*) ning *post hoc* testina Bonferroni testi, kus \*\*  $p < 0,01$  ja \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Katseandmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM. Katses kasutati isaseid 5-kuuseid rotte ning valimimahud on järgmised: WT Sal,  $n = 4$ ; KO Sal,  $n = 4$ ; WT DA-CH5,  $n = 4$ ; KO DA-CH5,  $n = 4$ .



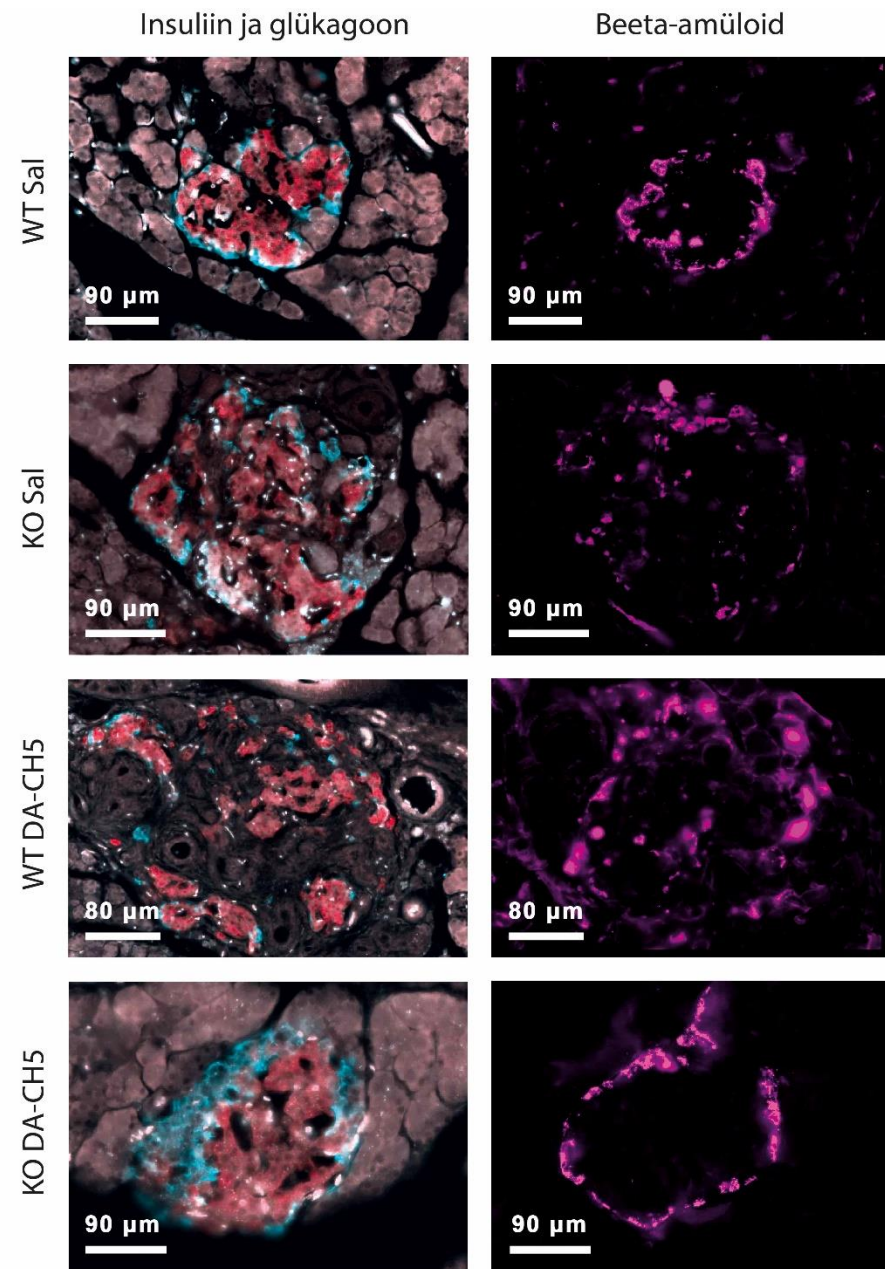
Joonis 7. Näitlikustav foto pankrease Langerhansi saarekese rakulisest ehitusest. Insuliini sisaldavad beeta-rakud on värvitud oranžiga ja glükagooni sisaldavad alfa-rakud sinisega. Joonisel on kujutatud WT kontrollgruppi kuulunud katselooma Langerhansi saarekest. Mõõtejoone pikkus on 90  $\mu\text{m}$ .



Joonis 8. Näitlikustavad fotod kõikide katsegruppide Langerhansi saarekestest. Insuliini sisaldavad beeta-rakud on värvitud oranžiga ja glükagooni sisaldavad alfa-rakud sinisega. Rakutuumavärving on teostatud DAPI-ga. Visuaalsel vaatlusel paistab, et võrreldes teiste katsegruppidega on kontrollgrupi KO loomadel on rohkem alfa-rakke. DA-CH5 ravi saanud KO loomade saarekesed sarnanevad morfoloogiliselt pigem WT loomade kui KO kontrollgrupi loomade saarekestega. Joonistel on kujutatud analüüsides kasutatud Langerhansi saareke iga katsegrupi ühelt loomalt. Mõõtejoone pikkus on 90 µm.

### 2.3.5. Beeta-amüloid Langerhansi saarekestes

Morfoogilise anüüsi tulemusena selgus, et pankrease Langerhansi saarekestes leidub beeta-amüloidi valku (joonis 9). Beeta-amüloid esines saarekestes olenemata katsegrupist ning visuaalsel vaatlusel näib, et valk on lokaliseeritud nii alfa- kui ka beeta-rakkudesse.



Joonis 9. Näitlikustavad kuvandid beeta-amüloidi valgu esinemisest pankrease Langerhansi saarekestes. Joonisel on kujutatud üks Langerhansi saareke iga katsegrupi loomalt. Punasega on värvitud insuliin ning sinisega glükagoon. Parempoolsemas veerus on näha lillaga värvitud beeta-amüloidi valk. Mõõtejoone pikkused on toodud igal fotol eraldi välja.

## 2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, milline on GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 mõju WFS1-puudulike katseloomade diabeedi sümptomite leevendamisele. Lisaks kirjeldati WFS1-puudulike ja WT katseloomade pankrease Langerhansi saarekeste morfoloogilisi erinevusi ja selgitati välja, kas ravil DA-CH5-ga on mõju saarekeste rakulisele ehitusele. Uurimisküsimuste väljaselgitamiseks kasutati töös mitmeid meetodikaid: IPGTT-d, hormoonide taseme mõõtmist ja immunofluorestsentsanalüüsi.

Kõikidesse katsegruppidesse kuuluvaid loomi kaaluti enne ja pärast 7 päeva kestnud katset. 7-päevane ravi DA-CH5-ga alandas kehakaalu nii WFS1-puudulikel kui ka WT loomadel. Kontrollgruppidesse kuulunud loomade kehakaaludes muutusi ei toimunud. DA-CH5 mõjub kui GLP-1 ja GIP-i retseptori agonist. Uuringud on näidanud, et GLP-1 retseptori agonistil liraglutiidil on WSi rotimudelil kehakaalu alandav toime (Jagomäe *et al.*, 2021; Seppa *et al.*, 2019, 2021; Toots *et al.*, 2018). Ühtlasi vähendab GLP-1 retseptori aktiveerimine söögiisu, millel on samuti oluline roll kehakaalu langetamises (Flint *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2006). Üksnes GIP-i retseptori aktiveerimisel ei ole kehakaalu alandavat toimet leitud, kuid selle retseptori analoog suurendab GLP-1 retseptori aktiveerimisest indutseeritud kaalukaotust (Nørregaard *et al.*, 2018). GIP-i ja GLP-1 koagonistid on suutnud 2. tüüpi diabeediga patsientidel langetada kehakaalu rohkem kui üksnes GLP-1 retseptori agonist dulaglutiid (Frias *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2021). Ülekaal on diabeeti haigestumise üks põhilisimaid riskifaktoreid (Bellou *et al.*, 2018). 1. tüüpi diabeediga patsientidel suurendab rasvumine insuliinisresistentsuse riski ja raskendab haiguskulgu (Schueren *et al.*, 2021). Seega on kehakaalu reguleerimine väga oluline diabeedi sümptomite kontrolli all hoidmiseks ning käesolevas töös tehtud katse DA-CH5-ga näitab, et sellest ravimist võiks olla abi diabeediga kaasnevate kaaluprobleemide leevendamiseks.

