



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Insulin sensitivity : modulation by neuropeptides and hormones**

Hoek, A.M. van den

### **Citation**

Hoek, A. M. van den. (2006, April 26). *Insulin sensitivity : modulation by neuropeptides and hormones*. Haveka B.V., Alblasserdam. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4372>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4372>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## **Summary / Samenvatting**



## Summary

Nowadays, in our Western society food is in abundance and energy-rich with high levels of sugar and saturated fats. At the same time, large shifts towards less physically demanding work have been observed. These environmental changes are reflected in the large number of overweight/obese people. Obesity has now reached epidemic proportions globally and has become a worldwide public health problem. It can lead to several chronic diseases, including cardiovascular disease and insulin resistance/type 2 diabetes mellitus. The problem of obesity arises when food intake exceeds energy expenditure.

Food intake or energy intake is regulated by a highly complex system, that integrates several signals concerning the metabolic status and energy expenditure. This regulation mechanism consists of several central regulation centers, which are situated in several different brain regions, particularly in the hypothalamus, which is considered as the main feeding center of the brain. In the hypothalamus there are two opposing pathways that regulate food intake: one pathway stimulates food intake and consists of neurons, that produce the neuropeptides NPY (neuropeptide Y) and/or AgRP (agouti-related peptide), the other pathway inhibits food intake and consists of neurons that produce the neuropeptides POMC (pro-opiomelanocortin) and/or CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript).

In addition to these central regulation centers of food intake, there are numerous peripheral signals, which are also involved in the regulation of food intake. These factors are derived from different organs like stomach, gut, pancreas and adipose tissue, by example. These hormones act on the central regulation centers, and, thereby, contribute to the regulation of food intake by providing the brain information about hunger, satiety and body fat stores.

The hypothesis, that is used throughout this thesis, is that the neuropeptides/hormones that are involved in the regulation of food intake, also regulate insulin sensitivity (besides and independent of their role in regulating food intake). In obesity, dysregulation of several hypothalamic neuropeptides and peripheral hormones that regulate food intake, has been observed and will lead to an increased food intake. Perhaps the same dysregulation of these neuropeptides and hormones can cause insulin resistance as well.

In **chapter 2** the effects of NPY, the most important neuropeptide of the pathway that stimulates food intake, on insulin sensitivity were studied, independent of the effects on food intake or body weight. NPY was continuously infused in the lateral ventricle of the brain (icv) of mice and insulin sensitivity was simultaneously determined by means of a hyperinsulinemic euglycemic clamp technique. The results of this chapter show increased hepatic glucose and VLDL production under hyperinsulinemic conditions, and thereby provide evidence, that icv NPY administration precludes the inhibition of hepatic glucose and VLDL production by circulating insulin. This finding may imply, that the increased hypothalamic NPY levels, that are typically observed in various obese animal models may underlie hepatic insulin resistance and associated metabolic anomalies in these models.

The aim of **chapter 3** was to evaluate the effects of central administration of melanotan II (MTII), on hepatic and whole-body insulin sensitivity, independent of food intake and body weight. MTII is an agonist of the melanocortin receptors 3 and 4, which are both receptors of the POMC pathway, the pathway that inhibits food intake. The results of this chapter show an increase in the basal glucose production and uptake after central administration of MTII. Furthermore, hyperinsulinemic glucose uptake was increased in the mice that received MTII, whereas the inhibitory effect of insulin on hepatic glucose production was not affected by MTII. We, therefore, conclude, that icv administration of MTII acutely increases insulin-mediated glucose disposal, but does not affect insulin's capacity to suppress the hepatic glucose production in mice. These data indicate, that central stimulation of melanocortin-3/4 receptors modulates insulin sensitivity in a tissue-specific manner, independent of its well-known impact on feeding and body weight.

In **chapter 4**, the acute effects of PYY<sub>3-36</sub> on insulin sensitivity were investigated. PYY<sub>3-36</sub> is a hormone, that is released by the gut in response to nutrient ingestion. It modulates the activities of orexigenic NPY neurons and anorexigenic POMC neurons in the hypothalamus to inhibit food intake. As both NPY and POMC have been shown to also impact insulin action, we wondered whether PYY<sub>3-36</sub> could improve insulin sensitivity. PYY<sub>3-36</sub> was therefore intravenously infused in mice during a hyperinsulinemic euglycemic clamp. The results of this chapter show, that in hyperinsulinemic conditions, glucose disposal was significantly increased in PYY<sub>3-36</sub>-infused- compared with vehicle-infused mice. We therefore conclude, that PYY<sub>3-36</sub>

improves insulin sensitivity, in particular the ability of insulin to enhance glucose disposal.

