

Imaging myocellular lipid droplet dynamics in relation to insulin sensitivity

Citation for published version (APA):

van Polanen, N. (2021). *Imaging myocellular lipid droplet dynamics in relation to insulin sensitivity: Analysis in human intervention studies*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20210922np>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210922np](https://doi.org/10.26481/dis.20210922np)

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.

Samenvatting

Meer dan één miljoen mensen in Nederland hebben diabetes, waarvan 90% type 2 diabetes. Patiënten met type 2 diabetes worden gekenmerkt door insulineresistentie. Bij insulineresistentie reageren de weefsels in het lichaam minder op insuline waardoor minder glucose wordt opgenomen. Dit kan leiden tot hoge glucosewaarden in het bloed. De spier neemt na een maaltijd ongeveer 80% van de totale glucose op uit het bloed en insulineresistentie in de spier is dan ook een van de eerste kenmerken van het ontwikkelen van type 2 diabetes. Hoe insulineresistentie ontstaat is nog niet bekend. Mogelijk speelt overmatige vetopslag een belangrijke rol in het ontstaan van insulineresistentie van de spier.

Vet (lipiden) worden in de spiercel (myocel) opgeslagen als zogenaamde intramyocellulaire lipiden (IMCL), onder andere in de vorm van lipide druppels (LDs). Een toename van IMCL wordt geassocieerd met een toename in insulineresistentie. Duurathleten hebben, paradoxaal genoeg, ook grote hoeveelheden IMCL, maar zijn insulinegevoelig. Dit fenomeen is bekend als 'de atleten-paradox'. Lipiden in de spier interfereren dus niet altijd met insulinegevoeligheid. In duurathleten ondergaan LDs een constante cyclus van opslag en verbruik, waarbij interactie plaatsvindt met andere organellen zoals mitochondriën. LDs worden tegenwoordig gezien als dynamische organellen die lipiden opslaan of vrijmaken afhankelijk van de voeding of de energieproductie die nodig is. Het behouden van deze dynamiek is belangrijk om insulineresistentie en metabole ziektes te voorkomen. Om de aspecten van LD dynamiek te bestuderen, richt onderzoek zich niet alleen op de totale vetopslag in de spier, maar ook op veranderingen in LD morfologie (aantal en grootte), locatie van de LDs in de cel en de aanwezigheid van bepaalde eiwitten op de LDs.

LDs bestaan uit een neutrale lipide kern van voornamelijk triglyceriden en cholesterolesters omringt door een fosfolipidenmembraan. Op dit membraan bevinden zich ook veel verschillende eiwitten, waaronder lipasen en perilipine 5 (PLIN5). PLIN5 komt voor in de spier en speelt een rol bij de opslag van lipiden in LDs en het vrijmaken van vetzuren uit LDs voor oxidatie. Een goede balans tussen

de opslag en het vrijmaken van vetzuren is belangrijk om lipotoxiciteit te voorkomen. Lipotoxiciteit is de aanwezigheid van bioactieve lipiden in het cytoplasma die het functioneren van de cel belemmeren. Mogelijk kunnen deze bioactieve lipiden de insulinesignalering hinderen wat kan leiden tot insuline-resistentie. LDs en eiwitten die een rol spelen in vetmetabolisme spelen een grote rol om lipotoxiciteit te voorkomen. Vetopslag gekenmerkt door een hoog aantal LDs wordt geassocieerd met insuline-gevoeligheid, terwijl grote LDs geassocieerd zijn met insulineresistentie. Individuen met een hoge insulinegevoeligheid hebben meer PLIN5 in hun spieren en meer LDs met PLIN5 op het membraan. Hieruit blijkt dat de morfologie van LDs en de aanwezigheid van PLIN5 een belangrijke rol kunnen spelen in insulinegevoeligheid.

De spier bestaat uit type I en type II vezels. Type I vezels hebben een hoge oxidatieve capaciteit, bevatten veel mitochondriën en hebben meer IMCL dan type II vezels. Type II vezels hebben vooral een hoge anaerobe capaciteit en gebruiken voornamelijk koolhydraten. Daarom is het belangrijk om beide vezeltypen in acht te nemen wanneer er gekeken wordt naar IMCL. Binnen een spiercel bevinden de LDs zich tussen de myofibrillen (intermyofibrillaire (IMF) LDs) en vlak onder de celmembraan (subsarcolemmale (SS) LDs). Er wordt gedacht dat IMF-LDs energie kunnen leveren aan de IMF- mitochondriën die belangrijk zijn voor het produceren van ATP voor spiercontractie. SS-LDs bevinden zich vlak bij het vasculaire systeem en worden daarom beïnvloed door hoge lipide waarden in het bloed die worden opgenomen door de spier. De insulinerceptoren bevinden zich in de celmembraan en daarom wordt gedacht dat vooral SS-LDs negatieve invloed kunnen hebben op de insulinesignalering. Patiënten met type 2 diabetes hebben meer SS-LDs, met name in type II spiervezels, en SS-LDs worden dan ook geassocieerd met insulineresistentie.

