

Samenvatting

Regulering van microvasculaire
insuline-gevoeligheid door perivascularair vet:
een translationele benadering

Het doel van dit proefschrift was te onderzoeken of perivasculair vet – vet rondom de bloedvaten in de microcirculatie- de reacties van de bloedvaatjes op insuline beïnvloedt. De microcirculatie, die opgebouwd is uit de kleinste bloedvaatjes in het lichaam, speelt een onmisbare rol in het transport en de afgifte van verschillende stoffen aan de weefsels, en de regulering van de bloeddruk. Insuline, het hormoon dat de opname van glucose in de weefsels stimuleert, wordt ook door de microcirculatie vervoerd en afgegeven. Dit hormoon beïnvloedt echter ook zijn eigen transport door voor vaatverwijding in de microcirculatie te zorgen, waardoor er meer doorbloeding is, en het uitwisselingsoppervlak toeneemt. Op die manier wordt de uitwisseling van allerlei stoffen makkelijker gemaakt. Een goed functioneren van dit vaatverwijdend effect draagt dus bij aan het efficiënt functioneren van insuline en de opname van suikers. Slecht functioneren hiervan is een belangrijke risicofactor voor het ontwikkelen van type 2 diabetes en hart- en vaatziekten. De mate van het vaatverwijdend effect van insuline in de kleine bloedvaten noemen we 'microvasculaire insuline-gevoeligheid'. De regulering van de vaateffecten van insuline vindt plaats in het endotheel; de binnenbekleding van de bloedvaten. Bij mensen met overgewicht en obesitas is de microvasculaire insuline-gevoeligheid afgenomen in vergelijking met slanke mensen. Dit zorgt deels voor het verhoogde risico op type 2 diabetes en hart- en vaatziekten bij mensen met overgewicht en obesitas.

Waarom mensen met obesitas een verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid hebben wordt niet goed begrepen. De hoeveelheid vet opgeslagen onder de huid ('subcutaan vet') en rondom de buikorganen ('visceraal vet') is doorgaans toegenomen in obesitas, deze vetdepots kunnen echter de verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid onvoldoende verklaren. Enkele jaren geleden is een nieuw vetdepot ontdekt, namelijk het perivasculaire vet. Vanwege de nabijheid bij de bloedvaten hebben wij onderzocht of we de verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid wellicht beter kunnen verklaren door middel van eigenschappen van dit vet. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van verschillende methoden om dit te onderzoeken, grosso modo kan gezegd worden dat we eerst bij proefdieren hebben onderzocht of ons idee zou kunnen kloppen, en

direct de betrokken mechanismen te onderzoeken. Vervolgens toetsten we of deze bevindingen ook daadwerkelijk kloppen met de mens. Een dergelijk onderzoek, dat van de basale mechanismen direct de vertaling naar de menselijke situatie maakt, wordt 'translationeel onderzoek' genoemd. Translationeel onderzoek zorgt voor een snelle overdracht van kennis van basaal naar klinisch onderzoek.

Meetmethoden

Ondanks het translationele aspect van dit onderzoek, en dat we dus zowel onderzoek hebben verricht met (gezonde) deelnemers en proefdieren, hebben we getracht de gebruikte methoden zoveel mogelijk vergelijkbaar te houden, zodat de vertaling van de resultaten directer zou zijn. De eerste techniek die we hebben toegepast is de hyperinsulinemische euglycemische clamp; met deze techniek verhogen we de insuline-spiegel in het bloed, om zo de glucose-opname te stimuleren. De mate van glucose-opname meten we af aan de hoeveelheid glucose die we moeten toedienen om de glucose-concentratie in het bloed gelijk te houden. Hoe meer glucose we moeten toedienen, hoe insuline-gevoeliger de deelnemer is. Een ander effect van de insuline is –zoals hierboven uitgelegd– vaatverwijding in de microcirculatie, leidend tot een toegenomen microvasculair bloedvolume. Hoe groot het effect van de insuline op de microcirculatie is, hebben we gemeten door middel van contrast versterkte echografie (CEU). Door middel van deze techniek kunnen we het relatieve bloedvolume in de microcirculatie van de skeletspier meten. Hoe groter de toename, hoe groter de microvasculaire insuline-gevoeligheid. Deze technieken hebben we zowel bij onze deelnemers als bij proefdieren toegepast. Om de microvasculaire insuline-gevoeligheid aan perivasculair vet te kunnen relateren, hebben we een stukje spierweefsel afgenomen uit het bovenbeen van onze deelnemers, dit is vervolgens onder de microscoop bekeken, om zo de hoeveelheid perivasculair vet te bepalen. Uit dit stukje weefsel hebben we ook een aantal kleine bloedvaatjes geïsoleerd samen met het vet er omheen, deze hebben we opgehangen in een drukmyograaf, waarin we de vaatverwijding in aan- en afwezigheid van perivasculair vet konden bestuderen. Dit laatste hebben we tevens toegepast bij de muizen. Dit

