

# Lipid accumulation in skeletal muscle; big deal?! : mechanisms underlying the development of insuline resistance

Citation for published version (APA):

Meex, R. C. R. (2011). *Lipid accumulation in skeletal muscle; big deal?! : mechanisms underlying the development of insuline resistance*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20110908rm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110908rm](https://doi.org/10.26481/dis.20110908rm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary

*Chapter 1* starts with a general introduction with respect to type 2 diabetes. Global prevalence and incidence rates of type 2 diabetes are very high and increase rapidly. It has been estimated that in 2000 approximately 171 million individuals were diagnosed with type 2 diabetes and this number is likely to double by 2030. Type 2 diabetes is characterized by high plasma glucose levels and results from a reduction in insulin secretion from the pancreas, and from a blunted sensitivity (i.e. resistance), of tissues for insulin, the hormone responsible for glucose uptake into the cells. The underlying mechanism of insulin resistance is not yet known. Accumulation of intramyocellular lipids (IMCL) has been associated with the severity of insulin resistance. However, endurance trained athletes also have high IMCL levels while being highly insulin sensitive, making IMCL accumulation *per se* less plausible as a cause for the development of insulin resistance. It has therefore been suggested that other parameters, such as impaired mitochondrial function, a decreased ability to switch between glucose oxidation and fat oxidation (metabolic inflexibility) and a decreased ability to store glucose, are also important in development of muscle insulin resistance. This PhD-thesis focuses on these parameters as well as on their role in relation to the development of the insulin resistant state

Fatty acids are derived from the breakdown (lipolysis) of triacylglycerol (TAG) and are quantitatively the most important substrate under resting and fasted conditions. Originally, hormone sensitive lipase (HSL) was considered the only lipase involved in TAG breakdown. More recently, however, adipose triglyceride lipase (ATGL) has been identified as the enzyme catalysing the initial step of lipolysis. The discovery of ATGL greatly expanded our understanding on the regulatory mechanisms of lipid droplet breakdown. In addition to HSL and ATGL, lipid droplets in skeletal muscle are also covered by a variety of other proteins such as CGI-58, ADRP, TIP-47, S3-12 and OXPAT, which are shown to be important in regulating the balance between lipid droplet synthesis and breakdown. Even more so, an increasing amount of evidence suggests that dysregulation of lipid droplet dynamics is possibly an important

factor in the development of insulin resistance. *Chapter 2* gives an overview of current knowledge with respect to lipase activity, lipid droplets and lipid droplet coating proteins, and their roles in relation to muscular insulin sensitivity.

Exercise training is an insulin sensitizing intervention. *Chapter 3* discusses the effect of a 12-week progressive exercise program on insulin sensitivity and insulin sensitivity associated parameters in 20 older, obese man with type 2 diabetes and in 18 older, obese, but otherwise healthy men. Before training, type 2 diabetic subjects showed a decreased insulin sensitivity, a compromised mitochondrial function and a blunted metabolic flexibility compared to control subjects, which is in line with reports from earlier studies. Exercise training in patients with type 2 diabetes, however, completely restored in vivo mitochondrial function and metabolic flexibility towards values observed in control subjects. This restoration went along with an improved (but not restored) insulin stimulated glucose disposal. In addition, IMCL levels tended to increase and non-oxidative glucose disposal increased modestly, albeit not significantly. This study is the first to show that mitochondrial function, oxidative glucose disposal and metabolic flexibility in type 2 diabetes patients can be entirely restored upon training. However, the fact that this training program in these subjects did not result in improved non-oxidative glucose disposal suggests that combinations with other training programs or therapies could be considered.

*Chapter 4* proceeds on the exercise-induced effects described in chapter 3 (i.e. changes in metabolic flexibility, oxidative capacity and insulin sensitivity) and aims to explain them in the light of observed changes in lipases (ATGL and HSL), lipase activity (TAG hydrolase and DAG hydrolase activity) and lipid droplet coating proteins (CGI-58, ADRP, TIP-47, S3-12 and OXPAT) in skeletal muscle. Pre-training protein levels of TIP47 were lower in type 2 diabetic patients, compared to control subjects, but restored to control levels upon training. Given the role of TIP47 and given the near significant increase in IMCL, this may point towards an improved capacity of type 2 diabetic subjects to store free fatty acids into nascent lipid droplets. In contrast to TIP-47, pre-training protein levels of ADRP, OXPAT and ATGL were similar between type 2 diabetic and control subjects, and support previous studies

