

Modification of white adipose tissue biology and metabolic profiles in humans by nutritional bio-actives

Citation for published version (APA):

Warnke, I. (2018). *Modification of white adipose tissue biology and metabolic profiles in humans by nutritional bio-actives*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20180316iw>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180316iw](https://doi.org/10.26481/dis.20180316iw)

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Introduction

The well-balanced interplay of lipid storage and release (lipolysis) in human adipose tissue (AT) secures energy homeostasis in times of a nutrient surplus or food shortage, respectively. More recently, the constant technological progress led to a continuous availability of cheap, processed energy-dense foods and a dramatic reduction of physical activity. Their concomitant negative effects are the increasing accumulation of body fat causing obesity, which elevates the risk for various non-communicable diseases e.g., type-2-diabetes, non-alcoholic fatty liver disease, cardiovascular diseases, and several forms of cancer. Promoting life-style changes is the first defence line against increased body fat and metabolic dysfunctions such as insulin resistance, ectopic fat accumulation and chronic low-grade inflammation. However, apparently this approach cannot be effectively implemented and maintained in all individuals as shown by the on-going obesity epidemic. Therefore, further non-invasive strategies need to be explored that contribute to the reversal or prevention of these metabolic impairments and promote weight loss. This explains the numerous studies in recent decades on cellular and molecular processes underlying fat metabolism and on effects of nutrients on adipocyte functions (Chapter 1). In this thesis, we investigated the effects of nutritional bio-actives like *trans*-resveratrol (Res), epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (all-E)-lycopene (Lyc), and eicosapentaenoic acid (EPA) on adipocyte functions and metabolic profiles of overweight-obese humans.

***In-vitro* study results**

To identify nutritional bio-actives that could modulate adipocyte functions (e.g., the accumulation of cytosolic lipid droplets (LDs) in differentiating adipocytes) valid *in-vitro* test systems are required. Therefore, we set-up an automated high content assay using fluorescent microscopy (ArrayScan® VTI reader) to quantify LDs in adipocytes (Chapter 2). The assay was validated with several dietary constituents (n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), carotenoids, polyphenols) by determining their influence on LD accumulation and the expression of adipogenic and lipogenic genes (RT-qPCR). n-3 PUFAs, beta-carotene and hydroxytyrosol strongly inhibited the rosiglitazone-stimulated lipid formation in murine adipocytes, whereas Lyc and EGCG showed a moderate and Res no inhibition of LD accumulation. The observed effects on the LD formation induced by the nutritional constituents correlated with the modulation of the adipogenic genes PPAR-gamma, C/EBP-alpha, and aP2. Hence, this *in-vitro* assay is a valuable substitute for the commonly used Oil Red O procedure, allowing a rapid automated improved quantification of changes in adipocyte LD parameters.

Human AT dysfunction, characterized by hypertrophic adipocytes, inflammation, and impaired adipogenesis, rather than an increased fat mass *per se*, is strongly associated with obesity-related

metabolic diseases. Therefore, in Chapter 3 we investigated the impact of bio-active dietary constituents on functional features of *in-vitro* differentiated primary human adipocytes. The bio-actives Lyc, EPA, and Res were tested for their individual or combined effects. In addition to the fluorescence assay, AT function-related gene expression and cyto-/adipokine secretion (LiquiChip®) was measured. Treating differentiating human adipocytes for 14 days with the combinations Lyc/Res and EPA/Res significantly inhibited the LD formation. Increased PPAR-gamma mRNA levels and a decreased expression of lipogenic markers (LPL, FAS, GLUT-4) and PLIN-1 accompanied this reduced lipid accumulation. Furthermore, the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and CCL2/MCP-1) and adiponectin was blunted by the treatment with these combinations. These data indicate that treatment with combinations of dietary bio-actives during adipogenic differentiation can influence adipocyte function by affecting the balance between adipogenic, lipogenic and lipolytic gene expression, resulting in reduced lipid storage and a less inflammatory secretion profile. Here we showed for the first time that combining Lyc or EPA with Res partially augmented the effects of the single compounds on human adipocytes, supporting the concept of mutual interactions between nutrients.

