

# The role of free fatty acids in ectopic lipid accumulation, insulin resistance and inflammation in humans.

## Citation for published version (APA):

van Herpen, N. A. (2012). *The role of free fatty acids in ectopic lipid accumulation, insulin resistance and inflammation in humans*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## 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

The prevalence of type II diabetes mellitus (“diabetes”) is increasing rapidly all around the world. Diabetes has serious health consequences, as it can induce damage to the eyes, and is related to cardiovascular disease and kidney failure. Furthermore, there is an increased risk of developing inflammation and impaired wound healing. Increased levels of glucose in the blood, which are caused by a decreased insulin sensitivity, are central in the development of type II diabetes mellitus and its harmful consequences.

An increased level of circulating free fatty acids (FFA), in combination with a decreased mitochondrial function, leads to lipid accumulation in non-adipose tissue such as skeletal muscle and liver. Mitochondria are known as the energy factories of cells. They are responsible for oxidation of FFA. Therefore, when mitochondria are less capable of burning free fatty acids, for example because the mitochondria are damaged, accumulation of lipid intermediates can occur inside a cell. These lipid intermediates can interfere with insulin signaling of muscle cells, which in turn leads to a decreased insulin sensitivity or in other words insulin resistance. Furthermore insulin resistance is often related to low-grade systemic inflammation. For example, several studies have suggested that inflammation and insulin resistance reinforce each other via a positive feedback loop. Indeed, the two often come together: for instance, rheumatoid arthritis, an inflammatory disease, increases the risk to develop insulin resistance. This thesis focuses on the relationship between FFA, lipid accumulation, insulin sensitivity, and inflammation.

In chapter 3, we showed that prolonged fasting leads to increases in FFA, which in turn lead to lipid accumulation in muscle and decreased insulin sensitivity. Furthermore, whole-body fat oxidation increased. Furthermore, we found that prolonged fasting, despite an increase in whole-body fat oxidation, leads to an overall reduction in both state 3 respiration and maximally uncoupled respiration in permeabilized skeletal muscle fibers. This decrease in mitochondrial capacity in skeletal muscle is counterintuitive, especially since this decrease was substrate-independent and also apparent upon a lipid substrate. Furthermore, these reductions could not be explained by changes in mitochondrial density. It is important to note that the reduction in muscle mitochondrial capacity does not (yet) affect the capability of the body to enhance fat oxidation. This is an important finding, since it has generally been assumed that a reduction in muscle mitochondrial function will result in reductions in whole-body fat oxidative capacity. Here, we show that this extrapolation may not be justified. Since prolonged fasting is a physiological condition in which increased fat oxidation becomes very important, a reduced mitochondrial function

seems unbeneficial from a physiological point of view. Our findings suggest that the elevated plasma FFA and/or intramuscular lipid levels associated with the insulin resistant state are responsible for the secondary negative effects on mitochondrial function. We therefore think that mitochondrial dysfunction is rather a consequence of lipid accumulation and insulin resistance.

As already mentioned, inflammation and insulin resistance reinforce each other via a positive feedback loop. It has been suggested that this inflammation is related to increased FFA levels. However, increased levels of glucose and insulin may also contribute to inflammation. In chapter 4, we used the model of prolonged fasting to study the effects of increased FFA on inflammatory markers. Interestingly, the model of prolonged fasting does not lead to hyperinsulinemia or hyperglycemia, which made it possible to study the effects of increased FFA concentrations apart from those of increased insulin and glucose concentrations. We found that fasting for 60 hours did not affect concentrations in plasma inflammatory markers such as TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-8, and hs-CRP. Therefore, we can conclude that in normal-weight subjects, insulin-resistance or increased FFA concentrations per se are not a prerequisite to induce a pro-inflammatory cytokine profile.