Because the long-term effects of PYY<sub>3-36</sub> on insulin sensitivity are still unknown, the effects of chronic PYY<sub>3-36</sub> administration on insulin sensitivity were examined in **chapter 5**. In addition, metabolic efficacy of continuous vs. intermittent administration of PYY<sub>3-36</sub> was evaluated. Mice therefore received PYY<sub>3-36</sub> subcutaneously for 7 days by means of an osmotic minipump or daily subcutaneous injections, after which insulin sensitivity was determined with the hyperinsulinemic euglycemic clamp technique. In hyperinsulinemic conditions, glucose disposal was significantly increased in PYY<sub>3-36</sub> treated mice vs. vehicle-treated mice. In contrast, insulin action on hepatic glucose production was not significantly affected, although there was a tendency towards enhanced ability of insulin to suppress hepatic glucose production. Furthermore, none of these metabolic parameters was affected by the mode of PYY<sub>3-36</sub> administration (continuous or intermittent). These observations suggest, that PYY<sub>3-36</sub> or potential analogues may be a useful treatment for insulin resistance.

Finally, in **chapter 6**, the role of the adipose tissue-derived hormone leptin and the role of its central signalling on insulin sensitivity is examined in *ob/ob* mice and evaluated against the contribution of the obese phenotype itself on insulin sensitivity. To explore the contribution of *cerebral* leptin deficiency to insulin resistance in leptin deficient *ob/ob* mice, we infused leptin icv in *ob/ob* mice. To also evaluate the impact of adiposity on insulin action in these animals, another group of young *ob/ob* animals were subjected to severe calorie restriction, so that their body weight became similar to that of wild type mice. The hyperinsulinemic euglycemic clamp technique was subsequently used to determine insulin sensitivity. Icv leptin infusion acutely increased both the hepatic insulin sensitivity and insulin-mediated glucose disposal in *ob/ob* mice. Furthermore, icv leptin administration acutely reduced circulating insulin levels during continuous insulin infusion (hyperinsulinemic period). Food restriction barely affected body composition although it profoundly curtailed body weight. Insulin suppressed the hepatic glucose production clearly more in the lean *ob/ob* mice than in their obese counterparts, but its impact remained less than in wild-type mice. Insulin-mediated glucose disposal of lean *ob/ob* mice was also in between that of obese *ob/ob* and lean wild-types. In conclusion, leptin deficiency *per se* is not just responsible for hyperphagia and obesity in *ob/ob* mice, but critically determines body

## Summary / Samenvatting

---

composition, insulin action and insulin clearance from the circulation in these animals. The data suggest that leptin resistance in obese humans may contribute to insulin resistance and hyperinsulinemia in these individuals.

In conclusion, the studies presented in this thesis show the effects of several neuropeptides/hormones on insulin sensitivity. As there is still a lot of research that has to be done, the research described in this thesis can be considered as a starting-point showing that neuropeptides/hormones that are involved in the regulation of food intake also, and independently of their effect on food intake, affect insulin sensitivity.

## Samenvatting

Tegenwoordig is in onze Westerse samenleving voedsel in overvloed aanwezig en bovendien energierijk, met hoge suikergehaltes en veel verzadigde vetten. Tegelijkertijd worden er enorme verschuivingen waargenomen naar fysiek minder veeleisend werk. Deze veranderingen in onze omgeving worden gereflecteerd in het percentage mensen dat kampt met overgewicht/obesitas. Obesitas heeft inmiddels globaal gezien epidemische proporties aangenomen en is een wereldwijd gezondheidsprobleem geworden. Het kan tot verschillende chronische ziekten leiden, waaronder cardiovasculaire aandoeningen en insuline resistentie/type 2 diabetes mellitus. Het probleem van obesitas ontstaat op het moment dat de voedselinname het energieverbruik overschrijdt.