Selleks, et mõõta katseloomade glükoositaluvust ja DA-CH5 mõju organismi glükeemilisele kontrollile, tehti loomadele enne ja pärast ravikuuri IPGTT. Ravieelselt oli WFS1-puudulike loomade veresuhkru tase IPGTT testis kõrgem kui WT loomadel ning neil oli 5-kuuselt kujunenud välja glükoositalumatus. WSi loomudel on näidatud, et WFS1-puudulike rottide glükoositaluvus hakkab halvenema alates 3. elukuust ning 7. elukuuks on katseloomade glükoositalumatus oluliselt kehvem kui WT loomadel (Plaas *et al.*, 2017). Võrreldes WT loomadega on WFS1-puudulikel katseloomadel väiksem Langerhansi saarekeste mass (Plaas *et al.*, 2017; Riggs *et al.*, 2005; Toots *et al.*, 2018). Pankrease Langerhansi saarekeste beeta-rakkudes toodetakse insuliini, mis on organismi veresuhkru taset langetav hormoon.

Mutatsioonid *WFS1* geenis põhjustavad ER-i stressi, mis võib viia beeta-rakud apoptoosi (Fonseca *et al.*, 2010). Käesolevas töös leiti, et *WFS1*-puudulikel katseloomadel on pindalaühiku kohta vähem beeta-rakke kui WT loomadel. Samuti on *WFS1*-puudulike patsientidel täheldatud Langerhansi saarekeste atrofeerumist ja vähe insuliiniposiitviseid rakke (Karasik *et al.*, 1989). Beeta-rakkude hävimine võib olla seega üks põhjustest, miks on *WFS1*-puudulike katseloomade glükoositaluvus langenud.

7 päeva kestnud ravi DA-CH5-ga parandas *WFS1*-puudulike katseloomade glükoositaluvust. Ravi GLP-1 retseptori agonisti liraglutiidiga on kõikides käesolevas töös kasutatud *WFS1*-puudulike loomade veresuhkru taset (Jagomäe *et al.*, 2021; Seppa *et al.*, 2019; Toots *et al.*, 2018). GLP-1 retseptori agoniste, sh liraglutidi, kasutatakse 2. tüüpi diabeedi ravis ning neil on patsientide glükeemilist kontrolli parandav toime (Buse *et al.*, 2009; W.-H. Feng *et al.*, 2019; Marre *et al.*, 2009; Pratley *et al.*, 2010; Russell-Jones *et al.*, 2009). GLP-1 retseptori agonistide veresuhkru taset alandav mõju on põhjustatud tema insuliini sekretsiooni stimuleerivast ja glükagooni sekretsiooni inhibeerivast toimest (Holst, 2019). Käesolevas töös leiti, et ravi DA-CH5-ga parandas *WFS1*-puudulike katseloomade glükoositaluvust ning ravijärgset vereseerumi insuliinitaset mõõtes selgus, et ka katseloomade insuliini tase on tõusnud, kuigi muutus ei olnud statistiliselt oluline. C-peptiidi tekib insuliiniga ekvimolaarses koguses ning selle poolestusaeg on u 20 min (Cañas *et al.*, 1995). C-peptiidi tase veres näitab seega nii esimeses kui ka teises faasis sekreteeritud insuliini hulka. Sarnaselt insuliiniga oli ka C-peptiidi hulk ravimit saanud *WFS1*-puudulikel loomadel tõusnud. Seega võis katseloomade veresuhkru tase alaneda tänu DA-CH5 toimele aktiveerida GLP-1 retseptoreid, millel on omakorda insuliini sekretsiooni suurendav mõju.

Insuliini eelühendiks on proinsuliin, mille A ja B ahelate ühendamisel moodustub insuliini molekul ning eraldub C ahel ehk nn C-peptiid. *WFS1* puudulikkus põhjustab rakkudes ER-i stressi (Fonseca *et al.*, 2010), mille tõttu on häirunud ER-i töö ja ühes sellega ka valgusüntees. Kui valgusüntees on tulenevalt ER-i stressist inhibeeritud, väheneb ka insuliini protsessing ehk proinsuliini konverteerimine insuliiniks. *WFS1*-puudulikel hiirtel on leitud, et neil on WT grupist suurem proinsuliini tase (Noormets *et al.*, 2011). GLP-1 retseptori agonistil on tõestatud ER-i stressimarkereid vähendav toime (Cheng *et al.*, 2021; Toots *et al.*, 2018). GLP-1 agonistid on suutnud katseloomadel vähendada proinsuliini hulka mis viitab sellele, et rakkudes oli paranenud proinsuliini konverteerimine insuliiniks (Degn *et al.*, 2004; L. Wang *et al.*, 2014). GLP-1 retseptori agonistide ER-i stressi vähendav mõju ja sellest tulenev insuliini protsessingu paranemine võib olla üks põhjustest, miks langetas ravi DA-CH5-ga *WFS1*-puudulike katseloomade veresuhkru taset.

DA-CH5 aktiveerib peale GLP-1 retseptori ka GIP-i retseptori. GIP on lisaks beeta-rakkudele ekspresseeritud ka alfa-rakkudes (El ja Campbell, 2020). Tervetel inimestel suurendab madala veresuhkru korral GIP-i aktiveerimine glükagooni sekretsiooni, et tõsta vere glükoositaset, ning hüperglükeemilises olukorras ei tõsta GIP mitte glükagooni, vaid hoopiski insuliini sekretsiooni (Christensen *et al.*, 2011). Uuringud on näidanud, et glükoosi suurenenud kontsentratsioonidel mõjubki glükagoon insuliini sekretsiooni suurendavalt (Capozzi *et al.*, 2019; Svendsen *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019). GIP-i positiivne efekt insuliini sekretsioonile on aga 2. tüüpi diabeediga patsientidel häirunud (Meier ja Nauck, 2010; Nauck *et al.*, 1993). Erinevalt 1. tüüpi diabeediga patsientidest mõjub hüperglükeemilises olukorras 2. tüüpi diabeediga patsientidele GIP-i süstimine glükagooni sekretsiooni suurendavalt (Lund *et al.*, 2011). Uuringud on aga näidanud, et võrreldes monoagonistidega on GLP-1 ja GIP-i koagonistid efektiivsemad (Frias *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2021). Sellest võib järeldada, et koagonistidel on koostoimes uudne farmakodünaamiline profiil, millel on väga tugev veresuhkrut alandav mõju, kuid mille täpne toimemehhanism ei ole veel teada.

