



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**TEMPLE UNIVERSITY  
LEWIS KATZ SCHOOL OF MEDICINE  
CTM, METABOLIC BIOLOGY LABORATORY**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Ρόλος του FGF21 στην καρδιακή υπερτροφία  
που προκαλείται από αυξημένη πίεση**

**Ραφαηλία Κ. Σιδηροπούλου**

Επιβλέποντες καθηγητές:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Κωνσταντίνος Δροσάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Temple University

**Φιλαδέλφεια, ΗΠΑ  
2021**

Copyright © Temple University

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

TEMPLE UNIVERSITY  
LEWIS KATZ SCHOOL OF MEDICINE  
CTM, METABOLIC BIOLOGY LABORATORY

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Ρόλος του FGF21 στην καρδιακή υπερτροφία  
που προκαλείται από αυξημένη πίεση

“Role of FGF21 in pressure overload driven  
cardiac hypertrophy”

**Ραφαηλία Κ. Σιδηροπούλου**

Εξεταστική Επιτροπή:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Άννα Κούρτη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Δήμητρα Μηλιώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Ρόλος του FGF21 στην καρδική υπερτροφία που προκαλείται από υπερφόρτωση πίεσης

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων  
Τμήμα Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Lewis Katz School of Medicine  
Center for Translational Medicine  
Molecular Biology Laboratory

### Περίληψη

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν τη βασική αιτία θανάτου παγκοσμίως. Η καρδιακή υπερτροφική ανάπτυξη απαντάται σε πολλές περιπτώσεις καρδιαγγειακών παθήσεων, και μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο.

Ο FGF21 είναι μια ορμόνη που παράγεται και εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ και επηρεάζει σημαντικά τον μεταβολισμό. Χαμηλότερα επίπεδα FGF21 εκκρίνονται από τον σκελετικό μυ και από το λιπώδη ιστό. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα, έχουν οδηγήσει σε αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο του FGF21 στην καρδιακή υπερτροφία καθώς μπορεί να δράσει είτε προστατευτικά είτε καταστροφικά, επιδεινώνοντας την παθολογία της νόσου ανάλογα με τον τρόπο που αυτή έχει προκληθεί. Για να εξετάσουμε τον ρόλο του FGF21 στην παθολογική υπερτροφία χρησιμοποιήσαμε ποντίκια που δεν εκφράζουν τον FGF21 στους δύο κύριους ιστούς προέλευσής του: το ήπαρ και τους σκελετικούς μύες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ποντίκια στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του FGF21 στους αντίστοιχους ιστούς μέσω διασταύρωσης ποντικίων που διέθεταν δύο περιοχές LoxP εκατέρωθεν του γονιδίου του FGF21 με ποντίκια που εξέφραζαν την Cre ρεκομπινάση στο ήπαρ (*Alb-Cre<sup>+/+</sup>*) ή στον σκελετικό μυ (*MLC-Cre<sup>+/+</sup>*).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τον τρόπο με τον οποίο η απαλοιφή του γονιδίου του FGF21 στο ήπαρ ή στους σκελετικούς μύες επηρεάζει την καρδιακή υπερτροφία που προκαλείται από αυξημένη πίεση. Η αύξηση της πίεσης στο μυοκάρδιο εφαρμόστηκε με την τεχνική της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης (Transverse Aortic Constriction; TAC) σε ποντίκια ελέγχου (*Alb-Cre<sup>+/+</sup>*, *MLC-Cre<sup>+/+</sup>*) και σε ποντίκια που έχει γίνει knock out ο παράγοντας FGF21 στο ήπαρ (*Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>*) ή στους σκελετικούς μύες (*MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις δύο ομάδες ελέγχου (*Alb-Cre<sup>+/+</sup>* και *MLC-Cre<sup>+/+</sup>*) η Εγκάρσια Αορτική Στένωση αύξησε τα επίπεδα του FGF21 στον ηπατικό ιστό και στο πλάσμα και προκάλεσε καρδιακή υπερτροφία. Στα ποντίκια *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>*, τα οποία είχαν μειωμένα επίπεδα ηπατικής έκφρασης του FGF21, παρατηρήθηκε μείωση του βάρους της καρδιάς προς το βάρος του σώματος και προς το μήκος της κνήμης, σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου που είχαν υποστεί TAC (*Alb-Cre<sup>+/+</sup>*).

Εξέταση της μορφολογίας και της λειτουργίας της καρδιάς μετά τη στένωση με ανάλυση του διαθωρακικού ηχοκαρδιογραφήματος στον οριζόντιο και τον διαμήκη άξονα έδειξε ότι τα κλάσματα Εξώθησης και Βράχυνσης καθώς και οι Τελικοί Διαστολικοί και Συστολικοί όγκοι των ποντικίων *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Επιπλέον, στα ποντίκια *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* παρατηρήσαμε αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας που δεν συνοδευόταν, προς έκπληξή μας, με διάταση της κοιλίας.

Οι μελέτες μας στα ποντίκια *MLC-FGF21<sup>-/-</sup>* με TAC δεν είχαν τα ίδια ευρήματα με την ομάδα των *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* ποντικίων όσον αφορά στη μορφολογία και στη λειτουργία της καρδιάς. Συγκεκριμένα, η

απαλοιφή του γονιδίου του FGF21 από τον σκελετικό μυ δεν αποκατέστησε τη φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς και δεν λειτούργησε προστατευτικά έναντι της υπερτροφικής ανάπτυξης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο FGF21 που προέρχεται από το ήπαρ είναι ο βασικός παράγοντας συμβολής στην καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την αυξημένη πίεση.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιολογία Συστημάτων» του τμήματος Βιοτεχνολογίας της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών. Η πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο εργαστήριο του Αναπλ. Καθ. Κωνσταντίνου Δροσάτου στο Center for Translational Medicine του Lewis Katz School of Medicine at Temple University στη Philadelphia των ΗΠΑ, στο οποίο ανήκει και η πνευματική ιδιοκτησία όλων των αποτελεσμάτων.

**Επιστημονική περιοχή:** καρδιακή υπερτροφία

**Λέξεις κλειδιά:** ποντίκι, FGF21, εγκάρσια αορτική στένωση, φυσιολογική υπερτροφία, παθολογική υπερτροφία, Cre ρεκομπινάση, απαλοιφή γονιδίου, ηχοκαρδιογράφημα

## Role of FGF21 in pressure overload driven cardiac hypertrophy

*MscDP: Systems Biology  
Dept: Biotechnology  
Molecular Biology Laboratory*

*Lewis Katz School of Medicine  
Center for Translational Medicine  
Molecular Biology Laboratory*

### **Abstract**

Cardiovascular diseases (CVDs) are the main cause of death globally. Cardiac hypertrophic growth is seen in many forms of CVDs and can lead to cardiac failure and death. Previous studies in our lab found higher plasma levels of FGF21 in murine models of cardiac dysfunction and in plasma from heart failure patients.

FGF21 is a hormone, secreted predominately by the liver, which affects metabolism. Low levels of FGF21 are secreted by the skeletal muscle and adipose tissue. Research up to date has indicated a contradictory role for FGF21 as either a protective or deleterious hormone in the progression of cardiac hypertrophy, depending on how the disease has been developed. To examine the role of FGF21 in pathological hypertrophy we used mice that do not express FGF21 in the liver and skeletal muscle which are the two main tissues of FGF21 secretion. For this purpose, we used mice with specific deletion of FGF21 gene in the corresponding tissues. The mouse lines resulted from crossing mice that had two LoxP sites on either region of FGF21 gene with mice that expressed Cre recombinase in the liver (*Alb-Cre<sup>+/-</sup>*) or in the skeletal muscle (*MLC-Cre<sup>+/-</sup>*) respectively.

Subsequently, we studied how does the deletion of the FGF21 in the liver or skeletal muscle affect pressure overload induced cardiac hypertrophy. The pressure overload in the myocardium was accomplished by performing Transverse Aortic Constriction (TAC) on control mice (*Alb-Cre<sup>+/-</sup>*, *MLC-Cre<sup>+/-</sup>*) and on liver (*Alb-FGF21<sup>-/-</sup>*) and skeletal muscle (*MLC-FGF21<sup>-/-</sup>*) knockout mice.

The results showed that in both control groups (*Alb-Cre<sup>+/-</sup>* and *MLC-Cre<sup>+/-</sup>*), TAC surgery increased the levels of FGF21 in the liver and in the plasma and eventually led to cardiac hypertrophy. On the contrary, in the TAC *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* mice that had significantly lower levels of FGF21, there was a reduction in the ratio of heart weight to body weight and in the ratio of heart weight to tibial length compared to the control group (*Alb-Cre<sup>+/-</sup>*).

We then examined cardiac morphology and function post-TAC and saw a preservation of baseline Ejection Fraction (EF), Fractional Shortening (FS), End Diastolic Volume (EDV), and Systolic Volume (ESV), in both Long Axis and Short Axis in our *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* TAC group as compared to control. Additionally, we saw an increase in Left Ventricle (LV) wall thickness though interestingly this did not correlate with increased dilation or HW/BW and HW/TL ratios.

Our studies of *MLC-FGF21<sup>-/-</sup>* mice post-TAC did not show the same preservation of EF, FS, EDV and ESV, indicating that cardiac function was not rescued by FGF21 deletion. Moreover, knock out of FGF21 in skeletal muscle did not protect against hypertrophic growth, suggesting that liver derived FGF21 is the main contributor to cardiac dysfunction post Pressure Overload.

The above results suggest that liver-derived FGF21 is a major contributing factor in Pressure Overload Heart Failure.

The present thesis fulfills the requirements of the “Systems Biology” Master’s Program of the Department of Biotechnology of Agricultural University of Athens. The experiments were conducted at the laboratory of Dr. Konstantinos Drosatos at the Center for Translational Medicine of Lewis Katz School of Medicine at Temple University in Philadelphia (USA), which owns the intellectual property of all the results.

**Scientific area:** cardiac hypertrophy

**Keywords:** mouse, FGF21, transverse aortic constriction (TAC), physiological hypertrophy, pathological hypertrophy, Cre recombinase, gene deletion, echocardiography

## ***Ευχαριστίες***

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μεταβολικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής (Lewis Katz School of Medicine) του Πανεπιστημίου του Temple (Φιλαδέλφεια, Πενσυλβάνια) σε συνεργασία με το Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Δροσάτο που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριό του. Υπήρξε καθηγητής και μέντορας για μένα, με βοήθησε να εξελιχθώ, να μορφωθώ και να μάθω από τα λάθη μου. Πάντα θα εκτιμώ την υπομονή, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Δρ. Ιωάννη Κυριαζή που υπήρξε δίπλα μου σε κάθε βήμα. Με επιμονή, υπομονή και μεράκι με δίδαξε όχι μόνο τις εργαστηριακές τεχνικές αλλά και το πως να είμαι σωστή στη δουλειά μου και στην έρευνα. Ακούραστος και αλληλέγγυος, θα τον ευγνωμονώ πάντα για τα όσα μου πρόσφερε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω πολύ τη Δήμητρα Παλιούρα και τον Matthew Hoffman από το εργαστήριο του Δρ. Δροσάτου που μεταλαμπάδευσαν τις γνώσεις τους σε μένα. Η Δήμητρα υπήρξε δασκάλα, φίλη, στήριγμα και συνοδοιπόρος σε αυτό το όμορφο ταξίδι.

*Από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας, εκεί που ξεκίνησαν όλα...*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος μας, Δρ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και για την προθυμία του να συμμετέχει σε αυτή τη συνεργασία Πανεπιστημίων για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου έρευνας.

Επίσης, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Δρ. Γεράσιμο Δάρα που ήταν πάντοτε πρόθυμος και διαθέσιμος να λύσει τις όποιες απορίες ή ανησυχίες είχα καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος και τους συμφοιτητές μου, Μάρη Χρυσοπούλου και Κώστα Τορνεσάκη, για τη συμβολή τους στην πορεία του μεταπτυχιακού. Μοιράστηκαν τις γνώσεις και τις εμπειρίες τους και πρόσφεραν τη βοήθειά τους όποτε το ζήτησα.

Την ευγνωμοσύνη μου θα έχουν πάντα και οι καθηγητές μου Δρ. Στραβοπόδης και Δρ. Στυλιάρης για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που με χαρά μου πρόσφεραν στο ξεκίνημα μου στον χώρο των θετικών επιστημών.

*Το πιο μεγάλο ευχαριστώ όμως το χρωστάω στην οικογένειά μου...*

Στην αγαπημένη μου φίλη και συμφοιτήτρια Αλεξάνδρα Δημητρίου, που με επέλεξε, με εμπιστεύτηκε και με πρότεινε στον Δρ. Δροσάτο για συνεργασία. Η αξιόλογη και ταλαντούχα Αλεξάνδρα μου, ήταν από την πρώτη μέρα εκεί να με συμβουλέψει, να με προσανατολίσει, να μου δώσει θάρρος, κουράγιο, ιδέες, να μου εξηγήσει, να μου μάθει, να κάνει τη μάθηση και τη ζωή μου πολύ πιο εύκολη!