Voedselinname of energie-inname wordt gereguleerd door een complex systeem dat de verschillende signalen omtrent de metabole status en het energieverbruik integreert. Dit regulatiesysteem bestaat uit verschillende centrale regulatiecentra die gesitueerd zijn in verschillende hersengebieden, met name in de hypothalamus, het gebied dat wordt beschouwd als het belangrijkste voedingscentrum van de hersenen. In de hypothalamus zijn er twee tegenovergestelde paden die voedselinname reguleren: één pad stimuleert voedselinname en bestaat uit neuronen die de neuropeptiden NPY (neuropeptide Y) en/of AgRP (agouti-gerelateerd peptide) produceren, het andere pad inhibeert voedselinname en bestaat uit neuronen die de neuropeptiden POMC (pro-opiomelanocortine) en/of CART (cocaine- en amfetamine gereguleerd transcript).

Naast deze centrale regulatiecentra van voedselinname, zijn er ook veel perifere signalen die ook betrokken zijn bij de regulatie van voedselinname. Deze factoren komen vanuit verschillende organen zoals maag, darm, pancreas en vetweefsel, bijvoorbeeld. Deze hormonen werken op de centrale regulatiecentra en dragen daarmee bij aan de regulatie van voedselinname door de hersenen te voorzien van informatie betreffende honger, verzadiging en vet-voorraden.

De hypothese, waarop de studies uit dit proefschrift gebaseerd zijn, is dat de neuropeptiden/hormonen die betrokken zijn bij de regulatie van voedselinname, ook de insulinegevoeligheid reguleren (naast en onafhankelijk van hun rol in de regulatie van voedselinname). Bij obesitas is er een disregulatie waargenomen van verschillende hypothalamische neuropeptiden en perifere hormonen die voedselinname



reguleren. Wellicht kan dezelfde disregulatie van deze neuropeptiden en hormonen ook insulineresistentie veroorzaken.

In **hoofdstuk 2** werden de effecten van NPY, het belangrijkste neuropeptide van het pad dat voedselinname stimuleert, op insulinegevoeligheid onderzocht, onafhankelijk van de effecten op voedselinname of lichaamsgewicht. NPY werd continu geïnfuseerd in het laterale ventrikel van de hersenen (icv) van muizen en de insulinegevoeligheid werd tegelijkertijd bepaald met behulp van de hyperinsulinemische euglycemische clamp techniek. De resultaten van dat hoofdstuk laten onder hyperinsulinemische condities een verhoogde hepatische glucose- en VLDL-productie zien en tonen daarmee aan, dat icv NPY toediening de inhibitie van de hepatische glucose- en VLDL-productie door insuline kan voorkomen. Deze bevinding impliceert, dat de toegenomen hypothalamische NPY levels, die worden waargenomen in verschillende obese diermodellen, wellicht ten grondslag liggen aan de hepatische insulineresistentie en de daarmee geassocieerde metabole afwijkingen van deze modellen.

Het doel van **hoofdstuk 3** was om de effecten van centrale toediening van melanotan II (MTII), op hepatische en totale insulinegevoeligheid te onderzoeken, onafhankelijk van voedselinname en lichaamsgewicht. MTII is een agonist van de melanocortine receptoren 3 en 4, dat beiden receptoren zijn van de POMC route, welke voedselinname inhibeert. De resultaten van dat hoofdstuk laten een toename zien in de basale glucose productie en opname na centrale toediening van MTII. Bovendien was de hyperinsulinemische glucose opname toegenomen in de muizen die MTII hadden ontvangen, terwijl MTII geen effect had op het inhiberende effect van insuline op de hepatische glucose productie. We concluderen hieruit, dat icv toediening van MTII acuut de insuline-gemedieerde glucose opname verhoogt, maar geen effect heeft op het vermogen van insuline om de hepatische glucose productie te onderdrukken. Deze data geven aan, dat centrale stimulatie van de melanocortine 3/4 receptoren de insulinegevoeligheid moduleert op een weefselspecifieke manier en onafhankelijk van het al bekende effect op voedselinname en lichaamsgewicht.

In **hoofdstuk 4** werden de acute effecten van PYY<sub>3-36</sub> op insulinegevoeligheid onderzocht. PYY<sub>3-36</sub> is een hormoon, dat wordt afgescheiden door de darm in respons op een maaltijd. Het moduleert de activiteiten van de orexigene NPY neuronen en de anorexigene POMC neuronen in de hypothalamus om zo voedselinname te inhiberen. Aangezien zowel NPY als POMC een effect heeft op de

insulinewerking, vroegen wij ons af of PYY<sub>3-36</sub> de insulinegevoeligheid zou kunnen verbeteren. PYY<sub>3-36</sub> werd daarom intraveneus geïnfuseerd bij muizen tijdens een hyperinsulinemische euglycemische clamp. De resultaten van dat hoofdstuk laten zien dat onder hyperinsulinemische condities, de glucose opname significant is toegenomen in PYY-geïnfuseerde dieren in vergelijking met vehicle-geïnfuseerde muizen. We concluderen hieruit, dat PYY<sub>3-36</sub> de insulinegevoeligheid verbetert, met name het vermogen van insuline om de glucose opname te stimuleren.

