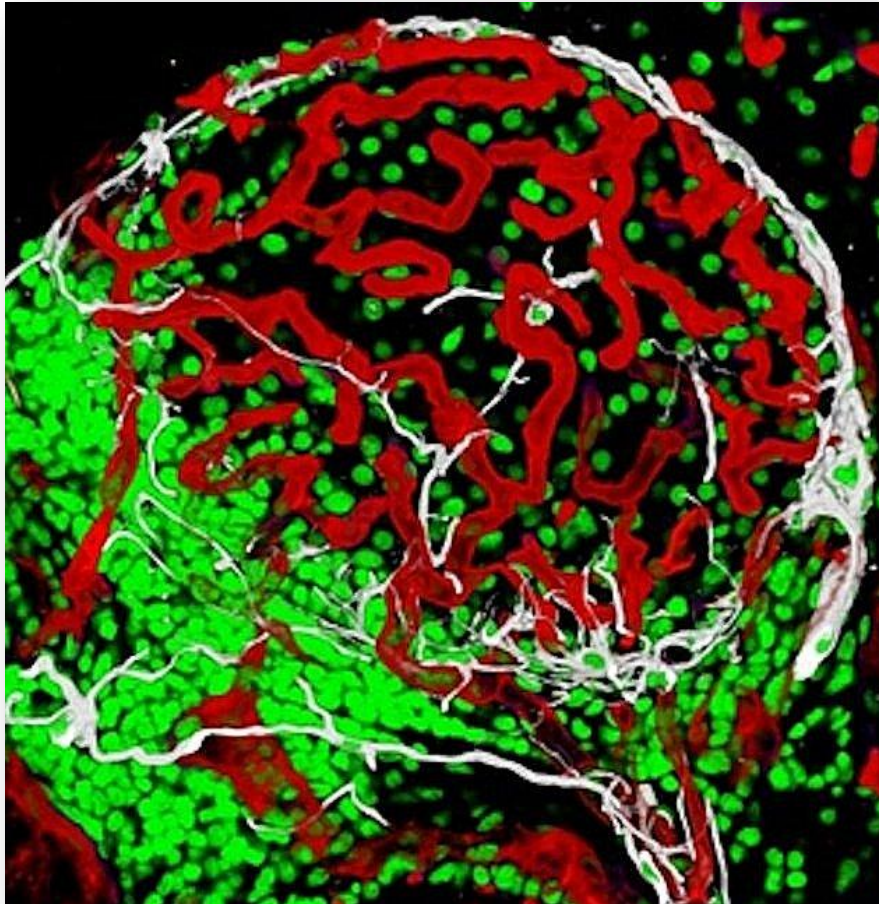


Stimulatie van innervatie na eilandjes van Langerhans transplantatie



Auteur: Nienke Stege, s2538717

Datum: 22-06-2016

Bachelor essay

Cursus: Pathofysiologie Research

Pathologie en Medische Biologie sectie Immunoendocrinologie

Onder begeleiding van Sandra Smink en Paul de Vos

Afbeelding voorblad:

3-D imaging van de microstructuur, vascularisatie en innervatie van een eilandje van Langerhans van een nestlin-GFP muis. Aankleuring van bloedvaten (rood), TH positieve sympatische zenuwen (grijs) en kernen (groen). Tang, S.C. (z.d.). 3-D labeling & microscopy of pancreatic islet. Geraadpleegd op 11 juni, 2016, van <http://www.3d-histology.com/mouse-pancreatic-islet.html>

SAMENVATTING

Type 1 diabetes mellitus is een auto-immuunziekte, die wordt gekenmerkt door de vernietiging van de insuline producerende bètacellen, welke aanwezig zijn in de eilandjes van Langerhans van de pancreas. Dit leidt tot micro- en macrovasculaire aandoeningen, die ondanks toediening van insuline analogen optreden. Deze behandelmethode zorgt namelijk niet voor een fysiologische glucoseregulatie. Pancreastransplantatie is hier wel toe in staat, maar vereist een ingrijpende procedure. Een veelbelovende andere methode is eilandjestransplantatie, dit is veel minder ingrijpend en leidt wel tot normoglycemie. In de kliniek worden eilandjes getransplanteerd door middel van injecties in de lever poortader, maar omdat deze locatie niet optimaal is zijn de positieve effecten van korte duur. Aangezien het lichaam geen goede transplantatieplek biedt is men een alternatieve transplantatieplek gaan ontwikkelen met behulp van een driedimensionale biopolymeer scaffold. De scaffold kan gebruikt worden om een ideale omgeving te creëren voor overleving en functioneren van de eilandjes. Daarbij is een goede innervatie van de eilandjes noodzakelijk om een goede interactie tussen de eilandjes en de rest van het lichaam te krijgen. In deze scriptie beschrijven wij hoe de innervatie van de scaffold gestimuleerd kan worden. Dit kan bijvoorbeeld door middel van co transplantatie met stamcellen, afkomstig uit de neurale lijst of door het toevoegen van groeifactoren. Uit ons literatuur overzicht kunnen wij concluderen dat integratie van neurotrofe factoren in de scaffold de innervatie het sterkst stimuleert.

INHOUDSOPGAVE

INLEIDING	5
INNERVATIE VAN DE SCAFFOLD STIMULEREN	8
Co transplantatie met neurale lijst stamcellen	8
Groeifactoren gerelateerd aan de neurale lijst stamcellen	9
<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	9
<i>Ciliary neurotrophic factor</i>	9
<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	10
<i>Nerve growth factor</i>	10
<i>Vascular endothelial growth factor</i>	10
Combineren van groeifactoren	11
De groeifactoren in de scaffold verwerken.....	12
DISCUSSIE	13
REFERENTIES.....	17

INLEIDING

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is een auto-immuunziekte, die wordt gekenmerkt door de vernietiging van de insuline producerende bètacellen. Deze bètacellen zijn onderdeel van de eilandjes van Langerhans in de pancreas. De pancreas maakt deel uit van het verteringsstelsel vanwege het produceren en uitscheiden van pancreassappen. Het orgaan functioneert tevens als een endocriene klier. De endocriene functie wordt uitgevoerd door de eilandjes van Langerhans. Deze structuur is opgebouwd uit een aantal celtypes, namelijk de glucagon producerende alfacellen, de insuline- en amyline- producerende bètacellen, de somatostatine producerende deltacellen, de pancreas polypeptide producerende PP cellen en de ghrelin producerende epsiloncellen (Dolenšek et al., 2015). Glucagon en insuline houden normaal gesproken de glucosespiegel in balans. Maar wanneer de insulineproducerende bètacellen vernietigd worden, zoals bij T1DM, raakt de balans verstoord en treedt er hyperglycemie op. Dit is een gevolg van de combinatie van glucose overproductie en verlaagde cellulaire opname van glucose door perifere weefsels, als spier- en vetweefsel, vanwege een tekort aan insuline (Eiselein et al., 2004). Daarnaast schakelt het lichaam bij gebrek aan insuline over op het afbreken van vetzuren. De excessieve vetafbraak en vetzuur oxidatie kunnen vervolgens leiden tot hyperlipidemie en ketose (Eiselein et al., 2004). Al deze gevolgen zijn dodelijk. Daarnaast is er bij T1DM sprake van een verhoogd risico op het ontwikkelen van secundaire microvasculaire (retinopathie, nefropathie en neuropathie) en macrovasculaire (cardiovasculaire en cerebrovasculaire aandoeningen) complicaties (Forbes & Cooper, 2013). De incidentie van T1DM neemt met een alarmerende snelheid toe. In Europa is er, bij kinderen tussen de 0 en 14 jaar oud, gedurende de afgelopen 20 jaar een toenemende trend van 3 tot 4 procent per jaar waar te nemen (Patterson et al., 2012).

