

The physiological role of leptin in man

Citation for published version (APA):

Hukshorn, C. J. (2005). *The physiological role of leptin in man*. Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2005

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The discovery of the hormone leptin in 1994 had an enormous impact both in understanding the molecular control of energy balance and in attitudes to the scientific study of obesity. The leptin pathway appeared to be the long-sought peripheral signal pathway from the adipose tissue to the brain involved in the regulation of feeding and energy balance. Since the discovery of leptin, the view of its physiological role in humans has constantly evolved and broadened based on new data and theoretical considerations. The aim of our research presented in this thesis was to test these new insights using different approaches and experimental protocols.

Leptin must gain access to specific regions of the brain to exert its effects and therefore needs to cross the blood-brain-barrier. The pilot study described in **chapter 2** investigated the crucial question if the long-acting pegylated recombinant leptin (PEG-OB) used in all our trials could enter into the human central nervous system. Four days after PEG-OB treatment, leptin concentrations in the cerebrospinal fluid of two patients scheduled for an elective lumbar puncture (to exclude the presence of neurologic Lyme disease) were approximately 10 times higher than predicted from their baseline plasma leptin concentrations. These findings strongly suggested (but did not prove) that PEG-OB was able to cross the human blood-brain barrier.

Soon after the cloning of the *ob* gene, leptin-deficient *ob/ob* mice were injected with recombinant leptin, which led to weight loss due to decreased food intake and increased energy expenditure. This result suggested that leptin functioned as an anti-obesity hormone. According to this hypothesis, rising concentrations of leptin with increasing adiposity would generate a signal to reduce food intake and increase energy expenditure to limit further weight gain. However, this early concept was challenged by the widespread occurrence of leptin resistance in both animals and humans. At that time, it was believed that leptin resistance might be overcome by therapeutic augmentation of circulating leptin levels in a manner similar to the use of exogenous insulin to overcome insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. To test this hypothesis, our first study described in **chapter 3** investigated the effect of weekly administration of 20 mg PEG-OB on body weight loss, energy expenditure, and metabolic profile in obese men during mild hypocaloric conditions (deficit: 2.0 MJ/day) for 12 weeks. Despite sustained elevated levels of both PEG-OB and leptin, which increased post-absorptive satiety throughout the treatment period, no effect was observed on weight loss or energy expenditure. Also other biological effects of PEG-OB or leptin demonstrated in animal studies (such as effects on glucose homeostasis and lipids) were not observed. However, PEG-OB treatment was found to be well tolerated and safe in humans.

After the conclusion of our first study, the results of another clinical trial became available which demonstrated a significant dose-response relationship with weight and fat loss in both lean and obese humans. The dose used in our first trial only led to about 60% of the maximal serum leptin concentrations observed in the most effective highest dose cohorts of this study. Hence, the administration of a higher therapeutical dose of PEG-OB might be able to reduce body weight in obese subjects. To that end, the study described in **chapter 4** explored whether weekly administration of a higher

dose (60 mg per week) of PEG-OB was able to induce additional weight loss and metabolic changes in obese male and female subjects on a mild hypocaloric (deficit: 3.2 MJ/day) diet for 8 weeks. The results of our second study clearly showed that even exposure to the increased dose of PEG-OB (300%) failed to promote additional weight loss over caloric restriction despite the augmented leptin levels. Furthermore, no treatment effects on the levels of glucose, insulin (including estimated insulin resistance) and triglycerides were observed.

The outcome of our first two clinical studies and the clinical trial conducted by another group demonstrated that even supraphysiological leptin concentrations failed to significantly affect body weight regulation, which implicates that humans are highly leptin resistant. This observation was, however, consistent with an alternative view of the physiological role of leptin, which suggests that leptin has a broader physiological role and evolved as a signal whose reduction indicates starvation and subsequently initiates the complex neural, metabolic, neuroendocrine, and behavioral responses thought to have survival value in periods of inadequate energy intake. A consequence of this hypothesis is that exogenous leptin should be able to blunt these fasting-induced adaptations when administered during severe energy restriction. The answer to the question whether elevated leptin levels using PEG-OB changed the effects of semistarvation on weight loss or body-composition, energy expenditure, appetite, metabolic profile and neuroendocrine measures in healthy overweight male subjects, is addressed in **chapter 5** and **6**. Weekly subcutaneous administration of 80 mg of PEG-OB led to significant additional weight loss and reductions in appetite after 6 weeks of treatment and severe energy restriction (by means of a very-low-energy diet) but did not affect changes in energy expenditure, body composition, and other metabolic parameters (**chapter 5**). Our findings suggested that leptin predominantly influences the human energy balance by stimulating appetite during starvation but appears not to be involved in regulating energy expenditure.