zijn de voornaamste technieken geweest waarmee we tot de volgende bevindingen zijn gekomen.

Resultaten

In **hoofdstuk 2** hebben we allereerst een uitgebreide inleiding gegeven over de basisprincipes waarop dit proefschrift berust. Verder wordt uitgelegd hoe we tot onze onderzoeksvragen zijn gekomen.

Vervolgens hebben we in **hoofdstuk 3a** aangetoond dat de microvasculaire insuline-gevoeligheid direct gerelateerd is aan de insuline-gestimuleerde glucose-opname. Dit bleek te gelden voor zowel de microvasculaire insuline-gevoeligheid in skeletspier en in de huid. Door de CEU meting van het microvasculaire bloedvolume vóór en ná de clamp uit te voeren, hebben we de microvasculaire insuline-gevoeligheid in de skeletspier kunnen meten. Contrast versterkte echografie is niet geschikt om de microcirculatie van de huid te bestuderen, hiervoor hebben we een langer gebruikte techniek toegepast, de capillairmicroscopie. Ook deze techniek hebben we vóór en ná de clamp uitgevoerd. De volgorde van de metingen hebben we willekeurig uitgevoerd zodat dit geen invloed zou hebben op de uitkomst. De mate van microvasculaire insuline-gevoeligheid in de skeletspier en huid, zoals gemeten met deze twee methoden, was niet alleen met de metabole insuline-gevoeligheid gerelateerd, maar de twee microvasculaire meetmethoden bleken ook met elkaar gerelateerd. Deze bevindingen bevestigen eerdere observaties dat een toename in microvasculaire perfusie bijdraagt aan glucose-opname door een toegenomen transport naar de weefsels.

Microvasculaire perfusie is niet enkel van belang voor glucose-transport, maar is ook een belangrijke regulator van de bloeddruk. In **hoofdstuk 3b** hebben we bestudeerd of de microvasculaire perfusie, zoals gemeten door middel van CEU, inderdaad gerelateerd is aan de bloeddruk van de deelnemers, omdat deze techniek daar nog nooit voor gebruikt was. Hiervoor is dezelfde groep mensen geanalyseerd als in hoofdstuk 3a. Inderdaad bleek de microvasculaire perfusie, zoals gemeten met CEU negatief gerelateerd te zijn aan de bloeddruk; zowel de systolische, diastolische en gemiddelde bloeddruk.

Hoofdstuk 4 beschrijft hoe perivasculair vet (PVAT) insuline-geïnduceerde vaatverwijding in arteriolen beïnvloedt. Hiervoor hebben we arteriolen en PVAT geïsoleerd uit de achterpoot van muizen, en de insuline-geïnduceerde verandering in diameter in aan- en afwezigheid van PVAT bestudeerd. Dit is gecombineerd met meerdere farmacologische interventies, waarmee we verschillende stoffen remmen of nabootsen. Hierdoor hebben we gevonden dat PVAT van slanke muizen insuline-geïnduceerde vaatverwijding stimuleert, terwijl PVAT van obese muizen dit niet doet. Dit komt doordat het PVAT van slanke muizen meer adiponectine uitscheidt. Adiponectine vergemakkelijkt –via activatie van andere eiwitten zoals 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)- de productie van de vaatverwijdende stof stikstofdioxide (NO). Op die manier zorgt adiponectine dus voor meer vaatverwijding. Een andere belangrijke bevinding is dat het afwezige vaatverwijdende effect van obese PVAT hersteld kan worden door de remming van ontsteking.