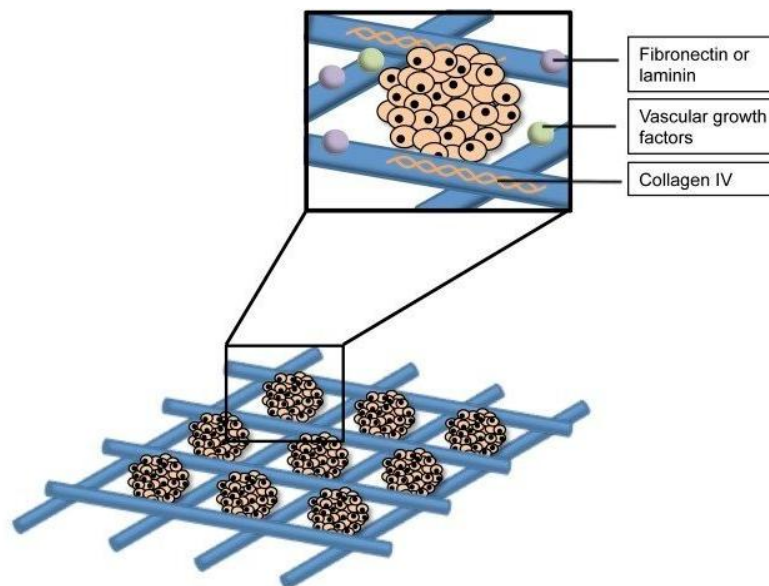
De huidige standaard therapie, om de bloedglucosespiegel te reguleren, berust op toediening van insuline analogen. Dit kan door meerdere malen per dag insuline te injecteren of door middel van continue subcutane insuline-infusie. Deze behandelmethode is echter belastend voor de patiënt, het vereist frequente bloedglucose metingen en een zorgvuldige balans in insuline dosering, voedselinname en fysieke activiteit (Daneman, 2006; Grunberger, 2013). Deze therapie zorgt niet voor een fysiologische glucoseregulatie. Zo kan een disbalans, door onvoldoende calorie-inname, overmatige insulinedosering of onvoldoende voorbereiding op de lichamelijke activiteit, leiden tot hypoglycemie (Daneman, 2006). Ook kan ketoacidose, ondanks het verlaagde risico, optreden door de combinatie van te lage insulinespiegels met verhoogde spiegels van contra-regulerende hormonen (glucagon, catecholamines, cortisol en groeihormoon) (Umpierrez & Kitabchi, 2003). Door het aanblijven van perioden met hyperglycemie en hypoglycemie, treden de diabetes-gerelateerde secundaire complicaties ook nog steeds op (Atkinson, 2014).

Door middel van transplantatie van de gehele pancreas kan er wel een constante fysiologische glucoseregulatie verkregen worden. Deze behandelmethode normaliseert de glucosespiegels en voorkomt het optreden van de secundaire complicaties (White, 2009). Echter is er voor deze procedure een ingrijpende operatie nodig en zit de patiënt vast aan levenslange immuunonderdrukking (Robertson, 2000). Dit is dan ook geen therapeutische optie voor de meerderheid van de T1DM patiënten.

Een veelbelovende andere optie is transplantatie van de eilandjes van Langerhans. Deze procedure is minimaal invasief en zorgt op de korte termijn ook voor normalisatie van de glucosespiegels. Door deze transplantatie wordt de glucose level fysiologisch in balans gehouden, wat de kans op het ontwikkelen van diabetes gerelateerde complicaties vermindert (Shapiro et al., 2006; Thompson, 2011). Een jaar na transplantatie is tot wel 90% van de patiënten insuline onafhankelijk (Shapiro et al., 2003). Deze behandelmethode moet echter nog verder ontwikkeld worden, aangezien vijf jaar na transplantatie nog maar 50% van de patiënten insuline onafhankelijk is (Froud, 2005; Bellin, 2012; Lablanche, 2015). In de kliniek worden eilandjes getransplanteerd door middel van injecties in de lever poortader (Narang & Mahato, 2006). Aan deze methode zijn wel een aantal nadelen verbonden. Wanneer humane eilandjes worden blootgesteld aan bloed, zetten ze een onmiddellijke, door bloed gemedieerde, ontstekingsreactie (instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR) in gang. Dit proces wordt gekenmerkt door binding van bloedplaatjes aan het eilandjesoppervlak en activatie van coagulatie en complementsystemen (Bennet et al., 2000). IBMIR leidt tot significante schade aan de humane eilandjes en versterkt de hierop volgende afstoting (Bennet et al., 2000). Daarnaast neemt de functie van het transplantaat op de lange termijn af, wat naast IBMIR ook veroorzaakt wordt door hoge metabolische druk, terugkerende auto-immuniteit en allo-immuniteit en blootstelling aan hoge concentraties immunosuppressiva (Smink et al., 2013). Verder gaat het grootste deel van de eilandjes verloren in de periode kort na transplantatie. Dit kan mogelijk verklaard worden door het optreden van ischemie, vanwege de gebruikte transplantatie methode (Henriksnäs et al., 2012). In de gezonde situatie leveren de bloedvaten namelijk veel zuurstof aan de eilandjes in de pancreas. Tijdens de isolatie van de eilandjes wordt de vascularisatie echter verstoord, waardoor er in de periode kort na transplantatie nog geen bloedvaten aanwezig zijn en de eilandjes afhankelijk zijn van de diffusie van zuurstof. Het bovenstaande geeft aan dat het erop lijkt dat de lever geen geschikte transplantatieplaats is voor eilandjes van Langerhans. Er is onderzoek gedaan naar alternatieve transplantatieplekken, echter biedt het menselijk lichaam geen omgeving die voldoet aan de ideale eisen voor eilandjestransplantatie (Smink et al., 2013).

Vanwege het gebrek aan een goede transplantatieplek in het lichaam is het van belang dat er een artificiële, alternatieve transplantatieplek wordt ontwikkeld. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van een driedimensionale scaffold, welke vervolgens onderhuids wordt aangebracht (figuur 1). De scaffold, opgebouwd uit biopolymeervezels, zorgt voor driedimensionale ondersteuning en bootst de micro-omgeving van de pancreas na (Dufour et al., 2005). Verder kunnen aanpassingen in de scaffold de verstoring van de vascularisatie en innervatie van de eilandjes en de interactie tussen de cellen en de extracellulaire matrix, veroorzaakt tijdens het isolatieproces van de eilandjes, reduceren (Stendahl et al., 2009). Door aan de scaffold extracellulaire matrixeiwitten toe te voegen, wordt de overleving van de eilandjes verhoogd (figuur 1) (Pinkse et al., 2006). Deze matrixeiwitten bevorderen namelijk de celhechting, wat de cellen in staat stelt om op fysiologische veranderingen in de omgeving te reageren, waardoor hun functioneren wordt verbeterd (Dufour et al., 2005). Daarnaast is goede vascularisatie van de scaffold essentieel, vanwege de behoefte aan de aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen en de afvoer van afvalstoffen en insuline (Pepper, 2013; Pepper, 2015). Zoals genoemd is het optreden van ischemie waarschijnlijk de voornaamste oorzaak van eilandjessterfte in de periode direct na transplantatie. Door de scaffold een maand voordat de eilandjes worden getransplanteerd te implanteren, krijgen bloedvaten de kans om de scaffold in te groeien. Dit kan verder gestimuleerd worden door angioneer groeifactoren, zoals vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor of basic fibroblast growth factor, aan de scaffold toe te voegen (figuur

1) (Smink et al. Niet gepubliceerd). Verder bevordert de scaffold de diffusie van voedingsstoffen en wordt directe blootstelling aan bloed in de eerste weken na transplantatie voorkomen, waardoor IBMIR wordt afgezwakt (Dufour et al., 2005). Deze eigenschappen resulteren in een toename van de eilandjesoverleving in de periode direct na transplantatie. Daarnaast maakt de transplantatie methode het mogelijk om de immuunsuppressiva lokaal toe te dienen, om zo de bijwerkingen van immuunsuppressiva te verminderen (Dufour et al., 2005).



Figuur 1: Een driedimensionale scaffold, opgebouwd uit biopolymeervezels voor eilandjestransplantatie. De scaffold zorgt voor driedimensionale ondersteuning en bootst de micro-omgeving van de pancreas na (Dufour et al., 2005). Daarnaast verhogen de extracellulaire matrixeiwitten (fibronectin, laminin en collagen IV) en angiogene groeifactoren de overleving en vascularisatie van de eilandjes (Pinkse et al., 2006; Smink et al., niet gepubliceerd). Aangepaste afbeelding van Smink et al. (2013).