To investigate the relation between dietary lipids, lipid accumulation and insulin resistance we examined the effects of a high-fat diet versus a low-fat diet on hepatic lipid accumulation (chapter 5). It was hypothesized that a high-fat diet would lead to an accumulation of lipids in muscle and liver (intrahepatic lipid, IHL), and consequently to a decreased insulin sensitivity. For this, twenty apparently overweight men were randomly allocated to a low-fat or high-fat diet group. Both groups started with a three-week low-fat diet (15 En% protein, 65 En% carbohydrates, 20 En% fat), after which half of all subjects switched to a three-week isocaloric high-fat diet (15 En% protein, 30 En% carbohydrates, 55 En% fat). We found that in the low-fat diet group, IHL decreased by 13%, whereas it increased by 17% in the high-fat diet group. This difference in change was statistically significant. As we anticipated an increase in IHL content in the high-fat diet group, we also examined IHL content after one week on the high-fat diet. Interestingly, the increase in IHL upon the high-fat diet already occurred in the first week, with no further increase in the following two weeks. This agrees with literature, which states that – when fed in energy balance – subjects are capable of increasing fat oxidation to match fat intake after one week on a high-fat diet. It can thus be suggested that prolonged consumption of a high-fat diet increases 24h fat oxidation to match fat intake, and thereby does not lead to further accumulation of ectopic fat. In this study, we did not find a statistically significant increase in IMCL levels after the high-fat diet or an effect on insulin sensitivity. This indicates that, in humans, high-fat feeding does not lead to insulin resistance when subjects are in energy balance.

In chapter 6, we studied substrate oxidation in response to a three week high-fat diet into more detail. With regard to fat oxidation, resting fat oxidation did not increase after the high-fat diet, but we did observe that metabolic flexibility was reduced, as indicated by a reduced inhibition of lipid oxidation during insulin infusion. Although speculative, a reduced ability to suppress lipid oxidation during insulin infusion may reflect the postprandial situation and could indicate that postprandial fat oxidation is increased after high-fat diet, reducing the necessity to deposit excess lipids in ectopic fat stores.

A decreased metabolic flexibility, i.e. an impaired switching from fatty acid to glucose oxidation in response to insulin, has been linked to type II diabetes. To further investigate the mechanism underlying a decreased metabolic flexibility, we determined mRNA expression of genes involved in lipid and glucose metabolism, and mitochondrial content in skeletal muscle biopsies (vastus lateralis). We found that mRNA expression of genes involved in lipid metabolism such as carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) and peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1beta (PGC1b) were reduced by the high-fat diet. So far, it is unknown if insulin-induced suppression of fat oxidation is dependent on CPT1 activity. Therefore, we cannot conclude if a decrease in CPT1 and PGC1b are causally related to a reduced metabolic flexibility.

From the results described in this thesis, we conclude that a mismatch between lipid oxidation and lipid availability is needed to induce ectopic lipid accumulation. Furthermore, we showed that high-fat diets, when subjects are in energy balance, do not lead to insulin resistance. These findings suggest that overfeeding and therefore an increase in bodyweight are needed for the development of insulin resistance. Furthermore our studies showed that a reduced oxidative capacity/mitochondrial function might be a consequence of increased FFA availability.

These findings suggest that the development of human insulin resistance cannot simply be explained by one factor, but rather depends on an interplay between lipid availability and oxidation and related mitochondrial function.



# Samenvatting

Net zoals in de rest van de wereld neemt in Nederland de prevalentie van type 2 diabetes mellitus (“diabetes”) toe. De gevolgen van diabetes zijn onder andere beschadigingen aan het netvlies van het oog, hart- en vaatziekten, en nieraandoeningen. Ook is er een verhoogde kans op ontstekingen en slecht genezende wonden. De verhoogde glucosewaarden in het bloed, veroorzaakt door een verminderde insulinegevoeligheid van diverse weefsels, staan centraal in het ontstaan van deze gevolgen.