Om de bevinding dat het eiwit AMPK een belangrijke intermediair vormt in de communicatie tussen PVAT en de vaatwand verder uit te zoeken, hebben we in **hoofdstuk 5** de rol van dat eiwit in insuline-geïnduceerde vaatverwijding verder onderzocht. We hebben dit gedaan door middel van CEU en drukmyografie. 5' AMP-activated protein kinase wordt geactiveerd door adiponectine, wat door PVAT wordt geproduceerd, en door AICAR, een farmacologisch middel. Uit deze resultaten bleek dat AMPK-activatie niet enkel zorgt voor stimulatie van NO-productie door insuline, maar ook vaatvernauwing remt door inhibitie van ERK1/2. Zowel farmacologische, als genetische remming van AMPK leidde tot verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid en dientengevolge ook verminderde metabole insuline-gevoeligheid.

Een andere belangrijke bevinding in hoofdstuk 4 was dat het vaatverwijdende effect van obese PVAT was te herstellen door de remming van ontsteking. Meer specifiek deden we dit door middel van remming van het eiwit c-Jun N-terminaal Kinase (JNK). **Hoofdstuk 6** onderzoekt verder of met name de remming van JNK in het PVAT van belang is, of de remming in het endotheel. Om dit te onderzoeken hebben we eerst muizen op een vetrijk dieet gezet. Na twee weken vet

eten hebben muizen verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid, zoals gemeten door middel met CEU. In de drukmyograaf bleek dat zowel de eigenschappen van het PVAT, als van het endotheel veranderd zijn door deze dieetinterventie. Vaatjes van slanke muizen werden namelijk niet meer wijder na toediening van insuline, in aanwezigheid van PVAT van dikke muizen. Andersom werden vaatjes van de muizen die het vetrijke dieet hadden gekregen ook niet wijder onder invloed van insuline, in aanwezigheid van slank PVAT. Vaatjes van slanke muizen werden wel gewoon wijder in aanwezigheid van PVAT van slanke muizen. Inderdaad reageren de vaatjes van muizen die het vetrijke dieet hadden gekregen ook niet meer onder invloed van insuline in aanwezigheid van adiponectine. Het voorkomen van infiltratie van JNK2-positieve cellen in PVAT en de vaten leidt wel tot verbetering van de eigenschappen van het PVAT, maar de vaten verwijden nog steeds niet onder invloed van insuline. Dit wijst er op dat deze JNK2-positieve cellen een belangrijke rol spelen in het verminderde effect van PVAT op de microvasculaire insuline-gevoeligheid.

Uiteindelijk hebben we in **hoofdstuk 7** de bijdrage van PVAT aan de microvasculaire insuline-gevoeligheid in-vivo onderzocht in gezonde slanke en obese vrouwen. In dit hoofdstuk worden eerdere bevindingen, dat obese vrouwen een verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid hebben, bevestigd. Het bleek dat de verminderde metabole insuline-gevoeligheid in ieder geval statistisch gedeeltelijk gemedieerd wordt door de verminderde microvasculaire insuline-gevoeligheid. De doorsnede van de vetcellen van het PVAT is groter in obese vrouwen, vergeleken met slanke vrouwen. Deze toename in doorsnede verklaart deels de afgenomen microvasculaire insuline-gevoeligheid. Het PVAT werd ook in de drukmyograaf bestudeerd, ook hier zorgde PVAT van slanke deelneemsters voor insuline-geïnduceerde vaatverwijding, het PVAT van obese deelneemsters leidde zelfs tot insuline-geïnduceerde vaatvernauwing. Deze bevindingen lagen grotendeels in lijn met de bevindingen in de muizen.

Conclusie

Concluderend hebben we gevonden dat slank PVAT de microvasculaire insuline-gevoeligheid stimuleert, zowel in het lichaam, als in een proefopstelling, en dat dit effect is afgenomen in obesitas. De verandering van het effect van PVAT op de microvasculaire insuline-gevoeligheid wordt gemedieerd door afname van de adiponectine productie, wat komt door infiltratie van ontstekingscellen in het PVAT. De resultaten in dit proefschrift tonen aan dat PVAT een interessant nieuw vetdepot is met belangrijke effecten op microvasculaire functie. Er zal echter nog meer onderzoek nodig zijn voordat PVAT een behandeldoel in de klinische praktijk zal kunnen zijn.