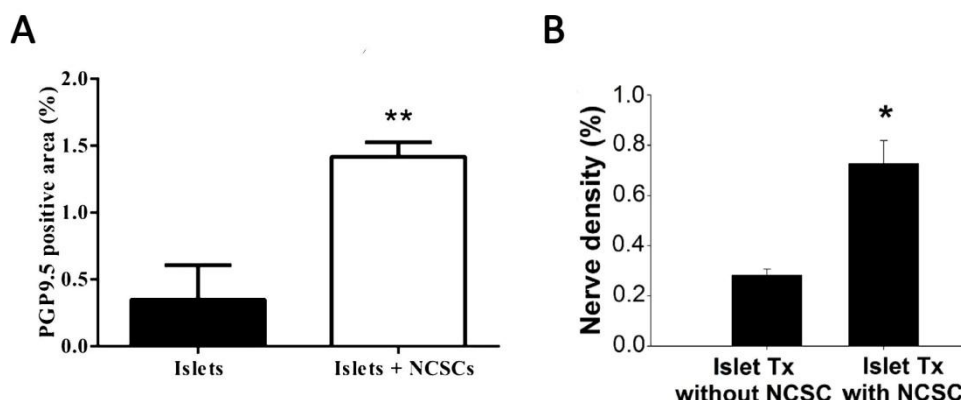
Er zijn daarentegen nog geen aanpassingen aan de scaffold gedaan, om de innervatie van de scaffold te verbeteren. Een goede innervatie van de eilandjes is echter noodzakelijk om een goede interactie tussen de eilandjes en de rest van het lichaam te krijgen. De humane eilandjes kunnen zelf veranderingen in de bloedglucosespiegel waarnemen en hierop reageren met een gepaste hormoonreactie (Rodriguez-Diaz & Caicedo, 2014). Daarnaast worden ze in de pancreas ook nog geïnnerveerd door het autonome zenuwstelsel. Het zenuwstelsel regelt de doorbloeding van de eilandjes en de proliferatie van de bètacellen (Atef et al., 1997; Carlsson et al., 1999; Imai et al., 2008; Lausier, 2010). Ook maakt het zenuwstelsel de gecoördineerde pulserende afgifte van insuline mogelijk (Pørksen et al., 1994). Dit mechanisme verloopt namelijk via communicatie tussen de eilandjes. In de afwezigheid van innervatie wordt insuline op individueel eilandjesniveau wel pulserend afgegeven, maar verloopt de netto afgifte van insuline door de pancreas (van alle eilandjes samen) niet op een pulserende wijze (Pørksen et al., 1994). Verder zorgen de hersenen voor feed-forward aansturing van de eilandjes, dus voordat de veranderingen in de bloedglucosespiegel optreden (Rodriguez-Diaz & Caicedo, 2014). Dit anticipatie mechanisme treedt op als er sprake is van voedselinname, waar de parasympaticus een stijging in de glucosespiegel voorkomt, maar ook als er sprake is van stress, waar de sympaticus zorgt voor snelle vrijmaking van glucose (Ahrén, 2000). Daarnaast sturen de zenuwen ook signalen naar de eilandjes, gebaseerd op informatie over de glucosespiegel. In hyperglycemische condities stimuleert de parasympaticus de insuline productie door de bètacellen en remt het tevens de sympaticus (Thorens, 2014; Benthem, 2001). In het geval

van hypoglycemie zet de sympaticus de alfacellen aan tot de productie van glucagon, daarnaast remt het de afgifte van insuline (Thorens, 2014). Optimalisatie van de innervatie van de scaffold is daarom essentieel, met het uiteindelijke doel om de eilandjesfunctie van de gezonde pancreas zo dicht mogelijk te benaderen. De hoofdvraag luidt dan ook: Hoe kan de innervatie van de scaffold gestimuleerd worden?

INNERVATIE VAN DE SCAFFOLD STIMULEREN

Co transplantatie met neurale lijst stamcellen

De toepasbaarheid van stamcellen maakt op vele onderzoeksgebieden stormachtige ontwikkeling door. De veelzijdigheid van stamcellen resulteerde onder andere in een doorbraak op het gebied van weefselregeneratie. Het gebruik van stamcellen om de innervatie van de scaffold te stimuleren is dan ook een voor de hand liggende optie. Recentelijk, hebben Grapensparr et al. (2015) de potentie van stamcellen afkomstig uit de neurale lijst (NCSCs) onderzocht, om innervatie na eilandjes transplantatie te stimuleren. De eilandjes werden samen met NCSCs in het nierkapsel getransplanteerd. Door middel van immunohistochemie is de zenuwdichtheid bepaald door het relatieve PGP9,5 positieve gebied (marker voor neuronen) in de eilandjes (IA2 positief) te meten. Met deze methode is na 4 weken een toename in de zenuwdichtheid met een factor 4 aangetoond (figuur 2a). In overeenstemming met de resultaten van Grapensparr et al. (2015), hebben Lau et al. (2015) een toename in de zenuwdichtheid met een factor 3 waargenomen, wat significant hoger was dan de controle (figuur 2b). De zenuwdichtheid is volgens dezelfde methode als Grapensparr et al. (2015) bepaald. Met behulp van immunohistochemie tonen ze daarnaast aan dat de NCSCs, aanwezig in het transplantaat, tot zowel glia/Schwanncellen als neuronen differentieerden. Dat donor Schwanncellen bijdragen aan eilandjestransplantatie en de neurale regeneratie van het transplantaat, heeft een onderzoek van Juang et al. (2015) aangetoond. Lau et al. (2015) laten ook zien dat muizen met NCSCs gecoate eilandjes een hogere glucoseopname snelheid hebben na toediening van een lading glucose. De resultaten van beide onderzoeken suggereren dat co transplantatie met NCSCs zowel de innervatie van de eilandjes als de functie van het transplantaat kan verbeteren.



Figuur 2: De zenuwdichtheid in de eilandjestransplantaten. (a) De dichtheid neemt toe met een factor 4 na co transplantatie van stamcellen afkomstig uit de neurale lijst met humane eilandjes. n=4 per groep. (Grapensparr et al., 2015). (b) De dichtheid was met een factor 3 toegenomen na coating van de eilandjes met stamcellen afkomstig uit de neurale lijst. n=7 per groep (Lau et al., 2015). De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SEM; *, $P < .05$; **, $P < .01$ ten opzichte van controle transplantaten.

Groefactoren gerelateerd aan de neurale lijst stamcellen

Een andere optie is, om naast vascularisatie stimulerende groeifactoren ook innervatie stimulerende groeifactoren aan de scaffold toe te voegen. Uit de onderzoeken van Grapensparr et al. (2015) en Lau et al. (2015) bleek dat de differentiatie van zenuwcellen uit NCSCs nauwelijks heeft bijgedragen aan de gemeten toename in zenuwdichtheid. Dit suggereert dat de positieve effecten van de NCSCs op eilandjestransplantatie mogelijk deels ten grondslag liggen aan de groeifactoren die deze cellen uitscheiden. Neurotrofe groeifactoren ondersteunen de groei, overleving en differentiatie van zowel ontwikkelende als volwassen neuronen. Voorbeelden van neurotrofe factoren zijn nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) en glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Verscheidene studies hebben aangetoond dat deze groeifactoren positieve invloeden hebben op de eilandjes. In plaats van co transplantatie van de eilandjes met NCSCs zou het aanbrengen van de NCSCs gerelateerde neurotrofe groeifactoren in de scaffold ook een methode kunnen zijn om de innervatie van de scaffold te verbeteren. Hoewel de invloed van GDNF, CNTF en BDNF op de innervatie in het geval van eilandjestransplantatie nog niet uitgebreid onderzocht is, zijn er wel onderzoeken uitgevoerd naar de invloed van deze factoren op de innervatie van andere organen en celtypes.

Glial cell line-derived neurotrophic factor

GDNF stimuleert, zowel *in vitro* als *in vivo*, de sympatische innervatie van cardiomyocyten (Miwa et al., 2013; Fu et al., 2013). Dit geeft aan dat GDNF als een chemoattractant voor sympatische innervatie kan werken. Mocht het ook deze werking uitoefenen in de eilandjes, dan zou met behulp van deze factor de sympatische reïnnervatie van getransplanteerde eilandjes gestimuleerd kunnen worden. Een ander belangrijk neuraal celtype in de eilandjes van Langerhans zijn de Schwanncellen. Voor GDNF is aangetoond dat het de migratie en proliferatie van deze cellen in de hippocampus en nervus ischiadicus stimuleert (Paratcha G et al., 2003; Höke et al., 2003). Verder wordt deze groeifactor veel gebruikt bij zenuwregeneratie, vanwege zijn werking als trofische factor voor zenuwvezels en als promotor van axongroei en -vertakking (Boyd & Gordon, 2003). GDNF is dus in staat om de innervatie van weefsels te stimuleren, maar of dit ook het geval is in de eilandjes moet nog onderzocht worden. Dat GDNF wel invloed op bètacellen kan uitoefenen is onderzocht door Mwangi et al. (2008). Zij hebben aangetoond dat GDNF proliferatie en overleving van de bètacellen verhoogt.

Ciliary neurotrophic factor

CNTF lijkt voornamelijk invloed te hebben op motorneuronen. Zo bevordert het de regeneratie van motorneuronen in ratten en stimuleert het *in vitro* het uitgroeien van neurieten uit dit type neuronen (Xu et al., 2009; Oyesiku & Wigston, 1996). Motorneuronen zijn de neuronen, waarlangs het autonome zenuwstelsel zijn effect op de weefsels uitoefent. Reïnnervatie van dit neurontype is dus van belang voor de autonome aansturing van de eilandjes. Daarnaast suggereren Xu et al. (2009) dat CNTF de axon regeneratie en Schwanncel proliferatie, groei en migratie na nervus ischiadicus transectie stimuleert. Als deze effecten ook aanwezig zijn in eilandjes, dan zou het toevoegen van deze factor de autonome innervatie van getransplanteerde eilandjes kunnen verbeteren. Ook voor CNTF is al wel aangetoond dat het de overleving van de eilandjes verhoogt, wat aangeeft dat deze factor wel invloed heeft op de eilandjes (Rezende et al., 2009; Rezende et al., 2012).