Een overmaat aan vrije vetzuren in de bloedsomloop, in combinatie met een verminderde mitochondriële functie, leidt tot vetstapeling in de zogenaamde perifere weefsels zoals de skeletspier en de lever. Mitochondriën bevinden zich in de cel en spelen een belangrijke rol bij de verbranding van deze vrije vetzuren. Als de werking van de mitochondriën verstoord is, dan stapelen bepaalde schadelijke stoffen (lipid-intermediären) in een cel op, waardoor de werking van insuline afneemt. Met andere woorden, de insulinegevoeligheid van een cel neemt af. Insulineresistentie gaat ook vaak gepaard met verhoogde hoeveelheden ontstekingsstoffen in het bloed. In dit proefschrift staat de relatie tussen verhoogde vrije vetzuren, vetstapeling, insulinegevoeligheid en ontsteking centraal.

In hoofdstuk 3 hebben we laten zien dat een verhoging van vrije vetzuren tot vetstapeling in de spier leidt en tot een verminderde insulinegevoeligheid. In het geval van diabetes gaat de aanwezigheid van insulineresistentie gepaard met een verminderde oxidatieve capaciteit van de spier, veroorzaakt door minder goed functionerende mitochondria, de energiecentrales van de cel. Er is echter nog een discussie gaande of deze verminderde oxidatieve capaciteit een oorzaak of een gevolg is van insulineresistentie. Bij diabetes wordt gesuggereerd dat een verminderde oxidatieve capaciteit - vanwege slechter functionerende mitochondria - zorgt voor een verminderde vetverbranding, hetgeen op lange termijn zou leiden tot vetstapeling en insulineresistentie. Het is echter ook mogelijk dat een verminderde mitochondriële functie het gevolg is van bijvoorbeeld hoge vetzuurconcentraties of insuline resistentie, zoals bij diabetes het geval is. Deze hypothese hebben we onderzocht door jonge gezonde vrijwilligers 60 uur te laten vasten, een model om acuut insuline resistentie op te wekken. Het vasten zorgde voor een enorme toename van de hoeveelheid vrije vetzuren in de bloedsomloop en - zoals verwacht - een grote daling van de insuline gevoeligheid. Wij vonden dat, ondanks een verhoging van de vetverbranding in het lichaam, de oxidatieve capaciteit van spiervezels na vasten was afgenomen door minder goed functionerende mitochondriën. Dit toont aan dat het acuut verhogen van de vetzuren, waarvan bekend is dat het tot insulineresistentie leidt,

gepaard gaat met een vermindering van de mitochondriële functie. Dit kan suggereren dat mitochondriële dysfunctie een gevolg van hoge vetzuren en/of insulineresistentie kan zijn in plaats van een oorzaak.

Zoals hierboven besproken, hebben mensen met diabetes vaak meer moeite om te herstellen van een ontsteking. Het wordt gesuggereerd dat dit gerelateerd is aan een overmaat aan vrije vetzuren, maar ook de verhoogde waarden van insuline en glucose zijn genoemd als veroorzakers van de ontsteking. Echter, welke afwijkingen in het bloedprofiel nu van doorslaggevend belang zijn, is onbekend. Het model waarin jonge gezonde vrijwilligers 60 uur vasten zou hier een uitkomst kunnen bieden. Dit model wordt namelijk gekenmerkt door een verhoging van vrije vetzuren en insulineresistentie zoals het geval is bij type II diabetes. Maar in tegenstelling tot wat we zien bij diabetes, zijn de glucose- en insulinewaarden in het bloed verlaagd. We hebben gevonden dat 60 uur vasten geen verhoging gaf van de ontstekingsstoffen (TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-8, en hs-CRP) in het bloed. Om deze reden concluderen wij dat een verhoogde hoeveelheid vrije vetzuren in het bloed niet persé leidt tot een verhoging van de hoeveelheid ontstekingsstoffen in het bloed. Mogelijk is het noodzakelijk dat ook de glucose- en insulinewaarden verhoogd zijn om effecten van vrije vetzuren op deze ontstekingsstoffen te vinden. Deze bevindingen hebben we beschreven in hoofdstuk 4.

