

# Targeting PPARs in metabolic risk management: A pharmacological and nutritional approach

## Citation for published version (APA):

Bragt-van Wijngaarden, M. C. E. (2011). *Targeting PPARs in metabolic risk management: A pharmacological and nutritional approach*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20111214mb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20111214mb](https://doi.org/10.26481/dis.20111214mb)

## 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



## Summary

The incidence of the metabolic syndrome is rapidly increasing world-wide and predisposes to the development of type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases (CVD). Obesity is often associated with various risk factors characterizing the metabolic syndrome, such as abnormal lipid and carbohydrate metabolism and a pro-inflammatory state of the body. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)  $\alpha$  and  $\gamma$  are interesting molecular targets in metabolic risk management, as these receptors are involved in many metabolic pathways and present in various tissues. They can be activated by drugs and dietary fatty acids. Comparing a pharmacological and a nutritional approach to target PPARs may reveal a potential role for nutrition in modulating these transcription factors to ameliorate metabolic disturbances. Applying a nutrigenomics approach is an interesting way to explore the molecular effects of pharmacological and nutritional challenges on the metabolic state or condition of specific target tissues. However, access to specific metabolically relevant target tissues, such as muscle and adipose tissue, is complicated in humans. Therefore, it would be advantageous to be able to use the readily accessible peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs also express PPARs, making them of interest to study the molecular effects of these transcription factors.

The major objective of the studies described in this thesis was to examine the physiological and molecular effects of PPARs in various metabolic processes and to identify a potential role for nutritional fatty acids in modulating these transcription factors. The second objective was to evaluate the suitability of PBMCs as surrogate cells for tissues to reflect PPAR-related gene expression and gene expression in general.

## Lipid, lipoprotein and glucose metabolism

PPAR $\alpha$  predominantly regulates lipid metabolism and effectively lowers blood triglyceride concentration. This hypotriglyceridemic effect is ascribed to a PPAR-mediated increase in activity of the enzyme lipoprotein lipase (LPL) and subsequent breakdown of triglycerides. In our 6-week intervention with fish oil (3.7 g/d n-3 long chain polyunsaturated fatty acids) and fenofibrate (200 mg/d) in overweight and obese subjects, we indeed found strong hypotriglyceridemic effects for both treatments. This was accompanied by reductions in large very low density lipoprotein (VLDL) particles. Fenofibrate further improved the serum lipid profile, as also low density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations decreased and high density lipoprotein (HDL) cholesterol increased. In contrast to fenofibrate, fish oil increased LDL cholesterol concentrations. For fish oil and fenofibrate treatment, it was expected that the LDL particle size would change to a more buoyant and less atherogenic type, but we could not confirm this in our study. Neither fenofibrate nor fish oil exerted effects on plasma glucose concentrations.

PPAR $\gamma$  is mainly known for its insulin-sensitizing effects, which is related to an increased glucose uptake and stimulation of adipocyte differentiation to create more smaller and insulin sensitive adipocytes. Indeed, our intervention study of an 8-week treatment with the synthetic PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (8 mg/d) improved insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, making these patients as insulin sensitive as healthy reference subjects. Furthermore, rosiglitazone also improved the serum lipid

profile, as shown by reduced serum triglycerides and free fatty acids and by increased HDL cholesterol concentrations.

## Markers of inflammation and vascular activity

The metabolic syndrome is also characterized by a state of low-grade inflammation, although this is not part of its official diagnostic criteria. Since inflammation has been implicated in the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases, it is of relevance to prevent this. It has been reported that PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  agonists are able to inhibit proinflammatory transcription factors, such as nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). The cardioprotective effect of fish oil has also been partly described to a reduction in markers of low-grade inflammation. In our mechanistic in vitro study in human liver (HepG2) cells, we showed that fenofibrate and different fatty acids were indeed able to inhibit NF $\kappa$ B activation, although the effects of fatty acids seemed to be largely independent of PPAR $\alpha$ . Despite this finding, we did not observe potent anti-inflammatory effects of PPAR agonists that can be linked with CVD reduction in our human intervention studies. Only very few plasma inflammatory and vascular activity markers were, inconsistently, affected by rosiglitazone, fenofibrate and fish oil, showing both pro- and anti-inflammatory effects. Rosiglitazone decreased macrophage chemoattractant protein 1 (MCP1) and C-reactive protein (CRP), but increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in type 2 diabetic patients. Fenofibrate reduced soluble endothelial selectin (sE-selectin), but increased MCP1 in overweight and obese subjects and no changes were seen upon fish oil treatment.