Brain-derived neurotrophic factor

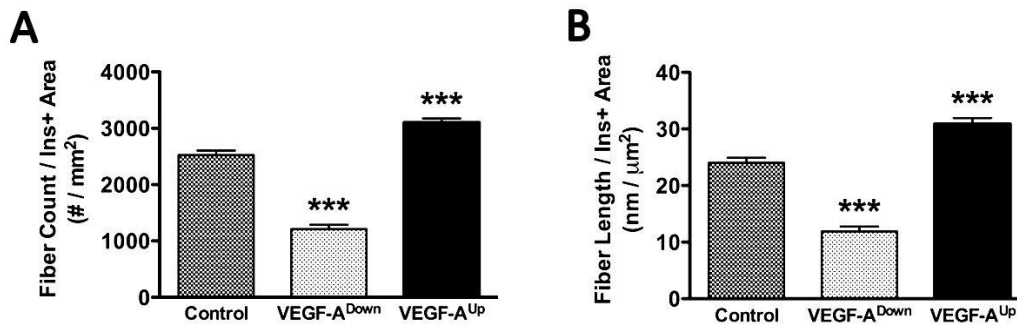
BDNF induceert de sympatische innervatie van een transplantaat in de substantia nigra en stimuleert het ingroeien van functionele sensorische en motorische zenuwen in een scaffold, geplaatst in de ruimte ontstaan na volledige ruggenmerg transectie (Lucidi-Phillipi et al., 1995; Han et al., 2014; Han et al., 2015). Hieruit blijkt de potentie van BDNF in het induceren van de reïnnervatie van transplantaten, wat veelbelovend lijkt voor het stimuleren van de innervatie van getransplanteerde eilandjes, maar dit moet nog onderzocht worden. Dat BDNF in staat is om invloed uit te oefenen op eilandjes is al wel aangetoond. Zo verhoogt BDNF de bètacel / niet-bètacel verhouding en het aantal insuline-secretie granules in de eilandjes van obese diabetische muizen (Yamanaka et al., 2006).

Nerve growth factor

NGF werkt *in vitro* als chemoattractant voor sensorische neuronon, microglia en Schwanncellen (Letourneau, 1978; De Simone et al., 2007; Maniwa et al., 2003). Naast de stimulerende effecten op zenuwcellen *in vitro*, is van deze neurotrofe groeifactor de invloed op de innervatie van getransplanteerde eilandjes al wel onderzocht. Reimer et al. (2003) hebben eilandjes, verkregen uit genetisch identieke ratten, in de pancreas van diabetes ratmodellen getransplanteerd. Er werden lokaal korrels aan het transplantaat toegevoegd, welke 14 dagen lang voor de afgifte van NGF zorgden. Na 7 weken bleek uit immunofluorescentie analyse dat er na NGF toediening grotere eilandjes aanwezig waren en dat het insuline positieve gebied in de eilandjes was toegenomen. Daarnaast zorgde NGF voor een significante toename in het aantal TH positieve cellen (marker voor perifere sympatische neuronon) (figuur 4). Dat NGF ook echt de transplantatieresultaten verbeterde is onder andere aangetoond door Hata et al. (2014). Zij toonden aan dat, na voorbehandeling van de eilandjes met NGF, een hoger percentage normoglycemie, toegenomen seruminsuline en verbeterde glucosetolerantie bereikt werden. Verder bleek uit de onderzoeken van Miao et al. (2005; 2006) dat NGF (voor)behandeling zowel *in vitro* als *in vivo* de overleving van eilandjes verhoogde.

Vascular endothelial growth factor

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is een welbekende groeifactor voor vascularisatie, maar het schijnt ook een neurotrofe werking te hebben. Reinert et al. (2014) hebben onderzocht of VEGF ook eilandjes innervatie kan reguleren. Met behulp van immunohistochemie werd aangetoond dat een reductie van de expressie van VEGF in de pancreas in een muismodel resulteerde in een afname van 52% in het aantal TUJ1 positieve cellen (marker voor zenuwvezels) en een afname van 50% in de lengte van deze vezels, ten opzichte van de controle pancreas met normale VEGF expressie (figuur 3). Wanneer VEGF in de pancreas tot overexpressie werd gebracht, leidde dit tot een toename van 23% in het aantal TH positieve cellen en een zenuwlengte toename van 29% (figuur 3). Om vast te stellen of de door VEGF veroorzaakte verandering in de innervatie van de eilandjes selectief de sympatische of parasympatische zenuwvezels beïnvloedde, werden de pancreassen vervolgens voor TH (marker voor sympatische zenuwvezels) en VAcHt (marker voor parasympatische zenuwvezels) aangekleurd. Reductie van de VEGF expressie resulteerde in een afname in de dichtheid van zowel de TH positieve als de VAcHt positieve cellen, waar overexpressie van VEGF in een toename in de dichtheid van TH positieve en VAcHt positieve cellen resulteerde. Hieruit blijkt dat VEGF zowel de sympatische als parasympatische innervatie van de eilandjes stimuleert.



Figuur 3: De morfometrische kwantificering van de TH positieve cel dichtheid (a) en vezellengte (b) n=4-6 muizen per groep. De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SEM; ***, P < .001 ten opzichte van de controlegroep (Reinert et al., 2014).

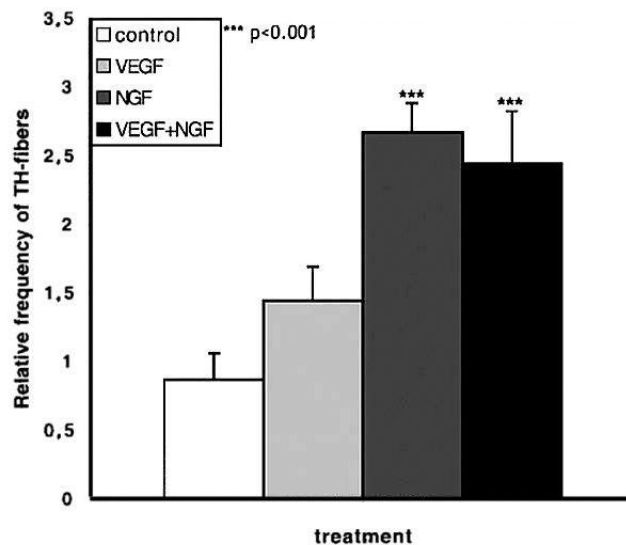
De positieve effecten van VEGF op de innervatie zouden echter ook via NGF of een andere neurotrofe groeifactor kunnen verlopen. Shvartsman et al. (2014) toonden bijvoorbeeld aan, dat de door VEGF geïnduceerde axonregeneratie in een muismodel met spierschade gemedieerd werd door NGF en GDNF. Wanneer NGF of GDNF geneutraliseerd werd met antilichamen werd er namelijk geen innervatie meer waargenomen. Daarnaast hebben zij een verhoogde expressie van deze beide groeifactoren waargenomen, wanneer VEGF werd toegediend. Ze hebben tevens *in vitro* onderzocht of VEGF inderdaad voor een toename van NGF of GDNF kon zorgen. De NGF secretie nam inderdaad significant toe wanneer VEGF werd toegevoegd aan muis myoblasten die zich in een metabolische stress situatie bevonden. Daar komt bij dat er in het onderzoek van Reinert et al. (2014) ook een verhoogde expressie van NGF werd waargenomen, wanneer VEGF tot overexpressie werd gebracht. Opmerkelijk is dat Reimer et al. (2003) geen significante verschillen in de innervatie van de getransplanteerde eilandjes vonden, nadat VEGF werd toegediend (figuur 4).

Combineren van groeifactoren

In vivo zijn het vaak meerdere groeifactoren samen die een stabiel neuraal netwerk opbouwen. Het toevoegen van een enkele groeifactor aan de scaffold heeft daarom misschien een minder sterk effect op de innervatie, dan wanneer er een combinatie van groeifactoren wordt toegevoegd. Om deze reden hebben Reimer et al. (2003) ook gekeken naar de combinatie van VEGF en NGF. Wanneer er lokaal zowel VEGF als NGF werd afgegeven, resulteerde dit, net als bij alleen NGF, in een toename van de grootte van de eilandjes en in een toename van het insuline positieve gebied in de getransplanteerde eilandjes. Verder zorgde de combinatie voor een toename in het aantal TH positieve cellen en ditmaal ook in het aantal NPY positieve cellen (figuur 4). Reimer et al. concludeerden dan ook dat in ratten lokale groeifactor behandeling een gunstig effect heeft op de autonome reïnnervatie, de eiland integriteit en de overleving van het transplantaat na eilandjestransplantatie in ratten.