## SUMMARY

stating that these proteins are not likely to play a causal role in the development of insulin resistance. While exercise training resulted in increased ADRP and OXPAT protein levels and decreased TAG hydrolase activity in type 2 diabetic and control subjects, ATGL protein content increased in T2D only. ATGL is the key enzyme in TAG lipolysis; therefore, the increase in ATGL in type 2 diabetic subjects, along with a decreased TAG hydrolase activity seems contradicting. Yet, ADRP is found to reside on the lipid droplet surface and to prevent access of lipases to the lipid droplet. It is therefore hypothesized that increased ADRP levels resulted in a decreased interaction of ATGL with the lipid droplets, thereby inhibiting TAG lipolysis and increasing lipid storage. Interestingly, we did not observe correlations between any of the PAT proteins and insulin sensitivity. However, we did observe a strong positive correlation between training-induced increases in ADRP- and OXPAT protein content with training-induced improvements in metabolic flexibility. This suggests that although PAT protein levels are not directly related to insulin sensitivity, an insulin sensitizing exercise intervention leads to favourable changes in lipid droplet associated proteins as reflected by an improved storage of fatty acid in lipid droplets and an improved protection of the lipid droplet against uncontrolled lipolysis, and contributes to an improved metabolic flexibility.

Hyperlipidemia and hyperglycaemia are frequently reported in obese subjects. Whereas implementing routine physical exercise in daily life is advocated in treatment of hyperglycaemia, treatment with statins is often prescribed in case of hyperlipidemia. Use of statins has been associated with myotoxicity, mitochondrial dysfunction and muscular damage. In addition, it has been suggested that statin use may blunt the adaptive response to exercise training. To investigate whether exercise-induced improvements on insulin sensitivity and related parameters were less pronounced in statin users compared to non-statin users, the entire group of diabetes patients and healthy control subjects from chapter 3 and 4 were restratified according to statin use (statin group, n=14 and non-statin group, n=22). The findings are discussed in *chapter 5* and show that statin treatment prior to the onset of the training program did not impede mitochondrial function, muscle function or exercise tolerance. Also, training-induced improvements in mitochondrial function and content

were preserved in ST. Surprisingly, effects of training with respect to blood-lipid profile, insulin sensitivity, non-oxidative and oxidative glucose disposal and insulin-mediated suppression of fat oxidation were more prominent in ST than in C. The combined prescription of statins along with exercise training appears safe and should be considered for subjects prone to develop insulin resistance.

**Chapter 6** outlines a study in which healthy, young untrained males and healthy, young endurance-trained males were submitted to 2 hyperinsulinemic euglycemic clamps with either glycerol or lipid infusion. Endurance trained men with a high oxidative capacity showed a higher insulin sensitivity during the glycerol clamp compared to the untrained men and the difference in insulin sensitivity could entirely be attributed to a difference in insulin-stimulated glucose oxidation. Lipid infusion reduced insulin stimulated glucose disposal in both groups but was -as expected- less pronounced in endurance trained subjects, compared to untrained subjects. Surprisingly however, oxidative glucose disposal decreased to a similar extent in both groups, whereas non-oxidative glucose oxidation was only affected in the untrained group. These findings are in line with findings in T2D and they support the notion that an impairment in non-oxidative glucose disposal is an important defect which contributes largely the insulin resistant state. Aside, it was interesting to note that when respiratory values were normalized to mitochondrial content, the difference in *ex vivo* mitochondrial respiration between trained and untrained disappeared, indicating similar intrinsic mitochondrial function. Furthermore, it was remarkable that in both groups lipid-induced insulin resistance occurred without concomitant changes in mitochondrial function.

**Chapter 7** extends on the study described in chapter 6 and considers the effect of salsalate on lipid-induced insulin resistance in young healthy untrained male subjects. Salsalate has been suggested to improve insulin sensitivity and glucose homeostasis and to ameliorate lipid-induced insulin resistance. The untrained subjects underwent a 3<sup>rd</sup> hyperinsulinemic euglycemic clamp, with simultaneous lipid infusion in this case preceded by 4 days of a high dosage of salsalate. The aim of the study was to ameliorate lipid-induced insulin resistance and explore underlying mechanisms.