Aangezien de lange-termijn effecten van PYY<sub>3-36</sub> op insulinegevoeligheid nog onbekend zijn, werden de effecten van chronische PYY<sub>3-36</sub> toediening op insulinegevoeligheid onderzocht in **hoofdstuk 5**. Daarnaast werd ook de metabole efficiëntie van continue vs. onderbroken toediening van PYY<sub>3-36</sub> onderzocht. Muizen kregen daarvoor 7 dagen lang subcutaan PYY<sub>3-36</sub> toegediend dmv een osmotische minipomp die onderhuids werd geplaatst of dmv dagelijkse subcutane injecties, waarna vervolgens de insulinegevoeligheid werd gemeten met de hyperinsulinemische euglycemische clamp techniek. Onder hyperinsulinemische condities was de glucose opname significant toegenomen in de PYY-behandelde dieren vs. vehicle-behandelde dieren. De insulinewerking op de hepatische glucose productie was daarentegen niet significant veranderd, alhoewel er een tendens was tot een toegenomen vermogen van insuline om de hepatische glucose productie te onderdrukken. Bovendien werd geen van deze metabole parameters beïnvloed door de wijze van PYY<sub>3-36</sub> toediening (continu of onderbroken). Deze observaties suggereren dat PYY<sub>3-36</sub> of potentiële analogen een nuttige behandeling kunnen vormen tegen insulineresistentie.

Ten slotte werd in **hoofdstuk 6** de rol van het door vetweefsel geproduceerde hormoon leptine en de rol van de centrale signalling hiervan op insulinegevoeligheid onderzocht in *ob/ob* (leptine deficiënte) muizen en afgezet tegen de bijdrage van het obese fenotype zelf op insulinegevoeligheid. Om de bijdrage van cerebrale leptine deficiëntie op insulineresistentie te onderzoeken, werd leptine icv geïnfuseerd in *ob/ob* muizen. Om ook de impact van de hoeveelheid vet op de insuline werking te onderzoeken, werd een andere groep jonge *ob/ob* muizen op strenge calorie restrictie gezet, zodat hun lichaamsgewicht gelijk werd aan dat van de wild-type muizen. De hyperinsulinemische euglycemische clamp techniek werd vervolgens gebruikt om de insulinegevoeligheid te bepalen. Icv leptine infusie verhoogde acuut zowel de hepatische insulinegevoeligheid als de insuline gemedieerde glucose

## Summary / Samenvatting

---

opname. Bovendien reduceerde icv leptine acuut de circulerende insuline concentraties gedurende continue insuline infusie (hyperinsulinemische periode). Voedselrestrictie had nauwelijks invloed op de lichaamssamenstelling ondanks de aanzienlijke vermindering van lichaamsgewicht. Insuline onderdrukte de hepatische glucose productie duidelijk meer in de dunne *ob/ob* muizen in vergelijking met de dikke *ob/ob* muizen, maar dit effect bleef verminderd in vergelijking met de wild-type muizen. Insuline-gemedieerde glucose opname van de dunne *ob/ob* muizen lag ook in tussen die van de obese *ob/ob* en de dunne wild-type muizen. We concluderen hieruit dat leptine deficiëntie *per se* niet slechts verantwoordelijk is voor de hyperfagie en obesitas in *ob/ob* muizen, maar bepalend is voor lichaamssamenstelling, insulinewerking en insulineklaring vanuit de circulatie in deze dieren. De data suggereert dat leptineresistentie in obese patienten mogelijk bij kan dragen aan de insulineresistentie en hyperinsulinemie van deze individuen.

Concluderend, de studies in dit proefschrift laten de effecten zien van verschillende neuropeptiden/hormonen op insulinegevoeligheid. Aangezien er nog veel onderzoek gedaan moet worden hieraan, kan het hier beschreven onderzoek beschouwd worden als een beginpunt dat laat zien, dat neuropeptiden/hormonen die betrokken zijn bij de regulatie van voedselinname ook, en onafhankelijk van hun effect op voedselinname, insulinegevoeligheid beïnvloeden.