Om de relatie tussen vet, vetstapeling en insulineresistentie verder uit te diepen hebben we, buiten 60 uur vasten, gebruik gemaakt van een hoog-vet voeding. In hoofdstuk 5 hebben mannen met overgewicht (BMI tussen 25 en 30 kg/m<sup>2</sup>) tussen de 40 en 60 jaar gedurende 3 weken een laag-vet voeding (20 energieprocent (En%) vet) geconsumeerd waarna de helft van de groep overging op een iso-energetische hoog-vet voeding (55 En% vet). Na 1 week op de hoog-vet voeding hebben we de hoeveelheid vet in de lever gemeten en deze was toegenomen. Na 3 weken hebben we de vetstapeling opnieuw gemeten en deze was niet verder toegenomen in vergelijking met de meting na 1 week. Dit komt mogelijk omdat het lichaam de vetverbranding aan kan passen aan de hoeveelheid vet in de voeding.

Naast vetstapeling in de lever hebben we ook naar de vetstapeling in de spier gekeken en vonden hier geen effecten van de voeding. Ook vonden we geen effecten van de hoog-vet voeding op de insulinegevoeligheid. Dit suggereert dat bij de mens een vetrijke voeding niet per se tot insulineresistentie leidt, althans zolang de voeding in energiebalans wordt gegeven.

We hebben daarna in meer detail gekeken naar de verbranding van verschillende substraten als gevolg van de hoog-vet voeding. Dit is beschreven in hoofdstuk 6. We vonden geen verhoging van de vetoxidatie in rust, maar wel een verminderde capaciteit van insuline om de koolhydraatoxidatie te stimuleren. Deze verminderde me-

tabole flexibiliteit suggereert dat het lichaam, na 3 weken hoog-vet voeding, in de postprandiale situatie de voorkeur geeft aan het verbranden van vetten in plaats van koolhydraten. Om deze verminderde metabole flexibiliteit verder te verklaren hebben we in spierbiopten van het bovenbeen gekeken naar de mRNA-expressie van verschillende genen betrokken bij het vet- en glucosemetabolisme. Het bleek dat de mRNA-expressie van carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) en peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1beta (PGC1b) waren afgenomen na de hoog-vet voeding. De verminderde genexpressie was geassocieerd met een verminderde metabole flexibiliteit, zoals gevonden door een verminderde remming van de vetoxidatie door insuline. We kunnen echter niet concluderen, dat dit werd veroorzaakt door een verlaging van de CPT1 en PGC1b activiteit. Verder onderzoek zal aan moeten tonen of de veranderingen in metabole flexibiliteit nu een gunstige aanpassing zijn aan een hoog-vet voeding of op de lange termijn wel leidt tot insulineresistentie van de skeletspier.

Uit de resultaten verkregen in dit proefschrift concluderen we dat een disbalans tussen het aanbod van vet en vetoxidatie nodig is voor vetstapeling in de lever en de spier. Verder tonen we aan dat het consumeren van een vetrijke voeding, in energiebalans, niet leidt tot insulineresistentie. Dit kan suggereren dat overvoeding, en dus een toename van lichaamsgewicht, nodig is voor het ontstaan van insulineresistentie. Daarnaast geven onze studies aan dat een verminderde oxidatieve capaciteit / mitochondriële functie een gevolg kan zijn van verhoogde vetzuurconcentraties in het bloed en/of insuline resistentie.

Onze bevindingen tonen daarom aan dat insulineresistentie in mensen niet verklaard kan worden door één factor, het consumeren van een vetrijke voeding, in energiebalans, maar eerder afhankelijk is van een samenspel tussen het aanbod en verbranding van vet en de daarbij betrokken mitochondriële functie.