## Gene expression

PBMCs can be seen as sentinels that travel through the body and pick up physiological signals. It has been shown that PBMCs have an active metabolism, express PPARs and are able to respond to nutritional interventions. However, it is not clear if these cells are adequate surrogate cells reflecting the condition of relatively inaccessible target tissues. Reviewing the literature on this topic showed that PBMCs have the capability to reflect lipid metabolic genes and expression changes in these genes upon dietary or pharmacological hypolipidemic treatment. PBMCs could therefore potentially be surrogate cells to reflect the liver with respect to lipid metabolism. We performed whole genome microarray analysis on PBMCs, muscle and white adipose tissue (WAT) samples from eleven subjects who received 6-week treatments with placebo, fish oil (3.7 g/d n-3LCPUFA) and fenofibrate (200 mg/d). These tissues are relevant in the etiology of the metabolic syndrome and could reveal important (PPAR $\alpha$ -regulated) genes implicated in metabolic risk reduction. Despite the several physiological effects we observed after PPAR $\alpha$  or  $\gamma$  agonists in our intervention studies, these effects were not, or only very marginally, reflected by changes in (PPAR-) related genes. Especially, lipid metabolic gene expression pathways were downregulated after fish oil and fenofibrate treatment in PBMCs. In addition, mitochondrial metabolic pathways were downregulated in both treatments, which may be related to peroxisome proliferation. Fenofibrate hardly affected gene expression in muscle and adipose tissue, showing that these tissues are not primary

PPAR $\alpha$  target tissues. There was hardly any overlap in gene expression changes between all three tissues. However, there might be a role for PBMCs to serve as surrogate for adipose tissue, due to the large resemblance in altered pathways upon fish oil treatment. These pathways were mainly involved in lipid and amino acid metabolism.

## Conclusion

The studies described in this thesis show that PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  agonists are able to beneficially modulate metabolic risk factors in type 2 diabetic and overweight subjects. In some instances, nutritional PPAR $\alpha$  agonists may provide an alternative for synthetic agonists, as we show that both fish oil as fenofibrate can exert a comparable TG lowering effect. However, the comparison does not go beyond this and high dosages of fish oil are needed to obtain this effect. Despite their in vitro capability to block pro-inflammatory transcription factor NF $\kappa$ B, the PPAR agonists rosiglitazone, fenofibrate and fish oil inconsistently affected markers of inflammation in humans, if at all. The studies in this thesis also show that PPAR agonists are able to induce gene expression changes in PBMCs, although these changes seem not to be a reflection of direct effects of PPAR activation. Despite the very little overlap in gene expression changes between PBMCs, WAT, and muscle after fish oil and fenofibrate treatment, PBMCs might have potency to serve as surrogate cells for WAT for gene expression analysis, since these two cell types showed a large overlap in regulated pathways after fish oil treatment.



# **SAMENVATTING**





## Samenvatting

De incidentie van het metabool syndroom neemt wereldwijd snel toe en vergroot het risico op het ontwikkelen van type 2 diabetes (T2D) en hart- en vaatziekten (HVZ). Overgewicht en obesitas zijn vaak geassocieerd met verschillende risicofactoren die het metabool syndroom karakteriseren, waaronder een abnormaal vet- en koolhydraatmetabolisme en een laag-grade ontstekingsstatus van het lichaam. Peroxisoom prolifererence receptoren (PPARs)  $\alpha$  en  $\gamma$  zijn interessante moleculaire doelwitten voor management van metabole risico's, omdat deze receptoren bij veel metabole processen betrokken zijn en in diverse weefsels tot expressie komen. Ze kunnen geactiveerd worden door medicijnen en vetzuren uit de voeding. Door een vergelijking te maken tussen een farmacologische en voedingskundige benadering om PPARs te beïnvloeden, kan een mogelijke rol van voeding ontrafeld worden ter voorkoming van metabole verstoringen. Een interessante manier om de moleculaire effecten van een farmacologische en voedingsinterventie op de metabole conditie van specifieke weefsels, zoals vet- en spierweefsel, te onderzoeken is door middel van nutrigenomics. Echter, deze specifieke weefsels zijn in mensen moeilijk beschikbaar voor onderzoek. Het zou daarom gunstig zijn als de eenvoudig bereikbare perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC) hiervoor gebruikt zouden kunnen worden. Deze bloedcellen brengen immers ook PPARs tot expressie, waardoor ze interessante surrogaatcellen kunnen zijn om de moleculaire effecten van deze transcriptiefactoren te onderzoeken.