Στον θείο Σάκη και στη θεία Κική που μου κάνανε δώρο τα δίδακτρα του μεταπτυχιακού προγράμματος και βάλανε το πρώτο και βασικό λιθαράκι γι' αυτήν την τόσο συναρπαστική εμπειρία.

Στους γονείς μου, Ελένη και Κώστα, και στον αδερφό μου Γιάννη που πάντα με στηρίζουν και με βοηθούν με κάθε δυνατό τρόπο. Μου έχουν χαρίσει απεριόριστη αγάπη, αξέχαστες εμπειρίες, ανεκτίμητες στιγμές, άφθονες ανέσεις και συνεχίζουν να μου δίνουν περισσότερα απ' όσα αξίζω!

*Χωρίς εσάς θα παρέμεναν όλα ένα ακόμη όνειρο θερινής νυκτός...*



## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	10
I. Λειτουργία Καρδιάς .....	10
II. Καρδιακή Υπερτροφία .....	11
III. Πειραματικά Μοντέλα Υπερτροφίας.....	14
IV. Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών 21- Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21).....	16
α. Η Οικογένεια των FGF.....	16
β. Δομή.....	17
γ. Λειτουργίες .....	18
δ. Κυτταρική Σηματοδότηση.....	28
ε. Ιστοί Στόχοι .....	31
V. Ο Ρόλος του FGF21 στην Καρδιά .....	38
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	44
I. Τα ποντίκια ως μοντέλο μελέτης .....	44
II. Το σύστημα Cre-LoxP .....	45
III. Ηχοκαρδιογράφημα.....	47
IV. Συλλογή Ιστών.....	49
V. Απομόνωση ολικού mRNA ιστών .....	50
VI. Σύνθεση cDNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR).....	51
VII. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	54
3. Αποτελέσματα .....	57
4. Συζήτηση.....	71
5. Μελλοντικές Προοπτικές.....	78
6. Ακρωνύμια .....	80
7. Βιβλιογραφία.....	82

# 1. Εισαγωγή

## I. Λειτουργία Καρδιάς

Η καρδιά είναι ένας μυς που λειτουργεί σαν αντλία με σκοπό να προωθεί το αίμα στο σώμα (συστημική κυκλοφορία) και στους πνεύμονες (πνευμονική κυκλοφορία)[2]. Διαθέτει δύο διαφράγματα που την χωρίζουν σε τέσσερις κοιλότητες: Οι δύο πάνω ονομάζονται κόλποι (δεξιός και αριστερός) και οι δύο κάτω κοιλίες (δεξιά και αριστερή)[3]. Η δεξιά κοιλία προωθεί το μη οξυγονωμένο αίμα στο χαμηλής αντίστασης αγγειακό δίκτυο της πνευμονικής κυκλοφορίας, και η αριστερή εξωθεί το οξυγονωμένο αίμα στο υψηλής αντίστασης αγγειακό δίκτυο της συστημικής κυκλοφορίας. Η μηχανική λειτουργία της καρδιάς ελέγχεται από τέσσερις βαλβίδες, δεξιά από την τριγλώχινα και την πνευμονική και αριστερά από τη μιτροειδή και την αορτική[4]. Η αιματική ροή από τους κόλπους κατευθύνεται προς τον χώρο εισόδου των κοιλιών και από εκεί προς την κορυφή της καθεμίας. Κατά τη μηχανική συστολή της καρδιάς, η βράχυνση και η περιστροφική κίνηση της κορυφής (στροφή κατά τον επιμήκη άξονα) εξωθούν το αίμα προς τον χώρο εξόδου και τα μεγάλα αγγεία (πνευμονική αρτηρία και αορτή), οπότε οι αντίστοιχες βαλβίδες ανοίγουν ώστε να μπορέσει το αίμα να φύγει, ενώ οι βαλβίδες που ενώνουν τους κόλπους με τις κοιλίες κλείνουν και εμποδίζουν έτσι το αίμα να επιστρέψει στους κόλπους.

Τα τοιχώματά της καρδιάς αποτελούνται από τρεις στοιβάδες κυττάρων που από μέσα προς τα έξω ονομάζονται ενδοκάρδιο, μυοκάρδιο και περικάρδιο[2]. Η στοιβάδα των καρδιομυοκυττάρων είναι η πιο μεγάλη και το εξωτερικό τοίχωμα της καρδιάς καλύπτεται από μια ακόμη στρώση κυττάρων που ονομάζεται επικάρδιο. Επειδή οι πιέσεις στο αριστερό κομμάτι της καρδιάς, το οποίο ευθύνεται για την εξώθηση του αίματος στο υπόλοιπο σώμα, είναι πολύ υψηλότερες από αυτές στο δεξί, το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας είναι σημαντικά πιο παχύ. Η κύρια λειτουργία των καρδιομυοκυττάρων είναι η μηχανική συστολή και χάλαση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω δύο

συσταλών πρωτεϊνών, της ακτίνης και της μυοσίνης. Η ακτίνη και η μυοσίνη δημιουργούν ένα σύμπλεγμα που ονομάζεται σαρκομερές[2]. Κατά τη συστολή βραχύνεται το μήκος του σαρκομερούς, ενώ κατά τη διαστολή αυξάνεται. Η ενέργεια που απαιτείται για τη βράχυνση του σαρκομερούς προέρχεται από τη διάσπαση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate; ATP). ATP παράγεται στα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, από τη γλυκόλυση της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα και από τον κύκλο φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της κρεατίνης. Συγκεκριμένα, η φωσφοκρεατίνη φωσφορυλιώνει μόρια διφωσφορικής αδενοσίνης που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, παράγοντας ATP και κρεατίνη.

## II. Καρδιακή Υπερτροφία

Η καρδιά πρέπει συνεχώς να εξωθεί αίμα προς την κυκλοφορία για να εφοδιάζει το σώμα με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά[4], οπότε για να μπορεί να ανταπεξέρχεται στις ενεργειακές και μηχανικές απαιτήσεις του ρόλου της διαθέτει πολλαπλά βιολογικά συστήματα που της επιτρέπουν να προσαρμόζεται σε τυχόν αλλαγές των συστημικών απαιτήσεων. Τα κύτταρά της μπορούν να μεγαλώνουν σε μέγεθος, να συρρικνώνονται ή και να πεθαίνουν σαν απάντηση σε διαφορετικά είδη στρες[5]. Η ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας είναι ένας τέτοιος μηχανισμός. Πρόκειται για την απόκριση του μυοκαρδίου σε φυσιολογικά ή παθολογικά ερεθίσματα τα οποία μπορούν να έχουν μηχανικό ή ορμονικό υπόβαθρο και αναγκάζουν την καρδιά να λειτουργεί κάτω από συνθήκες αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων. Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι αυξημένη πίεση λόγω άσκησης[6], στένωση αρτηρίας ή βαλβίδας[7], έμφραγμα του μυοκαρδίου[8]. Η ανάγκη αύξησης της καρδιακής μυϊκής μάζας ως προσαρμογή σε αυτές τις συνθήκες, καλύπτεται όχι από πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μυοκαρδίου αλλά από επιμήκυνση και επιπλέον από την αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης[5],[9]. Οι αλλαγές αυτές, σε συνδυασμό με έκκριση νευροχυμικών μεσολαβητών,

αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών συμβάλλουν στην αύξηση μάζας του μυοκαρδίου και τελικά στην υπερτροφική αναδιαμόρφωση της καρδιάς[10]. Η υπερτροφία του μυοκαρδίου θεωρείται προσαρμοστικός μηχανισμός στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του αιμοδυναμικού φορτίου και επιτρέπει στην καρδιά να αποκτήσει μεγαλύτερη συσταλτική δύναμη και να αντισταθμίσει την αύξηση της πίεσης του τοιχώματος σύμφωνα με τον νόμο του Laplace[9]. Ο νόμος του Laplace ορίζει ότι το στρες που δέχεται το τοίχωμα της καρδιάς είναι ανάλογο της πίεσης που ασκείται και της ακτίνας του τοιχώματος και αντιστρόφως ανάλογο με το διπλάσιο του πάχους του. Η ακριβής σχέση που συνδέει αυτούς τους παράγοντες φαίνεται παρακάτω:

$$\text{wall stress} = \frac{\text{pressure} \times \text{radius}}{2 \times \text{wall thickness}}$$

Συνεπώς, το αυξημένο stress της αριστερής κοιλίας της καρδιάς λόγω πίεσης αντισταθμίζεται από αύξηση του πάχους του τοιχώματος της κοιλίας. Η αύξηση επιτυγχάνεται, όπως προαναφέρθηκε, μέσω αλλαγών της δομής των καρδιομυοκυττάρων. Υπάρχουν δύο είδη καρδιακής υπερτροφίας, η φυσιολογική και η παθολογική[5],[9] με σημαντικές μεταξύ τους διαφορές τόσο στους μοριακούς μηχανισμούς που τις διέπουν όσο και στον τελικό φαινότυπο που αφορά στη λειτουργία της καρδιάς:

- Η φυσιολογική καρδιακή υπερτροφία χαρακτηρίζεται από ήπια αύξηση της καρδιακής μάζας (10%-20%, εκτός από την περίπτωση της μεταγεννητικής υπερτροφίας). Εμφανίζεται κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των παιδιών, στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και πιο έντονα στους αθλητές. Στη φυσιολογική υπερτροφία, η καρδιακή λειτουργία διατηρείται σε βάθος χρόνου, είναι πλήρως αντιστρέψιμη και δεν οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια[9].

- Η παθολογική υπερτροφία συνοδεύεται από έντονη αύξηση σε μήκος αλλά και σε πάχος των καρδιομυοκυττάρων, καρδιακή δυσλειτουργία, ίνωση, αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, κυτταρική δυσλειτουργία και επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε καρδιακή αναδιαμόρφωση και καρδιακή ανεπάρκεια. Ορισμένες από τις καρδιαγγειακές παθήσεις που

προκαλούν παθολογική υπερτροφία είναι η αορτική στένωση, η υπέρταση και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις, όπως η υπερτροφική καρδιομυοπάθεια (γενετική ασθένεια) που επηρεάζουν με παρόμοιο τρόπο τα τοιχώματα και τη λειτουργία της καρδιάς. Άλλοι παράγοντες που μπορούν ν' αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης υπερτροφίας είναι η φυλή, το φύλο, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, το βάρος και ο διαβήτης[5],[9].

Η παρατεταμένη υπερτροφία δημιουργεί επιπλοκές όπως διακεκομμένη παροχή αίματος, ακανόνιστο παλμό και μειωμένη παροχή οξυγόνου, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρότερων καρδιαγγειακών παθήσεων συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης των μυοκυττάρων και της κοιλιακής ίνωσης. Για παράδειγμα, η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων, αρρυθμίες, βαλβιδική νόσο, ισχαιμικά καρδιακά επεισόδια και εγκεφαλικό. Η υπερτροφική αναδιαμόρφωση αποτελεί μεταβατική φάση που εξελίσσεται σε καρδιακή διαστολή και καρδιακή ανεπάρκεια[11]. Καθώς η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας αλλάζει τη δομή και τη λειτουργία της καρδιάς, η κοιλία γίνεται ασθενής, άκαμπτη και λιγότερο ελαστική. Η αριστερή κοιλία ανταποκρίνεται στο αυξημένο φορτίο μεταβάλλοντας τη γεωμετρική διαμόρφωσή της οπότε προκύπτουν δύο διαφορετικοί υπερτροφικοί φαινότυποι:

- Η ομόκεντρη υπερτροφία που είναι συνέπεια της υπερφόρτωσης πίεσης[12]. Χαρακτηριστικό της ομόκεντρης υπερτροφίας είναι η παράλληλη προσθήκη σαρκομερών και η πλευρική ανάπτυξη των καρδιομυοκυττάρων.