Dat het effect op de innervatie sterk afhangt van de combinatie van factoren bleek uit het onderzoek van Förander et al. (1998). Zij combineerden NGF met een andere neurotrofe factor, namelijk neurotrophin-3 (NT-3). Deze factor is nog niet eerder aan bod gekomen, aangezien het ten opzichte van de andere neurotrofe factoren een minder sterk effect heeft op het stimuleren van innervatie. Förander et al. (1998) kwamen tot de ontdekking dat wanneer NGF en NT-3 gecombineerd werden, er een afname van de zenuwvezel formatie optrad in plaats van een versterkte toename. Er zal dus nog goed onderzocht moeten worden welke combinatie van factoren en welke concentraties tot het optimale resultaat leiden. Maar dat het combineren van factoren wel degelijk tot een sterkere

innervatie kan leiden dan het toevoegen van een enkele groeifactor, is onder andere aangetoond door Chen et al. (2010).



Figuur 4: Semi-kwantitatieve analyse van het aantal TH zenuwcellen positieve vezels in pancreas secties, inclusief de getransplanteerde eilandjes, met of zonder lokale behandeling met alleen NGF of VEGF of in combinatie, in streptozotocin-diabetische ratten 7 weken na transplantatie. n=6 ratten per groep, met 24-26 transplantaten per rat. De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SEM; ***, $P < .001$ ten opzichte van de controle groep (Reimer et al., 2003).

De groeifactoren in de scaffold verwerken

Naast het selecteren van één of meerdere groeifactoren, is het ook belangrijk om na te denken over hoe deze groeifactoren kunnen worden toegediend. Aangezien het injecteren van de groeifactoren tot schadelijke neveneffecten leidt, is dit geen optie. Zo leidt systemische toediening van exogeen NGF aan gezonde vrijwilligers bijvoorbeeld tot pijn in diepe weefsels en hyperalgesie op de plaats van injectie (Petty et al., 1994). Het toevoegen van groeifactorproducerende cellen aan de scaffold zou voor een fysiologische regulatie kunnen zorgen, maar deze cellen zullen de competitie met de eilandjes aangaan om zuurstof en nutriënten. Het zou dus mogelijk de innervatie van de scaffold kunnen verbeteren, maar dit gaat dan ten koste van het aantal goed functionerende eilandjes. Het integreren van de groeifactoren in de scaffold zou mogelijk wel een optie kunnen zijn. Wanneer je de groeifactoren in vrije vorm aan de scaffold zou toevoegen is hun werking niet van lange duur, aangezien lichaamsvloeistoffen voor snelle diffusie van de factoren zorgt en het zich door het gehele lichaam zal verspreiden. Verhoging van de concentratie zou daarentegen kunnen leiden tot schadelijke neveneffecten, zoals cachexie waargenomen bij een hoge systemische CNTF concentratie (Henderson et al., 1994). Om snelle diffusie te voorkomen is men op zoek gegaan naar een manier om de groeifactoren in de scaffold te houden. Zo hebben Han et al. (2009) een methode gevonden om een groeifactor aan een collageen scaffold te laten hechten. Ze hebben de DNA sequentie van het collageen bindingsdomein, afgeleid van collagenase, aan de N-terminus van het humane BDNF DNA fragment gezet. Met behulp van een ELISA essay werd aangetoond dat het vrij toegevoegde BDNF op de eerste dag snel werd afgegeven, terwijl het aan het bindingsdomein gekoppelde BDNF geleidelijk over 14 dagen werd vrijgemaakt (Han et al., 2009). Dat BDNF ondanks de fusie met het bindingsdomein zijn positieve effecten op de innervatie behoudt, hebben Han et al. (2014; 2015) vervolgens bevestigd. De scaffold werd, na complete ruggenmergtransectie in honden, in de ruimte geplaatst die ontstaan was. De transplantatie zorgde voor reïnnervatie van functionele perifere

zenuwen en resulteerde zelfs in het zelfstandig kunnen staan en in enige motoriek. Op een vergelijkbare manier hebben Sun et al. (2009) deze methode toegepast op een collageen scaffold waar laminin in verwerkt zat. Zij fuseerden NGF met een laminin bindingsdomein. Ook in deze situatie werd hetzelfde verschil in afgifte patroon als bij Han et al. (2009) waargenomen. Verder hebben ze aangetoond dat zowel *in vitro* als *in vivo* de activiteit van NGF behouden bleef. CNTF kon ook effectief aan een laminin bindingsdomein gekoppeld worden, er bleef meer eiwit op de scaffold behouden en er was sprake van verbeterde zenuwregeneratie en functioneel herstel ten opzichte van vrij CNTF (Cao et al., 2011).

Vervolgens hebben Cao et al. (2013) de effecten van vrij, met collageen- en met laminin bindingsdomein gefuseerd BDNF en CNTF op gezichts-zenuwregeneratie vergeleken. Na gezichts-zenuw transsectie was het snelste motoriekherstel waar te nemen in de met fusie-eiwit getransplanteerde scaffold groepen. Er waren geen significante verschillen tussen de met laminin gefuseerde en collageen gefuseerde groeifactoren aanwezig. Wat wel duidelijk naar voren kwam is dat de combinatie van beide fusie-eiwitten resulteerde in een significant verbeterde motoriekherstel en regeneratie van axonen en Schwanncellen ten opzichte van de groepen die zijn behandeld met een enkel fusie-eiwit. Dit toont opnieuw aan dat het combineren van groeifactoren een sterker effect kan hebben op de innervatie dan het toedienen van een enkele groeifactor. Door collageen of laminin in de scaffold te verwerken en de gekozen groeifactoren vervolgens te fuseren met een bindingsdomein voor dit eiwit, kan door geleidelijke en langdurige afgifte de innervatie van de scaffold dus nog effectiever gestimuleerd worden. Hoewel dankzij deze methode de periode van groeifactor afgifte verlengd is, bedraagt deze alsnog maar twee weken. Desalniettemin zijn de effecten over een veel langere periode waar te nemen. Zo observeerden Han et al. (2015) zelfs na 38 weken nog verschillen in de mate van innervatie tussen de met fusie-eiwit behandelde groep en de controle groepen. De meeste onderzoeken werden echter over een minder lange periode uitgevoerd, al werden hier in ieder geval na 15 tot 16 weken nog verschillen in innervatie tussen de groepen aangetoond (Han et al., 2009; Cao et al., 2013).

DISCUSSIE

Eilandjestransplantatie is een veelbelovende behandelmethode voor type 1 diabetes mellitus, het heeft vele voordelen ten opzichte van de huidige standaard therapieën. Eilandjestransplantatie wordt voornamelijk uitgevoerd door de eilandjes in de leverpoortader te injecteren, maar het optimaal functioneren van het transplantaat blijkt via deze wijze niet van lange duur te zijn. Aangezien het lichaam geen goede transplantatieplek biedt is men een artificiële, alternatieve transplantatieplek gaan ontwikkelen met behulp van een biopolymeer scaffold. Deze kan onderhuids worden aangebracht om vervolgens eilandjes erin te transplanteren. Om de transplantaatfunctie te optimaliseren worden er vasculaire groeifactoren en extracellulaire matrixeiwitten aan de scaffold toegevoegd, om zo de levensvatbaarheid van de eilandjes te verhogen. Om een goede interactie tussen de eilandjes en de rest van het lichaam te krijgen zou de innervatie van het transplantaat echter ook nog geoptimaliseerd moeten worden.

In deze scriptie zijn verscheidene methoden beschreven om de innervatie van de scaffold te stimuleren. Één daarvan is stimulatie door middel van co transplantatie met stamcellen, welke afkomstig zijn uit de neurale lijst. Transplantatie van deze cellen tezamen met eilandjes zorgt voor

een toename in innervatie met een factor 4 (Grapensparr et al., 2015). Daarnaast is aangetoond dat de transplantaatfunctie ook daadwerkelijk verbeterd was ten opzichte van de controle transplantaten (Grapensparr et al., 2015; Lau et al., 2015). Een groot nadeel van deze techniek is dat het gebruik van stamcellen soms resulteert in tumorvorming. Melzi et al. (2010) hebben laten zien dat er, 140 dagen na co transplantatie van eilandjes en neurale stam/precursor cellen, maligne tumoren in de muizen aanwezig waren. Lau et al. (2015) hebben vervolgens een lange termijn follow-up studie voor de met NCSC gecoate eilandjes uitgevoerd. Gedurende deze studie van 140 dagen hebben zij geen tumorvorming waargenomen. Mocht men deze methode echter klinisch willen gaan toepassen, dan geeft 140 dagen nog geen reëel lange termijn beeld, aangezien men wil bereiken dat de transplantaten jaren meegaan. Daarnaast zullen de NCSCs vanwege ethische bezwaren in dit geval op een andere manier verkregen moeten worden, bijvoorbeeld uit de huid of uit het beenmerg (Shi et al., 2013; Shinagawa et al., 2015; Yang & Xu, 2013; Krejčí & Grim, 2010). De vraag is echter of deze stamcellen dezelfde resultaten zullen opleveren als de NCSCs, verkregen uit embryonaal weefsel. Tussen NCSCs met verschillende oorsprong zitten namelijk verschillen in onder andere genexpressie, proliferatie capaciteit en differentiatie potentie (Nagoshi et al., 2008; Bixby et al., 2002; Dupin & Sommer, 2012). Verder zullen de NCSCs de competitie met de eilandjes aangaan om zuurstof en nutriënten. Dit houdt in dat co transplantatie van eilandjes met NCSCs ten koste kan gaan van het aantal goed functionerende eilandjes.

