

DISS ETH N.19719

**Regulation of Adipose Tissue in Three Models
of Obesity**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of Doctor of Sciences

presented by

Viktoria Luise Gloy,

M. Sc. Christian-Albrechts-University Kiel

Born December 30, 1981

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Dr. Nori Geary, co-examiner

Prof. Dr. Thomas Lutz, co-examiner

2011

Summary

The present work investigated adipose tissue (AT) mass regulation in three rat models of obesity. The most prevalent view of AT mass regulation posits that endocrine “adiposity signals” such as insulin, leptin, ghrelin and amylin convey information about the level of AT mass to the brain, which adjusts eating and energy expenditure (EE) appropriately if AT mass is increased or decreased. Insulin and leptin are thought to act on neurons in the Arcuate nucleus of the hypothalamus (Arc) to initiate such regulatory responses. These Arc neurons express NPY and α -MSH, which are considered to be crucial signaling molecules in the neural network. Similarly, downstream signaling molecules, including PVN CRH neurons, are thought to be involved.

The first experiments investigated the dynamic compensatory changes in eating and the return to near-normal levels of AT mass following experimentally induced obesity, done here by chronic intragastric (IG) overfeeding. Such compensatory responses provide probably the strongest evidence for active regulation of AT mass. Additional experiments used ovariectomy (OVX) to model the increase in AT mass, in particular intra-abdominal AT (IAAT), associated with the loss of estrogens at menopause. In fact, however, whether OVX increases IAAT in rats has not been measured directly yet. These experiments also included rats with “dietary obesity,” i.e., obesity induced by the availability of palatable, energy-dense foods, which is thought to be the main cause of the present obesity epidemic. Each study involved measurement of AT mass and regional AT distribution by computed tomography (microCT). Such a direct measure of AT has not been applied to these models before.

Despite the strong evidence for dynamic AT regulation in rats recovering from forced overweight, changes in adiposity signals and associated brain mechanisms during such dynamic regulation has not been extensively investigated. Therefore in **study 1** I tested whether basal plasma levels of insulin, leptin, amylin and ghrelin encode information about AT mass during dynamic AT mass regulation. Rats were IG overfed for 23 d, resulting in excess BW and AT mass. When the IG overfeeding regimen was terminated, rats underate for at least 23 d, lost excess AT mass and BW. Basal levels of insulin, leptin and ghrelin, but not of amylin, changed linearly with AT mass during the overfeeding phase, but during the subsequent phase of dynamic AT regulation, none of the hormones accurately reflected AT mass. Plasma levels of insulin returned to control levels on d 1 of recovery and decreased below control levels thereafter. Leptin also decreased disproportionately to AT mass, but was still elevated on d 5 and 8 and was no longer higher than the control level by d 17 of recovery. Neither ghrelin nor amylin changed reliably during recovery. These data indicate

that basal plasma levels of insulin, leptin, ghrelin, and amylin do not provide sufficient information to guide dynamic regulation of AT mass following forced overweight and that changes in them are not necessary for such regulation.

In **study 2** in situ hybridization assays of mRNA were used to test whether hypothalamic levels of NPY, α -MSH or CRH might be involved during dynamic regulation of AT mass. Rats were similarly IG overfed but killed on d 9 of recovery, when they were undereating by ~40% and had ~94 g excess BW and ~75 g excess AT mass. Arc and DMH NPY mRNA and Arc POMC mRNA were not significantly changed. In contrast PVN CRH mRNA was significantly increased. Plasma corticosterone on d 9 was not significantly different between groups, indicating that the increase in CRH mRNA was neurocrine rather than neuroendocrine. Insulin and leptin levels were consistent with Study 1. These data indicate that compensatory undereating and AT mass loss is not mediated by down-regulation of Arc or DMH NPY or upregulation of Arc α -MSH, but that upregulation of PVN CRH mRNA might be involved.

In **study 3** OVX and sham-operated rats were fed normal chow or chow plus Ensure (Abbott) liquid diet and treated with subcutaneous injections of 2 ug estradiol benzoate / 4 d or the oil vehicle for 41 d. MicroCT indicated that OVX led to increased SAT, but little or no increase in IAAT. Chemical carcass analysis in chow-fed rats revealed the OVX increased fat mass by ~24 g, of which ~10 g was outside the AT, and increased fat-free mass ~33 g. Ensure feeding markedly increased BW (~65 g) and both SAT (~28 g) and IAAT (~23 g); the additional effect of OVX was similar to those in chow-fed rats. Estradiol treatment prevented all the effects of OVX. These data indicate that OVX in rats and human menopause differ in several respects that are likely to affect energy homeostasis: OVX selectively increases SAT rather than IAAT, increase rather than decreases fat-free body mass, and probably increases deposition of fat outside the AT more. Thus, OVX in rats is unlikely to be a homologous model for menopause-related metabolic changes and health risks. In contrast, dietary obesity in female rats parallels the AT profile of common obesity in humans.