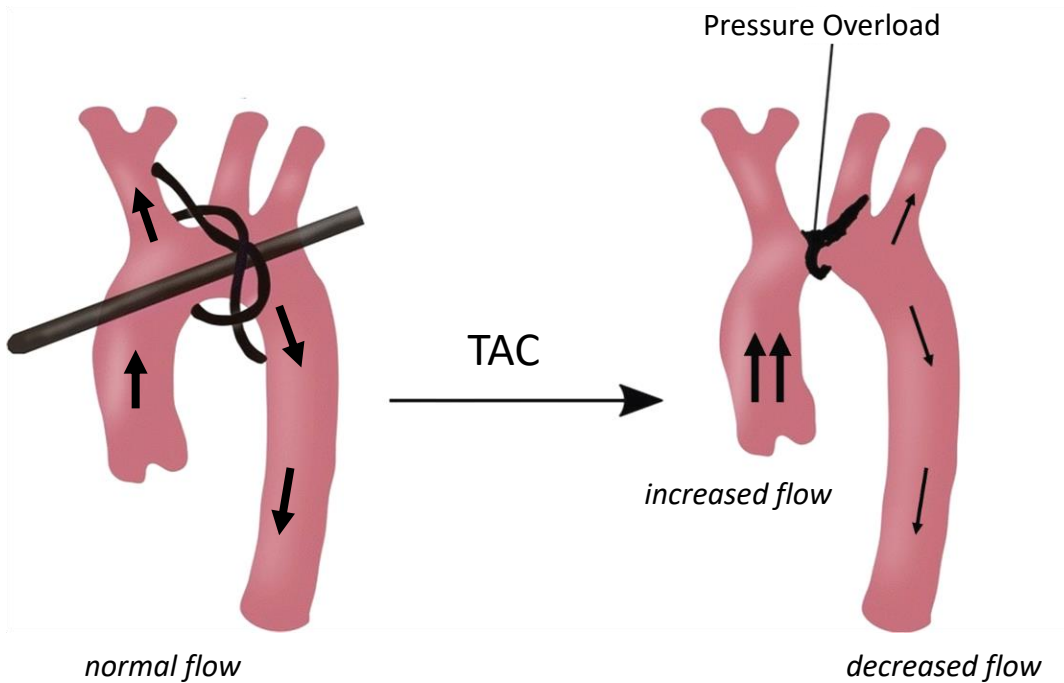
- Η έκκεντρη υπερτροφία προκαλείται από την αύξηση της πίεσης στην κοιλία και χαρακτηρίζεται από τη διαμήκη ανάπτυξη των κυττάρων[13]. Η ομόκεντρη υπερτροφία ονομάζεται αλλιώς και «αντισταθμική» γιατί μειώνει τη συστολική τάση του τοιχώματος και την κατανάλωση οξυγόνου.

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό καρδιακής υπερτροφίας είναι η  $\alpha$ - και  $\beta$ - ισομορφή των βαρέων αλυσίδων μυσίνης ( $\alpha$ -MHC και  $\beta$ -MHC) και το νατριουρητικό πεπτίδιο Β-τύπου (B-type Natriuretic peptide, BNP). Η  $\beta$ -MHC αποτελεί την κύρια ισομορφή στην καρδιά του ενηλικού ανθρώπου. Αντιθέτως, οι καρδιές στα ποντίκια και στους αρουραίους εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά (~90%) την  $\alpha$ -MHC. Σε περιπτώσεις υπερτροφίας, η αναλογία αυτή αντιστρέφεται[14].

Το BNP μαζί με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των νατριουρητικών πεπτιδίων αποτελούν αμυντικούς μηχανισμούς έναντι του στρες της καρδιάς. Η δράση τους έχει σαν αποτέλεσμα τη χαλάρωση των αιμοφόρων αγγείων, τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και τη μείωση του φόρτου εργασίας της καρδιάς[15]. Η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται σημαντικά όταν η καρδιά βρίσκεται υπό πίεση και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για τη διάγνωση.

### III. Πειραματικά Μοντέλα Υπερτροφίας

Το επικρατέστερο ερευνητικό μοντέλο που προσομοιάζει την παθολογική καρδιακή υπερτροφία είναι το μοντέλο της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης (Transverse Aortic Constriction-TAC)[16]. Στο μοντέλο αυτό προκαλείται χειρουργικά στένωση σ' ένα σημείο της αορτής, δένοντας ένα ράμμα γύρω από αυτήν ώστε να μεταβληθεί η διάμετρος της. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται αύξηση της ταχύτητας ροής και της πίεσης του αίματος στην περιοχή που προηγείται της στένωσης, ενώ το αίμα που ρέει στην περιοχή μετά τη στένωση μειώνεται σημαντικά[12],[16]. Κατά συνέπεια, δημιουργείται υπερφόρτωση πίεσης πριν το σημείο του δεσίματος που καταλήγει σε ανεπάρκεια του αριστερού τμήματος της καρδιάς. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας προκειμένου να αντισταθμιστεί η αυξημένη πίεση που δέχεται το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας.



**Εικ.1:** Σχηματική αναπαράσταση της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης. Η στένωση γίνεται με ειδικό ράμμα που δένεται γύρω από την αορτή. Αριστερά του δεσίματος, η ροή του αίματος αυξάνεται και το ίδιο και η πίεση ενώ δεξιά του δεσίματος η ροή του αίματος είναι μειωμένη. Αποτέλεσμα της στένωσης είναι η δημιουργία μιας κατάστασης με ιδιαίτερα αυξημένη πίεση στο σημείο εφαρμογής του ράμματος.

Έχουν αναπτυχθεί και άλλα μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας στα ποντίκια. Ένα από αυτά προκύπτει από την αλλαγή της φυσικής κατάστασης των ποντικών ύστερα από συστηματική άσκηση. Συγκεκριμένα, ποντίκια που υποβάλλονται σε μεγάλα και συνεχόμενα διαστήματα κολύμβησης αναπτύσσουν υπερτροφικές καρδιές μετά το πέρας 4 εβδομάδων[17]. Δύο ακόμη μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας έχουν χαρακτηριστεί σε ποντίκια με ισχαιμική νεφροπάθεια. Η πρόκληση στένωσης με κλιπ της νεφρικής αρτηρίας ποντικών με ένα ή δυο νεφρά, οδηγεί στην ανάπτυξη υπέρτασης και υπερτροφίας της καρδιάς σε διάστημα 2 εβδομάδων μετά τη στένωση[18]. Τέλος, έχουν δημιουργηθεί μοντέλα από υπερέκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία των καρδιομυοκυττάρων (καλμοδουλίνης[19],  $\alpha 1$  αδρογονικός υποδοχέας[20], p21-ras[21], ιντερλευκίνη  $\beta$ [22]) ή και από διαγραφή γονιδίων[23].

#### IV. Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών 21- Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)

##### α. Η Οικογένεια των FGF

Οι Αυξητικοί Παράγοντες των Ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors; FGFs) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος σε διάφορες διεργασίες όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην κυτταρική αγγειογένεση και στην ανάπτυξη. Οι FGFs είναι 22 στο σύνολο, έχουν ενδοκρινή, παρακρινή ή αυτοκρινή ρόλο και είναι διαχωρισμένοι σε 8 μικρότερες οικογένειες ανάλογα με τη λειτουργία τους. Οι οικογένειες είναι οι εξής : FGF1/2, FGF3, FGF4/5/6, FGF7/10/22, FGF8/17/18/24, FGF9/16/20, FGF11/12/13/14 και FGF19/21/23[24]. Φυλογενετικά, τα γονίδια των FGFs απαντώνται σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών. Για παράδειγμα, τέσσερα γονίδια τύπου FGF έχουν περιγραφεί σε σκαθάρια και στη *Drosophila* και κάποια προγονικά γονίδια στο *Caenorhabditis elegans*. Οι γονιδιωματικές αναλύσεις δείχνουν ότι πολλοί FGF προέκυψαν από αναπαραγωγές γονιδίων πριν την εμφάνιση των τετράποδων[25]. Οι περισσότεροι FGFs είναι μικροί, με μοριακό βάρος ανάμεσα στα 17kDa με 34kDa. Πρόκειται για σηματοδοτικές πρωτεΐνες, η μεταγωγή σήματος των οποίων ακολουθεί την πρόσδεσή τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης της πλασματικής μεμβράνης σε συνδυασμό με την παρουσία πρωτεογλυκάνης θειικής ηπαρίνης που ενισχύει την αλληλεπίδραση υποδοχέα-συνδέτη. Γι' αυτό το λόγο, όλοι οι FGFs, εκτός των ορμονικών, διαθέτουν μια περιοχή δέσμησης της ηπαρίνης[26].

Στην τελευταία αναφερθείσα οικογένεια ανήκουν οι FGF19 (FGF15 για ποντίκια), FGF21 και FGF23 που αποτελούν ορμονικά πεπτίδια σηματοδότησης, τα οποία δρουν κυρίως εξωκυτταρικά (ενδοκρινής ρόλος). Χαρακτηρίζονται από μια σχετικά καλά συντηρημένη κεντρική περιοχή 120-130 αμινοξέων, που οργανώνεται σε 12 αντιπαράλληλα β-ελάσματα και δημιουργεί μια τριγωνική δομή



που ονομάζεται β τρίλοβο φύλλο (beta trifoil). Η απουσία περιοχής πρόσδεσης της ηπαρίνης σε αυτήν την οικογένεια, απαιτεί την ύπαρξη ενός ακόμη βοηθητικού υποδοχέα για τη σηματοδότηση.

## β. Δομή

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FGF21 εντοπίστηκε τυχαία το 2000 σε έμβρυο ποντικού χρησιμοποιώντας qRT-PCR με εκκινητές του FGF19[27] καθώς οι δύο ισομορφές παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομολογία αμινοξέων (35%) σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους FGFs. Η ίδια μελέτη κατέδειξε 75% ομολογία αμινοξικής ακολουθίας μεταξύ ανθρώπου και ποντικού.

Στον άνθρωπο, το γονίδιο του FGF21 (ID26291) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (19q13.33) και περιέχει τρία εξόνια που κωδικοποιούν πρωτεΐνη 209 αμινοξέων. Στα ποντίκια το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (ID56636) και η πρωτεΐνη που σχηματίζεται αποτελείται από 210 αμινοξέα. Για τους ανθρώπους έχουν αναφερθεί πάνω από 40 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs), εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι συνώνυμοι. Το γονίδιο του FGF21 στα θηλαστικά διατηρείται σε μεγάλο βαθμό. Πράγματι, υπάρχει μια διαφορά μόνο ενός ή δύο αμινοξέων μεταξύ ανθρώπων και γοριλών ή ανθρώπων και χιμπατζήδων, αντίστοιχα, και υπάρχει σχεδόν 80% ομολογία μεταξύ ανθρώπων και τρωκτικών. Ο FGF21 βρίσκεται επίσης σε άλλα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των ερπετών[26].

Ο FGF21 παράγεται από πολλά όργανα με το ήπαρ να αποτελεί τον κύριο ιστό έκφρασης του FGF21. Μετά την παραγωγή του FGF21, αποκόπτεται μια υδρόφοβη αλληλουχία σήματος 30 αμινοξέων μεταξύ της αλανίνης στη θέση 29 και της τυροσίνης στη θέση 30 του αμινοτελικού άκρου του FGF21, το οποίο οδηγεί στην έκκριση της πρωτεΐνης[27].



**Εικ.2:** Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής του FGF21 όπως αποτυπώθηκε από το PyMOL.

#### γ. Λειτουργίες

Η λειτουργία του FGF21 παρέμενε άγνωστη για αρκετά χρόνια ώσπου η ερευνητική ομάδα του *Kharitonov* ανακάλυψε ότι διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης τόσο σε κυτταρικές σειρές λιποκυττάρων 3T3L1 όσο και σε παχύσαρκα ob/ob ποντίκια με μεσολαβητή τον μεταφορέα γλυκόζης 1 (Glucose Transporter 1; GLUT1)[28]. Μελέτες της ίδιας ομάδας σε διαβητικά ποντίκια ob/ob και db/db αλλά και σε παχύσαρκους αρουραίους ZDF απέδειξαν ότι η χορήγηση FGF21 οδηγεί σε σημαντική μείωση της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων του αίματος καθώς επίσης και σε μείωση των επιπέδων ινσουλίνης κατά τη νηστεία. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο FGF21 δεν προκάλεσε υπογλυκαιμία ή αύξηση βάρους σε οποιαδήποτε δόση κι αν δοκιμάστηκε σε διαβητικά, υγιή ή διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση του γονιδίου. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο FGF21 έχει σημαντικό μεταβολικό ρόλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του διαβήτη. Έκτοτε, διάφορα μοντέλα ζώων έχουν χρησιμοποιηθεί για να διευρυνθεί περαιτέρω ο ρόλος του FGF21 κατά τη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών αλλά και σε διάφορες μεταβολικές ασθένειες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease; NAFLD)[28].