Een andere optie is het toevoegen van neurale groeifactoren aan de scaffold. Zo zouden NCSCs afkomstige factoren als nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor of glial cell line-derived neurotrophic factor gebruikt kunnen worden. Wanneer de positieve effecten van de verschillende groeifactoren onderling vergeleken worden dan lijkt dit sterk afhankelijk te zijn van het orgaan/celtype waarin het onderzoek wordt uitgevoerd en het (neurale) celtype waarop de effecten worden bestudeerd. Zo is voor GDNF, BDNF en CNTF aangetoond dat ze de overleving van sympatische neuronen, verkregen uit de medulla, verhogen, terwijl NGF geen effect op de overleving had (Coprav et al., 1999). Maar wanneer er gekeken werd naar de invloed van deze factoren op het groeien van sympatische neurieten richting cardiomyocyten, bleek dat GDNF, BDNF én NGF in staat waren dit te stimuleren, terwijl CNTF geen invloed op het groeien had (Miwa et al., 2010). Verder tonen verscheidene onderzoeken aan dat NGF voornamelijk invloed heeft op de sensorische neuronen, terwijl GDNF en BDNF voornamelijk invloed hebben op de motorische neuronen (Chen et al., 2010; Santos et al. 2016). In de vergelijkende studies lopen de resultaten van CNTF te sterk uiteen, waardoor over het effect van deze factor niets te zeggen valt. Om een uitspraak te doen over welke van deze factoren het best gebruikt kan worden om de eilandjes innervatie te verbeteren moet er dus specifiek gekeken worden naar de effecten van deze factoren in getransplanteerde eilandjes. De potentie in het stimuleren van de innervatie van getransplanteerde eilandjes is echter alleen nog maar onderzocht voor NGF. Reimer et al. (2003) toonden aan dat behandeling met NGF het aantal sympatische zenuwvezels met ruim een factor 2,5 verhoogde. Ook voor NGF is bewezen dat het de functie van het transplantaat verbeterde en de eilandjesoverleving toenam (Hata et al., 2014; Miao et al., 2005; Miao et al., 2006). Saito et al. (2012) beweren echter dat de effectiviteit van NGF in het stimuleren van de innervatie afhankelijk is van de transplantatieplek. In tegenstelling tot de veelbelovende resultaten van andere onderzoeksgroepen, gebaseerd op transplantatie onder het nierkapsel, kwam uit het onderzoek van Saito et al. (2012) dat NGF behandeling bij intraportale eilandjestransplantatie geassocieerd is met transplantaat falen. Een groot verschil tussen de gebruikte methode van Saito et al. (2012) en de methode van Reimer et al.

(2003), is dat Saito et al. de eilandjes 24 uur voor transplantatie incubeerden met NGF, terwijl Reimer et al. door middel van NGF korrels de getransplanteerde eilandjes gedurende 14 dagen stimuleerden. Een 24 uur durende voorbehandeling met NGF is dus mogelijk niet voldoende om de door NGF geïnduceerde effecten te krijgen die Reimer et al. (2003) hebben aangetoond. De oorzaak van het transplantaat falen in het geval van het onderzoek van Saito et al. (2012) kan dus een gebrek aan NGF stimulatie zijn, al kan de transplantatieplek wel degelijk bepalend zijn voor de mate van het optreden van innervatie (Korsgren et al., 1993). Om een gegronde uitspraak te kunnen doen over de transplantatieplek afhankelijke effectiviteit van NGF, zal er eerst een vervolgonderzoek uitgevoerd moeten worden, waarbij de NGF stimulatie van de intraportale getransplanteerde eilandjes volgens de methode van Reimer et al. (2003) gerealiseerd wordt.

Reinert et al. (2014) onderzochten de invloed van VEGF op de innervatie van eilandjes. Hieruit bleek dat VEGF naast zijn angiogenische werking ook zorgt voor een toename in het aantal zenuwvezels en de lengte hiervan. Zoals genoemd zou dit effect echter ook via een neurotrofe groeifactor kunnen verlopen. Mocht dit het geval zijn, dan is het gebruik van deze neurotrofe factor effectiever dan het gebruiken van VEGF, aangezien het effect op de innervatie zo eerder bereikt is. Dit is van belang, omdat de groeifactoren niet lang aanwezig zullen zijn in de scaffold en dus niet veel tijd hebben om hun werking uit te oefenen. Opmerkelijk is dat Reimer et al. (2003) geen significante verschillen in de innervatie van de getransplanteerde eilandjes vonden na VEGF behandeling. Dit zou verklaard kunnen worden door verschillen in de gebruikte methode. Zo duurde de VEGF stimulatie bij Reimer et al. (2003) een week langer dan bij Reinert et al. (2014). Tevens analyseerden Reinert et al. de eilandjes direct na de periode van stimulatie, terwijl Reimer et al. hier nog 5 weken mee wachtten. Hoewel voor uitsluiting vervolgonderzoek vereist is, lijkt het gebruik van VEGF niet de meest effectieve manier om de innervatie van de scaffold te stimuleren.

Aangezien er nog geen onderzoeken zijn uitgevoerd naar het effect van BDNF, CNTF en GDNF op de innervatie van getransplanteerde eilandjes en uit de literatuur wel duidelijk naar voren komt dat de effecten sterk afhangen van de plaats in het lichaam, kan er op basis van de huidige informatie nog geen uitspraak gedaan worden over welke van de neurotrofe factoren het best gebruikt kan worden om de eilandjes innervatie te verbeteren. De potentie van NGF is echter al aangetoond en aangezien uit de vergelijkende studies blijkt dat, in andere plekken in het lichaam, BDNF en GDNF meer invloed hebben op motorneuronen dan NGF, lijken BDNF en GDNF veelbelovende factoren om de innervatie van de scaffold te stimuleren. Naast het toevoegen van een bepaalde neurale groeifactor aan de scaffold, zou het combineren van meerdere neurotrofe groeifactoren ook een optie zijn om de innervatie van de scaffold te stimuleren. Aangezien factoren elkaars werking kunnen versterken maar ook kunnen afzwakken, zal er eerst onderzocht moeten worden welke combinatie van factoren het beste resultaat oplevert (Förander et al., 1998; Chen et al., 2010). Verder zal voor elke factor de optimale concentratie moeten worden vastgesteld. De voordelen van het combineren van factoren boven het gebruik van een enkele factor, is door onder andere Chen et al. (2010) al aangetoond en zal de beste methode zijn om de innervatie van de scaffold te optimaliseren. Om een langdurig effect van deze factoren te bereiken kunnen ze gekoppeld worden aan een collageen of laminin bindingsdomein, zodat ze hechten aan de scaffold en er sprake is van langzame diffusie van de factoren (Han et al., 2009; Sun et al., 2009). Hiervoor zal er collageen of laminin in de scaffold verwerkt moeten worden. Voor beide opties is aangetoond dat de innervatie stimulerende effecten van de fusie-eiwitten, dankzij de geleidelijke en langdurige afgifte, versterkt is ten opzichte van de in

vrije vorm toegevoegde groeifactoren (Han et al., 2014; Cao et al. 2011). Verder is er nog geen significant verschil aangetoond tussen de effectiviteit van groeifactoren gefuseerd met laminin bindingsdomeinen en met collageen bindingsdomeinen (Cao et al. 2013). Onderzoek moet nog uitwijzen welke methode het beste resultaat oplevert in het geval van de getransplanteerde eilandjes. Hierbij moet gekeken worden naar het effect op de innervatie, maar moet ook rekening gehouden worden met welke van beide extracellulaire matrixeiwitten de meest ideale omgeving wordt gecreëerd voor overleving en functioneren van de eilandjes.

