

Microbiota, obesity and insulin resistance

Citation for published version (APA):

Reijnders, D. (2016). *Microbiota, obesity and insulin resistance: unraveling the impact of the microbiome on metabolic health in humans*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Proefschriftmaken.nl | Uitgeverij Boxpress. <https://doi.org/10.26481/dis.20160921dr>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160921dr](https://doi.org/10.26481/dis.20160921dr)

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

Over the last decades, the prevalence of obesity has reached epidemic proportions, with an increasing impact on health care. Several recent studies have indicated that the composition of the gut microbiota might play a prominent role in body weight regulation and impairments in metabolic health. Moreover, perturbations in microbial populations may contribute to changes in body weight, inflammation, glucose metabolism and insulin sensitivity. Importantly, however, mechanistic studies almost exclusively have been performed in rodent models, and most human evidence comes from large metagenomic studies. Therefore, the studies described in this thesis investigated the impact of manipulation of the gut microbiota composition on human physiology in subjects at increased risk for developing type 2 diabetes mellitus. In addition, we examined the relationship between the microbiota composition at the genus level and tissue-specific insulin sensitivity, as determined by the gold-standard hyperinsulinemic-euglycemic clamp.

In **Chapter 2**, we demonstrated that a seven-day intervention with amoxicillin (AMOX; broad-spectrum) or vancomycin (VANCO; narrow-spectrum antibiotic) did not affect host metabolism as compared to placebo in 57 obese, insulin resistant males. In this double-blind, randomized placebo-controlled trial, we found a pronounced decrease in bacterial diversity and a reduction of Firmicutes-abundance after VANCO, but not after AMOX. The reduction of Firmicutes resulted in decreased plasma and/or fecal concentrations of short-chain fatty acids and bile acid metabolites. However, this did not affect hepatic, peripheral and adipose tissue insulin sensitivity, as determined by a two-step hyperinsulinemic-euglycemic clamp with [6,6-2H₂]-glucose tracer infusion. In addition, gut permeability, circulating lipopolysaccharide binding protein (LPB) concentrations and fecal energy harvest were not affected by either VANCO or AMOX.

Despite a still considerably altered microbial composition, also at eight-weeks follow-up, we did not find effects on several aspects of human metabolism such as energy harvest, adipocyte size and whole-body insulin sensitivity.

Additionally, antibiotics intervention did not affect fasting and/or postprandial energy expenditure, substrate utilization and circulating insulin, GLP-1, ANGPTL₄ and leptin. In **Chapter 3**, we studied the effect of a seven-day antibiotics intervention on forearm skeletal muscle metabolism in more detail by

combining measurements of arterio-venous concentration differences across forearm muscle and forearm blood flow. In line with Chapter 2, antibiotic treatment did neither affect fasting and postprandial plasma glucose, triacylglycerol (TAG) and free fatty acid (FFA) concentrations, nor the extraction of glucose, TAG and FFA across the forearm muscle. In addition, no changes in lactate flux across forearm muscle were observed.

As described in **Chapter 2**, microarray analysis showed that VANCO induced a significant decrease of immunity-related pathways in adipose tissue. However, these gene expression alterations did not translate into changes in systemic low-grade inflammatory markers. Both VANCO and AMOX increased adipose tissue gene expression of pathways related to oxidative metabolism and pathways feeding into these cycles, although adipocyte morphology remained unaltered. In addition, in **Chapter 4**, we performed functional measurements at the level of adipose tissue. Here, we found that seven-day VANCO treatment slightly but significantly improved *ex vivo* β -adrenergic sensitivity. However, the physiological importance of this slight effect remains to be determined since no significant effects on *ex vivo* basal lipolysis and maximal β -adrenergic receptor-mediated lipolysis in mature human adipocytes were observed. In line, β -adrenoceptor expression and post-receptor signaling pathways in adipose tissue were unaltered following antibiotics treatment.

Finally, in **Chapter 5**, we have investigated the relationship between gut microbiota composition and tissue-specific insulin sensitivity in detail in two independent cohorts of obese men (recruited in Maastricht and Amsterdam). Except for the association between centrain bacterial species and HbA_{1c} in the Maastricht cohort, we did not find any significant associations between fasting and clamp-derived measures of tissue-specific insulin sensitivity in both cohorts.