These experiments should contribute to a better understanding of the regulation of AT mass, which in the future may be useful in efforts to develop more effective, physiologically based, non-surgical therapies for obesity.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Fettgewebssmasse in drei Modellen für Adipositas untersucht. Gemäss der vorherrschenden Meinung bezüglich der Regulation der Fettgewebssmasse fungieren die basalen Plasmakonzentrationen von verschiedenen Hormonen als Feedbacksignale, welche dem Gehirn Informationen über die Masse des Fettgewebes liefern („Adipositassignale“). Wenn diese Signale eine Veränderung der Fettgewebssmasse anzeigen, steuert das Gehirn die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch adäquat. Es werden hauptsächlich Insulin und Leptin, aber auch Amylin und Ghrelin als Adipositassignale vorgeschlagen. Dabei wird angenommen, dass Insulin und Leptin auf Neurone des Nucleus arcuatus (Arc) im Hypothalamus wirken, welche Neuropeptid Y (NPY) und α -Melanozyten-stimulierendes-Hormon (α -MSH) produzieren. NPY und α -MSH gelten als wichtige Signalmoleküle im neuronalen Netzwerk der Steuerung von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch. Ausserdem ist eine Reihe von nachgeschalteten Signalmolekülen involviert; dazu gehört das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), welches im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) gebildet wird.

Die ersten Experimente untersuchten die dynamische Regulation der Fettgewebssmasse und Kompensationen in der Nahrungsaufnahme bei Ratten, die chronisch intraagastral überfüttert wurden, um sie übergewichtig zu machen. Solche kompensatorischen Reaktionen liefern wohl den stärksten Hinweis auf eine aktive Regulation des Fettgewebes. Zusätzlich wurden Experimente an Ratten nach Ovariectomie (OVX) durchgeführt, welche als Modell für die Zunahme der Fettgewebssmasse nach der Menopause gelten. Ausserdem wurde noch eine Gruppe von intakten und OVX-Ratten in die Studie aufgenommen, denen zusätzlich zu ihrem normalen Futter als Modell für eine diätinduzierte Adipositas eine schmackhafte, energiedichte Nahrung angeboten wurde. Jede Studie nutzte die Messung der Fettgewebssmasse und der Fettgewebsverteilung mittels Computertomographie (CT) für Nager, was bisher in diesem Zusammenhang noch nie gemacht wurde.

Trotz der starken Hinweise für eine dynamische Regulation der Körperfettmasse als Reaktion auf experimentell induziertes Übergewicht, gibt es kaum Informationen über Veränderungen von Adipositassignalen oder deren nachgeschalteten Mechanismen im Gehirn in dieser Situation. Aus diesem Grund wurde in **Studie 1** getestet, ob basale Plasmakonzentrationen von Insulin, Leptin, Amylin und Ghrelin während dieser dynamischen Regulation als Informationsträger bezüglich der Masse des Fettgewebes fungieren. Die Ratten wurden dazu für 23 Tage intraagastral überfüttert, so dass sie ~130 g

Körpergewicht und ~100 g Fettgewebssmasse mehr zunahmen als Kontrolltiere. Nach dem Ende der Überfütterung frassen die Ratten für mehr als 23 Tage deutlich weniger als die Kontrollen und verloren Körpergewicht und Fettgewebssmasse. Während der Überfütterung veränderten sich die basalen Plasmakonzentrationen von Insulin, Leptin und Ghrelin, aber nicht Amylin, linear mit der Fettgewebssmasse. Während der folgenden Phase der dynamischen Regulation des Fettgewebes reflektierte keines dieser Hormone die Fettgewebssmasse akkurat. Die Plasmakonzentrationen von Insulin unterschieden sich bereits am Tag 1 nicht mehr von denen der Kontrollgruppe und sanken im weiteren Verlauf unter die Kontrollwerte. Leptin sank ebenfalls disproportional im Vergleich zur Fettgewebssmasse, war jedoch am Tag 5 und 8 noch erhöht, aber nicht danach. Weder Ghrelin noch Amylin veränderten sich während dieser Phase. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass basale Plasmakonzentrationen von Insulin, Leptin, Ghrelin oder Amylin nicht genügend Informationen für die dynamische Regulation der Fettgewebssmasse nach experimentell induziertem Übergewicht liefern und dass Veränderungen der basalen Plasmaspiegel für diese Regulation damit nicht notwendig sind

