

Diss. ETH No. 17697

Hepatic Fatty Acid Oxidation and Control of Food Intake

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

Abdelhak Mansouri

M.Sc. (Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Greece)

Born on April 21st, 1975, Algeria

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Dr. Nori Geary, co-examiner

Dr. Monika Leonhardt, co-examiner

Zurich 2008

1. Summary

This thesis addresses the role of fat metabolism, and in particular fatty acid oxidation (FAO), in the control of food intake. The hypothesis that hepatic FAO controls eating was originally based on studies showing that peripherally administered inhibitors of FAO, such as mercaptoacetate (MA) or methylpalmoxyrate, stimulate feeding in laboratory animals and humans. More recently it was also shown that C75, an inhibitor of fatty acid synthesis, inhibits feeding. Despite intensive efforts, however, the exact mechanism and origin of MA's stimulatory effect on feeding is still unclear. Likewise, it is unknown whether intraperitoneally (IP) injected C75 acts peripherally or centrally to inhibit feeding, and whether this effect is behaviorally specific. This thesis examined these questions.

In the first study, rats were fed a medium-chain or long-chain triacylglycerol rich-diet (MCT or LCT diet, 18 % fat). Because medium-chain fatty acids (MCFA) reach the liver and are oxidized faster than long-chain fatty acids (LCFA), IP MA should stimulate feeding more potently in MCT-fed rats than in LCT-fed rats, if MA's feeding-stimulatory effect depends on inhibition of hepatic FAO. In contrast to our hypothesis, however, MA injected in the middle of the light phase stimulated feeding similarly in both MCT- and LCT-fed rats. Moreover, at light onset MA stimulated 1h feeding only in LCT-fed rats but not in MCT-fed rats. MA increased serum β -hydroxybutyrate (BHB) levels at 30 min after injection more in MCT- than LCT-fed rats and did not affect the fatty acid profile of hepatic or duodenal mitochondria. However, 3 h after injection, MA induced an accumulation of mitochondrial fatty acid content in the duodenum but not in the liver in 12 h-fasted rats. These findings indicate that MA's feeding-stimulatory effect does not

depend on hepatic FAO inhibition. The accumulation of fatty acids in duodenal mitochondria suggests that inhibition of duodenal mitochondrial FAO may be involved in MA's stimulatory effect on feeding.

In the second study, MA was infused either into the hepatic portal vein (HPV), the inferior vena cava (VC) or into the descending aorta near the beginning of the celiac artery (NCA). The comparison of MA's effectiveness to stimulate feeding after HPV vs. VC infusions aimed at identifying the liver as the origin of MA's feeding-stimulatory effect, whereas the NCA vs. HPV infusions examined the possible role of the gastrointestinal tract. MA stimulated food intake from about 1 to 3 h after HPV or VC infusions, whereas NCA MA infusion did not affect feeding. These results are inconsistent with a hepatic site of action of MA and also failed to identify the intestine as a possible origin of MA's feeding-stimulatory effect, but they show for the first time that MA can stimulate feeding after intravenous infusion in rats.

In the third study, we investigated the behavioral specificity of the feeding-inhibitory effect of IP C75 by recording meal patterns and performing a two-bottle conditioned taste aversion test (CTA) with hypophagic doses of C75. Also, we examined whether the feeding-inhibitory effect of IP C75 requires intact abdominal vagal afferents by comparing the effects of IP C75 on eating in rats with total subdiaphragmatic vagotomy (TVX) or in rats with subdiaphragmatic vagal deafferentations (SDA) and in the corresponding sham-operated control rats. The main outcomes were that low C75 doses injected IP reduced food intake primarily by reducing meal frequency and in the absence of a CTA, and that neither TVX nor SDA attenuated the feeding-inhibitory effect of IP C75. C75 in fact appeared to reduce food intake more potently in TVX and SDA

rats than in the corresponding sham rats. These data indicate that the feeding-inhibitory effect of low C75 doses injected IP is not due to CTA and does not require intact abdominal vagal afferents, suggesting that peripherally administered C75 acts in the brain to inhibit feeding.

In summary, these findings do not support a role of the liver and/or of changes in hepatic FAO in either the feeding-stimulatory effect of IP or intravenously infused MA nor in the feeding-inhibitory effect of IP C75. The findings failed to reveal a site of action for either compound, although some of the results, together with the available evidence from the literature, suggest that MA may act in the intestine to stimulate feeding, whereas C75 most likely inhibits feeding by acting directly in the brain. All in all, these findings indicate that changes in hepatic FAO are not crucial for the effects of MA and C75 on feeding.

2. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Bedeutung des Fettstoffwechsels, insbesondere der Fettsäureoxidation (FAO), bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Die Hypothese, dass die hepatische FAO die Nahrungsaufnahme reguliert, beruht ursprünglich auf Studien, die zeigten, dass die periphere Verabreichung von FAO-Inhibitoren wie Merkaptoacetat (MA) oder Methylpalmoxyrat die Nahrungsaufnahme von Labortieren aber auch von Menschen stimuliert. Vor einiger Zeit konnte ferner gezeigt werden, dass C75, ein Hemmstoff der Fettsäuresynthese, die Nahrungsaufnahme inhibiert. Trotz intensiver Anstrengungen sind der Ursprung und der genaue Mechanismus des verzehrsstimulierenden Effekts von MA noch unklar. Ebenfalls unbekannt ist, ob intraperitoneal (IP) verabreichtes C75 über periphere oder zentrale Mechanismen die Nahrungsaufnahme reduziert und ob dieser Effekt verhaltensspezifisch ist. Die vorliegende Dissertation untersuchte diese Fragen.