Selleks, et uurida, kas ja missugune mõju on DA-CH5-l pankrease Langerhansi saarekeste rakulisele ehitusele, tehti koelõikudele immunohistokeemia ja loendati saarekeste alfa- ja beeta-rakud. Katses kasutati 5 kuu vanuseid loomi ning olenemata genotüübist oli kõikide katsegruppide Langerhansi saarekeste keskmine pindala üle 30 000  $\mu\text{m}^2$  ehk 0,03  $\text{mm}^2$ . WS-i rotimudelil on varem näidatud, et 3- ja 7-kuuste loomadel on enamik saarekesi ligikaudu 0,03  $\text{mm}^2$  suuruse pindalaga ja seda nii WFS1-puudulikel kui ka WT loomadel (Plaas *et al.*, 2017). Iga katselooma pankrease lõikude seeriast analüüsiti 40% kõikidest leitud Langerhansi saarekestest ning kui saarekeste keskmised pindalad on võrreldavad, siis see näitab, et muutused saarekeste rakulises ehituses ei ole tingitud saarekeste suurusest.

Beeta-rakkude süstemaatilise loendamise tulemusena selgus, et WFS1-puudulikel katseloomadel on võrreldes mõlema grupi WT loomadega ja 7-päevast DA-CH5 ravi saanud KO loomadega beeta-rakkude arvukus väiksem. IPGTT testi tulemused näitasid samuti, et kontrollgrupi loomadel oli 5. elukuuks kujunenud välja glükoositalumatus ning neil ei tõusnud pärast ravi seerumi insuliinitase. Beeta-rakkude arvukuse vähenemine võib olla ka põhjus, miks WFS1-puudulikel loomadel on vähenenud glükoositaluvus ja insuliini sekretsioon. Käesolevas töös leiti, et alfa-rakkude arvukus pindalaühiku kohta on WFS1-puudulikel loomadel suurem kui WT loomadel. Seega võis WFS-1 puudulike loomade halvem glükoositaluvus väljenduda Langerhansi saarekeste rakulises ehituses. Nimelt on leitud, et alfa-rakkude arv on tõusnud diabeedi sümptomitega närilistel (Gannon *et al.*, 2000; Starich *et al.*, 1991).

WSi loomudelis hakkab Langerhansi saarekeste mass kahanema alates 7. elukuust ning 14. elukuuks on WFS1-puudulikel loomadel enamik saarekestest hävinud (Plaas *et al.*, 2017). Sellest tulenevalt oleks tarvilik leida ravimeid, mis suudaksid hoida ära pankrease beeta-rakkude apoptoosi ja suurendada olemasolevate rakkude proliferatsiooni, et taastada algne rakupopulatsioon ning leevendada insuliini puudulikkusest tulenevaid diabeedi sümptomeid.

Hiirtega tehtud uuringud on näidanud, et ulatuslik beta-rakkude hävimine aktiveerib beeta-rakkude jagunemise (Cano *et al.*, 2007). Kui enamik beeta-rakkudest on hävinenud, hakkavad alfa-rakud transdiferentseeruma beeta-rakkudeks (Chera *et al.*, 2014; Thorel *et al.*, 2010). Alfa-rakkude transdiferentseerumiseks ei pea aga ootama, kuni enamik beeta-rakkude populatsioonist on hävinenud. On leitud, et neurotransmitter GABA on alfa-rakkude beeta-rakkudeks konverteerimise põhimediaator ning selle annustamine initsieerib alfa-rakkude muutumise beeta-rakkudeks (Ben-Othman *et al.*, 2017). GLP-1 retseptori agonisti puhul on näidatud, et see stimuleerib beeta-rakkudes GABA sünteesi (Wang *et al.*, 2007). Seega võiks DA-CH5-st, mis aktiveerib samuti GLP-1 retseptori, olla kasu, et takistada WS-iga kaasnevat beeta-rakkude hävimist ja sellest tingitud häireid glükoosiregulatsioonis.

Beeta-amüloidi on leitud 2. tüüpi diabeediga patsientide pankrease kudede analüüsimisel (Miklossy *et al.*, 2010). Amüloidagregaatide kuhjumist pankreases seostatakse beeta-rakkude hävimise ja diabeedi sümptomite süvenemisega (Höppener ja Lips, 2006). See andis alust eeldada, et ka käesolevas töös kasutatud WSi rotimudelil võiks ilmned a beeta-amüloidi kuhjumine saarekestes. Töö tulemusena selgus, et beeta-amüloidi valku esineb Langerhansi saarekestes sõltumata katsegrupist. Töös ei hinnatud valgu hulka kvantitatiivselt ning seetõttu ei saa teha järeldusi katsegruppide vaheliste võimalike erinevuste kohta. Amüloidide agregeerumit pankreases tasuks uurida edasi seoste tõttu neurodegeneratiivsete haigustega, mis on iseloomulikud ka WSile. Uuringud on näidanud, et diabeediga kaasnevad patoloogilised muutused mõjutavad ka neurodegeneratiivsete häirete teket (Morales-Corraliza *et al.*, 2016; Takeda *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Langerhansi saarekestes sünteesitav IAPP põhjustab Alzheimeri sümptomite ilmnemist (Wijesekara *et al.*, 2017). Seega on mõtet teha edasisi uuringuid, et analüüsida pankreases toimuvaid muutusi valkude agregeerumises ja hinnata seekaudu, mitte ainult diabeedi, vaid ka neurodegeneratiivsete häirete kulgu. Ühtlasi on GLP-1 retseptori agonistidel tõestatud neuroprotektiivne toime (Seppa *et al.*, 2019). Need on parandanud katseloomade sooritust mälu katsetes (During *et al.*, 2003) ning langetanud beeta-amüloidi hulka ajus (Perry *et al.*, 2003). Seega võiks DA-CH5, mis aktiveerib samuti GLP-1 retseptorid, olla potentsiaalne ravim, et võidelda WS-iga kaasneva neurodegeneratsiooni vastu.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti, milline on GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 mõju WS-i rotimudeli diabeedi sümptomite leevendamisele. Lisaks vaadeldi pankrease Langerhansi saarekeste rakulist ehitust ja analüüsiti, kas ravi DA-CH5-ga avaldab mõju saarekeste alfa- ja beetarakkude arvukusele. Samuti hinnati Alzheimeri tõvega seostatud beeta-amüloidi valgu esinemist Langerhansi saarekestes. Töö läbiviimiseks tehti IPGTT ja mõõdeti vereseerumis hormoonide taset. Langerhansi saarekeste morfoloogiliseks analüüsiks tehti koelõikudele immunohistokeemia.

7-päevane ravi DA-CH5-ga alandas kehakaalu nii WT kui ka WFS1-puudulikel loomadel. IGPTT tulemusena selgus, et DA-CH5 parandas WFS1-puudulike loomade glükoositaluvust ning tõstis nende vereseerumi insuliinitaset. Pankrease Langerhansi saarekeste alfa- ja beeta rakkude kvantitatiivne analüüs näitas, et võrreldes WT katseloomadega oli WFS1-puudulikel loomadel vähenenud beeta-rakkude hulk. Morfoloogilisel analüüsil selgus, et WFS1-puudulikel loomadel oli alfa-rakkude arvukus suurem kui WT loomadel. Beeta-amüloidi valk esines Langerhansi saarekestes sõltumata katsegrupist.

Töö tulemused kirjeldati, milline on koagonisti DA-CH5 mõju WS-i loomudeli diabeedi sümptomite leevendamisele ja pankrease Langerhansi saarekeste rakulisele ehitusele. DA-CH5 parandas WFS1-puudulikel katseloomadel glükoositaluvust. Seega võiks DA-CH5 kasutada WS-i põhjustatud diabeedi ravimisel ja ennetamisel. Immunofluorestsentsanalüüs näitas, et WFS1-puudulike loomade saarekeste rakuline ehitus erineb WT katseloomadest ning seega võiks uurida edasi, kuidas määrab saarekeste morfoloogia haiguse fenotüüpi ja kas ravil DA-CH5-ga oleks sellele mõju. Beeta-amüloidi valgu esinemine saarekestes annab põhjust mõõta valgu hulka kvantitatiivselt, et uurida välja, kas ja missugused seosed esinevad WS-i kaasneva diabeedi ja neurodegeneratiivsete häirete vahel.