Hoofdstuk 2 bevat een literatuuroverzicht van de huidige wetenschappelijke literatuur over de invloed van voeding en fysieke activiteit op IMCL en de relatie tot insulinegevoeligheid. Voeding en inspanning hebben beide invloed op LD dynamiek. Een hoge vetinname, en daarbij verhoogde triglyceridewaarden en vrije vetzuren in het bloed, zorgt voor een verhoogde vetopname in de spier en daarmee een toename in IMCL. IMCL neemt weer af tijdens calorierestrictie,

hoewel langdurig vasten leidt tot een toename in IMCL (waarschijnlijk door op den duur verhoogde vetzuren in het bloed). IMCL wordt ook gebruikt als energiebron tijdens acute inspanning. Duurtraining zorgt op langer termijn voor een toename in IMCL, waarbij IMCL een belangrijke energiebron is. IMCL is dus een dynamische verzameling van LDs die zich aanpassen aan energieaanbod en -vraag. Door middel van onder andere fluorescentiemicroscopie kunnen aspecten van LD dynamiek geanalyseerd worden. Deze methodiek wordt ook toegepast in **hoofdstukken 4 t/m 6**. Het doel van dit proefschrift is om de rol van LD dynamiek te besturen in relatie tot insulinegevoeligheid in verschillende humane interventiestudies. Daarom hebben we lipiden en kenmerken van LD dynamiek bestudeerd na blootstelling aan kou (**hoofdstuk 3**), verstoord dag-nacht ritme (**hoofdstuk 4**), inname van het voedingssupplement resveratrol (**hoofdstuk 5**) en acute inspanning (**hoofdstuk 6**).

In **hoofdstuk 3** hebben we gekeken naar de invloed op kou op triglyceridegehalte in het bloed. Insulineresistente individuen hebben hoge triglyceridenwaarden in hun bloed en daarmee meer risico op het ontwikkelen van hart- en vaatziekten. In deze studie zorgde acute kou voor een verhoogd energiegebruik met name door een verhoogde vetoxidatie, maar dit leidde niet tot een verhoogde triglycerideklaring. In dierenstudies wordt bruin vetweefsel geactiveerd door kou en vervolgens de triglyceride klaring verhoogd. In mensen is het bruin vetweefsel wellicht niet voldoende om het triglyceridegehalte in het bloed te doen verminderen. In deze studie werd gebruik gemaakt van kou geïnduceerde thermogenese zonder dat de proefpersonen aan het rillen waren (spieractivatie). Blootstelling tot langdurige kou of het toestaan van rillen zouden wellicht het triglyceridegehalten in het bloed kunnen doen dalen in mensen.

In **hoofdstuk 4** zijn we verder gaan kijken naar de relatie tussen insulinegevoeligheid en IMCL. In eerdere studies hebben we gezien dat een verstoord slaap-waak ritme leidt tot een verminderde insulinegevoeligheid. Dit komt bijvoorbeeld voor bij mensen die in ploegdiensten werken en daarbij ook nachtdiensten draaien. Het doel van dit hoofdstuk was om te achterhalen of deze verminderde insulinegevoeligheid te verklaren is door veranderingen van lipiden in de spier. Echter zagen we geen

veranderingen in IMCL, LD morfologie of locatie van LDs na een verstoring van slaap-waak ritme. Met behulp van lipidomics technieken is er gekeken naar verschillende soorten lipiden en daaruit bleek dat enkele type lipiden (cardiolipine en zeer lange verzuren) waren veranderd door een verstoorde slaap-waak ritme. Deze type lipiden zijn interessant om verder te onderzoeken en hun relatie met insuline-gevoeligheid te bestuderen.

Resveratrol is een polyfenol dat van nature voorkomt in onder andere druiven en pinda's. In eerdere studies is gebleken dat resveratrol de mitochondriële functie verbeterd en dat dit gaat gepaard met een toename in IMCL en afname in levervet. Op welke manier resveratrol voor deze effecten zorgt is nog onbekend. Deze veranderingen in IMCL zijn daarentegen vergelijkbaar met mensen die gaan trainen. Resveratrol is daardoor een interessant voedingssupplement dat IMCL beïnvloed op een manier dat wordt geassocieerd met gezondheidswinst. In **hoofdstuk 5** wordt de hypothese getest of de toename in IMCL na resveratrol-inname (in de afwezigheid van een daling in insulinegevoeligheid) gepaard gaat met veranderingen in LD morfologie die overeenkomen met de LD morfologie van duurtgetrainde atleten. Het doel van dit hoofdstuk was om de verhoogde vetopslag na 30 dagen resveratrol-inname te bestuderen in individuen met verminderde stofwisseling en of deze vetopslag in de spier lijkt op een 'gezonde opslag'. In deze studie zagen we bij individuen die een toename lieten zien in IMCL, dat dit vooral werd opgeslagen in type I vezels en in LDs met PLIN5. Dit is vergelijkbaar met de vetopslag die in atleten wordt gezien, en een toename in IMCL door resveratrol hoeft daarom niet negatief te zijn voor de gezondheid.

