

# Role for the endothelial glycocalyx in regulation of insulin sensitivity in muscle

Citation for published version (APA):

Eskens, B. J. M. (2014). *Role for the endothelial glycocalyx in regulation of insulin sensitivity in muscle*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20140523be>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2014

**DOI:**

[10.26481/dis.20140523be](https://doi.org/10.26481/dis.20140523be)

**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

In this thesis the role of the endothelial glycocalyx in the regulation of insulin sensitivity in the muscle was investigated. The glycocalyx is the protective layer between the endothelium and the circulating blood, and was previously shown to be involved in multiple aspects of endothelial function. While endothelial dysfunction has been associated with the development of insulin resistance and ultimately type II diabetes, the actual relation between both has been unclear in the past. We hypothesized that a damaged glycocalyx may be the missing link.

The glycocalyx is the first compartment which nutrients (e.g. glucose) and hormones (e.g. insulin) encounter when they pass through the circulation towards the insulin-independent tissues, such as the skeletal muscle. In **chapter 1** a general introduction is provided, in which the possible interaction between the endothelial glycocalyx and the delivery of insulin towards its target tissues is described.

In **chapter 2**, the effect of insulin on capillary blood volume was tested. It was demonstrated that administration of insulin onto the cremaster muscle in C57Bl/6 mice was associated with an increase in tube hematocrit in individual capillaries. In contrast, topical insulin administration onto the cremaster muscle of diabetic mice (db/db mice), which were previously associated with glycocalyx loss, was associated with a reduction in the number of blood-perfused capillaries and a lack of effect on blood volume in the remaining capillaries.

In **chapter 3**, the effect of insulin on the glycocalyx and its relation to insulin-mediated recruitment of microvascular blood volume was studied. Using SDF imaging, in combination with our newly developed software to measure glycocalyx barrier properties in the microcirculation, we showed that during healthy conditions insulin was able to rapidly modulate the glycocalyx in such a way that microvascular blood volume within already perfused microvessels could increase. In rats, in which the endothelial glycocalyx was enzymatically degraded by a single bolus of hyaluronidase the ability of insulin to recruit microvascular blood volume was, however, impaired, and this was associated with an impaired insulin-mediated glucose disposal during an intravenous insulin tolerance test.

While these studies were performed in anesthetized rats, in **chapter 4** we confirmed that glycocalyx degradation is associated with an impaired insulin-mediated glucose disposal measured in conscious rats under more physiological conditions. Furthermore,

in this study we showed that, in line with the reduction in insulin sensitivity, about 1.5 fold more insulin was needed to dispose intravenously infused glucose in the rats in which glycocalyx damage was induced. These data indicate that acute glycocalyx damage triggers the development of insulin resistance, but that in an early stage the induced insulin resistance can be compensated by an increased insulin release by the pancreas.

Since obesity has been associated with insulin resistance and endothelial dysfunction, in **chapter 5** it was tested if glycocalyx damage was an early event in the development of diet-induced obesity (DIO). We showed that glycocalyx barrier properties were impaired already after 6 weeks of high fat diet (HFD) in mice, before glucose intolerance was fully manifested. In the following 12 weeks of feeding a HFD to mice, glucose intolerance developed, without a further impairment of glycocalyx barrier properties. These data indicate that glycocalyx damage is an early event in DIO.

From the previous data, we were interested in therapeutic opportunities for glycocalyx restoration and their effect on insulin sensitivity. In **chapter 6**, the effect of short-term metformin administration on glycocalyx barrier properties was measured in db/db mice. Metformin is the most prescribed anti-hyperglycemic drug worldwide, and while it has been shown by others that metformin improves endothelial dysfunction, the exact mechanism for this effect is still unknown. Evaluation of the whole-body distribution of large (70kDa) versus small dextrans (40kDa), revealed that two weeks of metformin in the drinking water improved the glycocalyx barrier properties in the db/db mice. It is anticipated that the metformin-mediated improvement of the glycocalyx may contribute to the reported cardiovascular benefits of metformin.