## SUMMARY

### **The effects of GLP-1 and GIP receptor co-agonist DA-CH5 on diabetic phenotype and cellular architecture of islets of Langerhans in a Wolfram syndrome (WS) rat model**

Kaia Grete Kukker

Diabetes is a group of chronic metabolic disorders characterized by hyperglycemia over a prolonged period of time. Half a billion people are living with diabetes worldwide and its prevalence is expected to increase globally. Type 1 diabetes is an autoimmune disease caused by destruction of pancreatic insulin-producing beta-cells. Type 2 diabetes primarily caused by cells becoming resistant to insulin due to pathological changes resulting from detrimental lifestyle choices: obesity and lack of physical activity. Diabetes is associated with many genetic disorders as well. Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in *Wfs1* gene. It is characterized by diabetes mellitus, blindness, deafness and neurodegeneration. Non-autoimmune insulin-dependent diabetes mellitus is typically the first symptom of WS and patients require lifelong insulin replacement therapy.

There is no cure for WS and current treatment strategies can only temporarily reduce the symptoms. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1) is a receptor protein found on pancreatic beta-cells. The main action of GLP-1 is to stimulate glucose-induced insulin secretion. Therefore, GLP-1 receptor agonists are widely used in the treatment of type 2 diabetes. Studies have shown that GLP-1 receptor agonist liraglutide protects against development of glucose intolerance in WS rat model. A recent study showed that lifelong treatment with liraglutide delayed the onset of diabetes in only half of the animals. Hence, new treatment strategies are being developed to limit the progression of diabetes and neurodegeneration more effectively. DA-CH5 is a novel co-agonists that activates GLP-1 as well as glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor that is also involved in insulin secretory signaling pathways. Recent studies have confirmed that DA-CH5 is superior to liraglutide in reducing blood glucose levels and has a profound neuroprotective effect.

The aim of this study was to assess the effects of GLP-1/GIP co-agonist DA-CH5 in improving glycaemic control in WS rat model. In this work, morphological analysis of islets of Langerhans were performed to find out changes in cellular architecture. At the age of 5 months, *WFS1*-deficient rats had developed glucose intolerance. Treatment with DA-CH5 was able to reduce blood glucose levels and increase insulin secretion in *WFS1* deficient animals. Therefore, DA-CH5 could be used in the treatment of diabetes symptoms in WS patients as well. Quantitative

analysis of the cells in islets of Langerhans revealed that WFS-1 deficient animals had reduced number of insulin producing beta-cells. Further studies are needed to confirm whether DA-CH5 can protect beta-cells from apoptosis or increase proliferation. Morphological study of pancreatic islets showed that amyloid-beta, a protein involved in neurodegenerative disorder Alzheimer's disease, is found in the islets of all animal groups. Diabetes has been shown to be linked to neurodegenerative disorders and therefore, it is necessary to assess morphological changes in islets of Langerhans to find novel ways for tracking pathophysiological changes in both diseases.

## **TÄNUSÕNAD**

Suur tänu minu juhendajale Kadri Seppale ja kaasjuhendajale Mario Plaasile.

Pikad paid neljajalgsetele karvastele sõpradele.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ahn, C., An, B.-S., and Jeung, E.-B. (2015). Streptozotocin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis via disruption of calcium homeostasis in mouse pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 302–308.
- Andralojc, K. M., Mercalli, A., Nowak, K. W., Albarello, L., Calcagno, R., Luzi, L., Bonifacio, E., Doglioni, C., and Piemonti, L. (2009). Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia*, 52(3), 486–493.
- Aragón, F., Karaca, M., Novials, A., Maldonado, R., Maechler, P., and Rubí, B. (2015). Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1850(2), 343–351.
- Banday, M. Z., Sameer, A. S., and Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10(4), 174–188.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Maness, L. M., Huang, W., and Jaspan, J. B. (1995). Permeability of the blood-brain barrier to amylin. *Life Sciences*, 57(22), 1993–2001.
- Barrett, T. G., Bunday, S. E., Fielder, A. R., and Good, P. A. (1997). Optic atrophy in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Eye (London, England)*, 11 ( Pt 6), 882–888.
- Barrett, T. G., Bunday, S. E., and Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet (London, England)*, 346(8988), 1458–1463.
- Batterham, R. L., Le Roux, C. W., Cohen, M. A., Park, A. J., Ellis, S. M., Patterson, M., Frost, G. S., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2003). Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), 3989–3992.
- Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., and Evangelou, E. (2018). Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses. *PLoS ONE*, 13(3), e0194127.
- Ben-Othman, N., Vieira, A., Courtney, M., Record, F., Gjernes, E., Avolio, F., Hadzic, B., Druelle, N., Napolitano, T., Navarro-Sanz, S., Silvano, S., Al-Hasani, K., Pfeifer, A., Lacas-Gervais, S., Leuckx, G., Marroquí, L., Thévenet, J., Madsen, O. D., Eizirik, D. L., ... Collombat, P. (2017). Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell*, 168(1–2), 73-85.e11.
- Bosco, D., Orci, L., and Meda, P. (1989). Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Experimental Cell Research*, 184(1), 72–80.

- Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., and Powers, A. C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(9), 1087–1097.
- Brunnicardi, F. C., Kleinman, R., Moldovan, S., Nguyen, T. H., Watt, P. C., Walsh, J., and Gingerich, R. (2001). Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas*, 23(3), 302–308.
- Burillo, J., Marqués, P., Jiménez, B., González-Blanco, C., Benito, M., and Guillén, C. (2021). Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Alzheimer’s Disease. *Cells*, 10(5), 1236.
- Buse, J. B., Rosenstock, J., Sesti, G., Schmidt, W. E., Montanya, E., Brett, J. H., Zychma, M., Blonde, L., and LEAD-6 Study Group. (2009). Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: A 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet (London, England)*, 374(9683), 39–47.
- Butterworth, E., Dickerson, W., Vijay, V., Weitzel, K., Cooper, J., Atkinson, E. W., Coleman, J. E., Otto, K. J., and Campbell-Thompson, M. (2018). High Resolution 3D Imaging of the Human Pancreas Neuro-insular Network. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 131.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–2339.
- Cabrera, O., Jacques-Silva, M. C., Speier, S., Yang, S.-N., Köhler, M., Fachado, A., Vieira, E., Zierath, J. R., Kibbey, R., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Caicedo, A., and Berggren, P.-O. (2008). Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metabolism*, 7(6), 545–554.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96.
- Cañas, X., Fernández-López, J. A., Ardévol, A., Adán, C., Esteve, M., Rafecas, I., Remesar, X., and Alemany, M. (1995). Rat insulin turnover in vivo. *Endocrinology*, 136(9), 3871–3876.
- Cano, A., Rouzier, C., Monnot, S., Chabrol, B., Conrath, J., Lecomte, P., Delobel, B., Boileau, P., Valero, R., Procaccio, V., Paquis-Flucklinger, V., French Group of Wolfram Syndrome, and Vialettes, B. (2007). Identification of novel mutations in WFS1 and

- genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(14), 1605–1612.
- Cao, Y., Hölscher, C., Hu, M.-M., Wang, T., Zhao, F., Bai, Y., Zhang, J., Wu, M.-N., and Qi, J.-S. (2018). DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 827, 215–226.
- Capozzi, M. E., Svendsen, B., Encisco, S. E., Lewandowski, S. L., Martin, M. D., Lin, H., Jaffe, J. L., Coch, R. W., Haldeman, J. M., MacDonald, P. E., Merrins, M. J., D'Alessio, D. A., and Campbell, J. E. (2019).  $\beta$  Cell tone is defined by proglucagon peptides through cAMP signaling. *JCI Insight*, 4(5), 126742.
- Cheng, C. K., Luo, J.-Y., Lau, C. W., Cho, W. C., Ng, C. F., Ma, R. C. W., Tian, X. Y., and Huang, Y. (2021). A GLP-1 analog lowers ER stress and enhances protein folding to ameliorate homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(10), 1598–1609.
- Chera, S., Baronnier, D., Ghila, L., Cigliola, V., Jensen, J. N., Gu, G., Furuyama, K., Thorel, F., Gribble, F. M., Reimann, F., and Herrera, P. L. (2014). Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic  $\delta$ -cells into insulin producers. *Nature*, 514(7523), 503–507.
- Christensen, M., Vedtofte, L., Holst, J. J., Vilsbøll, T., and Knop, F. K. (2011). Glucose-dependent insulintropic polypeptide: A bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans. *Diabetes*, 60(12), 3103–3109.
- Collier, D. A., Barrett, T. G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M. J., Maassen, J. A., and Bunday, S. (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 59(4), 855–863.
- Cras, P., Kawai, M., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B., and Perry, G. (1991). Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7552–7556.
- Cukierman-Yaffe, T., Gerstein, H. C., Williamson, J. D., Lazar, R. M., Lovato, L., Miller, M. E., Coker, L. H., Murray, A., Sullivan, M. D., Marcovina, S. M., Launer, L. J., and Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes-Memory in Diabetes (ACCORD-MIND) Investigators. (2009). Relationship between baseline glycemic control and cognitive function in individuals with type 2 diabetes and other cardiovascular risk

- factors: The action to control cardiovascular risk in diabetes-memory in diabetes (ACCORD-MIND) trial. *Diabetes Care*, 32(2), 221–226.
- Dahiya, L., Kaur, R., Kumar, R., Kumar, M., and Palta, K. (2020). GLP-1 Receptor Agonists in Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 16(4), 279–292.
- de Heredia, M. L., Clèries, R., and Nunes, V. (2013). Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: Insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15(7), 497–506.
- Degn, K. B., Juhl, C. B., Sturis, J., Andkobsen, G., Brock, B., Chandramouli, V., Rungby, J., Landau, B. R., and Schmitz, O. (2004). One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(5), 1187–1194.
- Diaz-Valencia, P. A., Bougnères, P., and Valleron, A.-J. (2015). Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: A systematic review. *BMC Public Health*, 15, 255.
- DiGruccio, M. R., Mawla, A. M., Donaldson, C. J., Noguchi, G. M., Vaughan, J., Cowing-Zitron, C., van der Meulen, T., and Huising, M. O. (2016). Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Molecular Metabolism*, 5(7), 449–458.
- Dobbins, R. L., Chester, M. W., Stevenson, B. E., Daniels, M. B., Stein, D. T., and McGarry, J. D. (1998). A fatty acid- dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2370–2376.
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., and Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(10), 3434–3438.
- Duffy, A. M., and Hölscher, C. (2013). The incretin analogue D-Ala2GIP reduces plaque load, astrogliosis and oxidative stress in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 228, 294–300.
- During, M. J., Cao, L., Zuzga, D. S., ... Haile, C. N. (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nature Medicine*, 9(9), 1173–1179.

- Eiberg, H., Hansen, L., Kjer, B., Hansen, T., Pedersen, O., Bille, M., Rosenberg, T., and Tranebjaerg, L. (2006). Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *Journal of Medical Genetics*, 43(5), 435–440.
- El, K., and Campbell, J. E. (2020). The role of GIP in  $\alpha$ -cells and glucagon secretion. *Peptides*, 125, 170213.
- Elayat, A. A., el-Naggar, M. M., and Tahir, M. (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *Journal of Anatomy*, 186(Pt 3), 629–637.
- Esler, W. P., Rudolph, J., Claus, T. H., ... Sweet, L. J. (2007). Small-Molecule Ghrelin Receptor Antagonists Improve Glucose Tolerance, Suppress Appetite, and Promote Weight Loss. *Endocrinology*, 148(11), 5175–5185.
- Feng, P., Zhang, X., Li, D., Ji, C., Yuan, Z., Wang, R., Xue, G., Li, G., and Hölscher, C. (2018). Two novel dual GLP-1/GIP receptor agonists are neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 133, 385–394.
- Feng, W.-H., Bi, Y., Li, P., Yin, T.-T., Gao, C.-X., Shen, S.-M., Gao, L.-J., Yang, D.-H., and Zhu, D.-L. (2019). Effects of liraglutide, metformin and gliclazide on body composition in patients with both type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A randomized trial. *Journal of Diabetes Investigation*, 10(2), 399–407.
- Flint, A., Raben, A., Astrup, A., and Holst, J. J. (1998). Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(3), 515–520.
- Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y., and Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39609–39615.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Oslowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A., and Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 744–755.
- Fraser, F. C., and Gunn, T. (1977). Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *Journal of Medical Genetics*, 14(3), 190–193.
- Frias, J. P., Nauck, M. A., ... Haupt, A. (2018). Efficacy and safety of LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in patients with type 2 diabetes: A randomised,

- placebo-controlled and active comparator-controlled phase 2 trial. *Lancet* (London, England), 392(10160), 2180–2193.
- Gannon, M., Ray, M. K., Van Zee, K., Rausa, F., Costa, R. H., and Wright, C. V. (2000). Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. *Development*, 127(13), 2883–2895.
- Ge, X., Yang, Y., Sun, Y., Cao, W., and Ding, F. (2018). Islet Amyloid Polypeptide Promotes Amyloid-Beta Aggregation by Binding-Induced Helix-Unfolding of the Amyloidogenic Core. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(5), 967–975.
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology*, 326(1), 4–35.
- Gorodezky, C., Alaez, C., Murguía, A., Rodríguez, A., Balladares, S., Vazquez, M., Flores, H., and Robles, C. (2006). HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmunity Reviews*, 5(3), 187–194.
- Guardado-Mendoza, R., Davalli, A. M., Chavez, ... Folli, F. (2009). Pancreatic islet amyloidosis,  $\beta$ -cell apoptosis, and  $\alpha$ -cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13992–13997.
- Hamilton, A., and Hölscher, C. (2009). Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport*, 20(13), 1161–1166.
- Hara, A., Kadoya, Y., Kojima, I., and Yamashina, S. (2007). Rat pancreatic islet is formed by unification of multiple endocrine cell clusters. *Developmental Dynamics*, 236(12), 3451–3458.
- Hascup, E. R., Broderick, S. O., Russell, M. K., Fang, Y., Bartke, A., Boger, H. A., and Hascup, K. N. (2019). Diet-induced insulin resistance elevates hippocampal glutamate as well as VGLUT1 and GFAP expression in A $\beta$ PP/PS1 mice. *Journal of Neurochemistry*, 148(2), 219–237.
- Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Carmignac, D., Richardson, C. C., Robinson, I. C. A. F., Low, M. J., Christie, M. R., Persaud, S. J., and Jones, P. M. (2009). Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*, 58(2), 403–411.
- Heller, R. S., Jenny, M., Collombat, P., Mansouri, A., Tomasetto, C., Madsen, O. D., Mellitzer, G., Gradwohl, G., and Serup, P. (2005). Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Developmental Biology*, 286(1), 217–224.