Op basis van de al uitgevoerde onderzoeken lijkt het toevoegen van een combinatie van neurotrofe factoren aan de scaffold de meest effectieve manier om de innervatie van de scaffold te stimuleren. Zo wordt namelijk het veiligheidsrisico van het gebruik van stamcellen vermeden, terwijl het er naar uitziet dat het de innervatie wel sterk stimuleert. Om een boost aan de initiële innervatie van de scaffold te geven zullen de met collageen of laminin bindingsdomein gefuseerde groeifactoren bij het implanteren van de scaffold al toegevoegd worden, zodat er een basale innervatie aangelegd kan worden in de vier weken voorafgaand aan de eilandjestransplantatie. Gedurende de eerste twee weken zal er een geleidelijke afgifte van de groeifactoren plaats vinden, maar aangetoond is dat de effecten over een langere periode, in ieder geval 15 weken, zichtbaar zijn. Er zal eerst nog verder onderzoek uitgevoerd moeten worden om de effectiviteit van het toevoegen van neurotrofe factoren op het stimuleren van de innervatie (in het geval van getransplanteerde eilandjes) echt vast te stellen. Ook zullen eerst de meest optimale combinaties en concentraties van de groeifactoren bepaald moeten worden en moeten de eventuele bijwerkingen onderzocht worden. Het lijkt echter een veelbelovende methode om de omgeving van de pancreas na te bootsen en daarmee de lange termijn overleving en functie van de eilandjes te vergroten, zodat meer T1DM patiënten in de toekomst behandeld kunnen worden.

REFERENTIES

- Ahrén, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 43(4), 393-410.
- Atef, N., Laury, M.C., N'Guyen, J.M., Mokhtar, N., Ktorza, A., & Penicaud, L. (1997). Increased pancreatic islet blood flow in 48-hour glucose-infused rats: involvement of central and autonomic nervous systems. *Endocrinology*. 138(5), 1836-40.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., & Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*. 383(9911), 69-82.
- Bellin, M.D., Barton, F.B., Heitman, A., Harmon, J.V., Kandaswamy, R., Balamurugan, A.N., ... Hering, B.J. (2012). Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am J Transplant*. 12(6), 1576-83.
- Bennet, W., Groth, C.G., Larsson, R., Nilsson, B., & Korsgren, O. (2000). Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci*. 105(2), 125-33.
- Bentham, L., Mundinger, T.O., & Taborsky, G.J. Jr. (2001). Parasympathetic inhibition of sympathetic neural activity to the pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280(2), E378-81.
- Bixby, S., Kruger, G.M., Mosher, J.T., Joseph, N.M., & Morrison, S.J. (2002). Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron*. 35(4), 643-56.
- Boyd, J.G., & Gordon, T. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol*. 183(2), 610-9.
- Cao, J., Sun, C., Zhao, H., Xiao, Z., Chen, B., Gao, J., ... Dai, J. (2011). The use of laminin modified linear ordered collagen scaffolds loaded with laminin-binding ciliary neurotrophic factor for sciatic nerve regeneration in rats. *Biomaterials*. 32(16), 3939-48.
- Cao, J., Xiao, Z., Jin, W., Chen, B., Meng, D., Ding, W., ... Dai, J. (2013). Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. *Biomaterials*. 34(4), 1302-10.
- Carlsson, P.O., Iwase, M., & Jansson, L. (1999). Stimulation of intestinal glucoceptors in rats increases pancreatic islet blood flow through vagal mechanisms. *Am J Physiol*. 276(1 Pt 2), R233-6.
- Chen, J., Chu, Y.F., Chen, J.M., & Li, B.C. (2010). Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *Adv Med Sci*. 55(1), 32-42.
- Coprav, J.C., Bastiaansen, M., Gibbons, H., van Roon, W.M., Comer, A.M., & Lipski, J. (1999). Neurotrophic requirements of rat embryonic catecholaminergic neurons from the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res Dev Brain Res*. 116(2), 217-22.
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*. 367(9513), 847-58.
- De Simone, R., Ambrosini, E., Carnevale, D., Ajmone-Cat, M.A., & Minghetti, L. (2007). NGF promotes microglial migration through the activation of its high affinity receptor: modulation by TGF-beta. *J Neuroimmunol*. 190(1-2), 53-60.
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 7(1), e1024405.
- Dufour, J.M., Rajotte, R.V., Zimmerman, M., Reznia, A., Kin, T., Dixon, D.E., & Korbitt, G.S. (2005). Development of an ectopic site for islet transplantation, using biodegradable scaffolds. *Tissue Eng*. 11(9-10), 1323-31.
- Dupin, E., & Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*. 366(1), 83-95.
- Eiselein, L., Schwartz, H.J., & Rutledge, J.C. (2004). The challenge of type 1 diabetes mellitus. *ILAR J*. 45(3), 231-6.
- Förander, P., Hoffer, B., & Strömberg, I. (1998). Nerve fiber formation and catecholamine content in adult rat adrenal medullary transplants after treatment with NGF, NT-3, NT-4/5, bFGF, CNTF, and GDNF. *Cell Tissue Res*. 292(3), 503-12.

- Forbes, J.M., & Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 93(1), 137-88.
- Froud, T., Ricordi, C., Baidal, D.A., Hafiz, M.M., Ponte, G., Cure, P., ... Alejandro, R. (2005). Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant.* 5(8), 2037-46.
- Fu, X.M., Lee, J.K., Miwa, K., Shimizu, T., Takagishi, Y., Hirabayashi, M., ... Ueda, Y. (2013). Sympathetic innervation induced in engrafted engineered cardiomyocyte sheets by glial cell line derived neurotrophic factor in vivo. *Biomed Res Int.* 2013, 532720.
- Grapensparr, L., Vasylovska, S., Li, Z., Olerud, J., Jansson, L., Kozlova, E., & Carlsson, P.O. (2015). Co-transplantation of human pancreatic islets with post-migratory neural crest stem cells increases β -cell proliferation and vascular and neural regrowth. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(4), E583-90.
- Grunberger, G. (2013). The need for better insulin therapy. *Diabetes Obes Metab.* 15, Suppl 1:1-5.
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., ... Oka, Y. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science.* 322(5905), 1250-4.
- Han, Q., Sun, W., Lin, H., Zhao, W., Gao, Y., Zhao, Y., ... Dai, J. (2009). Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding brain-derived neurotrophic factor improve the recovery of spinal cord injury in rats. *Tissue Eng Part A.* 15(10), 2927-35.
- Han, S., Wang, B., Jin, W., Xiao, Z., Chen, B., Xiao, H., ... Dai, J. (2014). The collagen scaffold with collagen binding BDNF enhances functional recovery by facilitating peripheral nerve infiltrating and ingrowth in canine complete spinal cord transection. *Spinal Cord.* 52(12), 867-73.
- Han, S., Wang, B., Jin, W., Xiao, Z., Li, X., Ding, W., ... Dai, J. (2015). The linear-ordered collagen scaffold-BDNF complex significantly promotes functional recovery after completely transected spinal cord injury in canine. *Biomaterials.* 41, 89-96.
- Hata, T., Sakata, N., Yoshimatsu, G., Tsuchiya, H., Fukase, M., Ishida, M., ... Unno, M. (2015). Nerve Growth Factor Improves Survival and Function of Transplanted Islets Via TrkA-mediated β Cell Proliferation and Revascularization. *Transplantation.* 99(6), 1132-43.
- Henderson, J.T., Seniuk, N.A., Richardson, P.M., Gauldie, J., & Roder, J.C. (1994). Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. *J Clin Invest.* 93(6), 2632-8.
- Henriksnäs, J., Lau, J., Zang, G., Berggren, P.O., Köhler, M., & Carlsson, P.O. (2012). Markedly decreased blood perfusion of pancreatic islets transplanted intraportally into the liver: disruption of islet integrity necessary for islet revascularization. *Diabetes.* 61(3), 665-73.
- Höke, A., Ho, T., Crawford, T.O., LeBel, C., Hilt, D., & Griffin, J.W. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci.* 23(2), 561-7.
- Juang, J.H., Kuo, C.H., Peng, S.J., & Tang S.C. (2015). 3-D Imaging Reveals Participation of Donor Islet Schwann Cells and Pericytes in Islet Transplantation and Graft Neurovascular Regeneration. *EBioMedicine.* 2(2), 109-19.
- Korsgren, O., Jansson, L., Andersson, A., & Sundler, F. (1993). Reinnervation of transplanted pancreatic islets. A comparison among islets implanted into the kidney, spleen, and liver. *Transplantation.* 56(1), 138-43.
- Krejčí, E., & Grim, M. (2010). Isolation and characterization of neural crest stem cells from adult human hair follicles. *Folia Biol (Praha).* 56(4), 149-57.
- Lablanche, S., Borot, S., Wojtuszczyk, A., Bayle, F., Tétaz, R., Badet, L., ... Benhamou, P.Y. (2015). Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network. *Diabetes Care.* 38(9), 1714-22.
- Lau, J., Vasylovska, S., Kozlova, E.N., & Carlsson, P.O. (2015). Surface coating of pancreatic islets with neural crest stem cells improves engraftment and function after intraportal transplantation. *Cell Transplant.* 24(11), 2263-72.
- Lausier, J., Diaz, W.C., Roskens, V., LaRock, K., Herzer, K., Fong, C.G., ... Jetton, T.L. (2010). Vagal control of pancreatic β -cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(5), E786-93.
- Letourneau, P.C. (1978). Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol.* 66(1), 183-96.