In **chapter 7** the effect of two week treatment of metformin as well as of the suggested glycocalyx mimetic sulodexide on improving insulin resistance in the HFD mouse was studied. We did not observe an effect of metformin on insulin-mediated glucose homeostasis in diet-induced obese (DIO) mice, suggesting that the beneficial effects of metformin on the barrier properties of the glycocalyx were insufficient to improve glucoregulation after two weeks already. Sulodexide, in contrast, did improve glucose levels measured during an intraperitoneal glucose tolerance test in mice which had received the HFD for 6 weeks. Also, at a later stage of DIO (18 weeks), short-term sulodexide treatment was shown to improve insulin resistance. Sulodexide was previously shown to partially restore glycocalyx barrier properties in type II diabetic subjects and appears to be a promising glycocalyx therapy.

The findings of the current thesis are discussed in **chapter 8**. We conclude that glycocalyx damage seems to be a “common soil” for endothelial dysfunction and (vascular) insulin resistance. The glycocalyx may, therefore, be a very useful target for diagnosis and therapeutic interventions in obese people, because of their increased risk for developing insulin resistance and type II diabetes, and ultimately cardiovascular disease.

## Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift is de rol van de endotheliale glycocalyx in de regulatie van insuline gevoeligheid in de spier onderzocht. De glycocalyx is de beschermende laag tussen het endotheel en het circulerende bloed, en recentelijk is aangetoond dat de glycocalyx betrokken is bij verschillende aspecten van endotheliale dysfunctie. Endotheliale dysfunctie is in eerdere studies geassocieerd met de ontwikkeling van insuline resistantie, maar de precieze relatie tussen beide is onduidelijk gebleven in het verleden. Onze hypothese is dat een beschadigde glycocalyx de missende link is.

De glycocalyx is het eerste compartiment dat nutriënten (bijv. glucose) en hormonen (bijv. insuline) tegenkomen wanneer ze door het circulerende bloed naar de insulinegevoelige weefsels, zoals de spieren, gaan. **Hoofdstuk 1** is een algemene introductie, waarin de mogelijke interactie tussen de endotheliale glycocalyx en het transport van insuline naar de insulinegevoelige weefsels is beschreven.

In **hoofdstuk 2** is het effect van insuline op het bloedvolume in de haervaten onderzocht. Er is aangetoond dat toediening van insuline op de cremaster spier van muizen samengaat met een toename in hematocriet in haervaten. In tegenstelling, toediening van insuline op de cremaster spier van diabetische muizen, waarin eerder glycocalyx beschadiging aangetoond is, gaat samen met een afname in het aantal met bloed gevulde haervaten. Verder was in deze muizen een effect van insuline op een toename in bloedvolume afwezig.

In **hoofdstuk 3** is het effect van insuline op de glycocalyx en de relatie tot de insuline-gemedieerde toename van het bloedvolume in de haervaten bestudeerd. Met SDF opgenomen beelden, in combinatie met door ons nieuw ontwikkelde software om de glycocalyx barrière eigenschappen in de microcirculatie te meten, hebben we aangetoond dat tijdens gezonde condities insuline in staat is om de glycocalyx snel te moduleren op een manier dat het bloedvolume in de haervaten toeneemt. In ratten, waarin de endotheliale glycocalyx enzymatisch beschadigd was met behulp van een eenmalige bolus van hyaluronidase, is de mogelijkheid van insuline om het bloed volume in de haervaten te laten toenemen afgangen. Deze afname ging samen met een verminderde insuline-gemedieerde glucose opname tijdens een intraveneuze insuline tolerantie test.