- Hilson, J. B., Merchant, S. N., Adams, J. C., and Joseph, J. T. (2009). Wolfram syndrome: A clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathologica*, 118(3), 415–428.
- Holst, J. J. (2019). The incretin system in healthy humans: The role of GIP and GLP-1. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 96, 46–55.
- Höppener, J. W. M., and Lips, C. J. M. (2006). Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(5–6), 726–736.
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, ... Bell, G. I. (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26(2), 163–175.
- Hörnblad, A., Cheddad, A., and Ahlgren, U. (2011). An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and  $\beta$ -cell mass distribution. *Islets*, 3(4), 204–208.
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., and Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, 345(11), 790–797.
- Hyöty, H. (2016). Viruses in type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, 17 Suppl 22, 56–64.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., ... Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics*, 20(2), 143–148.
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P. A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., and Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*, 5, 14634.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., ... Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1159–1170.
- Jacques-Silva, M. C., Correa-Medina, M., Cabrera, O., ... Caicedo, A. (2010). ATP-gated P2X3 receptors constitute a positive autocrine signal for insulin release in the human pancreatic beta cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6465–6470.
- Jagomäe, T., Seppa, K., Reimets, R., ... Plaas, M. (2021). Early Intervention and Lifelong Treatment with GLP1 Receptor Agonist Liraglutide in a Wolfram Syndrome Rat Model with an Emphasis on Visual Neurodegeneration, Sensorineural Hearing Loss and Diabetic Phenotype. *Cells*, 10(11), 3193.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R., and Herskowitz, R. D. (1989). Genetically Programmed Selective Islet  $\beta$ -Cell Loss in Diabetic Subjects With Wolfram's Syndrome. *Diabetes Care*, 12(2), 135–138.

- Kawano, J., Tanizawa, Y., and Shinoda, K. (2008). Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system. *The Journal of Comparative Neurology*, 510(1), 1–23.
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., and Hara, M. (2009). Islet architecture. *Islets*, 1(2), 129–136.
- Kim, W., and Egan, J. M. (2008). The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacological Reviews*, 60(4), 470–512.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656–660.
- Kondo, M., Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Morii, T., Takahashi, H., Seino, S., Yamada, Y., and Tanizawa, Y. (2018). Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia*, 61(10), 2189–2201.
- Larsen, P. J., Fledelius, C., Knudsen, L. B., and Tang-Christensen, M. (2001). Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. *Diabetes*, 50(11), 2530–2539.
- Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., Biankin, A. V., and Biden, T. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(4), 752–763.
- Levin, F., Edholm, T., Schmidt, P. T., Grybäck, P., Jacobsson, H., Degerblad, M., Höybye, C., Holst, J. J., Rehfeld, J. F., Hellström, P. M., and Näslund, E. (2006). Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), 3296–3302.
- Li, C., Liu, W., Li, X., Zhang, Z., Qi, H., Liu, S., Yan, N., Xing, Y., Hölscher, C., and Wang, Z. (2020). The novel GLP-1/GIP analogue DA5-CH reduces tau phosphorylation and normalizes theta rhythm in the icv. STZ rat model of AD. *Brain and Behavior*, 10(3), e01505.
- Lindqvist, A., Shcherbina, L., Prasad, R. B., ... Wierup, N. (2020). Ghrelin suppresses insulin secretion in human islets and type 2 diabetes patients have diminished islet ghrelin cell number and lower plasma ghrelin levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 511, 110835.
- Lipson, K. L., Ghosh, R., and Urano, F. (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PloS One*, 3(2), e1648.

- Lopes, D. H. J., Colin, C., Degaki, T. L., de Sousa, A. C. V., Vieira, M. N. N., Sebollela, A., Martinez, A. M. B., Bloch, C., Ferreira, S. T., and Sogayar, M. C. (2004). Amyloidogenicity and cytotoxicity of recombinant mature human islet amyloid polypeptide (rhIAPP). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42803–42810.
- Lu, J., Liu, J., Li, L., Lan, Y., and Liang, Y. (2020). Cytokines in type 1 diabetes: Mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clinical & Translational Immunology*, 9(3), e1122.
- Lugar, H. M., Koller, J. M., Rutlin, J., Marshall, B. A., Kanekura, K., Urano, F., Bischoff, A. N., Shimony, J. S., and Hershey, T. (2016). Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Scientific Reports*, 6.
- Lund, A., Vilsbøll, T., Bagger, J. I., Holst, J. J., and Knop, F. K. (2011). The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 300(6), E1038-1046.
- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., and Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *The Journal of Comparative Neurology*, 509(6), 642–660.
- Manschot, S. M., Biessels, G. J., de Valk, H., Algra, A., Rutten, G. E. H. M., van der Grond, J., Kappelle, L. J., and Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. (2007). Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(11), 2388–2397.
- Marre, M., Shaw, J., Brändle, M., Bebakar, W. M. W., Kamaruddin, N. A., Strand, J., Zdravkovic, M., Le Thi, T. D., Colagiuri, S., and LEAD-1 SU study group. (2009). Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU). *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 26(3), 268–278.
- Medlej, R., Wasson, J., Baz, P., Azar, S., Salti, I., Loiselet, J., Permutt, A., and Halaby, G. (2004). Diabetes mellitus and optic atrophy: A study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(4), 1656–1661.

- Mehla, J., Chauhan, B. C., and Chauhan, N. B. (2014). Experimental Induction of Type 2 Diabetes in Aging-Accelerated Mice Triggered Alzheimer-Like Pathology and Memory Deficits. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 39(1), 145–162.
- Meier, J. J., and Nauck, M. A. (2010). Is the Diminished Incretin Effect in Type 2 Diabetes Just an Epi-Phenomenon of Impaired  $\beta$ -Cell Function? *Diabetes*, 59(5), 1117–1125.
- Meyer, H. H., Vetterlein, F., Schmidt, G., and Hasselblatt, A. (1982). Measurement of blood flow in pancreatic islets of the rat: Effect of isoproterenol and norepinephrine. *The American Journal of Physiology*, 242(5), E298-304.
- Miklossy, J., Qing, H., Radenovic, A., ... McGeer, P. L. (2010). Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiology of Aging*, 31(9), 1503–1515.
- Molina, J., Rodriguez-Diaz, R., Fachado, A., Jacques-Silva, M. C., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2014). Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes*, 63(8), 2714–2726.
- Moore, C. X., and Cooper, G. J. (1991). Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: Modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(1), 1–9.
- Morales-Corraliza, J., Wong, H., Mazzella, M. J., Che, S., Lee, S. H., Petkova, E., Wagner, J. D., Hemby, S. E., Ginsberg, S. D., and Mathews, P. M. (2016). Brain-Wide Insulin Resistance, Tau Phosphorylation Changes, and Hippocampal Neprilysin and Amyloid- $\beta$  Alterations in a Monkey Model of Type 1 Diabetes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(15), 4248–4258.
- Moreno-Gonzalez, I., Edwards Iii, G., Salvadores, N., Shahnawaz, M., Diaz-Espinoza, R., and Soto, C. (2017). Molecular interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease through cross-seeding of protein misfolding. *Molecular Psychiatry*, 22(9), 1327–1334.
- Muoio, D. M., and Newgard, C. B. (2008). Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 193–205.
- Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Orskov, C., Holst, J. J., Ebert, R., and Creutzfeldt, W. (1993). Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(1), 301–307.
- Noormets, K., Kõks, S., Muldmaa, M., Muring, L., Vasar, E., and Tillmann, V. (2011). Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene.

- Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association, 119(5), 271–275.
- Nørregaard, P. K., Deryabina, M. A., Tofteng Shelton, P., Fog, J. U., Daugaard, J. R., Eriksson, P.-O., Larsen, L. F., and Jessen, L. (2018). A novel GIP analogue, ZP4165, enhances glucagon-like peptide-1-induced body weight loss and improves glycaemic control in rodents. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20(1), 60–68.
- Notkins, A. L., and Lernmark, Å. (2001). Autoimmune type 1 diabetes: Resolved and unresolved issues. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9), 1247–1252.
- Nyman, L. R., Wells, K. S., Head, W. S., McCaughey, M., Ford, E., Brissova, M., Piston, D. W., and Powers, A. C. (2008). Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3790–3797.
- O'Brien, R. J., and Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P., and Mueckler, M. (2003). Wolframin Expression Induces Novel Ion Channel Activity in Endoplasmic Reticulum Membranes and Increases Intracellular Calcium\*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52755–52762.
- Ott, A., Stolk, R. P., Hofman, A., van Harskamp, F., Grobbee, D. E., and Breteler, M. M. (1996). Association of diabetes mellitus and dementia: The Rotterdam Study. *Diabetologia*, 39(11), 1392–1397.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5695), 457–461.
- Pagliara, A. S., Stillings, S. N., Hover, B., Martin, D. M., and Matschinsky, F. M. (1974). Glucose modulation of amino acid-induced glucagon and insulin release in the isolated perfused rat pancreas. *The Journal of Clinical Investigation*, 54(4), 819–832.
- Pallotta, M. T., Tascini, G., Crispoldi, R., Orabona, C., Mondanelli, G., Grohmann, U., and Esposito, S. (2019). Wolfram syndrome, a rare neurodegenerative disease: From pathogenesis to future treatment perspectives. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 238.
- Patzelt, C., Labrecque, A. D., Duguid, J. R., Carroll, R. J., Keim, P. S., Heinrikson, R. L., and Steiner, D. F. (1978). Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic

- islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(3), 1260–1264.
- Perfetti, R., Zhou, J., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (2000). Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 141(12), 4600–4605.
- Perry, T., Lahiri, D. K., Sambamurti, K., Chen, D., Mattson, M. P., Egan, J. M., and Greig, N. H. (2003). Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A $\beta$  and iron. *Journal of Neuroscience Research*, 72(5), 603–612.
- Philbrook, C., Fritz, E., and Weiher, H. (2005). Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Experimental Gerontology*, 40(8–9), 671–678.
- Pirot, P., Naamane, N., Libert, F., Magnusson, N. E., Ørntoft, T. F., Cardozo, A. K., and Eizirik, D. L. (2007). Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia*, 50(5), 1006–1014.
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., ... Vasar, E. (2017). Wfs1- deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: Insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., and Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), E3342.
- Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2924–2929.
- Pratley, R. E., Nauck, M., Bailey, T., Montanya, E., Cuddihy, R., Filetti, S., Thomsen, A. B., Søndergaard, R. E., Davies, M., and 1860-LIRA-DPP-4 Study Group. (2010). Liraglutide versus sitagliptin for patients with type 2 diabetes who did not have adequate glycaemic control with metformin: A 26-week, randomised, parallel-group, open-label trial. *Lancet (London, England)*, 375(9724), 1447–1456.
- Purwana, I., Zheng, J., Li, X., ... Wang, Q. (2014). GABA promotes human  $\beta$ -cell proliferation and modulates glucose homeostasis. *Diabetes*, 63(12), 4197–4205.

- Quesada, I., Fuentes, E., Andreu, E., Meda, P., Nadal, A., and Soria, B. (2003). On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 284(5), E980-987.
- Quesada, I., Todorova, M. G., Alonso-Magdalena, P., Beltrá, M., Carneiro, E. M., Martin, F., Nadal, A., and Soria, B. (2006). Glucose induces opposite intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes*, 55(9), 2463–2469.
- Ravier, M. A., Güldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Söhl, G., Wollheim, C. B., Willecke, K., Henquin, J.-C., and Meda, P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca<sup>2+</sup> and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*, 54(6), 1798–1807.
- Rendtorff, N. D., Lodahl, M., Boulahbel, H., ... Tranebjaerg, L. (2011). Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(6), 1298–1313.
- Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L., and Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia*, 48(11), 2313–2321.
- Rigoli, L., Bramanti, P., Di Bella, C., and De Luca, F. (2018). Genetic and clinical aspects of Wolfram syndrome 1, a severe neurodegenerative disease. *Pediatric Research*, 83(5), 921–929.
- Rigoli, L., and Di Bella, C. (2012). Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2. *Current Opinion in Pediatrics*, 24(4), 512–517.
- Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M. C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M. H., Ricordi, C., Roper, S. D., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nature Medicine*, 17(7), 888–892.
- Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., Holl, R., Oexle, K., Kordonouri, O., Salzano, G., Meissner, T., Burger, W., Schober, E., Huebner, A., Lee-Kirsch, M. A., and Wolfram Syndrome Diabetes Writing Group. (2011). Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: A multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care*, 34(7), 1503–1510.
- Ron, D., ja Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529.

- Russell-Jones, D., Vaag, A., Schmitz, O., Sethi, B. K., Lalic, N., Antic, S., Zdravkovic, M., Ravn, G. M., Simó, R., and Liraglutide Effect and Action in Diabetes 5 (LEAD-5) met+SU Study Group. (2009). Liraglutide vs insulin glargine and placebo in combination with metformin and sulfonylurea therapy in type 2 diabetes mellitus (LEAD-5 met+SU): A randomised controlled trial. *Diabetologia*, 52(10), 2046–2055.
- Sano, R., and Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3460–3470.
- Schmidt-Kastner, R., Kreczmanski, P., Preising, M., Diederer, R., Schmitz, C., Reis, D., Blanks, J., and Dorey, C. K. (2009). Expression of the diabetes risk gene wolframin (WFS1) in the human retina. *Experimental Eye Research*, 89(4), 568–574.
- Schueren, B. V. der, Ellis, D., Faradji, R. N., Al-Ozairi, E., Rosen, J., and Mathieu, C. (2021). Obesity in people living with type 1 diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(11), 776–785.
- Scully, K. J., and Wolfsdorf, J. I. (2020). Efficacy of GLP-1 Agonist Therapy in Autosomal Dominant WFS1-Related Disorder: A Case Report. *Hormone Research in Paediatrics*, 93(6), 409–414.
- Sedman, T., Rünkorg, K., Krass, M., Luuk, H., Plaas, M., Vasar, E., and Volke, V. (2016). Exenatide Is an Effective Antihyperglycaemic Agent in a Mouse Model of Wolfram Syndrome 1. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 9239530.
- Seppa, K., Jagomäe, T., Kukker, K. G., Reimets, R., Pastak, M., Vasar, E., Terasmaa, A., and Plaas, M. (2021). Liraglutide, 7,8-DHF and their co-treatment prevents loss of vision and cognitive decline in a Wolfram syndrome rat model. *Scientific Reports*, 11(1), 2275.
- Seppa, K., Toots, M., Reimets, R., ... Plaas, M. (2019). GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Shi, Y.-C., Lin, Z., Lau, J., Zhang, H., Yagi, M., Kanzler, I., Sainsbury, A., Herzog, H., and Lin, S. (2013). PYY3-36 and pancreatic polypeptide reduce food intake in an additive manner via distinct hypothalamic dependent pathways in mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(12), E669-678.
- Shrestha, N., De Franco, E., Arvan, P., and Cnop, M. (2021). Pathological  $\beta$ -Cell Endoplasmic Reticulum Stress in Type 2 Diabetes: Current Evidence. *Frontiers in Endocrinology*, 12.
- Song, Y., Niu, T., Manson, J. E., Kwiatkowski, D. J., and Liu, S. (2004). Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *American Journal of Human Genetics*, 74(2), 208–222.