De hoofddoelstelling van de studies beschreven in dit proefschrift was om de fysiologische en moleculaire effecten te onderzoeken van PPARs in diverse metabole processen en om daarbij de rol van vetzuren uit de voeding te identificeren voor het moduleren van deze transcriptiefactoren. De secundaire doelstelling was om de geschiktheid van PBMCs te evalueren als surrogaatcellen voor andere lichaamsweefsels om (PPAR-gerelateerde) genexpressie te reflecteren.

## Lipide-, lipoproteïne- en glucosemetabolisme

PPAR $\alpha$  reguleert voornamelijk het vetmetabolisme en activatie van deze receptor leidt tot verlaging van de triglyceride concentratie in het bloed. Dit hypotryglyceridemische effect is toe te schrijven aan een toename van lipoproteïne lipase activiteit via PPAR $\alpha$ . In onze zesweekse interventie met visolie (3.7 g/d n-3 lange keten meervouding onverzadigde vetzuren (n-3 LCPUFA)) en fenofibraat (200 mg/d) in mensen met overgewicht en obesitas vonden we inderdaad sterke triglyceride-verlagende effecten na beide interventies. Dit ging samen met verlagingen in VLDL vetdeeltjes. Fenofibraat verbeterde het serumvetprofiel effectief, door ook een verlaging van het LDL cholesterol en verhoging van het HDL cholesterol te bewerkstelligen. Dit in tegenstelling tot visolie, waarbij een stijging van het LDL cholesterol werd waargenomen. Er werd verwacht dat de visolie- en fenofibraatinterventie de LDL deeltjes groter zouden worden met een lagere dichtheid, waardoor ook minder atherogeen. Dit konden we met onze studie echter niet bevestigen. Daarnaast leidde een interventie met fenofibraat of visolie niet tot veranderingen in plasmaglucosec concentraties.

PPAR $\gamma$  staat bekend om het insuline-gevoeliger maken van het lichaam,

wat gerelateerd is aan een toename van glucoseopname en een stimulering van vetcelldifferentiatie, waarbij meer kleine, insulinegevoeligere vetcellen worden gevormd. Inderdaad liet onze achtweekse interventie met de synthetische PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone zien dat de insuline-gevoeligheid toenam in patiënten met type 2 diabetes. Deze mensen werden zelfs weer net zo insulinegevoelig als de gezonde personen die als referentiegroep dienden. Verder verbeterde rosiglitazone ook het serumvetprofiel, door triglyceriden en vrije vetzurenconcentraties te verlagen en door HDL-cholesterolconcentraties te verhogen.

## Markers voor laag-grade ontsteking en vasculaire activiteit

Het metabool wordt ook gekarakteriseerd door een staat van laag-grade ontsteking, al hoort dit niet tot de officiële criteria om het metabool syndroom te diagnosticeren. Het is belangrijk dit te voorkomen, omdat laag-grade ontsteking betrokken is bij het ontstaan van T2D en HVZ. Van PPAR $\alpha$  en  $\gamma$  activatoren is gerapporteerd dat ze pro-inflammatoire transcriptiefactoren kunnen remmen, zoals de transcriptiefactor nucleaire factor kappa bèta (NF $\kappa$ B). De beschermende werking van visolie op het ontstaan van HVZ wordt ook gedeeltelijk toegeschreven aan de verlaging van laag-grade ontstekingsmarkers. In onze mechanistische in vitro studie in humane levercellen (HepG2), laten we zien dan fenofibraat en verschillende vetzuren de transcriptiefactor NF $\kappa$ B inderdaad kunnen remmen, al leek dit effect van vetzuren grotendeels onafhankelijk van PPAR $\alpha$  te zijn. Ondanks deze observatie zagen we in onze humane studie geen sterke ontstekingsremmende effecten van PPAR agonisten die gelinkt zouden kunnen worden aan een verminderd risico op het ontwikkelen van HVZ. Zeer weinig laag-grade ontstekingsmarkers en markers van vasculaire activiteit werden beïnvloed door rosiglitazone, fenofibraat en visolie. De veranderingen die werden waargenomen waren ook inconsistent, dus zowel mogelijk anti- als pro-inflammatoire effecten. Rosiglitazone zorgde er voor dat de concentraties van monocyt chemotactisch eiwit 1 (MCP1) en C-reefief proteïne (CRP) daalden, maar deed de concentratie van tumor necrosefactor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) stijgen in patiënten met T2D. Door fenofibraat daalde oplosbaar endotheliaal selectine (E-selectin), maar het deed MCP1 stijgen in mensen met overgewicht en obesitas. Door visolie veranderde zelfs geen van de markers voor laag-grade ontsteking en vasculaire activiteit.