It is described that human multi-potent adipose-derived stem (hMADS) cells retain inter-individual genetic and metabolic donor characteristics, which could modify the effect of nutritional bio-actives. Thus, we studied based on the results of Chapter 3, whether the combination Lyc/Res affects functional adipocyte features (incl. lipolytic response) of *in-vitro* differentiated hMADS cells. The cells were isolated from abdominal subcutaneous white AT of age-matched lean and obese donors (Chapter 4). The combination Lyc/Res strongly reduced the LD accumulation in differentiated hMADS cells independently of the donor's characteristics. Interestingly, Res alone affected the storage of LDs to a similar extent as Lyc/Res. Moreover, Res and Lyc/Res inhibited the lipolytic response (glycerol release) under basal and stimulated (beta-adrenergic) conditions in differentiated hMADS cells. These functional changes were accompanied by a decreased expression of the adipogenic (PPAR-gamma, C/EBP-alpha), lipogenic (FAS, GLUT-4) and lipolytic (ATGL, HSL) genes. The IL-6 and adiponectin secretion was also diminished by Res and the combination, hence reflecting a reduced pro-inflammatory secretion profile. Taken together, the results described in chapter 4 corroborate that Res is a potent driver of improved functional features in *in-vitro* differentiated human adipocytes under the used differentiation conditions and the effects seem independent of the donor's characteristics (lean *versus* obese). Nevertheless, evidence indicates that combinations of bio-actives may be a more beneficial strategy (as also observed in chapter 3) for preventing or correcting AT dysfunction and obesity-associated

metabolic diseases. This may be a result of the constituents targeting distinct pathways in white AT and other physiological pathways that affect metabolic health.

In-vivo study results

Based on the above-mentioned indications and metabolically beneficial results of a recently reported short-term clinical study (3 days) with combinations of polyphenols (Most *et al.* IJO 2014), we investigated in Chapter 5 and 6 whether long-term supplementation of EGCG and Res (282 and 80 mg/d) had positive effects on tissue-specific insulin sensitivity, mitochondrial capacity in skeletal muscle, lipid metabolism, and metabolic profiles. Therefore, a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial was conducted in overweight-obese, non-diabetic subjects (21 male, 21 female). The 12-week EGCG/Res supplementation increased the oxidative capacity in permeabilized muscle fibres (*ex-vivo*) and preserved fasting and postprandial whole-body fat oxidation (indirect calorimetry) compared to the PLA group, which showed a significant decline in fat oxidation. This was corroborated by an elevated expression of genes and proteins involved in mitochondrial respiration and energy metabolism (skeletal muscle biopsies taken before and after intervention). Furthermore, pre- and post-intervention measurements showed that the EGCG/Res supplementation prevented an increase in plasma triacylglycerol levels in the fasted state and during a high-fat mixed meal test. However, whole-body fat mass, energy expenditure, and the fasting plasma metabolic profile were not affected, although visceral AT mass (DEXA) tended to decrease after the intervention. Finally, these observed metabolic changes did not translate into improved peripheral, hepatic, and AT insulin sensitivity (2-step hyperinsulinemic-euglycemic clamp), but could in the long term prevent weight gain and the worsening of insulin resistance (Chapter 5).

Chapter 6 describes the effects of the 12-week EGCG/Res supplementation on the adipose tissue morphology and transcriptome. Before and after intervention, abdominal subcutaneous AT biopsies were collected for the assessment of adipocyte size, mitochondrial protein content and transcriptional profile. The present study showed that the EGCG/Res supplementation had no effect on mean adipocyte size, adipocyte size distribution, and AT lipolysis (microdialysis) compared with the PLA group. However, the transcriptome results suggest that the intervention may induce the suppression of gene sets related to adipogenesis and apoptosis/autophagy, inflammation, and the immune response in AT of overweight-obese men and women, indicative of a diminished adipocyte turnover and adipose tissue inflammation, respectively.

Conclusions

The *in-vitro* and *in-vivo* human studies described in this thesis extend the knowledge on whether and how individual and combinations of nutritional bio-actives benefit AT function, insulin sensitivity, and metabolic profiles. However, effects of treatment with combinations of bio-actives on adipocyte features *in-vitro* e.g., on lipid accumulation and secretory profile, are influenced by the applied differentiation conditions and do not necessarily translate into changes in AT biology and energy metabolism in humans *in-vivo*. Nevertheless, an increased mitochondrial capacity in skeletal muscle and whole-body fat oxidation were observed in overweight-obese adults after 12-week supplementation with EGCG/Res. Hence, despite the subtle metabolic improvements, which may slow the progression of insulin resistance, it remains to be further determined whether different dosages or metabolites of bio-actives, concomitant to lifestyle interventions and/or medical treatments, might elicit more favourable effects in the long-term. In summary, bio-actives have the potential to improve adipocyte functions and therefore the outcomes of lifestyle changes, although their effects may depend on health and weight status, the gut microbiota, environmental factors, and genetic predisposition. However, the application of bio-active supplements cannot compensate for an unhealthy lifestyle including overconsumption of energy-dense, micronutrient deprived food products and minimal physical activity (Chapter 7).

