

FATTY ACID OXIDATION AND INSULIN
IN THE CONTROL OF FOOD INTAKE

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

DENISE M. SURINA-BAUMGARTNER
B.S. Psychobiology (UCLA)
M.S. Nutritional Sciences (Univ. of AZ)
born July 12, 1963, citizen of U.S.A.



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. W. Langhans, examiner
Prof. Dr. C. Wenk, co-examiner
Prof. Dr. N. Geary, co-examiner

Zurich 1995

1 SUMMARY

Regulation of food intake by body fat has been hypothesized to depend on postabsorptive blood-borne factors that reflect adiposity and modulate the satiety signals arising during and after meals. One candidate signal is fatty acid oxidation, with rate of oxidation influenced by circulating fatty acids. Whether the nutrient composition of a single meal affects overall metabolite oxidation and specifically hepatic fatty acid oxidation is unclear. The first and second study presented here addressed this question in humans and rats. Another candidate signal for food intake control by body fat is insulin, the basal plasma levels of which are directly proportional to degree of adiposity. The third study presented here tested the hypothesis that circulating insulin may contribute to meal termination.

In the first study (Section 4), the influence of macronutrient content of a meal on postprandial fatty acid oxidation was investigated in 13 Caucasian males after consumption of a high-fat (HF) breakfast (with 33, 52, and 15% of the metabolizable energy derived from carbohydrate, fat, and protein, respectively) and after an equienergetic high-carbohydrate (HC) breakfast (with 78, 6, and 16% of the metabolizable energy derived from carbohydrate, fat, and protein, respectively). Respiratory quotient (RQ) and plasma β -hydroxybutyrate (BHB) were measured during the 3 h after the meal as indicators of whole body substrate oxidation and hepatic fatty acid oxidation, respectively. Plasma levels of free fatty acids (FFA), triglycerides, glucose, insulin, and lactate were also determined. RQ was significantly lower after the HF breakfast than after the HC breakfast, implying that more fat is oxidized in general after an HF meal. Moreover, plasma BHB was significantly increased after the HF breakfast, implying that fat is oxidized specifically in the liver after an HF meal. As expected, plasma FFA and triglycerides were higher after the HF meal, and insulin and lactate were higher after the HC meal.

In the second study (Section 5), to investigate meal-induced changes in fat and carbohydrate metabolism more specifically in the liver, hepatic venous, portal venous and aortal plasma levels of several metabolites as well as changes in hepatic glycogen and lactate content were measured during and after the first meal following a 12 h fast in rats fed an HF diet (18% w/w fat; with 41, 46, and 13% of the metabolizable energy derived from carbohydrate, fat, and protein, respectively). In response to the meal, plasma triglyceride level increased in all blood vessels. After a transient initial decrease, portal venous and aortal FFA levels, net hepatic FFA uptake, and hepatic BHB production increased towards meal end and reached fasting (meal onset) values by 30 min after the meal. Although liver glycogen did not change significantly, the liver released glucose continuously. The liver initially accumulated lactate and maintained this high lactate concentration despite a net release of lactate around 10 min into the meal. Taken together, these data indicate that hepatic glycolysis, gluconeogenesis, and considerable fatty acid oxidation occur concurrently in rat liver in response to a HF meal.

In the third study (Section 6), to investigate the acute effects of pancreatic insulin on spontaneous feeding in *ad libitum* fed rats, insulin or insulin antibodies were infused into the hepatic portal vein during the first meal of either the light phase or dark phase. Infusions (3 min, 0.033 ml/min) were remotely controlled, and a computerized system recorded meal patterns. Effects of 1, 2, 4, 8, and 16 mU insulin/meal were assessed in separate crossover tests. No insulin dose affected diurnal meal size, meal duration, or subsequent intermeal interval (p 's > 0.10). Nocturnal meal patterns were similarly unaffected, except that 2 mU insulin/meal did decrease nocturnal meal duration (19%, $p < 0.05$). In contrast, antagonism of endogenous insulin by infusions of polyclonal antibodies to human insulin with *in vitro* rat insulin binding capacity of 20 or 50 mU during the first nocturnal spontaneous meal increased meal size by 24% and 29% (p 's < 0.05), respectively. Meal duration, however, was reliably increased only by the smaller antibody dose. Subsequent intermeal interval was affected by neither antibody dose.