In der ersten Studie wurden Ratten mit einer Diät (18% Fettgehalt) gefüttert, die entweder reich an mittelkettigen (MCT) oder langkettigen Triglyceriden (LCT) war. Mittelkettige Fettsäuren aus der Nahrung werden schneller in der Leber oxidiert als langkettige Fettsäuren. Falls die Stimulierung der Nahrungsaufnahme durch MA auf einer Hemmung der hepatischen FAO beruht, sollte IP verabreichtes MA die Nahrungsaufnahme bei MCT-gefütterten Ratten stärker stimulieren als bei LCT-gefütterten Ratten. Konträr zu unserer Hypothese stimulierte MA, wenn es in der Mitte der Hellphase verabreicht wurde, die Nahrungsaufnahme jedoch bei MCT- und LCT-gefütterten Ratten gleichermassen. Des Weiteren stimulierte MA, wenn es am Beginn der

Hellphase verabreicht wurde, die Nahrungsaufnahme über eine Stunde nur bei LCT-gefütterten, nicht aber bei MCT-gefütterten Ratten. Dreissig min nach MA-Injektion war der Serumspiegel von β -Hydroxybutyrat (BHB) bei MCT-gefütterten Ratten stärker erhöht als bei LCT-gefütterten Ratten. Ferner hatte MA keinen Einfluss auf das Fettsäurenprofil in den Mitochondrien der Leber oder des Duodenums. Wurde MA jedoch bei Ratten nach einem 12-stündigen Futterentzug verabreicht, war drei Stunden nach der Injektion der Fettsäuregehalt in den duodenalen Mitochondrien, nicht aber in den hepatischen Mitochondrien, erhöht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die durch MA verursachte Stimulation der Nahrungsaufnahme nicht von der Hemmung der hepatischen FAO abhängt. Die Akkumulierung von Fettsäuren in den Mitochondrien des Duodenums deutet darauf hin, dass die Hemmung der FAO in den duodenalen Mitochondrien möglicherweise für die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch MA von Bedeutung ist.

In der zweiten Studie wurde MA entweder in die hepatische Pfortader (HPV), die Vena cava inferior (VC) oder in die absteigende Aorta in der Nähe des Beginns der Arteria Coeliaca (NCA) infundiert. Der Vergleich der Wirksamkeit von MA die Nahrungsaufnahme nach HPV oder VC-Infusion zu stimulieren hatte das Ziel, die Leber als Ursprung der verzehrssteigernden Wirkung von MA zu identifizieren. Die NCA-gegenüber HPV-Infusion von MA untersuchte hingegen die mögliche Bedeutung des Verdauungstraktes in diesem Zusammenhang. MA stimulierte die Nahrungsaufnahme von ein bis drei Stunden nach HPV aber auch nach VC Infusion, während die NCA MA Infusion keine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme hatte. Diese Ergebnisse sind nicht mit der Idee vereinbar, dass die Leber der Ursprung des verzehrssteigernden Effekts von MA ist. Der diesbezügliche Wirkort konnte nicht identifiziert werden. Diese Versuche zeigen

jedoch erstmals, dass MA auch dann die Nahrungsaufnahme stimuliert, wenn es intravenös infundiert wird.

In der dritten Studie untersuchten wir zunächst, ob der verzehrsreduzierende Effekt von C75 verhaltensspezifisch ist. Hierzu wurde das Mahlzeitenmuster nach IP C75 erfasst und ein 2-Flaschen-Test zur Feststellung einer erlernten Geschmacksaversion durchgeführt. Ferner untersuchten wir, ob die Hemmung der Nahrungsaufnahme nach IP C75 von intakten abdominalen vagalen Afferenzen abhängig ist. Hierzu wurde der Effekt von IP C75 auf die Nahrungsaufnahme bei Ratten nach vollständiger subdiaphragmatischer Vagotomie (TVX), nach subdiaphragmatischer vagaler Deafferentation (SDA) und bei entsprechenden scheinoperierten Ratten getestet. Die wichtigsten Ergebnisse waren wie folgt: Niedrige C75 Dosen reduzierten nach IP Verabreichung die Nahrungsaufnahme primär über eine Verminderung der Mahlzeitenfrequenz und induzierten keine Geschmacksaversion. Weder TVX noch SDA schwächten den Effekt von IP C75 auf die Nahrungsaufnahme ab. Tatsächlich scheint C75 die Nahrungsaufnahme bei TVX und SDA Ratten sogar wirksamer zu reduzieren als bei den korrespondierenden Kontrollratten. Diese Daten deuten darauf hin, dass die reduzierte Nahrungsaufnahme nach niedrigen IP C75 Dosen nicht auf einer Geschmacksaversion beruht und dass für diesen Effekt keine intakten abdominalen vagalen Afferenzen benötigt werden. Wahrscheinlich wirkt peripher verabreichtes C75 direkt im Gehirn, um die Nahrungsaufnahme zu reduzieren.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Leber und/oder eine Veränderung der hepatischen FAO weder bei der durch MA induzierten Steigerung noch bei der nach IP C75-Applikation auftretenden Hemmung der Nahrungsaufnahme von

entscheidender Bedeutung ist. Die vorliegenden Ergebnisse konnten den Ursprung der Wirkung beider Substanzen nicht eindeutig identifizieren. Jedoch deuten einige Ergebnisse, zusammen mit den verfügbaren Hinweisen aus der Literatur, darauf hin, dass MA auf den Darm wirkt, um die Nahrungsaufnahme zu stimulieren, während C75 wahrscheinlich direkt im Gehirn wirkt. Insgesamt deuten alle vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass Veränderungen der hepatischen Fettsäureoxidation nicht essentiell für den Effekt von MA und C75 auf die Nahrungsaufnahme sind.