In conclusion, although previous animal studies have suggested that the gut microbiota may be a promising target to improve metabolic health, our data demonstrated that short-term manipulation of the human gut microbiota by antibiotics does not have any metabolic consequences. A seven-day treatment with VANCO but not AMOX significantly decreased the microbiota diversity and reduced the abundance of Firmicutes, which was accompanied reduced bile acid metabolites and short-chain fatty acids in plasma and/or feces. This did not translate into significant effects on host metabolism directly after cessation of

the intervention, nor at eight-weeks follow-up, despite the fact that microbiota composition was not recovered completely to baseline at follow-up. In addition, we did not find a significant association between the gut microbiota and the host metabolic phenotype in humans in a cross-sectional analysis in two independent cohorts. Taken together, this thesis does not provide evidence that altering the gut microbiota in a robust, short-term manner has a pronounced impact on host metabolism in obese subjects with impaired glucose metabolism. Interference with the complex relation between the human being and the environment might need other strategies in order to obtain health benefits.

Samenvatting

De prevalentie van obesitas is de afgelopen decennia enorm toegenomen, wat geleid heeft tot een toegenomen druk op de gezondheidszorg en gerelateerde kosten. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de samenstelling van de populatie darmbacteriën een prominente rol kan spelen in de regulatie van het lichaamsgewicht en het metabolisme. Verstoringen van de bacterie-samenstelling, ofwel microbiota-compositie, kunnen leiden tot veranderingen van het lichaamsgewicht, ontstekingsparameters, de suikerstofwisseling en insulinegevoeligheid. Studies die de onderliggende mechanismen in de mens hebben onderzocht zijn schaars, omdat het merendeel van de studies is uitgevoerd in dieren.

In de onderzoeken die zijn beschreven in dit proefschrift onderzochten we wat het effect was van het manipuleren van de microbiota-compositie op de stofwisseling in mensen met overgewicht en obesitas. Daarnaast onderzochten we de relatie tussen de microbiota en insulinegevoeligheid van de lever, spier en het vetweefsel, organen die een belangrijke rol spelen bij verstoringen in de stofwisseling die aanwezig zijn bij mensen met obesitas en type 2 diabetes mellitus. De insulinegevoeligheid hebben we gemeten met behulp van de hyperinsulinemische-euglycemische clamp, wat de gouden-standaard techniek is.

In **Hoofdstuk 2** hebben we aangetoond dat een interventie met amoxicilline (AMOX; breed-spectrum antibioticum) en vancomycine (VANCO; smal-spectrum antibioticum, gericht tegen Gram-positieve bacteriën) geen effect heeft op het metabolisme bij mensen met overgewicht of obesitas. Aan dit onderzoek namen 57 insulineresistente mannen met overgewicht of obesitas deel, die allen gedurende 7 dagen één van de antibiotica of een placebo gebruikten. Dit dubbelblinde, gerandomiseerde onderzoek toonde aan dat de diversiteit van darmbacteriën na VANCO-behandeling was afgenomen, net als de aanwezigheid van de bacteriestam 'Firmicuten'. De AMOX-behandelde groep toonde deze effecten niet.

De afname van Firmicuten resulteerde in een verlaging van plasma en/of feces concentraties van korte-keten vetzuren en galzoutmetabolieten. Dit leidde echter niet tot veranderingen van de insulinegevoeligheid van de lever, spier of vetweefsel (gemeten met de twee-stap hyperinsulinemische-euglycemische clamp met een [6,6-²H₂]-glucose-tracer). Ook de doorlaatbaarheid van de

darmwand en het inflammatoir profiel, zoals gereflecteerd door circulerende concentraties van LBP en inflammatoire cytokines, bleven onveranderd.

Ondanks dat de microbiota compositie na acht weken follow-up nog niet volledig hersteld was, vonden we ook aan het einde van deze periode geen significante effecten op het metabolisme (energie-opname in de darm, de grootte van vetcellen en de insulinegevoeligheid (HOMA-IR) bij deze mensen met overgewicht en obesitas.