Considering that basal and prandial insulin and fatty acid levels correspond directly to adiposity, these studies have two implications for the hypothetical control of food intake by a signal related to adiposity. First, whole body and hepatic fatty acid oxidation continue or even increase following a fat-rich meal. This makes plausible the hypothesis that fatty acid oxidation contributes to the maintenance of satiety in the interval following the meal. Second, antagonism of endogenous prandial insulin affects meal size, indicating that insulin contributes to the control of meal termination. Exogenous insulin may have failed to decrease meal size under our conditions due to a ceiling effect, possibly indicating that insulin has only a permissive effect on short-term food intake control. All in all, insulin and fatty acid oxidation could act in concert by affecting meal size and intermeal interval, respectively, and contribute to the regulation of food intake.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Es wird angenommen, dass die Körperfettmasse die Nahrungsaufnahme über postabsorptive humorale Faktoren beeinflusst, deren Plasmakonzentration die Grösse der Fettdepots eines Individuums widerspiegelt und welche die während und nach einer Mahlzeit aktivierten Sättigungssignale modulieren. Ein mögliches Signal ist die Fettsäurenoxidation, deren Rate im allgemeinen proportional zur Plasmakonzentration der freien Fettsäuren ist. Ob dabei die Nährstoffzusammensetzung einer einzelnen Mahlzeit die Oxidation von Metaboliten generell und insbesondere die Fettsäurenoxidation in der Leber beeinflusst, ist noch unklar. Die ersten beiden hier beschriebenen Studien am Menschen und an der Ratte beschäftigen sich mit dieser Fragestellung. Ein weiteres mögliches Signal für die Regulation der Nahrungsaufnahme durch die Körperfettmasse ist Insulin, dessen Basalkonzentration im Blut direkt proportional zum Grad der Fettleibigkeit ist. Die dritte in dieser Arbeit beschriebene Studie überprüft die Hypothese, dass im Blut zirkulierendes Insulin zur Beendigung einer Mahlzeit beiträgt.

In der ersten Studie (Abschnitt 4) wurde an 13 Männern untersucht, ob die Fettsäurenoxidation nach der Aufnahme eines fettreichen (HF) Frühstücks (33, 52 und 15% der umsetzbaren Energie von Kohlenhydraten, Fett und Protein) oder eines kohlenhydratreichen (HC) Frühstücks (78, 6 und 16% der umsetzbaren Energie von Kohlenhydraten, Fett und Protein) mit gleichem Energiegehalt unterschiedlich ist. Der respiratorische Quotient (RQ) und der Plasmaspiegel von β -Hydroxybutyrat (BHB) wurden während drei Stunden nach der Mahlzeit als Indikatoren für die generelle bzw. hepatische Fettsäurenoxidation gemessen. Die Plasmaspiegel von freien Fettsäuren (FFA), Triglyzeriden, Glucose, Insulin und Lactat wurden ebenfalls bestimmt. Der RQ war nach dem HF-Frühstück signifikant niedriger als nach dem HC-Frühstück, was darauf schliessen lässt, dass nach dem HF-Frühstück generell mehr Fett oxidiert wurde. Ferner war die Plasmakonzentration von BHB nach dem HF-Frühstück signifikant erhöht, was bedeutet, dass Fettsäuren nach der HF-Mahlzeit speziell

in der Leber oxidiert wurden. Wie erwartet waren die Plasmaspiegel von FFA und Triglyzeriden nach der HF-Mahlzeit höher, die von Insulin und Lactat hingegen niedriger als nach dem HC-Frühstück.