Zusammenfassung

Einleitung

Das ausgeklügelte Zusammenspiel von Fetteinlagerung und -freisetzung (Lipolyse) im Fettgewebe des Menschen sichert die Energie-Homöostasis bei einem Nahrungsüberangebot bzw. in Zeiten des Nahrungsmangels. Der technologische Fortschritt der letzten Jahrzehnte begünstigte eine ständige Verfügbarkeit von billigen, industriell verarbeiteten energiereichen Nahrungsmitteln und eine drastische Abnahme der körperlichen Aktivität. Daraus folgt eine stetige Zunahme des Gesamtkörperfettes, was zu Adipositas führt und somit das Risiko erhöht, an nichtübertragbaren Krankheiten wie Typ-2 Diabetes, nichtalkoholischer Fettleber, Herz-Kreislauf Beschwerden und verschiedenen Krebsformen zu erkranken. Die erste und wichtigste Massnahme, um eine Zunahme des Körperfettes und metabolische Fehlfunktionen, wie Insulinresistenz, ektopische Fettansammlung und chronische geringgradige Entzündung zu verhindern, ist die Änderung des Lebensstils. Jedoch scheint dies schwer umsetzbar zu sein, wie die sich weiterhin epidemisch ausbreitende Fettleibigkeit zeigt. Aufgrund dessen sind zusätzliche Strategien notwendig, um diese metabolischen Störungen umzukehren oder zu verhindern und somit eine Gewichtsabnahme zu fördern. Dies erklärt die zahlreichen Studien, welche die zellulären und molekularen Grundlagen des Fettstoffwechsels und den Einfluss von Nährstoffen auf die Fettzellfunktionen untersuchten (Kapitel 1). In dieser Dissertation haben wir die Effekte von „bioaktiven“ Nahrungsbestandteilen wie z.B. *trans*-Resveratrol (Res), Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), (all-E)-Lycopin (Lyc), und Eicosapentaensäure (EPA) auf die Funktionen der Fettzellen und die metabolischen Profile von übergewichtigen Probanden untersucht.

Resultate der *in-vitro* Studie

Für die Identifizierung von bioaktiven Substanzen, welche Fettzellfunktionen - z.B. die Bildung von zytosolischen Lipidtröpfchen (LT) während der Adipozyten-Differenzierung - beeinflussen, braucht es valide *in-vitro* Testmethoden. Dafür haben wir einen neuen automatischen „high-content“ Assay etabliert, welcher mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (ArrayScan® VTI) die LT in Adipozyten quantifizieren kann (Kapitel 2). Zur Validierung wurden verschiedene Nahrungsbestandteile (mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-3 PUFAs), Carotenoide, Polyphenole) bezüglich ihres Einflusses auf die LT Bildung und auf die Expression adipogener und lipogener Gene (RT-qPCR) getestet. n-3 PUFAs, beta-Carotin und Hydroxytyrosol inhibierten die Rosiglitazon-stimulierte Lipidansammlung in murinen Fettzellen stark, wohingegen Lyc und EGCG eine moderate und Res keine Inhibition aufzeigten. Die Änderung der mRNA Level der adipogenen Marker PPAR-gamma, C/EBP-alpha und aP2 korrelieren mit der beobachteten Wirkung der bioaktiven Substanzen auf die LT Bildung. Somit ist dieser *in-vitro* Assay ein wertvoller Ersatz für die üblich verwendete Oil Red O Färbung, da er eine verbesserte,

automatisierte und schnelle Quantifizierung von Lipidtröpfchen-Parametern in Fettzellen ermöglicht.