Leptin-deficient *ob/ob* mice show many of the neuroendocrine changes observed in starved animals, which could be corrected by leptin treatment. In addition, prevention of the characteristic fall in leptin during fasting using exogenous leptin blunted the expected fasting-induced neuroendocrine changes in fasted wild-type mice. Starvation or severe energy restriction also rapidly evokes several neuroendocrine adaptive responses in humans thought to have survival value in periods of inadequate energy intake. To test whether elevated leptin levels using PEG-OB were able to attenuate the neuroendocrine adaptations to semistarvation in humans, we executed the study described in **chapter 6**. Although administration of PEG-OB failed to reverse the fasting-induced changes in the thyroid, corticotropic, somatotropic axes and sympathetic nervous system activity, the drop in mean LH levels was attenuated in the PEG-OB group compared with the placebo group. These data and other observational and interventional studies to date indicate that human leptin deficiency or absence might be responsible for the impaired reproductive function accompanying these states.

A growing body of evidence suggested that leptin is a modulator of the immune and proinflammatory responses. Leptin administration reversed the immunological abnormalities of both starved mice as well as *ob/ob* mice. Leptin levels are generally elevated in the obese population. In addition, human obesity appears to be associated with a low-grade proinflammatory state, which is reversed by weight reduction. Consequently, it has been suggested that elevated leptin levels underlie the low-grade

proinflammatory state in human obesity. To test this hypothesis, two studies described in **Chapters 4 and 7** were undertaken using two different experimental approaches. Our studies did not support a causative role of hyperleptinemia in low-grade proinflammatory state present in human obesity. Thus, it seems plausible that the definite long-term elevations in systemic leptin levels and the low-grade proinflammatory state found in obesity result from a common pathogenic mechanism present in this condition.

The neuroendocrine data derived from our previous study (**chapter 6**) prompted us to investigate the physiological role of leptin in regulating reproductive function in another low-leptin state. To that end, a detailed study described in **chapter 8** was executed designed to investigate the capability of leptin to influence pulsatile LH secretion in healthy young underweight women who were treated with PEG-OB. Pharmacologically induced hyperleptinemia was associated with lower mean, integrated and pulsatile LH release in healthy young underweight women. Although many lines of evidence indicate that leptin is a critical factor in maintaining human reproductive function, the findings of our last study suggest that leptin might have a dual effect on human reproduction as chronic hyperleptinemia might have a detrimental effect on the human reproductive axis.

Samenvatting

De ontdekking van het hormoon leptine in 1994 had een grote invloed op het inzicht in de moleculaire aansturing van de energiebalans als ook op de houding ten aanzien van wetenschappelijk onderzoek naar de regulatie van het lichaamsgewicht en obesitas. Het leptine systeem bleek het langgezochte perifere signaal systeem te zijn van het vetweefsel naar de hersenen betrokken bij de regulatie van de voedselinname en de energiebalans. Sinds de ontdekking van leptine zijn de opvattingen over de fysiologische rol daarvan bij mensen voortdurend geëvolueerd en verbreed op basis van nieuwe gegevens en theoretische overwegingen. Het doel van het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift, was deze nieuwe inzichten te testen door middel van verschillende benaderingen en experimentele protocollen.

Leptine dient specifieke gebieden van de hersenen te bereiken om zijn werking uit te kunnen oefenen en daarom moet het dus de bloed-hersenen barrière passeren. De pilot studie, die in **hoofdstuk 2** beschreven staat, onderzoekt de cruciale vraag of het langwerkend gepegyleerd humaan recombinant leptine (PEG-OB), dat in al onze klinische studies gebruikt is, in staat is bij mensen het centraal zenuwstelsel te bereiken. Vier dagen na het toedienen van PEG-OB waren de leptine concentraties in liquor van patiënten die reeds gepland waren voor een elektieve liquorpunctie (om de aanwezigheid van neuroborreliose uit te sluiten) ongeveer 10 keer hoger dan voorspeld op basis van hun basale plasma leptine concentraties. Deze resultaten suggereren sterk (maar bewijzen niet) dat PEG-OB in staat is de bloed-hersenen barrière bij de mens te passeren.