In der zweiten Studie (Abschnitt 5) wurden mahlzeitinduzierte Veränderungen des hepatischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels bei Ratten untersucht, die an eine Fett-reichen Diät (18% w/w Fett; mit 41, 46, and 13% der umsetzbaren Energie von Kohlenhydraten, Fett und Protein) adaptiert waren. Die Plasmakonzentrationen verschiedener Metabolite in Pfortader, Vena hepatica und Aorta sowie der Glykogen- und Lactatgehalt der Leber wurden während und nach der Aufnahme der ersten Mahlzeit nach einem 12-stündigen Futterentzug gemessen. Als Reaktion auf die Mahlzeit stieg die Plasmakonzentration der Triglyzeride in allen Blutgefäßen. Nach einer vorübergehenden initialen Abnahme stiegen auch die Plasmakonzentration der FFA in Pfortader und Aorta an. Auch die hepatische Aufnahme von FFA, berechnet als Differenz des FFA Zuflussend und Abflusses, und die Bildung von BHB gegen Ende der Mahlzeit nahm zu und erreichte 30 min nach der Mahlzeit ähnlich hohe Werte wie am Mahlzeitenbeginn. Obwohl sich die Leberglykogenkonzentration nicht signifikant veränderte, setzte die Leber kontinuierlich Glucose frei. Die Leber akkumulierte initial Lactat und die Lactatkonzentration blieb auch hoch, obwohl ab etwa 10 min nach Mahlzeitbeginn Lactat freigesetzt wurde. Diese Resultate sprechen dafür, dass als Antwort auf eine fettreiche Mahlzeit in der Rattenleber gleichzeitig Glycolyse und Gluconeogenese auftreten sowie Fettsäuren in erheblichem Umfang oxidiert werden.

In der dritten Studie (Abschnitt 6) wurden bei *ad libitum* gefütterten Ratten während der ersten spontanen Mahlzeit in der Hell- oder Dunkelphase Insulin oder Insulin-Antikörper in die Pfortader infundiert, um die akuten Effekte von Insulin auf die spontane Nahrungsaufnahme zu untersuchen. Die Infusionen (3 min, 0.033 ml/min) erfolgten ferngesteuert und ein computerunterstütztes System zeichnete das Mahlzeitenmuster auf. Die Effekte von 1, 2, 4, 8 und 16

mU Insulin pro Mahlzeit wurden in separaten Cross-Over-Tests bestimmt. Keine der Insulindosen beeinflusste die Mahlzeitengrösse, Mahlzeitdauer oder das darauffolgende Mahlzeitenintervall in der Hellphase (p 's > 0.10). In der Dunkelphase waren die betreffenden Mahlzeitenparameter gleichermassen unverändert, ausser dass die Mahlzeitdauer nach Infusion von 2mU Insulin abnahm (19%, $p < 0.05$). Die Infusion von Insulinantikörpern mit einer *in vitro*-Bindungskapazität von 20 oder 50 mU Insulin bewirkte in der Dunkelphase eine Zunahme der Mahlzeitengrösse um 24% bzw. 29% (p 's < 0.05). Die Mahlzeitdauer wurde zuverlässig nur durch die niedrigere Antikörperdosis erhöht. Das auf die Mahlzeit folgende Mahlzeitenintervall wurde durch die Insulinantikörper nicht beeinflusst.

Berücksichtigt man, dass der basale und prandiale Plasmaspiegel von Insulin sowie die Plasmakonzentration von FFA direkt proportional zur Körperfettmasse sind, lassen sich aus den Ergebnissen zwei Aussagen für die lipostatische Regulation der Nahrungsaufnahme ableiten. Zum einen scheint die Fettsäureoxidation generell und insbesondere in der Leber nach der Aufnahme einer fettreichen Mahlzeit zu. Dies passt zu der Hypothese, dass die Oxidation von Fettsäuren zur Aufrechterhaltung der Sättigung nach einer Mahlzeit beiträgt. Zum anderen verzögert die partielle Elimination von endogenem Insulin während einer Mahlzeit das Zustandekommen der Sättigung, was dafür spricht, dass Insulin an der Regulation der Mahlzeitgrösse beteiligt ist. Das Ausbleiben eines Effekts von exogenem Insulin auf die Mahlzeitgrösse könnte ein Indiz dafür sein, dass der Sättigungseffekt von endogenem Insulin unter diesen Bedingungen bereits maximal ist. Alles in allem könnten Insulin und FFA, indem sie Mahlzeitgrösse bzw. -frequenz beeinflussen, zur physiologischen Regulation der Nahrungsaufnahme beitragen.