Verder onderzochten we of de interventie met AMOX of VANCO een effect had op het energiegebruik en de vet- en koolhydraatverbranding na een nacht vasten en na een vetrijke maaltijd in de vorm van een milkshake. Ook werden veranderingen in circulerende hormonen zoals insuline, GLP-1, ANGPTL₄ en leptine onderzocht. We vonden geen veranderingen in deze hormonen na de interventie. De resultaten beschreven in **Hoofdstuk 3** zijn hiermee in overeenstemming. In dit hoofdstuk werd gekeken naar de stofwisseling van de spier in de onderarm met behulp van metingen van arteriële-veneuze concentratieverschillen en doorbloedingsmetingen van de onderarm. Dit onderzoek toonde aan dat antibiotica-behandeling geen significant effect had op de plasma glucose-, vrije-vetzuren- en lactaatconcentraties en de opname van glucose en lipiden door de spier, zowel na een nacht vasten als na het eten van een vetrijke maaltijd.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, verlaagde behandeling met VANCO de expressie van genen gerelateerd aan het immunsysteem in het vetweefsel. Deze genexpressie veranderingen vertaalden zich echter niet in veranderingen van inflammatoire parameters in het bloed. Zowel VANCO als AMOX verhoogden de expressie van genen die betrokken zijn bij een verhoogde verbranding van koolhydraten en vetten, maar hadden beide geen effect op de vetcelgrootte.

In **Hoofdstuk 4** hebben we functionele metingen verricht op het niveau van het vetweefsel (*ex vivo*). We vonden dat behandeling met VANCO gedurende 7 dagen de β -adrenerge gevoeligheid voor stimulatie van de lipolyse (vetafbraak) in vetcellen enigszins verhoogde. De fysiologische relevantie van dit effect vereist echter verder onderzoek, mede omdat er geen effect gevonden werd op de basale en β -adenerge receptor-gemedieerde stimulatie van de lipolyse.

Bovendien bleken de expressie van de β -adrenoceptor alsmede post-receptor effecten onveranderd na de interventie.

Tot slot hebben we in **Hoofdstuk 5** de relatie tussen de microbiota samenstelling en de weefselspecifieke insulinegevoeligheid onderzocht in twee onafhankelijke cohorten van mannen met obesitas. De cohorten waren gerekruteerd in Maastricht en Amsterdam. Met uitzondering van de associatie tussen bepaalde bacteriën en HbA_{1c}, een maat voor de regulatie van de glucose spiegel over een langere periode, in het Maastricht-cohort, vonden we geen enkele significante associatie tussen de microbiota en insulinegevoeligheid in beide cohorten, bepaald aan de hand van zowel gevaste parameters in het bloed en de insulinegevoeligheid zoals gemeten met behulp van de gouden-standaard techniek.

Concluderend kunnen we zeggen dat, in tegenstelling tot dierstudies die suggereerden dat de microbiota een grote rol speelt bij het metabolisme, wij geen relatie vonden tussen de bacteriesamenstelling in de darm en de stofwisseling bij mannen met overgewicht en obesitas. Behandeling met VANCO, maar niet AMOX, gedurende zeven dagen verlaagde de diversiteit van de microbiota en de aanwezigheid van de bacteriestam Firmicuten. Dit ging gepaard met een afname van galzoutmetabolieten en korte-keten vetzuren in de plasma en/of feces, maar vertaalde zich niet in een significant effect op het metabolisme van de gastheer. Ook twee maanden na het stoppen van de antibiotica vonden we geen aantoonbare effecten op de insulinegevoeligheid, ondanks het feit dat de microbiota nog steeds niet volledig hersteld was naar de samenstelling zoals aan het begin van het onderzoek.

Kortom, de onderzoeken beschreven in dit proefschrift tonen aan dat het veranderen van de darmbacterie-samenstelling met antibiotica op korte termijn geen significante effecten heeft op de stofwisseling in mensen met overgewicht en obesitas. Andere strategieën lijken noodzakelijk om de complexe relatie tussen de mens en zijn omgeving te manipuleren om de metabole gezondheid te bevorderen.