Die Fehlfunktion des Fettgewebes, gekennzeichnet durch hypertrophe Adipozyten, Entzündung und beeinträchtigte Adipogenese, ist im Menschen weniger mit einem erhöhten Körperfettanteil *per se* assoziiert als mit den die Adipositas begleitenden metabolischen Krankheiten. Deshalb haben wir in Kapitel 3 untersucht, welchen Einfluss bioaktive Nahrungsbestandteile auf die funktionellen Parameter von *in-vitro* differenzierten primären humanen Adipozyten haben. Die bioaktiven Substanzen Lyc, EPA, und Res wurden alleine oder in Kombination getestet. Zusätzlich zum Fluoreszenz-Assay wurde die Expression von Genen des Fettstoffwechsels und die Sekretion von Zyto-/Adipokinen (LiquiChip[®]) gemessen. Die 14-tägige Behandlung von differenzierenden humanen Adipozyten mit den Kombinationen Lyc/Res und EPA/Res inhibierte signifikant die Bildung von LT. Erhöhte PPAR-gamma mRNA Level und eine verringerte Expression von lipogenen Markern (LPL, FAS, GLUT-4) und PLIN-1 begleiteten die reduzierte Lipidakkumulierung. Des Weiteren war die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6 und CCL2/MCP-1) und Adiponektin nach der Behandlung mit diesen Kombinationen abgeschwächt. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Behandlung mit bioaktiven Substanz-Kombinationen während der Adipozyten-Differenzierung die Bilanz zwischen adipogener, lipogener und lipolytischer Genexpression beeinflussen, was in einer verringerten Lipidansammlung und einem weniger entzündlichen Sekretionsprofil resultiert und somit einer verbesserten Fettzellfunktion entspricht. Ausserdem zeigen wir hier zum ersten Mal, dass das Kombinieren von Lyc oder EPA mit Res die Effekte der Einzelsubstanzen auf menschliche Fettzellen verstärkt, was wiederum das Konzept gegenseitiger Wechselwirkungen zwischen Nährstoffen bekräftigt.

Es ist beschrieben, dass humane multipotente Stammzellen des Fettgewebes (hMADS Zellen) interindividuelle genetische und metabolische Eigenschaften der Spender beibehalten, was die Wirkung von Nahrungsbestandteilen beeinflussen könnte. Somit haben wir basierend auf den Resultaten von Kapitel 3 untersucht, ob die Kombination Lyc/Res funktionelle Fettzeleigenschaften (inkl. lipolytische Antwort) von *in-vitro* differenzierten hMADS Zellen modifiziert. Die Stammzellen wurden aus abdominalem subkutanem weissem Fettgewebe von altersgleichen schlanken und adipösen Spendern isoliert (Kapitel 4). Lyc/Res reduzierte, unabhängig von den Spendereigenschaften, die Lipidakkumulierung in differenzierten hMADS Zellen signifikant. Interessanterweise, zeigte Res allein eine ähnlich starke Wirkung auf die LT Bildung wie Lyc/Res. Ferner inhibierten Res and Lyc/Res die lipolytische Antwort (Glycerol Ausschüttung) in differenzierten hMADS Zellen unter basalen und stimulierten (beta-adrenergen)

Bedingungen. Diese funktionellen Veränderungen wurden von einer verringerten Expression der adipogenen (PPAR-gamma, C/EBP-alpha), lipogenen (FAS, GLUT-4) und lipolytischen (ATGL, HSL) Gene begleitet. Die Sekretion von IL-6 und Adiponektin war durch die Behandlung mit Res und Lyc/Res gleichermaßen vermindert, was somit ein geringeres pro-inflammatorisches Sekretionsprofil darstellt. Zusammengefasst bekräftigen die in Kapitel 4 beschriebenen Ergebnisse, dass Res eine wirksame Substanz ist, welche die funktionellen Eigenschaften der *in-vitro* differenzierten humanen Fettzellen unter den gegebenen Differenzierungsbedingungen positiv beeinflusst. Ausserdem scheint die Wirkung von Res unabhängig von den Spendereigenschaften (schlank *versus* adipös) zu sein. Nichtsdestotrotz gibt es wissenschaftliche Hinweise (wie auch in Kapitel 3 beobachtet), dass Kombinationen von bioaktiven Nahrungsbestandteilen geeigneter sein könnten, um Fettgewebefunktionen und Adipositas-assoziierte metabolische Erkrankungen zu verhindern oder zu behandeln. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Substanzen auf unterschiedliche Funktionen des weissen Fettgewebes und auf andere, die metabolische Gesundheit beeinflussende Signalwege abzielen.