Al snel na het kloneren van het *ob* gen werden leptine-deficiënte *ob/ob* muizen geïnjecteerd met recombinant leptine hetgeen resulteerde in gewichtsverlies door verminderde voedselinname en een verhoogd energiegebruik. Deze uitkomst suggereerde dat leptine functioneerde als een anti-obesitas hormoon. Volgens deze hypothese zou de stijgende leptine concentratie, veroorzaakt door de toename van de vetmassa een signaal genereren dat resulteerde in verminderde voedselinname en een verhoogd energiegebruik hetgeen verdere gewichtstoename zou beperken. Echter dit vroege denkbeeld werd betwist omdat leptine-resistentie wijdverbreid voorkomt in zowel obese dieren als mensen. Indertijd werd verondersteld dat leptine-resistentie mogelijk te overwinnen zou zijn door het therapeutisch verhogen van de leptine spiegels, vergelijkbaar met het gebruik van insuline om de insuline-resistentie te overwinnen bij patiënten met diabetes mellitus type 2.

Om deze hypothese te testen werd tijdens de eerste studie, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, het effect van wekelijkse toediening van 20 mg PEG-OB onderzocht op het verlies van lichaamsgewicht, energiegebruik en metabool profiel bij obese mannen op een mild dieet (tekort: 2.0 MJ/dag) gedurende 12 weken. Ondanks continu verhoogde spiegels van zowel PEG-OB als leptine wat leidde tot een toename van de post-absorptieve verzadiging gedurende de gehele behandelperiode, werd geen effect waargenomen op het verlies van lichaamsgewicht of energiegebruik. Ook andere biologische effecten van PEG-OB of leptine die aangetoond waren in dierproeven (zoals effecten op glucose homeostase en lipiden) werden niet waargenomen. Desalniet-

termin werd de behandeling met PEG-OB goed verdragen en bleek deze veilig voor mensen.

Na het beëindigen van deze eerste wetenschappelijke studie kwamen de resultaten van een andere klinische studie beschikbaar die een significante dosis-respons relatie met verlies van lichaamsgewicht en vetmassa liet zien in zowel slanke als obese individuen. De dosis gebruikt in onze eerste studie leidde echter maar tot een leptine concentratie van maximaal 60% van die waargenomen in het meest effectieve en hoogst gedoseerde cohort van deze andere studie. Aldus zou mogelijk de toediening van een hogere dosis PEG-OB in staat zijn het lichaamsgewicht te reduceren van obese proefpersonen. Op basis hiervan werd de studie die beschreven staat in **hoofdstuk 4** uitgevoerd om te bestuderen of wekelijkse toediening van een hogere dosis PEG-OB (60 mg per week) in staat was extra verlies van lichaamsgewicht en metabole veranderingen te induceren bij obese mannelijke en vrouwelijke proefpersonen op een mild dieet (tekort: 3.2 MJ/dag) gedurende 8 weken. De resultaten van deze tweede studie lieten duidelijk zien dat zelfs blootstelling aan deze hogere dosis PEG-OB (300%) geen extra verlies aan lichaamsgewicht veroorzaakte ondanks de verhoogde leptine spiegels. Bovendien werd er geen effect van de behandeling waargenomen op de bloedspiegels van glucose, insuline (inclusief de geschatte insuline resistentie) en triglyceriden.

Het resultaat van deze eerste twee wetenschappelijke studies en het klinisch onderzoek verricht door een andere wetenschappelijke groep lieten zien dat zelfs suprafysiologische leptine concentraties niet in staat waren de regulatie van het lichaamsgewicht te beïnvloeden, hetgeen suggereert dat mensen in hoge mate leptine-resistent zijn. Deze waarneming was echter wel verenigbaar met een alternatieve zienswijze aangaande de fysiologische rol van leptine gebaseerd op dierexperimenteel onderzoek, hetgeen suggereerde dat leptine een bredere fysiologische rol speelt en geëvolueerd is om verhogering te signaleren bij dalende bloedspiegels zodat vervolgens complexe neurale, metabole, neuroendocriene en gedrags responsen geactiveerd kunnen worden, waarvan gedacht wordt dat ze overlevingswaarde bezitten tijdens perioden van onvoldoende voedselinname. Een consequentie van deze hypothese is dat leptine therapie in staat zou moeten zijn om deze door honger geïnduceerde aanpassingen te verminderen wanneer het toegediend wordt tijdens een streng dieet. Het antwoord op de vraag of de door PEG-OB veroorzaakte verhoogde leptine spiegels de effecten van verhogering op het verlies van lichaamsgewicht of de veranderingen in lichaamssamenstelling, energiegebruik, honger, metabool profiel en neuroendocriene parameters beïnvloedt bij obese mannelijke proefpersonen wordt behandeld in **hoofdstuk 5** en **6**. Wekelijkse subcutane toediening van 80 mg PEG-OB leidde tot significant extra verlies van lichaamsgewicht en een reductie in hongergevoel na 6 weken behandeling en het volgen van een streng dieet (door middel van een laag calorisch, eiwit verrijkt dieet) maar had geen effect op de veranderingen in energiegebruik, lichaamssamenstelling en andere metabole parameters (**hoofdstuk 5**). Onze resultaten suggereren dat leptine voornamelijk de menselijke energiebalans beïnvloedt door het hongergevoel te stimuleren tijdens vasten maar niet betrokken lijkt bij de regulatie van het energiegebruik.