Έχει βρεθεί ότι στα ποντίκια ο FGF21 εκφράζεται στο ήπαρ (κύρια πηγή έκκρισης), στον θυροειδή και τον θύμο αδένα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην καρδιά, στον φαιό και τον λευκό λιπώδη ιστό, στους όρχεις, στο πάγκρεας, στον σκελετικό μυ και άλλους ιστούς. Ωστόσο, η μεγαλύτερη αναλογία του FGF21 που κυκλοφορεί μέσω του αίματος και δρα στους εκάστοτε ιστούς-στόχους αντιστοιχεί στο ηπατικό FGF21. Οι λειτουργίες του FGF21 είναι ποικίλες και καταλυτικής σημασίας κυρίως για το μεταβολισμό και παρατίθενται παρακάτω:

- *Διέγερση της πρόσληψης γλυκόζης*

Όπως προαναφέρθηκε, ο FGF21 προάγει την πρόσληψη γλυκόζης σε λιποκύτταρα μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής και κατά συνέπεια της έκφρασης του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1[28]. Συγκεκριμένα επώαση της κυτταρικής σειράς 3T3-L1 με FGF21 διεγείρει αρχικά την κινάση p44/42 MAPK ή αλλιώς ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated protein Kinase; ERK1/2), η οποία φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα SFR και την Elk-1 (ETS Like-1 protein). Έτσι, οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται, προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου της GLUT1 και τον ενεργοποιούν συνεργιστικά[29]. Η παραχθείσα πρωτεΐνη μεταφέρεται τελικά στη μεμβράνη του κυττάρου, όπου και μεσολαβεί για τη μεταφορά γλυκόζης από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου με τελικό προορισμό την παραγωγή ενέργειας ή την αποθήκευση υπό τη μορφή γλυκογόνου.

- *Αύξηση ευαισθησίας στην ινσουλίνη*

Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης της συνεισφοράς του FGF21 στο ενεργειακό ισοζύγιο, αποδείχθηκε πως ο FGF21 αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη[30]. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που τρέφονταν είτε με κανονική δίαιτα ή με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά και στα οποία είχε τοποθετηθεί αντλία με αισθητήρα των επιπέδων ινσουλίνης και γλυκόζης του αίματος και δυνατότητα έγχυσης γλυκόζης. Στη μέθοδο αυτή διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος και ελέγχεται ο ρυθμός έγχυσης γλυκόζης, που πρόκειται για την γλυκόζη που

μεταβολίζεται συνολικά απ' όλους τους ιστούς, ως μέτρο εκτίμησης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Χορήγηση διαφορετικών δόσεων ανασυνδυασμένου FGF21 έδειξε ότι τα παχύσαρκα ποντίκια που δέχτηκαν υψηλότερη δόση FGF21 μπόρεσαν να επαναφέρουν το ρυθμό εισροής γλυκόζης από την αντλία σε φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που δείχνει αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης του αίματος από τους ιστούς. Παράλληλα, η ομάδα των ποντικίων σε κανονική δίαιτα παρουσίασε περαιτέρω ενισχυμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη[30].

Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο FGF21 βελτιώνει τη συστηματική ευαισθησία στην ινσουλίνη μέσω της υγιούς ανάπτυξης του υποδόριου λιπώδους ιστού (Subcutaneous Adipose Tissue - SAT)[31]. Πιο αναλυτικά, σε παχύσαρκους ανθρώπους που παρουσίαζαν ευαισθησία στην ινσουλίνη, φάνηκε πως υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της περιοχής που κάλυπτε ο υποδόριος λιπώδης ιστός και των επιπέδων πρωτεΐνης του FGF21 στον ορό του αίματος. Σε συνέχεια αυτού του ευρήματος, ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου του FGF21 που ακολουθούσαν δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα παρουσίασαν αντίσταση στην ινσουλίνη και ταυτόχρονα είχαν μικρότερης έκτασης SAT. Για να ελέγξουν αν ο FGF21 σχετίζεται με την αυξημένη ευαισθησία και αν όντως υπάρχει σύνδεση με τον λιπώδη ιστό, χορήγησαν ανασυνδυασμένο FGF21 σε δύο ομάδες ποντικίων, σε παχύσαρκα *Fgf21*<sup>-/-</sup> ποντίκια και σε ποντίκια που είχαν στοχευμένη διαγραφή του γονιδίου του  $\beta$ -klotho στον λιπώδη ιστό. Τα ευρήματα έδειξαν ότι δόσεις ανάλογες των επιπέδων συγκέντρωσης του FGF21 που παρουσιάζονται στην παχυσαρκία, αποκατέστησαν τη μάζα του SAT στην πρώτη ομάδα και αντέστρεψαν την προϋπάρχουσα αντίσταση στην ινσουλίνη. Αντίθετα, τα ποντίκια με έλλειψη έκφρασης του  $\beta$ -klotho παρέμειναν στην ίδια κατάσταση[31].

- *Συντονισμός της κετογένεσης*

Όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση ασιτίας ή νηστείας υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες. Συγκεκριμένα, στο ήπαρ παράγονται κετονοσώματα ( $\beta$ -υδροξυβουτυρικό, ακετοξικό οξύ και ακετόνη) . Οι κετόνες παράγονται κυρίως στα

μιτοχόνδρια των ηπατικών κυττάρων από κετογενικά αμινοξέα (λευκίνη) ή σαν αποτέλεσμα της λιπόλυσης και μπορούν να χαρακτηριστούν ως ενεργειακό καύσιμο. Η κετογένεση σε υγιή άτομα ρυθμίζεται από την AMPK (5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) που ενεργοποιείται σε καταστάσεις μεταβολικού στρες. Έρευνες γύρω από το μηχανισμό της κετογένεσης έχουν δείξει ότι ο FGF21 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίησή της.

Για την αποσαφήνιση της συγκεκριμένης λειτουργίας, μελετήθηκε αν η έκφραση του *Fgf21* στο ήπαρ σχετίζεται και με αντίστοιχη συμμετοχή στις διάφορες διεργασίες του ήπατος[32]. Για το λόγο αυτό, η ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε ποντίκια που τρέφονταν με κετογονική δίαιτα και τα επιμόλυναν με αδενοϊό που περιείχε shRNA με στόχο το γονίδιο του FGF21. Οι αδενοϊοί έχουν υψηλό τροπισμό ως προς το ήπαρ οπότε επιτεύχθηκε η αποσιώπηση του FGF21 στα ηπατοκύτταρα. Η συγκεκριμένη δίαιτα είναι πλούσια σε λίπη και χαμηλή σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες και στοχεύει τη δημιουργία κετονοσωμάτων. Στους παραπάνω ποντικούς παρατηρήθηκε ότι η σίγαση του *Fgf21* οδήγησε σε σημαντική συσσώρευση λιπιδίων (τριγλυκερίδια, χοληστερόλη) στο ήπαρ και στον ορό του αίματος. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα κετονών στον ορό του αίματος ήταν μειωμένα και το ίδιο η ηπατική έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό (ακέτυλο-CoA , υδραξυακυλο-CoA, παλμιτυλοτρανφεράσης 1A της καρνιτίνης, ακυλο-CoA) και την κετογένεση (υδροξυ-μεθυλ-γλουταρυλ-CoA συνθετάση 2, 3-υδροξυβουτυρική διυδρογενάση). Με τα δεδομένα αυτά συμπέραναν πως ο FGF21 είναι βασικός παράγοντας ενεργοποίησης της λιπόλυσης και συμβάλλει επίσης στην ενεργοποίηση του μηχανισμού δημιουργίας κετονικών σωμάτων. Στην ίδια έρευνα εξέτασαν και την περίπτωση ποντικών με υπερέκφραση του γονιδίου *Fgf21* στο ήπαρ, και απέδειξαν πως η συγκέντρωση των κετονών ήταν ιδιαίτερως αυξημένη ενώ παράλληλα τα τριγλυκερίδια στο ήπαρ ήταν μειωμένα[32].

Όπως προαναφέρθηκε, ο FGF21 επάγεται λόγω νηστείας, μέσω ενεργοποίησης του PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferate Activated Receptor  $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ )[33]. Πιο αναλυτικά, σε μελέτη που έχει γίνει διαγραφή του γονιδίου PPAR $\alpha$ , τα επίπεδα mRNA του *Fgf21* στο ήπαρ βρέθηκαν μειωμένα, και η

μείωση αυτή αναστράφηκε μετά την χορήγηση αγωνιστών PPARα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφορικά με τη λειτουργία του FGF21 στην κετογένεση βρέθηκαν με διαγραφή του γονιδίου του σε ποντίκια, η οποία προκάλεσε στεάτωση και αυξημένο σωματικό βάρος όταν αυτά υποβλήθηκαν σε κετογονική δίαιτα[32].

- *Ηπατική γλυκονογένεση*

Σημαντικό είναι το εύρημα ότι ο παράγοντας FGF21 εμπλέκεται στη ρύθμιση της γλυκονογένεσης μέσω της ενεργοποίησης του PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας PPAR[34] και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σχετικών με τη γλυκονογένεση[35],[36], αλλά και με την οξείδωση λιπαρών οξέων[37] και τη βιογένεση μιτοχονδρίων[38]. Συγκεκριμένα, η επαγωγή της έκφρασης δύο γονιδίων που σχετίζονται με τη γλυκονογένεση (φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυκινάση) από τον FGF21, ανακόπηκε σε ποντίκια που είχε διαγραφεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την έκφραση του PGC1α[39]. Αντίστοιχα, σε ποντίκια *Fgf21<sup>-/-</sup>* δεν ήταν δυνατή η πλήρης επαγωγή της έκφρασης του PGC1α στην περίπτωση νηστείας[40]. Τα αποτελέσματα αυτά ανέδειξαν ακόμη ένα μονοπάτι δράσης του FGF21, αυτό της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ, με μεσολαβητή τον PGC1α.

- *Οξείδωση των λιπαρών οξέων*

Έρευνα που βασίστηκε στο βουτυρικό νάτριο και τις ευεργετικές ιδιότητες που εμφανίζει κατά της δυσλιπιδαιμίας και της παχυσαρκίας που προκαλείται από δίαιτα ανέδειξε τη σημασία του FGF21 στο μονοπάτι της οξείδωσης των λιπαρών οξέων[41]. Φυσιολογικά, το βουτυρικό νάτριο ενισχύει την ενεργειακή δαπάνη και τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Παρατηρήθηκε όμως ότι αυτό δεν συμβαίνει σε ποντίκια με διαγραφή του γονιδίου του FGF21. Αντίστοιχα, όταν έγινε ένεση βουτυρικού νατρίου σε παχύσαρκα ποντίκια, αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του FGF21 στο ήπαρ και η συγκέντρωσή του στον ορό των ποντικίων.

Αποδείχτηκε επίσης ότι η έκφραση του FGF21 επάγεται και όταν υπάρχει έλλειψη αμινοξέων. Συγκεκριμένα, κατά την έλλειψη λευκίνης βρέθηκε ότι ο FGF21 καταστέλλει την έκφραση γονιδίων λιπογένεσης στο ήπαρ και στο λευκό λιπώδη ιστό και ενεργοποιεί της φωσφορυλίωση ορμονοευαίσθητης λιπάσης HSL (Hormone Sensitive Lipase; HSL) και κατ' επέκταση τη δραστικότητα της στο λευκό λιπώδη ιστό (White Adipose Tissue; WAT). Σε αυτές τις συνθήκες, με απαλοιφή του γονιδίου του FGF21 είχαν φυσιολογική λιπογένεση στο ήπαρ και στο WAT, μειωμένη φωσφορυλίωση του HSL στο WAT υποδεικνύοντας προβληματική λιπόλυση και αδυναμία επαγωγής της πρωτεΐνης αποσύνδεσης 1 (Uncoupling Protein 1; UCP1) στο φαιό λιπώδη ιστό (Brown Adipose Tissue; BAT). Επομένως, η ορμόνη FGF21 που είναι σημαντική για την προσαρμογή στην πείνα, επάγεται και από τη στέρηση αμινοξέων με στόχο την ομαλή οξειδωση των λιπαρών οξέων[42].

Στις ιδιότητες του FGF21 που σχετίζονται με τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού έρχεται να προστεθεί και η ενεργοποίηση του μονοπατιού AMPK-SIRT1-PGC1α. Ο FGF21 συνδέεται στους αντίστοιχους υποδοχείς κινάσης των λιποκυττάρων (Liver Kinase B1; LKB1). Πρόσδεση στον LKB1 ενεργοποιεί τις ERK1 και 2 και στη συνέχεια αυξάνεται η δραστικότητα της AMPK (5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) και της SIRT1 (Sirtuin 1). Αυτό οδηγεί σε αύξηση του λόγου NAD<sup>+</sup>/NADH με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της SIRT1 και την αποακετυλίωση του PGC-1α και της Ιστονής 3 (Histone 3; H3). Η ενεργοποίηση αυτών των μεταβολικών αισθητήρων έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της μιτοχονδριακής οξειδωτικής λειτουργίας (αύξηση έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων και πρωτεϊνών)[43].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα βρίσκεται και η έρευνα των *Coskun et al.*[44], σύμφωνα με την οποία συστηματική χορήγηση του FGF21 για 2 εβδομάδες σε ποντίκια ob/ob και σε αγρίου τύπου ποντίκια που είναι παχύσαρκα λόγω δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά (Diet-Induced Obesity; DIO) ελάττωσε το σωματικό τους βάρος κατά 20% κυρίως μέσω της μείωσης του λίπους. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μείωση της συνολικής πρόσληψης θερμίδων ή αλλαγή στη σωματική δραστηριότητα των ζώων. Τα

ποντίκια αυτά εμφάνισαν αυξημένη ενεργειακή δαπάνη, προσάρμοσαν τον μεταβολισμό τους στην αυξημένη πρόσληψη λιπαρών οξέων, είχαν μειωμένη ηπατική στεάτωση και επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Αναδείχθηκε η ικανότητα του FGF21 να βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη λεπτίνη και να ενισχύει την οξείδωση του λίπους, καθιστώντας τον FGF21 υποψήφιο στόχο για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και της λιπώδους διήθησης του ήπατος.