- Spauwen, P. J. J., Köhler, S., Verhey, F. R. J., Stehouwer, C. D. A., and van Boxtel, M. P. J. (2013). Effects of type 2 diabetes on 12-year cognitive change: Results from the Maastricht Aging Study. *Diabetes Care*, 36(6), 1554–1561.
- Starich, G. H., Zafirova, M., Jablenska, R., Petkov, P., and Lardinois, C. K. (1991). A morphological and immunohistochemical investigation of endocrine pancreata from obese ob+/ob+ mice. *Acta Histochemica*, 90(1), 93–101.
- Stožer, A., Gosak, M., Dolensšek, J., Perc, M., Marhl, M., Rupnik, M. S., and Korošak, D. (2013). Functional connectivity in islets of Langerhans from mouse pancreas tissue slices. *PLoS Computational Biology*, 9(2), e1002923.
- Strom, T. M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., and Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics*, 7(13), 2021–2028.
- Suzuki, N., Hosoya, M., Oishi, N., Okano, H., Fujioka, M., and Ogawa, K. (2016). Expression pattern of wolframin, the WFS1 (Wolfram syndrome-1 gene) product, in common marmoset (*Callithrix jacchus*) cochlea. *Neuroreport*, 27(11), 833–836.
- Svendsen, B., Larsen, O., Gabe, M. B. N., Christiansen, C. B., Rosenkilde, M. M., Drucker, D. J., and Holst, J. J. (2018). Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Signaling. *Cell Reports*, 25(5), 1127-1134.e2.
- Swift, R. G., Sadler, D. B., and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet (London, England)*, 336(8716), 667–669.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., and Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics*, 10(5), 477–484.
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Rakugi, H., and Morishita, R. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 7036–7041.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, 580(24), 5635–5640.
- Thomas, M. K., Nikooienejad, A., Bray, R., Cui, X., Wilson, J., Duffin, K., Milicevic, Z., Haupt, A., and Robins, D. A. (2021). Dual GIP and GLP-1 Receptor Agonist Tirzepatide

- Improves Beta-cell Function and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(2), 388–396.
- Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P. L. (2010). Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*, 464(7292), 1149–1154.
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., and Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5541–5554.
- Tomasetto, C., Karam, S. M., Ribieras, S., Masson, R., Lefèbvre, O., Staub, A., Alexander, G., Chenard, M.-P., and Rio, M.-C. (2000). Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: The motilin-related peptide. *Gastroenterology*, 119(2), 395–405.
- Toots, M., Seppa, K., Jagomäe, T., Koppel, T., Pallase, M., Heinla, I., Terasmaa, A., Plaas, M., and Vasar, E. (2018). Preventive treatment with liraglutide protects against development of glucose intolerance in a rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Trimble, E. R., Halban, P. A., Wollheim, C. B., and Renold, A. E. (1982). Functional differences between rat islets of ventral and dorsal pancreatic origin. *The Journal of Clinical Investigation*, 69(2), 405–413.
- Tups, A., Benzler, J., Sergi, D., Ladyman, S. R., and Williams, L. M. (2017). Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 741–764.
- Ueda, K., Kawano, J., Takeda, K., Yujiri, T., Tanabe, K., Anno, T., Akiyama, M., Nozaki, J., Yoshinaga, T., Koizumi, A., Shinoda, K., Oka, Y., and Tanizawa, Y. (2005). Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *European Journal of Endocrinology*, 153(1), 167–176.
- Urano, F. (2016). Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Current Diabetes Reports*, 16(1), 6.
- Vasu, S., Moffett, R. C., Thorens, B., and Flatt, P. R. (2014). Role of Endogenous GLP-1 and GIP in Beta Cell Compensatory Responses to Insulin Resistance and Cellular Stress. *PLOS ONE*, 9(6), e101005.
- Wang, C., Mao, R., Van de Casteele, M., Pipeleers, D., and Ling, Z. (2007). Glucagon-like peptide-1 stimulates GABA formation by pancreatic beta-cells at the level of glutamate decarboxylase. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292(4), E1201-1206.

- Wang, L., Liu, Y., Yang, J., Zhao, H., Ke, J., Tian, Q., Zhang, L., Wen, J., Wei, R., and Hong, T. (2014). GLP-1 analog liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic  $\beta$ -cells via a PKA-dependent pathway. *Endocrinology*, 155(10), 3817–3828.
- Wang, X., Misawa, R., Zielinski, M. C., Cowen, P., Jo, J., Periwai, V., Ricordi, C., Khan, A., Szust, J., Shen, J., Millis, J. M., Witkowski, P., and Hara, M. (2013). Regional differences in islet distribution in the human pancreas—Preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PloS One*, 8(6), e67454.
- Wang, X., Zheng, W., Xie, J.-W., Wang, T., Wang, S.-L., Teng, W.-P., and Wang, Z.-Y. (2010). Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. *Molecular Neurodegeneration*, 5, 46.
- Weiss, M., Steiner, D. F., and Philipson, L. H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Wendt, A., and Eliasson, L. (2020). Pancreatic  $\alpha$ -cells—The unsung heroes in islet function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 103, 41–50.
- Wieczorek, G., Pospischil, A., and Perentes, E. (1998). A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 50(3), 151–172.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., and Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides*, 107(1), 63–69.
- Wijesekara, N., Ahrens, R., Sabale, M., Wu, L., Ha, K., Verdile, G., and Fraser, P. E. (2017). Amyloid- $\beta$  and islet amyloid pathologies link Alzheimer’s disease and type 2 diabetes in a transgenic model. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(12), 5409–5418.
- Willard, F. S., Douros, J. D., Gabe, M. B., ... Sloop, K. W. (2020). Tirzepatide is an imbalanced and biased dual GIP and GLP-1 receptor agonist. *JCI Insight*, 5(17), 140532.
- Williams, D. L., Baskin, D. G., and Schwartz, M. W. (2006). Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes*, 55(12), 3387–3393.

- Wojtuszczyzn, A., Armanet, M., Morel, P., Berney, T., and Bosco, D. (2008). Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia*, 51(10), 1843.
- Wolfram, D. J. and Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: Report of four cases. *13*, 715–718.
- Xu, R., Xia, B., Geng, J., Shi, J., Shi, H., Yuan, L., and De, W. (2009). Expression and localization of Wolfram syndrome 1 gene in the developing rat pancreas. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 15(43), 5425–5431.
- Xue, M., Xu, W., Ou, Y.-N., Cao, X.-P., Tan, M.-S., Tan, L., and Yu, J.-T. (2019). Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Research Reviews*, 55, 100944.
- Yamaguchi, S., Ishihara, H., Tamura, A., Yamada, T., Takahashi, R., Takei, D., Katagiri, H., and Oka, Y. (2004). Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(1), 250–256.
- Yamamoto, H., Hofmann, S., Hamasaki, D. I., Yamamoto, H., Kreczmanski, P., Schmitz, C., Parel, J.-M., and Schmidt-Kastner, R. (2006). Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Experimental Eye Research*, 83(5), 1303–1306.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881–891.
- Yukawa, M., Takeuchi, T., Watanabe, T., and Kitamura, S. (1999). Proportions of various endocrine cells in the pancreatic islets of wood mice (*Apodemus speciosus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 28(1), 13–16.
- Yusta, B., Baggio, L. L., Estall, J. L., Koehler, J. A., Holland, D. P., Li, H., Pipeleers, D., Ling, Z., and Drucker, D. J. (2006). GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*, 4(5), 391–406.
- Zatyka, M., Da Silva Xavier, G., Bellomo, E. A., Leadbeater, W., Astuti, D., Smith, J., Michelangeli, F., Rutter, G. A., and Barrett, T. G. (2015). Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Human Molecular Genetics*, 24(3), 814–827.

Zhu, L., Dattaroy, D., Pham, J., ... Wess, J. (2019). Intra-islet glucagon signaling is critical for maintaining glucose homeostasis. *JCI Insight*, 5, 127994.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

[www.biorender.com](http://www.biorender.com)

## LIHTLITSENTS

Mina, Kaia Grete Kukker,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „GLP-1 ja GIP-i retseptori koagonisti DA-CH5 mõju Wolframi sündroomi (WS) rotimudeli diabeedi sümptomite leevendamisele ja pankrease Langerhansi saarekeste rakulisele ehitusele”, mille juhendajaks on Kadri Seppa ja kaasjuhendajaks Mario Plaas, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 08.06.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kaia Grete Kukker

30.05.2022