Resultate der in-vivo Studie

Basierend auf oben genannten Hinweisen und auf einer jüngst veröffentlichten Kurzzeit-Studie (3 Tage), welche positive metabolische Effekte von Polyphenol-Kombinationen beschrieb (Most *et al.* IJO 2014), untersuchten wir in Kapitel 5 und 6, ob eine Langzeit-Supplementierung mit EGCG und Res (282 und 80 mg/d) eine vorteilhafte Wirkung auf die gewebespezifische Insulinsensitivität, die mitochondriale Kapazität im Muskel, den Lipid-Stoffwechsel und metabolische Profile hat. Dafür wurde eine randomisierte, Placebo (PLA)-kontrollierte klinische Doppelblindstudie in übergewichtigen-adipösen, nicht-diabetischen Probanden (21 Männer, 21 Frauen) durchgeführt. Die 12-wöchige EGCG/Res Supplementierung erhöhte die oxidative Kapazität in permeabilisierten Muskelfasern (*ex-vivo*) und bewahrte die *in-vivo* Fett-Oxidation (indirekte Kalorimetrie) im nüchternen und postprandialen Zustand verglichen mit der PLA-Gruppe, in der die Fett-Oxidation signifikant abnahm. Diese Resultate wurden durch eine erhöhte Expression von Genen und Proteinen (Muskelbiopsien vor und nach Intervention), die im oxidativen Energiestoffwechsel eine Rolle spielen, bekräftigt. Des Weiteren zeigten die Vorher-Nachher Messungen, dass die Polyphenolsupplementierung das Ansteigen der Triglyzerid-Konzentration im Plasma im Nüchternzustand und während des Testens einer fetthaltigen Mahlzeit verhinderte. Allerdings hat sich der Körperfettanteil, der Energieverbrauch und das Profil der Blut-Metaboliten im Nüchternzustand nicht verändert, obwohl sich die viszerale Fettmasse (DEXA) durch die Intervention tendenziell verringert hat. Diese beobachteten günstigen

metabolischen Veränderungen spiegelten sich jedoch nicht in einer Verbesserung der peripheren, hepatischen und Fettgewebe-Insulinsensitivität wieder (2-Schritt hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp Technik), könnten aber langfristig eine Gewichtszunahme und Verschlechterung der Insulinresistenz vorbeugen (Kapitel 5).

Kapitel 6 beschreibt die Wirkung der 12-wöchigen Intervention mit EGCG und Res auf die Morphologie und das Transkriptom des weissen Fettgewebes. Vor und nach der Supplementierung wurden subkutane Fettgewebebiopsien vom Bauch genommen, um die Effekte auf die Fettzell-Grösse, den mitochondrialen Proteingehalt und das Genexpressionsprofil zu bewerten. Es zeigte sich, dass die EGCG/Res Supplementierung die durchschnittliche Adipozyten-Grösse, die Grössen-Verteilung und die Fettgewebe-Lipolyse (Mikrodialyse) im Vergleich zur PLA-Gruppe nicht beeinflusste. Jedoch suggerieren die Transkriptom-Resultate, dass die Intervention eine Suppression derjenigen Gen-Sets induziert, welche in Verbindung zur Adipogenese und Apoptose/Autophagie, Entzündung und der Immunantwort im Fettgewebe stehen. Dies könnte einer verringerten Fettzellerneuerung bzw. Entzündung des Fettgewebes in übergewichtigen-adipösen Männern und Frauen entsprechen.

Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit beschriebenen *in-vitro* und *in-vivo* Human-Studien, erweitern unser Wissen, ob und wie individuelle bioaktive Nahrungsinhaltsstoffe oder deren Kombinationen der Fettgewebe-Funktion, Insulinsensitivität und metabolischen Profilen zugute kommen. Jedoch werden die Behandlungseffekte von bioaktiven Stoffen/Kombinationen auf *in-vitro* Adipozyten-Eigenschaften wie z.B. Fetteinlagerung und Sekretionsprofil, durch die Differenzierungsbedingungen beeinflusst und lassen sich nicht ohne Weiteres auf die Fettgewebebiologie und den Energiestoffwechsel des Menschen übertragen. Nichtsdestoweniger wurde ein Anstieg der mitochondrialen Kapazität im Muskel und ein Erhalt der Ganzkörper-Fett-Oxidation nach 12-Wochen EGCG/Res Supplementierung in übergewichtigen-adipösen Erwachsenen beobachtet. Trotz der metabolischen Verbesserungen, welche langfristig die zunehmende Insulinresistenz verzögern könnten, bedarf es weiterer Untersuchungen um zu zeigen, ob verschiedene Dosierungen oder Metaboliten von bioaktiven Substanzen zusammen mit Veränderungen des Lebensstils und/oder medikamentöser Behandlung effektiver wirken. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bioaktive Nahrungsinhaltsstoffe das Potenzial besitzen die Fettzellfunktionen und somit die Erfolge von Lebensstiländerungen zu verbessern, wenngleich deren Effekte vom Gesundheitszustand, Gewicht, der interstinalen Mikroflora, Umweltfaktoren und genetischer Veranlagung abhängen. Allerdings kann die Anwendung von bioaktiven

Supplementen einen ungesunden Lebensstil, insbesondere einen erhöhten Konsum an energiereichen, Mikronährstoffe-armen Nahrungsmitteln und mangelnde sportliche Aktivität, nicht kompensieren (Kapitel 7).