- *Αύξηση ενεργειακής δαπάνης*

Η ενεργειακή ομοιόσταση στα θηλαστικά είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία που περιλαμβάνει εισαγωγή θερμίδων και ενεργειακή δαπάνη. Διαταραχή του ισοζυγίου υπέρ του κέρδους σε θερμίδες οδηγεί σε παχυσαρκία. Το υπερβολικό βάρος αποτελεί πρόβλημα καθώς μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες όπως Διαβήτης Τύπου 2, καρδιαγγειακές παθήσεις, μη αλκοολική λιπώδης διήθηση ήπατος, αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνων όπως καρκίνος του μαστού και του εντέρου, και επιπλέον αυξάνει τον κίνδυνο θνησιμότητας ατόμων με καρκίνο[45],[46]. Διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και ο FGF21, συμμετέχουν στη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης. Ειδικότερα, μελέτη σε ποντίκια με παχυσαρκία λόγω δίαιτας έδειξε πως η χορήγηση FGF21 μείωσε το σωματικό βάρος τους χωρίς να επηρεάσει την κατανάλωση τροφής, ενώ παράλληλα αύξησε σημαντικά την ενεργειακή δαπάνη και τη σωματική τους δραστηριότητα. Με έμμεση θερμιδομετρία υπολόγισαν την κατανάλωση O<sub>2</sub> και την παραγωγή CO<sub>2</sub> ώστε να μπορούν να εκτιμήσουν και τον ρυθμό κατανάλωσης θρεπτικών συστατικών για την παραγωγή ενέργειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα παραπάνω είχαν δόσοεξαρτώμενη αύξηση στα ποντίκια που ακολουθούσαν θεραπεία με FGF21[30].

- *Μετατροπή λευκού λιπώδους ιστού σε φαιό και ενεργοποίηση θερμογένεσης*

Ο FGF21 συμμετέχει, επίσης, στη μετατροπή του λευκού λιπώδους ιστού σε φαιό και στην προσαρμοστική θερμογένεση μέσω της ρύθμισης του PGC-1α [47]. Ο λευκός λιπώδης ιστός χαρακτηρίζεται από μεγάλα σε μέγεθος λιποκύτταρα που περιλαμβάνουν μία κοιλότητα μέσα στην οποία αποθηκεύονται λιπίδια κατά κύριο λόγο υπό τη μορφή τριγλυκεριδίων. Σε συνθήκες αιτίας ή



νηστείας, τα λιποκύτταρα ελευθερώνουν λιπαρά οξέα για την παραγωγή ενέργειας. Ο φαιός λιπώδης ιστός διαθέτει μικρότερα κύτταρα με πολλαπλές κοιλότητες αποθήκευσης λιπιδίων και βασική του λειτουργία είναι η παραγωγή θερμότητας. Ορισμένες αποθήκες του λευκού λιπώδους ιστού μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε φαιά ύστερα από εκτεταμένη έκθεση στο κρύο ή σε κατεχολαμίνες που ενεργοποιούν β-αδρενεργικούς υποδοχείς. Αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκφραση της UCP1 στα λιποκύτταρα και εξυπηρετεί στην αύξηση της θερμογενετικής ικανότητας του οργανισμού. Ειδικότερα, έρευνα[47] έδειξε πως ο FGF21 που προέρχεται από τον λιπώδη ιστό δρα με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο για να αυξήσει την έκφραση της UCP1 και άλλων θερμογόνων γονιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται μερικώς με την αύξηση έκφρασης του PGC-1α που είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής του οξειδωτικού μεταβολισμού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο FGF21 δεν ρυθμίζει τα επίπεδα mRNA του PGC-1α αλλά αυξάνει την περιεκτικότητα αυτής της βασικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης του λιπώδους ιστού σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Έχει βρεθεί ότι ο PGC-1α επάγεται σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια έκθεσης στο κρύο[48] και ενεργοποιεί ταυτόχρονα πολλούς από τους παράγοντες μεταγραφής του DNA που απαιτούνται για τη θερμογένεση, όπως τους PPARα, PPARγ και ERRα. Η UCP1 με τη σειρά της εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου αποσυνδέει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και τη δημιουργία δυναμικού της μεμβράνης από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ATP, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση χημικής ενέργειας σε μορφή θερμότητας. Επομένως, ο FGF21 ενεργοποιεί τους θερμογόνους μηχανισμούς ώστε να παρέχει ισχυρή άμυνα ενάντια στην υποθερμία. Ποντίκια με ανεπάρκεια στον FGF21 αδυνατούν να προσαρμοστούν στη χρόνια έκθεση στο κρύο και ο ρυθμός μετατροπής των λευκών λιποκυττάρων σε φαιά είναι αισθητά μειωμένος[47].

- *Αντιφλεγμονώδης ρόλος*

Οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως είδαμε, οδηγούν σε συσσώρευση τριγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων στο ήπαρ που μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή και ίνωση και

τελικά μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic Steatohepatitis-NASH). Τα επίπεδα FGF21 στο αίμα αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) ή NASH[49]. Με αυτό το δεδομένο, μελετήθηκε ο ρόλος του FGF21 στην εξέλιξη της λιπώδης νόσου που προκαλείται σε ποντίκια όταν υπόκεινται σε δίαιτα με έλλειψη στη μεθειονίνη και τη χολίνη (Methionine and Choline Deficient; MCD)[50]. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα ποντίκια σε MCD είχαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA στο ήπαρ αλλά και αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης του FGF21 στο πλάσμα σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου που ακολουθούσαν κανονική διατροφή. Επιπρόσθετα, ποντίκια knockout για το γονίδιο *Fgf21* παρουσίαζαν πιο έντονα και σοβαρά συμπτώματα στεάτωσης, ίνωσης και φλεγμονής στο ήπαρ συγκριτικά με ποντίκια αγρίου τύπου. Επαναλαμβανόμενες υποδόριες εγχύσεις FGF21 βελτίωσαν την παθολογία της στεάτωσης και μείωσαν αισθητά τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη φλεγμονής και ίνωσης στο ήπαρ. Σε αυτή τη μελέτη λοιπόν, επαληθεύτηκε για άλλη μια φορά ότι η παρουσία του FGF21 είναι καταλυτικής σημασίας για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στο ήπαρ ενώ παράλληλα μεσολαβεί στην καταπολέμηση της φλεγμονής και της στεάτωσης.

Η παγκρεατίτιδα αποτελεί ακόμα μια περίπτωση φλεγμονής και σχετίζεται με πρόωρη ενεργοποίηση και δράση των πεπτικών ενζύμων του παγκρέατος που τελικά οδηγεί σε βλάβη του ιστού. Σε σχετική έρευνα συνέλεξαν δείγματα από ανθρώπους και ποντίκια με οξεία ή χρόνια παγκρεατίτιδα και απέδειξαν ότι παρουσίαζαν απώλεια έκφρασης παγκρεατικού *Fgf21*[51]. Η ομάδα έδειξε με ιστολογική ανάλυση πως, σε τρία διαφορετικά μοντέλα παγκρεατίτιδας ποντικών, η θεραπευτική αγωγή με ανασυνδυασμένο FGF21 μείωσε σημαντικά το παγκρεατικό οίδημα, τη φλεγμονή και τη νέκρωση κυττάρων του παγκρεατικού ιστού. Συνεπώς, ο FGF21 έχει αντιφλεγμονώδη δράση στο πάγκρεας και προστατεύει έναντι της παγκρεατίτιδας.

Έχει αποδειχθεί επίσης πως ο FGF21 έχει αντιφλεγμονώδη δράση και στους σκελετικούς μύες. Η παχυσαρκία, χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών στους σκελετικούς μύες όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ; TNF $\alpha$ ) και η ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6; IL-6). Οι *Chu-Sook Kim et al.* ερεύνησαν ποντίκια που τρέφονταν με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά και τους είχε γίνει ολική σίγαση του γονιδίου του FGF21[52]. Παρατήρησαν ότι τα παχύσαρκα *FGF21<sup>-/-</sup>* ποντίκια παρουσίαζαν αυξημένη παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών TNF $\alpha$  και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων (Monocyte Chemoattractant Protein-1; MCP-1) σε σύγκριση με παχύσαρκα ποντίκια αγρίου τύπου ενώ, παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της AMPK στους σκελετικούς μύες των παχύσαρκων *FGF21<sup>-/-</sup>* ποντικίων. Επομένως, η ανεπάρκεια στον FGF21 επιδείνωσε τη φλεγμονή των σκελετικών μυών που είχε προκληθεί από την παχυσαρκία. Απεναντίας, η επώαση μυοκυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12 με FGF21 και TNF $\alpha$  μείωσε αισθητά τις φλεγμονώδεις και ατροφικές αποκρίσεις που προκύπτουν φυσιολογικά από τη δράση του TNF $\alpha$  και αύξησε τη φωσφορυλίωση της AMPK σε αναλογία με την επιλεγμένη δόση του FGF21. Τελικώς, διαπίστωσαν ότι η προστατευτική δράση του FGF21 διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της AMPK. Σε αυτή την έρευνα επιβεβαιώθηκε, για ακόμα μία φορά, ότι ο FGF21 συνδέεται με την εξέλιξη της φλεγμονής καθώς έχει την ικανότητα να μετριάζει τις επιπτώσεις της[52].

Είναι άξιο αναφοράς ότι η αντιφλεγμονώδης δράση του FGF21 εμφανίζεται και στην καρδιά. Συγκεκριμένα, σε έρευνα που διεξήχθη γύρω από τις επιδράσεις του FGF21 στη καρδιομυοπάθεια που προκαλείται από χορήγηση δοξορουβικίνης (Doxorubicin; DOX) αποδείχτηκε ότι έχει αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντιαποπτωτική δράση[53]. Αρχικά, δημιούργησαν μοντέλα καρδιοτοξικότητας με χορήγηση δοξορουβικίνης σε κυτταρικές σειρές αλλά και σε ποντίκια. Τα ποντίκια παρουσίαζαν καρδιακή δυσλειτουργία και βλάβες λόγω δημιουργούμενης φλεγμονής και ύπαρξης οξειδωτικού στρες. Η έκθεση σε αυξανόμενες δόσεις DOX συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων mRNA των TNF $\alpha$  και IL-6. Η θεραπεία με FGF21 εξασθένησε την καρδιακή δυσλειτουργία και κατέστειλε σημαντικά την

έκφραση αυτών των φλεγμονωδών κυτοκινών. Εμβαθύνοντας στα μονοπάτια δράσης του FGF21 βρέθηκε ότι ενισχύει τη σύνδεση της σιρτουίνης 1 (Sirtuin 1; SIRT1) με την ηπατική κινάση 1 (Liver Kinase 1; LKB1). Αυτή η σύνδεση έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ακετυλίωσης της LKB1 και τη μεταγενέστερη ενεργοποίηση της AMPK. Εν κατακλείδι, ο FGF21 δρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού SIRT1/LKB1/AMPK καταστέλλοντας τη φλεγμονή και αποτρέπει την καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη[53].

Η αύξηση προ-φλεγμονωδών δεικτών στην καρδιά είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας. Σε ποντίκια *Fgf21<sup>-/-</sup>* και σε ποντίκια ελέγχου με προκαλούμενη υπερτροφία από χορήγηση Ισοπροτερενόλης, αποδείχτηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των προ-φλεγμονωδών δεικτών IL-6 και TNFα ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με αντίστοιχες ομάδες ελέγχου υγιών ποντικών. Επιπλέον, η δραστηριότητα του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (Nuclear Factor-kappa B;NF-κB), που είναι επαγωγέας προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών[54], ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στα ποντίκια *Fgf21<sup>-/-</sup>* με υπερτροφία[55].