- Lucidi-Phillipi, C.A., Gage, F.H., Shults, C.W., Jones, K.R., Reichardt, L.F., & Kang, U.J. (1995). Brain-derived neurotrophic factor-transduced fibroblasts: production of BDNF and effects of grafting to the adult rat brain. *J Comp Neurol.* 354(3), 361-76.
- Maniwa, S., Iwata, A., Hirata, H., & Ochi, M. (2003). Effects of neurotrophic factors on chemokinesis of Schwann cells in culture. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37(1), 14-7.
- Melzi, R., Antonioli, B., Mercalli, A., Battaglia, M., Valle, A., Pluchino, S., ... Piemonti, L. (2010). Co-graft of allogeneic immune regulatory neural stem cells (NPC) and pancreatic islets mediates tolerance, while inducing NPC-derived tumors in mice. *PLoS One.* 5(4), e10357.
- Miao, G., Mace, J., Kirby, M., Hopper, A., Peverini, R., Chinnock, R., ... Hathout, E. (2005). Beneficial effects of nerve growth factor on islet transplantation. *Transplant Proc.* 37(8), 3490-2.
- Miao, G., Mace, J., Kirby, M., Hopper, A., Peverini, R., Chinnock, R., ... Hathout, E. (2006). In vitro and in vivo improvement of islet survival following treatment with nerve growth factor. *Transplantation.* 81(4), 519-24.
- Miwa, K., Lee, J.K., Takagishi, Y., Opthof, T., Fu, X., Hirabayashi, M., ... Komuro, I. (2013). Axon guidance of sympathetic neurons to cardiomyocytes by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *PLoS One.* 8(7), e65202.
- Miwa, K., Lee, J.K., Takagishi, Y., Opthof, T., Fu, X., & Kodama, I. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances sympathetic neurite growth in rat hearts at early developmental stages. *Biomed Res.* 31(6), 353-61.
- Mwangi, S., Anitha, M., Mallikarjun, C., Ding, X., Hara, M., Parsadanian, A., ... Srinivasan, S. (2008). Glial cell line-derived neurotrophic factor increases beta-cell mass and improves glucose tolerance. *Gastroenterology.* 134(3), 727-37.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., ... Okano, H. (2008). Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2(4), 392-403.
- Narang, A.S., & Mahato, R.I. (2006). Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol Rev.* 58(2), 194-243.
- Oyesiku, N.M., & Wigston, D.J. (1996). Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. *J Comp Neurol.* 364(1), 68-77.
- Paratcha, G., Ledda, F., & Ibáñez, C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell.* 113(7), 867-79.
- Patterson, C.C., Gyürüs, E., Rosenbauer, J., Cinek, O., Neu, A., Schober, E., ... Soltész, G. (2012). Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia.* 55(8), 2142-7.
- Pepper, A.R., Gala-Lopez, B., Pawlick, R., Merani, S., Kin, T., & Shapiro, A.M. (2015). A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation. *Nat Biotechnol.* 33(5), 518-23.
- Pepper, A.R., Gala-Lopez, B., Ziff, O., & Shapiro, A.M. (2013). Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clin Dev Immunol.* 2013.
- Petty, B.G., Cornblath, D.R., Adornato, B.T., Chaudhry, V., Flexner, C., Wachsman, M., ... Peroutka, S.J. (1994). The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol.* 36(2), 244-6.
- Pinkse, G.G., Bouwman, W.P., Jiawan-Lalai, R., Terpstra, O.T., Bruijn, J.A., & de Heer, E. (2006). Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes.* 55(2), 312-7.
- Pørksen, N., Munn, S., Ferguson, D., O'Brien, T., Veldhuis, J., & Butler, P. (1994). Coordinate pulsatile insulin secretion by chronic intraportally transplanted islets in the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest.* 94(1), 219-27.
- Reimer, M.K., Mokshagundam, S.P., Wyler, K., Sundler, F., Ahrén, B., & Stagner, J.I. (2003). Local growth factors are beneficial for the autonomic reinnervation of transplanted islets in rats. *Pancreas.* 26(4), 392-7.

- Reinert, R.B., Cai, Q., Hong, J.Y., Plank, J.L., Aamodt, K., Prasad, N., ... Powers, A.C. (2014). Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation via vascular scaffolding. *Development*. 141(7), 1480-91.
- Rezende, L.F., Santos, G.J., Carneiro, E.M., & Boschero, A.C. (2012). Ciliary neurotrophic factor protects mice against streptozotocin-induced type 1 diabetes through SOCS3: the role of STAT1/STAT3 ratio in β -cell death. *J Biol Chem*. 287(50), 41628-39.
- Rezende, L.F., Vieira, A.S., Negro, A., Langone, F., & Boschero, A.C. (2009). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis. *Cytokine*. 46(1), 65-71.
- Robertson, R.P., Davis, C., Larsen, J., Stratta, R., & Sutherland, D.E. (2000). Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*. 23(1), 112-6.
- Rodriguez-Diaz, R., & Caicedo, A. (2014). Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 28(5), 745-56.
- Saito, Y., Chan, N.K., Sakata, N., & Hathout, E. (2012). Nerve growth factor is associated with islet graft failure following intraportal transplantation. *Islets*. 4(1), 24-31.
- Santos, D., Giudetti, G., Micera, S., Navarro, X., & Del Valle, J. (2016). Focal release of neurotrophic factors by biodegradable microspheres enhance motor and sensory axonal regeneration in vitro and in vivo. *Brain Res*. 1636, 93-106.
- Shapiro, A.M., Ricordi, C., & Hering, B. (2003). Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet*. 362(9391), 1242.
- Shapiro, A.M., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., ... Lakey, J.R. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 355(13), 1318-30.
- Shi, H., Zhang, T., Qiang, L., Man, L., Shen, Y., & Ding, F. (2013). Mesospheres of neural crest-derived cells enriched from bone marrow stromal cell subpopulation. *Neurosci Lett*. 532, 70-5.
- Shinagawa, K., Mitsuhara, T., Okazaki, T., Takeda, M., Yamaguchi, S., Magaki, T., ... Kurisu, K. (2015). The characteristics of human cranial bone marrow mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett*. 606, 161-6.
- Shvartsman, D., Storrie-White, H., Lee, K., Kearney, C., Brudno, Y., Ho, N., ... Mooney, D.J. (2014). Sustained delivery of VEGF maintains innervation and promotes reperfusion in ischemic skeletal muscles via NGF/GDNF signaling. *Mol Ther*. 22(7), 1243-53.
- Smink, A.M., Faas, M.M., & De Vos, P. (2013). Toward Engineering a Novel Transplantation Site for Human Pancreatic Islets. *Diabetes*. 62(5), 1357-64.
- Stendahl, J.C., Kaufman, D.B., & Stupp, S.I. (2009). Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant*. 18(1), 1-12.
- Sun, W., Sun, C., Zhao, H., Lin, H., Han, Q., Wang, J., ... Dai, J. (2009). Improvement of sciatic nerve regeneration using laminin-binding human NGF-beta. *PLoS One*. 4(7), e6180.
- Thompson, D.M., Meloche, M., Ao, Z., Paty, B., Keown, P., Shapiro, R.J., ... Warnock, G.L. (2011). Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*. 91(3), 373-8.
- Thorens, B. (2014). Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes Obes Metab*. 16 Suppl 1, 87-95.
- Umpierrez, G.E., & Kitabchi, A.E. (2003). Diabetic ketoacidosis: risk factors and management strategies. *Treat Endocrinol*. 2(2):95-108.
- White, S.A., Shaw, J.A., & Sutherland, D.E. (2009). Pancreas transplantation. *Lancet*. 373(9677), 1808-17.
- Yamanaka, M., Itakura, Y., Inoue, T., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Noguchi, H., & Taiji, M. (2006). Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism*. 55(10), 1286-92.
- Xu, J.J., Chen, E., Lu, C.L., & He, C. (2009). Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. *J Clin Neurosci*. 16(6), 812-7.
- Yang, R., & Xu, X. (2013). Isolation and culture of neural crest stem cells from human hair follicles. *J Vis Exp*. (74).