In **hoofdstuk 6** hebben we uitgebreider gekeken naar de invloed van acute inspanning op IMCL. Hierbij hebben we LDs geanalyseerd bij rust (voor het sporten), direct na inspanning en 4 uur na het sporten (herstel) in ongetrainde jonge mannen. Daarnaast hebben we de invloed van suikerinname tijdens het sporten bestudeerd door één groep te laten fietsen en herstellen in gevaste toestand (alleen het drinken van water was toegestaan) en de andere groep een glucosedrankje te laten drinken tijdens het hele experiment. Na 2 uur fietsen in gevaste toestand nam de vetopslag af in

de SS-regio en niet in de IMF-regio. Dit duidt op een rol van SS LDs tijdens acute inspanning in gevaste toestand. Tijdens het 4-uur durende herstel nam de IMCL weer toe in de gevaste toestand, met name in type I vezels, SS LDs en LDs met PLIN5. Vier uur na het fietsen was IMCL hoger in gevaste toestand dan wanneer glucose werd ingenomen. De invloed van inspanning op IMCL lijkt dus afhankelijk van de gevaste toestand, dat gepaard gaat met hogere vetzuurniveaus in het bloed en hogere vetverbranding.

Zoals boven benoemd, hebben we in dit proefschrift geprobeerd om de dynamiek van de LDs in kaart te brengen door kenmerken van dynamiek voor en na een interventie te meten in mensen. Deze kenmerken worden echter op een tijdstip gemeten en dynamiek zou nog beter in kaart gebracht kunnen worden door LDs te bestuderen gedurende een bepaalde tijdsduur. In **hoofdstuk 7** beschrijven we een nieuwe techniek met behulp van levende cel-microscopie (en fluorescentiemicroscopie) om LD dynamiek te bestuderen in spiercellen aan de hand van twee verschillende fluorescent gelabelde vetzuren. Allereerst wordt een (groen) gelabelde vetzuur toegevoegd om de eerste LDs te vormen. Om vervolgens te bestuderen hoe cellen omgaan met nieuwe vetzuren wordt na deze incubatie een ander gelabeld vetzuur toegevoegd (rood label) om te kijken waar deze nieuwe vetzuren terecht komen (in nieuwgevormde druppels of bestaande druppels). In **hoofdstuk 7** worden de stappen beschreven hoe deze methode is ontwikkeld om deze in de toekomst te gebruiken voor verdere onderzoeken. We verwachten dat spiercellen van insulinegevoelige donoren in staat zijn om veel nieuwe LDs te vormen. Spiercellen van insulineresistente donoren zullen grotere en meer statische LDs vormen. De eerste resultaten in een klein aantal donoren laten zien dat spiercellen van insulinegevoelige donoren sneller en meer vetzuren opnemen dan spiercellen van insulineresistente donoren en dat dit vooral resulteert in meer LDs (en geen grotere LDs). In de toekomst kan de methode gebruikt worden om de dynamiek te bestuderen in spiercellen van een grotere groep insulinegevoelige en insulineresistente donoren. Hierbij kan niet alleen worden gekeken waar de vetzuren worden opgeslagen, maar ook wat er gebeurt met de gelabelde vetzuren als lipolyse of vetoxidatie wordt gestimuleerd. Hiermee hopen

we het mechanisme beter te kunnen begrijpen hoe LD dynamiek invloed heeft op insulinegevoeligheid.

Het doel van het proefschrift was om meer inzicht te krijgen in de dynamiek van IMCL in relatie tot insulinegevoeligheid voor en na verschillende humane interventies. Met behulp van microscopische technieken hebben we niet alleen de totale vetopslag in de spier bestudeerd, maar ook de details van de LDs, waaronder aantal, grootte, locatie en de aanwezigheid van PLIN5 onder invloed van verschillende interventies. Hiermee willen we de LD dynamiek beter in kaart brengen. In **hoofdstuk 5 en 6** hebben we gezien dat een toename in IMCL na resveratrol-inname of na acute inspanning zich kenmerkt in een hoger aantal LDs, opslag in type I vezels met PLIN5. Dit komt overeen met de manier waarop atleten vet opslaan in de spier. Dit suggereert dat we met behulp van interventies (bijvoorbeeld resveratrol-supplementen of inspanning) de vorm van vetopslag in de spier kunnen veranderen. Het is nog niet bekend hoe insulineresistentie in de spier exact ontstaat en welke rol lipiden daarin een rol spelen. Daarom is het belangrijk om veel aspecten van vetopslag te bestuderen met name vanuit een humaan perspectief. Als het ontstaan van insulineresistentie beter wordt begrepen, dan kunnen therapieën ontwikkeld worden om het spiervet te moduleren en het ontstaan van insulineresistentie te voorkomen/behandelen. Daarmee kunnen nieuwe gevallen van type 2 diabetes voorkomen worden en/of de kwaliteit van leven van de patiënt met type 2 diabetes verbeterd worden.