#### δ. Κυτταρική Σηματοδότηση

Ο μοριακός μηχανισμός σηματοδότησης του FGF21 είναι περίπλοκος καθώς περιλαμβάνει αρκετούς υποδοχείς των FGFs (FGF Receptors; FGFRs) και έναν υποχρεωτικό υποδοχέα, τον β-klotho (KLB). Ο FGF21 συνδέεται με τους υποδοχείς FGFR με εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια. Για ν' αυξηθεί η ικανότητα σύνδεσης απαιτείται η αλληλεπίδραση με τον β-klotho , με τον οποίο σχηματίζεται ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο που ενισχύει τη σύνδεση και τη μεταγωγή σήματος[56]. Η έκφραση του β-klotho από έναν ιστό τον καθιστά πιθανό ιστό-στόχο της δράσης του FGF21[57].

Τέσσερα γονίδια FGFR (FGFR1-4) έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπους και ποντίκια. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν υποδοχείς κινασών τυροσίνης (800 αμινοξέα) και διαθέτουν μια εξωκυτταρική

περιοχή για την πρόσδεση του συνδέτη με τρία τμήματα ανοσοσφαιρίνων (I, II και III), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή κινάσης τυροσίνης. Οι FGFR1-3 κωδικοποιούν δυο διαφορετικές μορφές του τμήματος ανοσοσφαιρίνης III (IIIb IIIc) που προκύπτει από εναλλακτικό mRNA splicing που συμβαίνει στο ένα από τα δύο εξώνια. Το τμήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό για τον καθορισμό της ειδικότητας ως προς την πρόσδεση του συνδέτη[58]. Από τα τέσσερα γονίδια που έχουν περιγραφεί στα σπονδυλωτά προκύπτουν 7 FGFR πρωτεΐνες, οι οποίες διαφέρουν ως προς το τμήμα πρόσδεσης του συνδέτη (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c, και 4)[59, 60].

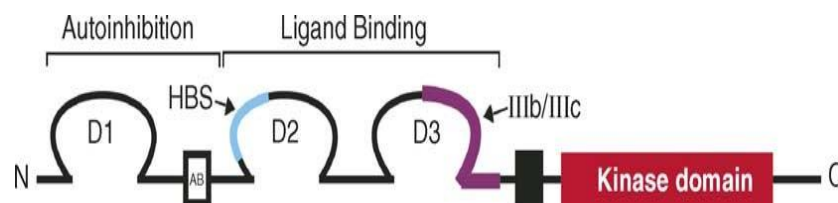
Ο FGF21 ενεργοποιεί τους FGFR1c, -2c, -3c και -4, έχοντας τη μεγαλύτερη συγγένεια με τον FGFR1c. Το καρβοξυτελικό άκρο του FGF21 δεσμεύεται από τον KLB ενώ το αμινοτελικό άκρο από τους τομείς D2 και D3 του FGFR1 που είναι παρόμοιοι με αυτούς των ανοσοσφαιρινών[61],[62]. Επομένως, για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο στην κυτταρική μεμβράνη και να ενεργοποιηθεί ο FGFR πρέπει και τα δύο άκρα του FGF21 να είναι ελεύθερα . Τα ποντίκια που έχουν υποστεί γενετική διαγραφή του KLB δεν ανταποκρίνονται στις φαρμακολογικές δράσεις του FGF21 ούτε όταν χρησιμοποιούνται πειραματικά μοντέλα διαγονιδιακών ζώων ούτε στην περίπτωση της εξωγενούς θεραπείας με εγχύσεις[63],[64]. Επίσης, σε ανεξάρτητη έρευνα όπου είχε διαγραφεί το γονίδιο *Fgfr1* στον λιπώδη ιστό των ποντικών, αποδείχθηκε πως ο FGFR1 είναι ο βασικός αλλά όχι αποκλειστικός υποδοχέας σύνδεσης του FGF21 καθώς φαίνεται να εξασθενούν πολλές, αλλά όχι όλες, οι μεταβολικές φαρμακολογικές δράσεις του FGF21 εν τη απουσία του[65].

Στα ποντίκια, ο KLB εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στον υπερχιασματικό πυρήνα (suprachiasmatic nucleus-SCN) και στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Έχει δειχθεί επίσης ότι εκφράζεται και στον ιστό της καρδιάς. Οπότε, οι συγκεκριμένοι ιστοί αποτελούν πιθανές θέσεις δράσεις του FGF21.

Όπως γίνεται με τις περισσότερες ισομορφές του FGF, ο FGF21 ενεργοποιεί την κυτταρική σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των Ras/Raf κινασών MAP (MAPK). Κατά την αλληλεπίδραση συνδέτη-υποδοχέα, ο FGFR διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνει τα αμινοξέα τυροσίνης του υποδοχέα. Ακολουθεί πρόσδεση και ενεργοποίηση του υποστρώματος 2α του υποδοχέα (FGFR substrate 2 alpha; FRS2α). Το FRS2α ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK μέσω της στρατολόγησης διαφόρων μορίων προσαρμογής. Οι κινάσες ERK1 και ERK2 (extracellular signal-related kinase) είναι κρίσιμες για τη σηματοδότηση των FGF καθώς ξεκινούν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων[26].

Το β-klotho μαζί με τον FGFR1 ή FGFR2 σχηματίζουν σύμπλοκο, το οποίο ενεργοποιείται με τη σύνδεση του FGF21. Τα αποτελέσματα που προκαλούνται από τον FGF21 δεν εξαρτώνται από την ηπαρίνη γεγονός που υποδηλώνει ότι ο β-klotho έχει ρόλο στη δραστηριότητα αυτής της ορμόνης παρόμοιο με αυτόν της ηπαρίνης στις περιπτώσεις των συμβατικών FGFs[56].

Ο FGF21 αλληλεπιδρά με την περιοχή D2D3 του FGFR1c. Η περιοχή σύνδεσης D1 κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των FGF21/FGFR1c και FGFR1c/β-klotho. Η περιοχή D1 αποτρέπει την άμεση σύνδεση του FGF21 στον FGFR1c έτσι ώστε να μην υπάρχει ενεργοποίηση του υποδοχέα απουσία του β-klotho. Αυτό είναι σημαντικό εφόσον η ενεργοποίηση του υποδοχέα συμβαίνει μόνο στους ιστούς που εκφράζουν και το συν-υποδοχέα. Επειδή το β-klotho δε διαθέτει τμήμα στο εσωτερικό του κυττάρου, η ενδοκυττάρια σηματοδότηση που ενεργοποιείται από τον FGF21 μεσολαβείται από τον FGFR. Ο β-klotho φέρνει κοντά τα δύο αυτά στοιχεία και συνεργάζεται με τον FGF21 για να ανοίξει την περιοχή των D2D3 ώστε η ορμόνη να μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα, να



**Εικ.3:** Σχηματική αναπαράσταση του FGFR. Με N και C χαρακτηρίζεται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα. Το τμήμα σύνδεσης της ηπαρίνης (HBS) είναι χρωματισμένο γαλάζιο. Το κομμάτι του τομέα D3 που γίνεται το εναλλακτικό splicing είναι χρωματισμένο μωβ. Φαίνεται επίσης η περιοχή που πραγματοποιείται η σύνδεση με τον συνδέτη[1].

προκαλέσει τον διμερισμό του και να ενεργοποιήσει τη σηματοδότηση[66].

#### ε. Ιστοί Στόχοι

Οι ορμόνες δρουν μόνο σε ορισμένα όργανα τα οποία ονομάζονται όργανα-στόχοι. Η αιτία γι' αυτήν την εξειδίκευση οφείλεται σε ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του οργάνου-στόχου και αναγνωρίζουν τη συγκεκριμένη ορμόνη. Η πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα προκαλεί μια σημαντική αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης και μέσω αυτής ενεργοποιούνται χημικές μεταβολές με τελικό αποτέλεσμα την αλλαγή της λειτουργίας του κυττάρου. Στην περίπτωση των πεπτιδορμονών, η αλληλεπίδραση ορμόνης-υποδοχέα ενεργοποιεί το ένζυμο αδενοσυλική κυκλάση. Με τη δράση αυτού του ενζύμου παράγεται η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic Adenosine Monophosphate; cAMP) η οποία δρα ενδοκυτταρικά ως δεύτερο μήνυμα, ενεργοποιώντας μια σειρά ενζύμων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό.

- *Ήπαρ*

Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο FGF21 που κυκλοφορεί στο αίμα είναι ηπατικής προέλευσης κατά το μεγαλύτερο ποσοστό[27]. Έχει δειχθεί ότι η σίγαση του γονιδίου στο ήπαρ έχει σαν αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος[67]. Η έκφραση του *Fgf21* ρυθμίζεται από τον PPARα[33],[68] και αυξάνεται σε περιπτώσεις νηστείας και σε καταστάσεις που συνοδεύονται από συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ. Στις βασικές λειτουργίες του FGF21 στο ήπαρ ανήκουν η ρύθμιση της παραγωγής κετονοσωμάτων, η οξείδωση των λιπαρών οξέων και η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη[33],[40],[44],[68]. Επιπλέον, δρα προστατευτικά κατά της στεάτωσης και της φλεγμονής του ήπατος και η δράση του είναι άμεσα συνδεδεμένη με αυτή της SIRT1 και του PGC-1α[40],[69],[70].

Απεναντίας, ποντίκια που δεν εκφράζουν τον FGF21 στο ήπαρ εμφανίζουν σοβαρές επιπλοκές στον ενεργειακό μεταβολισμό, κερδίζουν βάρος, αποτυγχάνουν να αυξήσουν τις ενεργειακές δαπάνες και παρουσιάζουν μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων. Η διαγραφή του γονιδίου συνάδει με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως ίνωση, στεάτωση και μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος[32],[30],[42],[41],[71].

- *Λιπώδης Ιστός*

Ο Kharitonov και η ομάδα του μελέτησαν τη δράση του FGF21 στα λιποκύτταρα (σειρά 3T3-L1) και έδειξαν πως διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης με μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της ινσουλίνης[28]. Στην ίδια σειρά λιποκυττάρων έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και το ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου μέσα από ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει το σύμπλοκο AMPK-SIRT1, το οποίο οδηγεί σε σταδιακή ακετυλίωση και ενεργοποίηση του PGC-1α[43].

Τα επίπεδα έκφρασης του β-klotho είναι πολύ υψηλά στον λιπώδη ιστό[39]. Έρευνες σε ποντίκια έχουν δείξει πως ο λιπώδης ιστός είναι πηγή έκφρασης και έκκρισης FGF21 αλλά η εκκρινόμενη πρωτεΐνη στο συγκεκριμένο ιστό έχει κυρίως αυτοκρινή ή παρακρινή ρόλο[72],[73]. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες είναι και η πρόσφατη κλινική έρευνα των *Marleen van Baak et al.* που παρατήρησαν ότι, σε παχύσαρκους ασθενείς που ακολούθησαν διαφορετικές δίαιτες και αδυνάτισαν μέσω της διατροφής τους, η παραγωγή του FGF21 από τον υποδόριο λιπώδη ιστό δεν συνεισφέρει στα επίπεδα κυκλοφορικού FGF21[74]. Η έκφραση του FGF21 στο λιπώδη ιστό επάγεται από τον PPARγ[75].

Αρκετές μελέτες έχουν επισημάνει τη θετική συσχέτιση μεταξύ του FGF21 και της αδιπονεκτίνης. Ειδικότερα, ποντίκια που είναι είτε παχύσαρκα ή αδύνατα κι έχουν ανεπάρκεια στον FGF21 επιδεικνύουν πολύ χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης στον ορό του αίματός τους[76],[77]. Η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται στον λιπώδη ιστό και εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της



γλυκόζης και στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων. Περαιτέρω έρευνες σχετικά με τις επιδράσεις στην έκφραση της αποκάλυψαν ότι ο FGF21 ενισχύει την έκφραση της αδιπονεκτίνης τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης[77],[76]. Τα ποντίκια που δεν εκφράζουν αδιπονεκτίνη (*Adipoq*<sup>-/-</sup>) έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα[76]. Συνεπώς, η αδιπονεκτίνη συμμετέχει στις μεταβολικές επιδράσεις του FGF21.