## **Curriculum vitae**

Curriculum vitae

---

## **Curriculum vitae**

Anita Mariska van den Hoek is geboren op 7 oktober 1976 in Bennekom. In 1993 behaalde zij haar HAVO diploma en in 1995 haar VWO diploma aan het Johannes Fontanus College in Barneveld. In datzelfde jaar begon zij aan de studie Biologie aan de Universiteit Utrecht. Hiervoor werd in 1996 de propedeuse behaald. Zij vervolgde met het doctoraal examen van de studie Fundamentele Biomedische Wetenschappen, waarvoor in 2000 het doctoraal examen werd behaald. In het kader van het doctoraalexamen heeft zij stage gelopen bij de vakgroep Vergelijkende Fysiologie, project-groep Neuro-Ethologie aan de Universiteit Utrecht onder begeleiding van dr. M.J. Lankheet en Prof. dr. W.A. van de Grind. Vervolgens werd een 2<sup>e</sup> stage gelopen bij het Nederlands Instituut voor Hersenonderzoek in Amsterdam onder begeleiding van dr. D.F. Fischer.

In december 2000 werd zij voor 4 jaar aangesteld als promovendus bij de afdeling Endocrinologie van het Leids Universitair Medisch Centrum waarbij zij gedetacheerd was bij de afdeling Biomedisch Onderzoek van TNO-Kwaliteit van Leven in Leiden. Gedurende deze periode werd onder begeleiding van dr. H. Pijl, Prof. dr. J.A. Romijn en Prof. dr. L.M. Havekes het in dit proefschrift beschreven onderzoek verricht.

Vanaf december 2004 werd zij vervolgens voor 1 jaar aangesteld bij de afdeling Endocrinologie van het Leids Universitair Medisch Centrum waarbij een vervolgonderzoek werd uitgevoerd van het hier beschreven onderzoek.

Vanaf januari 2006 werkt zij als onderzoeker Diabetes bij de afdeling Biomedisch Onderzoek van TNO-Kwaliteit van Leven in Leiden.



## **List of publications**



List of publications

---

## List of publications

Van den Hoek, A.M., van Heijningen, C., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Kalsbeek, A and Pijl, H.. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y hampers insulin action to suppress endogenous glucose production via the sympathetic nervous system. *In preparation*.

Van den Hoek, A.M., Heijboer, A.C., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Corssmit, E.P., and Pijl, H.. Chronic PYY<sub>3-36</sub> treatment promotes fat oxidation and ameliorates insulin resistance in C57BL6-mice. *In preparation*.

Heijboer A.C., Pijl, H, van den Hoek A.M., Havekes L..M., Romijn J.A., Corssmit E.P. Review: Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *Submitted*.

Van den Hoek, A.M., Teusink, B, Voshol, P.J., Havekes, L.M., Romijn, J.A., and Pijl, H. Leptin deficiency *per se* dictates body composition, insulin action and plasma insulin kinetics in ob/ob mice. *Submitted*.

Heijboer A.C., van den Hoek A.M., Parlevliet E.T., Havekes L.M., Romijn J.A., Pijl H, Corssmit E.P. Intravenous administration of ghrelin differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity. *Diabetologia, in press*.

Van den Hoek, A.M., Heijboer, A.C., Pijl, H., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Romijn, J.A. and Corssmit, E.P Intracerebroventricular administration of melanotan II increases insulin sensitivity of glucose disposal in fasted mice. *Diabetologia*, 48 (8): 1621-1626, 2005.

Van den Hoek, A.M., Voshol, P.J., Karnekamp, B.N., Buijs, R.M., Romijn, J.A., Havekes, L.M. and Pijl, H. Intracerebroventricular Neuropeptide Y infusion precludes inhibition of glucose and VLDL-production by insulin. *Diabetes*. 2004 Oct;53(10):2529-34.

List of publications

---

Van den Hoek, A.M., Heijboer, A.C., Corssmit, E.P., Voshol, P.J., Romijn, J.A., Havekes, L.M. and Pijl, H. PYY3-36 reinforces insulin action on glucose disposal in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):1949-52.

Muurling, M., van den Hoek, A.M., Mensink, R.P., Pijl, H., Romijn, J.A., Havekes, L.M. and Voshol, P.J. Overexpression of APOC1 in obob mice leads to hepatic steatosis and severe hepatic insulin resistance. *J Lipid Res*. 2004 Jan;45(1):9-16.