Deze vorige studies zijn uitgevoerd in ratten die onder anesthesie waren, maar in **hoofdstuk 4** is bevestigd dat afbraak van de glycocalyx ook in wakkere ratten, tijdens

meer fysiologische condities, samengaat met een afgenoem insuline-gemedieerde glucose opname. Verder is in deze studie aangetoond dat, in lijn met de afname in insuline gevoeligheid, ongeveer 1.5 keer meer insuline nodig is om een intraveneuze glucose toediening in ratten waarin glycocalyx schade geïnduceerd was, te klaren. Deze data tonen aan dat acute glycocalyx beschadiging de ontwikkeling van insuline resistantie triggert, maar dat in een vroeg stadium de geïnduceerde insuline resistantie gecompenseerd kan worden door een verhoogde afgifte van insuline door de alvleesklier.

Omdat obesitas geassocieerd is met insuline resistantie en endotheel dysfunctie, is in **hoofdstuk 5** getest of glycocalyx beschadiging vroeg voorkomt in de ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas. We hebben aangetoond dat de glycocalyx barrière eigenschappen reeds afgenoem zijn na toediening van een dieet met een hoog vet gehalte gedurende 6 weken in muizen, dit voordat glucose intolerantie volledig was ontwikkeld. In de daarop volgende 12 weken tijdens het voeden van het dieet met een hoog vet gehalte aan de muizen ontwikkelde glucose intolerantie zich, zonder een verdere afname van de glycocalyx barrière eigenschappen. Deze data tonen aan dat glycocalyx schade een vroegtijdig effect is in de ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas.

Vanuit boven genoemde data waren we geïnteresseerd in de therapeutische mogelijkheden voor glycocalyx herstel en het effect daarvan op insuline gevoeligheid. In **hoofdstuk 6** is het effect van korte metformine toediening op glycocalyx barrière eigenschappen gemeten in obese muizen. Metformine is het meest voorgeschreven medicijn bij diabeten wereldwijd, en hoewel anderen hebben aangetoond dat metformine endotheliale dysfunctie verbetert is het precieze mechanisme voor dit effect vooralsnog onbekend. Evaluatie van de lichaamsdistributie van grote (70kDa) versus kleine dextranen (40kDa) toonde aan dat metformine gedurende twee weken in het drinkwater de glycocalyx barrière eigenschappen verbetert in obese muizen. Het is te verwachten dat de metformine-gemedieerde verbetering van de glycocalyx zal bijdragen aan de gerapporteerde voordelen op hart en bloedvaten van metformine.

In **Hoofdstuk 7** is het effect van de behandeling van 2 weken metformine en van 2 weken sulodexide, een gesuggereerd glycocalyx mimeticum, op de verbetering van insuline resistantie in muizen die met een dieet met hoog vet gehalte gevoed werden getest. We vonden geen effect van metformine op de insuline-gemedieerde glucose homeostase in de muizen waarbij obesitas geïnduceerd was. Dit suggereert dat de voordelige effecten van 2 weken metformine op de barrière eigenschappen onvoldoende waren om de glucose regulatie al te verbeteren. Sulodexide daarentegen

verbeterde de glucose spiegels gemeten tijdens een intraperitoneale glucose tolerantie test in muizen die met een dieet met een hoog vet gehalte voor 6 weken waren gevoed. Ook tijdens een later tijdstip na toediening van dit dieet (18 weken) is aangetoond dat sulodexide behandeling insuline resistantie verbetert. Het was al eerder aangetoond dat sulodexide gedeeltelijk de glycocalyx barrière eigenschappen in personen met type II diabetes verbetert. Sulodexide lijkt dus een veelbelovende therapie.

De bevindingen van dit proefschrift worden bediscussieerd in **hoofdstuk 8**. We concluderen dat glycocalyx schade de gemeenschappelijk basis lijkt te zijn voor endotheel dysfunctie en (vasculaire) insuline resistantie. De glycocalyx kan, daarom, een belangrijk doelwit zijn voor de diagnose en therapeutische behandeling van mensen met obesitas vanwege hun toenemende risico voor de ontwikkeling van insuline resistantie en type II diabetes, en uiteindelijk hart- en vaatziekten.