## SUMMARY

Surprisingly, lipid-induced insulin resistance was not blunted upon salsalate treatment. Salsalate did however result in increased insulin levels in the basal and insulin stimulated condition and in a higher energy expenditure. The increase in energy expenditure was reflected by an increased lipid oxidation in the fasted state without a reduction in glucose oxidation, and by an enhanced glucose oxidation upon insulin stimulation without a reduction in lipid oxidation. Measurements of mitochondrial (un)coupling did not detect differences in mitochondrial respiration, leaving the underlying mechanism unravelled.

This thesis ends with a general discussion in *chapter 8*. It gives a brief overview of all interventions and their effects on insulin sensitivity, and is followed by an integrated discussion on how changes in parameters (IMCL, mitochondrial function, metabolic flexibility and lipolysis) may be related to the development of insulin sensitivity. Interestingly, none of the parameters discussed seems to be solely responsible. Dysfunction of certain parameters may contribute to the development of insulin resistance in one individual, but are not necessarily defect in another person. Yet, this is not entirely surprising as it is compatible with the multifactorial character of the disease. Although it may be clear that regular exercise, as applied in this thesis or as applied by the endurance-trained subjects may improve insulin stimulated glucose disposal via several pathways, additional research is warranted to gain more insight underlying mechanisms.



---

# Samenvatting

**Hoofdstuk 1** begint met een algemene inleiding over type 2 diabetes. Type 2 diabetes is één van de meest voorkomende welvaartsziekten wereldwijd; in 2000 werd het aantal mensen met diabetes op 171 miljoen geschat en verwacht wordt dat dit aantal zal verdubbelen tegen 2030. De ziekte wordt gekarakteriseerd door te hoge glucosespiegels in het bloed en wordt voornamelijk veroorzaakt door een verminderde gevoeligheid (i.e. resistentie) van weefsels voor insuline, het hormoon dat de opname van glucose faciliteert. De onderliggende mechanismen van insuline resistentie zijn nog niet bekend. Opstapeling van vetten in de spier is in sterke mate geassocieerd met de ernst van insuline resistentie, maar het feit dat duurgetrainde atleten ook gekenmerkt zijn door hoge vetzuurspiegels in hun spieren terwijl zij juist zeer insuline gevoelig zijn, suggereert dat niet vetopstapeling *alleen* een rol speelt, maar dat ook andere parameters van belang zijn. Mogelijke kandidaat parameters zijn een verminderde mitochondriële functie, een verminderde mogelijkheid om te switchen in substraatverbranding (metabole inflexibiliteit) en een verminderd vermogen om glucose op te slaan. Dit proefschrift richt zich op deze parameters en op hun mogelijke rol bij het ontstaan van insuline resistentie.

Vetzuren zijn nodig voor het leveren van energie en voor het behoud van homeostase in de cel. Vetzuren worden vrijgemaakt uit vetdruppeltjes onder invloed van lipasen. Eerder was enkel HSL bekend als lipase, maar de recente ontdekking dat ATGL en zijn co-activator CGI-58 ook een belangrijke rol spelen bij de afbraak van vetdruppels hebben geleid tot een verschuiving in het wetenschappelijk paradigma. Naast HSL, ATGL en CGI-58, zijn ook andere eiwitten van belang. De zogenaamde PAT-eiwitten, bestaande uit perilipine, ADRP, TIP-47, S3-12 en OXPAT, bevinden zich op of rond vetdruppels en hebben allen een functie in de opbouw en afbraak van vetdruppels. Een toenemend aantal wetenschappelijke publicaties wijst er op dat dysregulatie van deze vetdruppel-geassocieerde eiwitten mogelijk gerelateerd is met het ontstaan van insuline resistentie. **Hoofdstuk 2** geeft een stand van zaken met



betrekking tot de bestaande kennis over de regulatie van deze eiwitten in de spier en beschrijft mogelijke verbanden met het ontstaan van insuline resistentie.