Έχει δειχθεί ακόμη ότι ο FGF21 έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λιπόλυσης, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Σύμφωνα με την έρευνα των *Inagaki et al.*, επώαση λιποκυττάρων της σειράς 3T3-L1 με FGF21 (0.5nM), αύξησε την έκκριση γλυκερόλης[68]. Η ανίχνευση γλυκερόλης στα λιποκύτταρα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη λιπόλυση. Οι ερευνητές βρήκαν πως τα επίπεδα έκκρισης της γλυκερόλης αυξήθηκαν σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης σε FGF21 (1-10 ώρες) συγκριτικά με καλλιέργειες κυττάρων που επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο. Αντιθέτως, δύο άλλες μελέτες παρουσίασαν τον FGF21 ως καταστολέα αυτής της διαδικασίας[78],[79]. Τα αποτελέσματα της *in vitro* έρευνας των *Li et al.* σε πρωτεύοντα λιποκύτταρα ποντικών και σε λιποκύτταρα της σειράς 3T3-L1, έδειξαν πως σύντομη θεραπεία με FGF21 (4 ώρες) μείωσε αισθητά την έκκριση γλυκερόλης και στις δύο σειρές κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Επιπλέον, κατέστειλε τη συνολική δραστηριότητα της λιπάσης. Οι ερευνητές προσδιόρισαν επίσης και τα επίπεδα συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids;FFA) στο πλάσμα ποντικών αγρίου τύπου και *ob/ob* μετά τη χορήγηση δόσης FGF21 (5mg/kg). Στα ποντίκια αγρίου τύπου παρατηρήσανε ταχεία μείωση των FFAs στα 30 λεπτά μετά τη χορήγηση του FGF21 και αντίστοιχα στα *ob/ob* στο πέρας της 1 ώρας. Επιπλέον, είδαν πως τα επίπεδα των FFAs μειώνονταν σε αναλογία με την αύξηση της δόσης του FGF21[79]. Ανεξάρτητη έρευνα σε πρωτεύοντα ανθρώπινα λιποκύτταρα έδειξε πως η επώαση των κυττάρων με FGF21 μείωσε τα επίπεδα της λιπόλυσης. Συγκεκριμένα, κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες με FGF21 (150nM) ή με βασικό θρεπτικό μέσο και ακολούθησαν πλύσεις και επώαση με νοραδρεναλίνη, φροσκολίνη ή θρεπτικό μέσο (2 ώρες) ώστε να προκύψουν 6 ομάδες μελέτης. Η

νοραδρεναλίνη και η φροσκολίνη χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα επαγωγής της λιπόλυσης και οδήγησαν σε έντονη αύξηση της γλυκερόλης στις καλλιέργειες των κυττάρων που είχαν επωαστεί με βασικό θρεπτικό μέσο. Αντιθέτως, στις καλλιέργειες με τον FGF21 η δραστηριότητα της νοραδρεναλίνης και της φροσκολίνης περιορίστηκε και η συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν αισθητά πιο χαμηλή[78].

Απαιτείται, επομένως, περαιτέρω έρευνα για τον καθορισμό του ρόλου του FGF21 στη ρύθμιση της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό αλλά είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα εκάστοτε αποτελέσματα προέκυψαν ύστερα από χορήγηση διαφορετικής συγκέντρωσης FGF21, χρόνο διεξαγωγής και πειραματική διαδικασία.

Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η θερμογένεση αποτελεί μία ακόμα διεργασία που συμβαίνει στον λιπώδη ιστό και ρυθμίζεται από τον FGF21. Μετά την ενεργοποίηση της θερμογένεσης ο φαιός λιπώδης ιστός γίνεται πηγή συστημικού FGF21. Στη θερμογένεση βασικός μεσολαβητής είναι η UCP1, η έκφραση της οποίας ενισχύεται από τον FGF21. Η UCP1 εμπλέκεται και στη μετατροπή του λευκού λιπώδους ιστού σε φαιό που λειτουργεί σαν προσαρμοστική απόκριση στο στρες καθώς και σαν θερμογενής απόκριση στο κρύο [47].

- *Κεντρικό νευρικό σύστημα*

Στους ανθρώπους, ο FGF21 έχει ανιχνευθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cerebrospinal fluid; CSF) σε συγκεντρώσεις που είναι ανάλογες με τα επίπεδά του στον ορό[80]. Επίσης, οι υποδοχείς FGFR1, FGFR2 και FGFR3 εκφράζονται στον εγκέφαλο όπως και το β-klotho, οπότε ο εγκέφαλος αποτελεί ιστό στόχο. Ακόμη, ο FGF21 φαίνεται να επηρεάζει την κερκάρια περιοδικότητα καθώς και τη γονιμότητα, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση δράση του FGF21 στο ΚΝΣ[81],[82].

Έρευνα με ενδοκρανιακή έγχυση FGF21 σε παχύσαρκους, λόγω δίαιτας, αρουραίους επιβεβαίωσε πως το ΚΝΣ αποτελεί ιστό-στόχο και πως δυνητικά μπορεί να θεωρηθεί στόχος για τη θεραπεία του

διαβήτη και της παχυσαρκίας εφόσον συμβάλλει στην εκδήλωση των ευεργετικών ιδιοτήτων του FGF21. Οι αρουραίοι που έλαβαν FGF21 σημείωσαν αυξημένη πρόσληψη τροφής που αντισταθμίζονταν από υψηλότερη ενεργειακή δαπάνη και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη χωρίς ωστόσο να αλλάξει η περιεκτικότητα του σωματικού τους λίπους[83].

- *Πάγκρεας*

Η έκκριση του παγκρεατικού FGF21 είναι άμεσα συνδεδεμένη με παθολογικές καταστάσεις του ιστού όπως για παράδειγμα με την παγκρεατίτιδα[51],[84],[85]. Πρώτος, ο *Johnson et al.*, έκανε λόγο για μεσολάβηση του FGF21 στην προστασία του παγκρεατικού ιστού από την οξεία βλάβη κατά τη διάρκεια παγκρεατίτιδας[84]. Το πάγκρεας δημιουργεί την ορμόνη ινσουλίνη που βοηθάει στην ισορροπία του σακχάρου στο αίμα και εκκρίνει επίσης ένζυμα τα οποία απελευθερώνονται στο λεπτό έντερο για να βοηθήσουν στην πέψη. Η ρύθμιση της παραγωγής και έκκρισης αυτών των ενζύμων είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης του οργανισμού. Η παγκρεατίτιδα χαρακτηρίζεται από την πρόωρη ενεργοποίηση των πεπτικών ενζύμων που καταλήγει στη δημιουργία φλεγμονής, ίνωσης και τελικά στη βλάβη του ιστού. Για να προσδιορίσει τον ρόλο του FGF21 στην προκειμένη πάθηση χρησιμοποίησε αρχικά δύο ομάδες ποντικών. Η μία ομάδα υπέστη παγκρεατίτιδα με τη χορήγηση L-arginine (Cerulein-Induced Pancreatitis; CIP) και η ομάδα ελέγχου έλαβε φυσιολογικό ορό (saline). Η ανάλυση φανέρωσε σημαντική αύξηση της έκφρασης του FGF21 στο πάγκρεας με το μέγιστο να σημειώνεται στα 60 λεπτά μετά την πρόκληση της παγκρεατίτιδας, συγκριτικά με τα ποντίκια ελέγχου. Στη συνέχεια, εφάρμοσαν το μοντέλο της παγκρεατίτιδας σε δύο διαφορετικές σειρές ποντικών, σε ποντίκια με υπερέκφραση του *Fgf21 (FGF21Tg)* και ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου του FGF21. Η ιστολογική ανάλυση παγκρεατικού ιστού έδειξε πως τα knock out ποντίκια είχαν αναπτύξει ιδιαίτερα έντονο οίδημα και σημεία νέκρωσης σε σύγκριση με τα *FGF21Tg* όπου η βλάβη του ιστού δεν ήταν τόσο σοβαρή. Επιπλέον, η ανάλυση της συγκέντρωσης δεικτών που

σχετίζονται με τα στάδια που χαρακτηρίζουν την παγκρεατίτιδα (αμυλάση στον ορό του αίματος, φωσφορυλιωμένη κινάση JNK, ιντερλευκίνη-6 στο πλάσμα) οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο FGF21 έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της βλάβης των ιστών από την προκαλούμενη παγκρεατίτιδα.

Ανεξάρτητη έρευνα έδειξε ότι η δράση του FGF21 στο πάγκρεας έχει αυτοκρινή και παρακρινή χαρακτήρα[85]. Ιστολογική ανάλυση σε ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια knockout για το γονίδιο *Fgf21*, που βρίσκονταν σε νηστεία ή σε περίοδο με κανονική παροχή τροφής, έδειξε ότι τα επίπεδα της αμυλάσης και της λιπάσης ήταν αυξημένα στα knock out ποντίκια. Χορήγηση ανασυνδυασμένου FGF21 μείωσε τα επίπεδα συγκέντρωσης των πεπτικών ενζύμων του παγκρέατος και στις δύο ομάδες ποντικίων. Στην περίπτωση χορήγησης διαλύτη του φαρμάκου, τα knock out ποντίκια συνέχισαν να έχουν υψηλά επίπεδα. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης του FGF21 στο πάγκρεας αυξήθηκαν όταν χορηγήθηκε ξανά τροφή στα ποντίκια, ενώ το αντίθετο συνέβη στα επίπεδα της πρωτεΐνης του πλάσματος. Τα αποτελέσματα αυτά ήρθαν σε συμφωνία με προϋπάρχουσες έρευνες που γνωστοποίησαν πως κύρια πηγή έκκρισης του κυκλοφορικού FGF21 είναι το ήπαρ και πως η έκφραση του επάγεται κατά τη νηστεία και καταστέλλεται όταν υπάρχει κανονική παροχή τροφής. Επομένως, συμπέρανε πως ο FGF21 στο πάγκρεας δρα με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο για τη μείωση των επιπέδων συγκέντρωσης των πεπτικών ενζύμων.

Μεταγενέστερη έρευνα έδειξε ότι ποντίκια FGF21 KO που ακολουθούσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά παρουσίαζαν σοβαρή υπερπλασία στις νησίδες του παγκρέατος συνοδευόμενη από φλεγμονή αυξημένα επίπεδα έκφρασης των φλεγμονωδών κυτοκινών TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  και IL1 $\beta$  στα λεμφοκύτταρα. Ανακαλύφθηκε ότι ο FGF21 περιορίζει την υπερπλασία των νησιδίων του παγκρέατος, που έχει προκύψει από δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, καθώς και ότι αποτρέπει την προκαλούμενη φλεγμονή[86]. Σημαντική παρατήρηση ήταν ότι η έκφραση του FGF21 ήταν χαμηλή στο πάγκρεας κατά τη διάρκεια νηστείας, ενώ σε κατάσταση παχυσαρκίας σημείωσε εμφανή αύξηση. Συμπέραναν, λοιπόν, πως το παγκρεατικό FGF21 ρυθμίζεται από τη διατροφή.

- *Σκελετικός Μυς*

Ο FGF21 στο σκελετικό μυ εκκρίνεται κυρίως σαν απόκριση σε κυτταρικό στρες όπως αυτό που προκαλεί η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία[87]. Βρέθηκε ότι η χορήγηση FCCP (προϊόν αποσύνθεσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια) σε μυοκύτταρα της σειράς C2C12 προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της Ολοκληρωμένης Απόκρισης στο Στρες (Integrated Stress Response;ISR) η οποία σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του FGF21. Επιπρόσθετα, ανακαλύφθηκε ότι ο FGF21 που παράγεται στον σκελετικό μυ έχει και ενδοκρινή ρόλο. Έρευνα με διαγονιδιακά ποντίκια UCP1-Tg (UCP1-transgenic; UCP1-Tg) που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και έκκριση του FGF21 από τον σκελετικό μυ και έδειξε πως ο FGF21 που εκκρίνεται από τον σκελετικό μυ συμβάλλει στη μετατροπή του λευκού λιπώδους ιστού σε φαιό[88].

Ερευνητές μελέτησαν τη δράση του FGF21 ως μυοκίνη και είδαν πως τα επίπεδα έκφρασης του στο σκελετικό μυ ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα ηπατικά σε ποντίκια που βρίσκονταν σε νηστεία[89]. Επιπλέον, ανακάλυψαν πως η έκφραση του εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3-kinase; PI3-kinase) που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (Protein Kinase b; AKT1). Η υπερέκφραση της AKT1 σε διαφοροποιημένα μυοκύτταρα της σειράς C2C12 αύξησε τόσο το mRNA όσο και την πρωτεΐνη του FGF21. Καθώς η ινσουλίνη αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης της δράσης της AKT1, έλεγξαν και την επίδραση της ινσουλίνης στην έκφραση του FGF21 στα C2C12 μυοκύτταρα, η οποία ήταν αυξημένη. Αντιθέτως, χρήση αναστολέα της κινάσης PI3 σε ομάδες κυττάρων, που έγινε επώαση σε ινσουλίνη είτε σε διαλύτη, οδήγησε στην καταστολή της έκφρασης του FGF21 και στις δύο περιπτώσεις.