In **Studie 2** wurde in situ-Hybridisierung für mRNA eingesetzt um zu testen, ob NPY, α -MSH oder CRH in die dynamische Regulation der Fettgewebssmasse involviert ist. Dafür wurden Ratten ähnlich wie in Studie 1 überfüttert, aber am Tag 9 der Kompensation getötet. An diesem Tag war die Futterraufnahme um 40% reduziert, die Tiere hatten aber immer noch ein gegenüber der Kontrollgruppe um ~94 g erhöhtes Körpergewicht und ~75 g mehr Fettmasse. Die mRNA Konzentrationen von NPY sowie diejenige von Pro-opiomelanocortin (POMC, Vorläuferpeptid von α -MSH) im Arc waren nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu war die mRNA von CRH im PVN erhöht. Plasmakonzentrationen von Corticosteron am Tag 9 wiesen keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Ergebnisse bezüglich der Plasmakonzentrationen von Insulin und Leptin waren konsistent zu Studie 1. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die kompensatorische Hypophagie im Rahmen der dynamischen Regulation der Fettgewebssmasse nicht durch eine Abnahme von NPY im Arc oder DMH oder eine Erhöhung von POMC vermittelt wird. Hingegen könnte die Erhöhung der mRNA Konzentrationen von CRH im PVN beteiligt sein.

In **Studie 3** wurde getestet, ob OVX bei Ratten zur Bildung von mehr intraabdominalem Fettgewebe führt, ähnlich wie das für die Menopause angenommen wird. Dazu wurden weibliche Ratten ovariektomiert und anschliessend mit Östradiol (2 μ g alle 4 Tage) oder dem Öl (Träger) behandelt. Weitere weibliche Ratten wurden schein-operiert und erhielten entweder nur Standardfutter oder zusätzlich Ensure® (Abbott) ad libitum für 41 Tage. Die MicroCT zeigte, dass OVX-Ratten mehr subkutanes Fettgewebe (12 g), aber nur wenig

intraabdominales Fettgewebe zunehmen. Eine chemische Analyse der Körperzusammensetzung zeigte, dass OVX bei Ratten mit Standardfutter zu einer Zunahme der Fettmasse um 24 g führte, wovon 10 g ausserhalb des Fettgewebes waren. Die fettfreie Masse nahm um 33 g zu. Die Zufütterung von Ensure® führte zu einer deutlichen Zunahme der Körpermasse (≈65 g) sowie der subkutanen (≈28 g) und intraabdominalen Fettgewebsmasse (≈23 g). Die zusätzlichen Effekte der OVX waren ähnlich denen bei Standardfütterung. Die Behandlung mit Östradiol verhinderte alle OVX-Effekte. Diese Ergebnisse zeigen, dass OVX bei Ratten und die Menopause bei Menschen sich in verschiedenen Punkten unterscheiden, die vermutlich für die Energiehomöostase von Bedeutung sind: OVX bei Ratten führte zu einer selektiven Zunahme des subkutanen Fettgewebes und erhöhte die fettfreie Körpermasse und wahrscheinlich auch die Anlagerung von Fett ausserhalb des Fettgewebes. Hingegen geht man davon aus, dass die Menopause bei Frauen insbesondere das intraabdominale Fettgewebe vermehrt. Ausserdem kommt es nach der Menopause eher zu einem Abbau fettfreier Körpermasse. Deshalb ist OVX bei Ratten wahrscheinlich kein homologes Modell für die metabolischen und gesundheitsrelevanten Effekte der Menopause bei Frauen, was bei entsprechenden Untersuchungen berücksichtigt werden sollte. Im Gegensatz dazu gibt es durchaus Parallelen zwischen der diät-induzierten Adipositas bei weiblichen Ratten und Menschen.

Diese Experimente sollten dazu beitragen, die Physiologie der Regulation der Fettgewebsmasse zu verstehen. Dieses könnte genutzt werden um effizientere, auf Physiologie basierende Therapien für die Adipositas zu entwickeln.