Inspanning in een manier om insuline gevoeligheid te verbeteren. **Hoofdstuk 3** beschrijft het effect van een 12-weken durende inspanningsstudie op insuline gevoeligheid en op insuline gevoeligheid geassocieerde parameters in 20 oudere, obese mannen met type 2 diabetes en in 18 oudere, obese, maar overigens gezonde mannen. De studie bevestigt een eerder gerapporteerde verlaging in insuline gevoeligheid, een verminderde mitochondriële functie en een verminderde metabole flexibiliteit in de mannen met type 2 diabetes ten opzichte van de gezonden mannen voordat beide groepen aan het trainingsprogramma deelnamen. Na de trainingsperiode echter bleek de mitochondriële functie en de metabole flexibiliteit in de type 2 diabetes volledig hersteld en dit ging gepaard met een verbetering (maar geen volledig herstel) van de insuline gevoeligheid. Verder werd ook een bijna-significante verhoging van de vetaccumulatie waargenomen evenals een bescheiden, doch niet significante verhoging van de niet-oxidatieve glucose opname. Deze studie is de eerste die laat zien dat mitochondriële functie, oxidatieve glucose opname, en metabole flexibiliteit in type 2 diabetes volledig hersteld kunnen worden door training. Het feit dat de studie ook laat zien dat dit trainingsprogramma niet in staat was om in deze patiëntenpopulatie de niet-oxidatieve glucose opname te verbeteren suggereert dat combinaties met andere trainingsprogramma's of therapieën mogelijk overwogen moeten worden.

**Hoofdstuk 4** gaat verder op de inspannings geïnduceerde effecten beschreven in hoofdstuk 3 en poogt deze verder te bestuderen in het licht van veranderingen in lipasen (ATGL en HSL), lipase activiteit (TAG hydrolase en DAG hydrolase activiteit) en vetdruppel-geassocieerde eiwitten (CGI-58, ADRP, TIP-47, S3-12 en OXPAT) in de spier. Vóór aanvang van het trainingsprogramma waren TIP-47 niveau's in type 2 diabetes significant lager dan in gezonde personen, maar dit herstelde naar controlewaarden onder invloed van training. Gezien de functie van TIP-47 en een bijna-significante verhoging in de vetaccumulatie, kan dit er op wijzen dat training de opslagcapaciteit van vetten in de spier in mensen met type 2 diabetes

verbetert. In tegenstelling tot TIP-47, waren ATGL, CGI-58, ADRP en OXPAT niveau's vóór training wel gelijk in beide groepen en het is daarom weinig waarschijnlijk dat deze eiwitten een oorzakelijk rol spelen in het ontstaan van insuline resistentie. Terwijl training resulteerde in een verhoging van ADRP en OXPAT en een verlaging van TAG hydrolase activiteit in beide groepen, leidde training alleen tot een toename van ATGL bij de diabeten. De bevinding dat de verhoging in ATGL niet gepaard ging met een verhoging in TAG hydrolase activiteit is op het eerste zicht verrassend, maar is waarschijnlijk te verklaren door de stijging in ADRP. Van ADRP is bekend dat het de vetdruppel beschermt tegen de werking van lipasen, dus hierdoor hoeft een stijging in ATGL niet noodzakelijk te leiden tot een stijging van de lipolyse. Opmerkelijk nog was dat er geen correlatie was tussen de stijging van ADRP en OXPAT niveau's en de verbetering in insuline gevoeligheid, maar wel tussen de stijging in ADRP en OXPAT en de verbetering in metabole flexibiliteit. Concluderend kan dus gesteld worden dat een insuline gevoeligheid verbeterend trainingsprogramma leidt tot gunstige aanpassingen in vetdruppel-gerelateerde eiwitten met een verbeterde vetopslag, een verbeterde bescherming van de vetdruppel, en een verbeterde metabole flexibiliteit tot gevolg.

Zowel type 2 diabetes als te hoge cholesterol spiegels (hyperlipidemie) worden in sterke mate veroorzaakt door een teveel aan vetten. Beide aandoeningen komen dan ook vaak gelijktijdig voor en terwijl lichaamsbeweging een belangrijke plaats inneemt in de behandeling van type 2 diabetes, worden veel van deze patiënten voor hun hyperlipidemie behandeld door middel van statines. Er zijn echter onderzoeken die suggereren dat statine gebruik geassocieerd is met een verslechterde functie van mitochondrien, met spierschade en met een verminderde positieve respons op inspanning. In deze studie zijn de type 2 diabeten en gezonde mannen die eerder hadden deelgenomen aan het trainingsprogramma, retrospectief onderverdeeld in statine gebruikers (n=14) en een niet-statine gebruikers (n=22). De bevindingen van deze analyse worden beschreven in **hoofdstuk 5** en laten zien dat statine gebruik niet geassocieerd was met een verminderde mitochondriële functie of met spierschade en evenmin met een verminderde inspanningstolerantie. Mitochondriële functie en dichtheid verbeterden in beide groepen evenveel en verrassend waren de bevinding