## Genexpressie

PBMCs kunnen gezien worden als schildwachten die door het lichaam surveilleren en fysiologische signalen kunnen oppikken. Het is gerapporteerd dat PBMCs een actief metabolisme hebben, PPARs tot expressie brengen en reageren op voedingsinterventies. Echter, het is niet duidelijk of deze cellen goede surrogaatcellen zijn om de status van relatief onbereikbare doelweefsels weer te geven. De literatuur over dit onderwerp laat zien dat PBMCs de eigenschap bezitten om genen betrokken bij het vetmetabolisme te reflecteren en de expressie van deze genen te laten veranderen op een vetverlagende farmacologische of voedingsinterventie. PBMCs zouden om deze reden interessante surrogaatcellen kunnen vormen voor de lever wat betreft vetmetabolisme. We

hebben microarray-analyse gedaan op het volledige genoom van PBMCs, spier- en vetweefselmonsters van elf proefpersonen die zesweekse behandelingen ondergingen met placebo, visolie (3.7 g/d n-3 LCPUFA) en fenofibraat (200 mg/d) capsules. De onderzochte weefsels zijn relevant in de etiologie van het metabool syndroom en kunnen belangrijke (PPAR $\alpha$ -gereguleerde) genen onthullen die betrokken zijn bij risicoverlaging.

Ondanks de verschillende fysiologische effecten na behandeling met PPAR $\alpha$  en  $\gamma$  agonisten in onze interventiestudies, werden deze effecten, als ze al optraden, maar marginaal gereflecteerd door veranderingen in (PPAR-) gerelateerde genen. In PBMCs werden voornamelijk genexpressieroutes betrokken bij vetmetabolisme naar beneden gereguleerd als reactie op visolie en fenofibraatbehandeling. Ook mitochondriale metabole routes werden naar beneden gereguleerd, wat te maken kan hebben met een toegenomen peroxisoomproliferatie. Fenofibraat had maar erg marginaal invloed op genexpressie in spier- en vetweefsel, wat laat zien dat deze weefsels geen primaire doelweefsels zijn voor PPAR $\alpha$ . Er was haast geen overlap in genexpressieveranderingen tussen alle drie de weefsels. Echter, PBMCs zouden een rol kunnen spelen als surrogaatcellen voor vetweefsel, omdat er een grote overeenkomst was in veranderde genexpressieroutes na visoliebehandeling. Deze routes waren met name betrokken bij lipide en aminozuurmetabolisme.

## Conclusion

De studies die in dit proefschrift worden beschreven, laten zien dat PPAR $\alpha$  en  $\gamma$  agonisten in staat zijn om metabole risicofactoren gunstig te beïnvloeden in mensen met type 2 diabetes en mensen met overgewicht. In sommige gevallen zou een natuurlijke PPAR $\alpha$  agonist een alternatief kunnen zijn voor een synthetische agonist, omdat we hebben laten zien dat zowel visolie- als fenofibraatbehandeling een vergelijkbaar triglycerideverlagend effect kan bewerkstelligen. Echter, de vergelijking gaat niet verder dan dit overeenkomstige effect en er is een hoge dosering visolie nodig om dit effect te bereiken. Ondanks de eigenschap van PPAR agonisten rosiglitazone, fenofibraat en visolie om in vitro de pro-inflammatoire transcriptiefactor NF $\kappa$ B af te remmen, wordt dit nauwelijks en inconsistent gereflecteerd in veranderingen van plasma-ontstekingsmarkers in mensen. De studies beschreven in dit proefschrift laten ook zien dat PPAR agonisten genexpressieveranderingen in PBMCs kunnen induceren, al lijken deze veranderingen niet het directe resultaat te zijn van PPAR activering. Ondanks de zeer marginale overlap in genexpressieveranderingen na PBMCs, vetweefsel en spier na visolie en fenofibraat behandeling, zouden PBMCs wel de potentie kunnen hebben om als surrogaatcellen voor vetweefsel te dienen, omdat deze twee celtypen grote overlap in gereguleerde routes laten zien na visoliebehandeling.