Leptine-deficiënte *ob/ob* muizen bezitten vele neuroendocriene adaptaties die waargenomen zijn in uitgehongerde dieren hetgeen gecorrigeerd kan worden door leptine behandeling. Tevens bleek het voorkomen van de karakteristieke daling van de leptine spiegel tijdens vasten door het toedienen van leptine de verwachte door honger

geïnduceerde neuroendocriene veranderingen te verminderen in vastende wild-type muizen. Verhongerding of strenge energie-inname beperking veroorzaakt snel diverse neuroendocriene adaptaties bij mensen. Hiervan wordt gedacht dat deze overlevingswaarde bezitten tijdens perioden van onvoldoende voedselinname. Om te testen of de door PEG-OB geïnduceerde verhoogde leptine spiegels in staat waren de neuroendocriene aanpassingen te verminderen bij mensen die een streng dieet volgen is de studie beschreven in **hoofdstuk 6** uitgevoerd. Ondanks het feit dat de toediening van PEG-OB niet resulteerde in het voorkomen van de door honger veroorzaakte veranderingen in de schildklier, corticotrope, somatotrope hormonen en sympatisch zenuwstelsel activiteit was wel de daling van de gemiddelde LH spiegels verminderd in de PEG-OB groep ten opzichte van de placebo groep. Deze resultaten en andere wetenschappelijke waarnemingen en interventie studies tot nu toe geven aan dat een tekort aan of de afwezigheid van leptine mogelijk verantwoordelijk is voor de verminderde humane fertiliteit die hierbij optreedt.

In toenemende mate is er bewijs die suggereert dat leptine in staat is de immunologische en proinflammatoire responsen te moduleren. Leptine toediening corrigeerde de immunologische afwijkingen van zowel vastende als ook *ob/ob* muizen. Leptine spiegels zijn in het algemeen verhoogd in de obese populatie. Ook lijkt humane obesitas geassocieerd te zijn met een laaggradig proinflammatoire toestand die gecorrigeerd wordt door het reduceren van het lichaamsgewicht. Derhalve is gesuggereerd dat de verhoogde leptine spiegels ten grondslag liggen aan deze laaggradig proinflammatoire toestand die aanwezig is bij humane obesitas. Om deze hypothese te testen zijn twee studies, beschreven in **hoofdstuk 4** en **7** uitgevoerd, die gebruik maken van twee verschillende experimentele benaderingen. Deze studies ondersteunen een causaal verband tussen de hoge leptine concentraties en de aanwezigheid van een laaggradig proinflammatoire toestand in humane obesitas niet. Aldus lijkt het aannemelijk dat de uitgesproken langdurige verhoging van de systemische leptine bloedspiegels, alsmede de laaggradig proinflammatoire toestand aanwezig bij humane obesitas het resultaat zijn van een gemeenschappelijk pathologisch mechanisme, dat in deze conditie aanwezig is.

De neuroendocriene resultaten van de vorige studie (**hoofdstuk 6**) vormden de basis voor een nadere studie aangaande de fysiologische rol van leptine in een andere conditie, die ook geassocieerd is met een lage leptine bloedspiegel. Een uitvoerige studie die beschreven staat in **hoofdstuk 8** werd ontworpen om het vermogen van leptine te bestuderen om de pulsatiele LH secretie van gezonde jonge vrouwen met ondergewicht te beïnvloeden 10 dagen na behandeling met PEG-OB. Farmacologisch geïnduceerde verhoogde leptine bloedspiegels bij gezonde jonge vrouwen met ondergewicht waren geassocieerd met een verlaagd gemiddelde, geïntegreerde en pulsatiele LH secretie. Ondanks het feit dat er veel bewijs bestaat dat impliceert dat leptine deficiëntie leidt tot menselijke reproductief falen, suggereren de resultaten van deze laatste studie dat leptine mogelijk een tweeledig effect heeft op de menselijke reproductie, gezien het feit dat chronische continu verhoogde leptine bloedspiegels mogelijk een nadelig gevolg hebben voor de menselijke fertiliteit.