dat een aantal positieve effecten van inspanning (bloed-lipiden profiel, insuline gevoeligheid, niet-oxidatieve glucose opname en onderdrukking van insuline gemedieerde vetverbranding) meer uitgesproken of zelfs enkel aanwezig waren in de groep statine gebruikers. Het onderzoek suggereert daarom dat statine gebruik gecombineerd kan worden met inspanning en dat combinatie van beiden mogelijk zelfs overwogen moet worden.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de studie waarin een jonge getrainde mannen en jonge ongetrainde mannen onderworpen werden aan een hyperinsulinemische euglycemische clamp met glycerolinfusie en een hyperinsulinemische euglycemische clamp met vetinfusie. Zoals verwacht lieten de resultaten van de glycerol clamp zien dat de getrainde mannen met een betere oxidatieve capaciteit ook een betere insuline gevoeligheid hadden in vergelijking met de ongetrainde mannen, en dit verschil was enkel te verklaren door een hogere oxidatieve glucose opname. Ook in de lijn van de verwachtingen lag de observatie dat de getrainde mannen minder insuline resistent werden na lipid infusie in vergelijking met de ongetrainde mannen. Verrassend was wel dat oxidatieve glucose opname in beide groepen in gelijke mate verslechterde, terwijl de niet-oxidatieve glucose opname enkel in de ongetrainden proefpersonen daalde. Dit is analoog aan de bevinding in de type 2 diabetes en suggereert dat een defect in de niet-oxidatieve glucose opname een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van insuline resistentie. Terzijde is het nog interessant om op te merken dat de verlaagde oxidatieve capaciteit in ongetrainden enkel te verklaren was door een verlaagde mitochondriële dichtheid en niet door een verminderde intrinsieke mitochondriële functie en dat lipid-geïnduceerde insuline resistentie in geen van beide groepen gepaard ging met een gehinderde mitochondriële functie.

De studie bediscussieerd in **hoofdstuk 7** is een uitbreiding van de studie beschreven in hoofdstuk 6 en behandelt het effect van salsalaat in lipid-geïnduceerde insuline resistentie. Eerdere onderzoeken suggereerden positieve effecten van salsalaat op glucose homeostase en insuline gevoeligheid. Om het onderliggende mechanisme hiervan te onderzoeken werden de ongetrainde jonge mannen onderworpen aan de 3<sup>e</sup> hyperinsulinemische euglycemische clamp, met gelijktijdige infusie van lipid,

voorafgegaan door 4 dagen salsalaatinnname. Verrassend genoeg was er geen significante verbetering in de insuline resistentie na salsalaatinnname. Salsalaat verhoogde wel de insuline spiegels in de basale conditie en na insuline infusie, en leidde ook tot een toename in energieverbruik dat in de basale conditie te verklaren was door een verhoogde vetverbranding, en in de insuline gestimuleerde conditie door een verhoogde glucose verbranding. Analyses van mitochondriële functie lieten echter geen veranderingen zien in mitochondriële respiratie waardoor het onderliggend mechanisme van het verhoogde energie gebruik onbekend blijft.

**Hoofdstuk 8** is het slothoofdstuk en is een geïntegreerde discussie van dit proefschrift. Het geeft een kort overzicht van de effecten van de verschillende interventies op de insuline gevoeligheid en bediscussieert de rol van mogelijke parameters (IMCL, mitochondriële functie, metabole flexibiliteit and lipolyse). Gezien het multifactoriële karakter van het ziektebeeld type 2 diabetes, is geen enkele parameter op zichzelf de oorzaak van het ontstaan van insuline resistentie. Dysfunctie van bepaalde parameters kunnen een bijdrage leveren aan het ontstaan van insuline resistentie in een persoon, maar deze hoeft niet noodzakelijk defect te zijn bij een ander. Het is wel duidelijk dat regelmatige lichamelijke inspanning zoals toegepast in de trainingsstudie in dit proefschrift of zoals toegepast door de duur getrainde atleten via meerdere routes een positief effect kan hebben op de insuline gestimuleerde glucose opname, maar toekomstig onderzoek is nodig om meer inzicht in te krijgen in de precieze regulatie