## V. Ο Ρόλος του FGF21 στην Καρδιά

Ο FGF21 εκφράζεται και εκκρίνεται στην καρδιά από τα καρδιομυοκύτταρα[55]. Τα επίπεδα έκφρασης του σε φυσιολογικές συνθήκες είναι μόλις ανιχνεύσιμα. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι ο FGF21 εμπλέκεται σε αρκετές καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η στεφανιαία νόσος, η ισχαιμία του μυοκαρδίου, η διαβητική καρδιομυοπάθεια, η καρδιακή υπερτροφία και η καρδιακή ανεπάρκεια[91]. Ο FGF21 έχει την ικανότητα να περιορίζει το οξειδωτικό στρες, την καρδιακή λιποτοξικότητα και τη φλεγμονή καθώς και να αποτρέπει την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Σε όλες αυτές τις προαναφερθείσες ασθένειες η συγκέντρωση του FGF21 στον ορό είναι αυξημένη και κρίνοντας από την εξέλιξη της εκάστοτε νόσου θεωρείται προστατευτικός μηχανισμός. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν ο FGF21 που παράγεται από την καρδιά έχει κάποιο ειδικό ρόλο.

### *Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία νόσος*

Η αθηροσκλήρωση είναι χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή[92], προκύπτει από την εναπόθεση λιπιδίων, χοληστερόλης και ασβεστίου στα τοιχώματα των αρτηριών και οδηγεί σε πάχυνση του εσωτερικού τους. Συνήθως συνοδεύεται από υπέρταση και αν υπάρχει συνεχόμενη αύξηση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) του πλάσματος τότε δημιουργούνται ινώδεις πλάκες, οι οποίες μπορούν να αποκοπούν και να φράξουν αρτηρίες του καρδιακού μυός οπότε αυτός δεν τροφοδοτείται επαρκώς με αίμα (μυοκαρδιακή ισχαιμία) και τελικά καταλήγει σε στεφανιαία νόσο. Βασικοί παράγοντες εμφάνισης είναι το κάπνισμα, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και φυσικά επηρεάζουν το φύλο, η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό.

Η συγκέντρωση του κυκλοφορικού FGF21 σε ασθενείς και ποντίκια (ApoE<sup>-/-</sup>) με αθηροσκλήρωση είναι αισθητά ανεβασμένη, ενώ η απουσία του έχει δειχθεί ότι επιδεινώνει την κατάσταση καθώς συνοδεύεται από έξαρση του σχηματισμού πλακών, υποαδιπονεκτιναίμια και υπερχοληστερολαιμία και μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη θνησιμότητα των ApoE<sup>-/-</sup> ποντικών[93]. Η

χορήγηση εξωγενούς FGF21 στα ποντίκια αυτά συμβάλλει στην αντιμετώπιση της διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων, στη μείωση των αθηροσκληρωτικών πλακών και την αναστολή της φλεγμονής των μακροφάγων. Επιπλέον, αντιμετωπίζεται η υπερχοληστερολαιμία καθώς καταστέλλεται η δράση της SREBF2 και άρα η σύνθεση της χοληστερόλης. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο FGF21 δρα μέσω του AMPK μονοπατιού ενάντια στη συσσώρευση γλυκόζης και μεσολαβεί στη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας της σύνθεσης οξειδίου του αζώτου[94].

#### *Μυοκαρδιακή Ισχαιμία/Επαναιμάτωση*

Η μυοκαρδιακή ισχαιμία αναπτύσσεται όταν υπάρχει μείωση της ροής του αίματος στον καρδιακό μυ ύστερα από μερική ή πλήρη απόφραξη των καρδιακών αρτηριών. Η μείωση της ροής αίματος επιφέρει ανάλογη πτώση και στην παροχή οξυγόνου. Μια ξαφνική και σοβαρή απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας μπορεί να οδηγήσει και σε καρδιακή προσβολή. Τα πιο συχνά αίτια πρόκλησης ισχαιμίας του μυοκαρδίου περιλαμβάνουν την αθηροσκλήρωση και τους θρόμβους αίματος που επιτείνονται από το διαβήτη και την παχυσαρκία.

Η ισχαιμία του μυοκαρδίου προκαλεί βλάβη στα καρδιομυοκύτταρα και νέκρωση ενός τμήματος της καρδιάς που επηρεάζει τη γενικότερη λειτουργία της. Σε ποντίκια με μυοκαρδιακή ισχαιμία αυξάνεται η έκκριση του FGF21 από το ήπαρ και τον λιπώδη ιστό, το οποίο έχει περιγραφεί ως προστατευτική απόκριση[95]. Έρευνα σε κύτταρα της σειράς H9c2 που επώαστηκαν σε διάλυμα προσομοίωσης Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης (Ischemia/Reperfusion;I/R), έδειξε πως η επώαση με FGF21 αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων περίπου κατά 83% σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επιπλέον, το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων ήταν ανάλογο της δόσης του FGF21. Ειδικότερα, ο FGF21 βρέθηκε ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT - GSK-3β που προλαμβάνει την απόπτωση των κυττάρων[96].

## Διαβητική Καρδιομυοπάθεια

Ο ορισμός της διαβητικής καρδιομυοπάθειας (Diabetic Cardiomyopathy; DCM) δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Θεωρείται δυσλειτουργία του μυοκαρδίου που προκαλείται από την ύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη και δεν οφείλεται σε άλλα αίτια όπως στεφανιαία νόσος, αρτηριακή υπέρταση ή οποιαδήποτε άλλη καρδιαγγειακή πάθηση[97]. Η διαβητική καρδιομυοπάθεια συνοδεύεται από συσσώρευση καρδιακών λιπιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δομή του μυοκαρδίου. Η πάθηση συνεπάγεται δυσλειτουργία στην αριστερή κοιλία (διαστολική ή και συστολική δυσλειτουργία) που επιδεινώνεται αν ο ασθενής πάσχει και από υπέρταση ή ισχαιμία του μυοκαρδίου.

Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με Διαβήτη Τύπου 1 έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του FGF21 στην καρδιά είναι αυξημένα. Επίσης, η χορήγηση ανασυνδυασμένου FGF21, σε ποντίκια που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης διαβήτη, προλαμβάνει την καρδιακή απόπτωση. Ο FGF21 αποτρέπει την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού των ERK1/2-p38-MAPK-AMPK[98].

Σε ξεχωριστή έρευνα αποδείχθηκε ότι η ολική σίγαση του γονιδίου του FGF21 σε ποντίκια με καρδιακή δυσλειτουργία λόγω διαβήτη Τύπου 1 επιδεινώνει τα παθολογικά συμπτώματα δημιουργώντας μεταβολές στο βάρος της καρδιάς, στη δομή και τη λειτουργία της[99]. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποίησαν ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια *FGF21<sup>-/-</sup>*, τους έκαναν 6 ενέσιμες χορηγήσεις στρεπτοζοτοσίνης για να τους προκαλέσουν διαβήτη και στις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου έκαναν ενέσεις με τον διαλύτη της στρεπτοζοτοσίνης. Μετά την επαγωγή του διαβήτη, κατά τον 1<sup>ο</sup>, 2<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα, ελέγξαν τη λειτουργία της καρδιάς με ηχοκαρδιογράφημα. Αρχικά, είδαν πως και οι δύο ομάδες διαβητικών ποντικών είχαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, και πως στα διαβητικά ποντίκια αγρίου τύπου η συγκέντρωση του FGF21 στο πλάσμα μειώθηκε αισθητά μετά την



επαγωγή του διαβήτη, σε σύγκριση τα μη διαβητικά ποντίκια ελέγχου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα μη διαβητικά ποντίκια *FGF21*<sup>-/-</sup> δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στο μέγεθος, τη δομή και τη λειτουργία της καρδιάς τους παρά την έλλειψη του γονιδίου του FGF21. Αντιθέτως, τα διαβητικά ποντίκια αγρίου τύπου και τα διαβητικά *FGF21*<sup>-/-</sup> παρουσίασαν μείωση του βάρους της καρδιάς και αισθητή καρδιακή δυσλειτουργία μετά τους 4 και 2 μήνες αντίστοιχα. Ιστολογικά, οι καρδιές των διαβητικών ποντικιών *Fgf21*<sup>-/-</sup> εμφάνισαν πολύ πιο σοβαρές παθολογικές αλλαγές σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου *Fgf21*<sup>-/-</sup> αλλά και συγκριτικά με τα διαβητικά αγρίου τύπου. Επιπρόσθετα, ύστερα από σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων των διαβητικών ποντικιών, αποδείχθηκε ότι η έλλειψη του FGF21 στα διαβητικά ποντίκια επιτάχυνε την καρδιακή αναδιαμόρφωση που προκαλείται λόγω διαβήτη, επιδείνωσε το οξειδωτικό στρες και τη συσσώρευση λιπιδίων στην καρδιά[99].

#### *Καρδιακή Υπερτροφία*

Όπως είδαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η καρδιακή υπερτροφική αναδιαμόρφωση αποτελεί προσαρμοστική απόκριση της καρδιάς σε βλαπτικές καταστάσεις που προκαλούν στρες. Τα ώριμα καρδιομυοκύτταρα είναι τελικώς διαφοροποιημένα και έχουν χάσει την αναγεννητική τους ικανότητα, μπορούν όμως να μεταβάλλουν το μέγεθός τους. Το πιο σύνηθες αίτιο πρόκλησης υπερτροφίας είναι η στένωση κάποιας καρδιακής αρτηρίας που δημιουργεί υπέρταση και αναγκάζει την καρδιά να δουλεύει εντονότερα. Με δεδομένο ότι το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρδιομυοκυττάρων είναι πολύ χαμηλό, για να ανταποκριθεί ο καρδιακός μυς σε αυτές τις απαιτήσεις μεγεθύνει τα κύτταρά του οπότε η καρδιά αυξάνει σε μέγεθος με αποτέλεσμα να έχει μειωμένη συσταλτική ικανότητα .

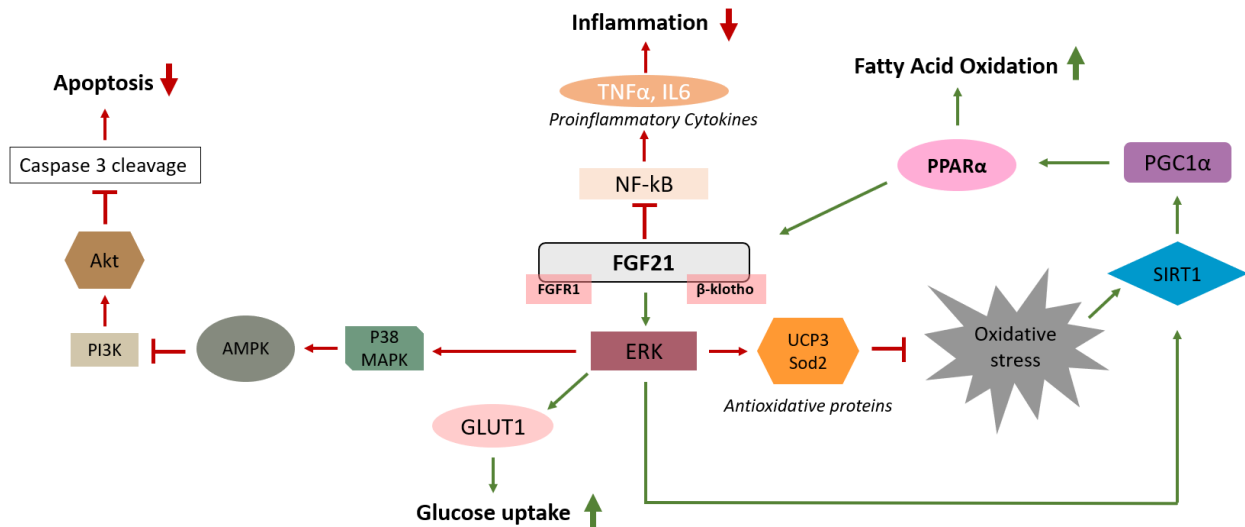
Υπερτασικοί ασθενείς και ποντίκια με υπέρταση έχουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορικού FGF21[100]. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του FGF21 και του β-klotho έχουν παρατηρηθεί και στην καρδιά αυτών των ποντικιών. Συγκεκριμένα, όταν χορηγείται δόση Αγγειοτενσίνης II (AngII) σε ποντίκια που

δεν εκφράζουν καθόλου FGF21 (ολική διαγραφή γονιδίου), η αύξηση στην αρτηριακή τους πίεση είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με υπερτασικά ποντίκια αγρίου τύπου και εμφανίζουν περισσότερο εκτεταμένη καρδιακή δυσλειτουργία και ίνωση. Η ερευνητική ομάδα έδειξε ότι ο FGF21 έχει προστατευτικό ρόλο στην υπέρταση και δρα με ενδοκρινή και αυτοκρινή τρόπο[101].

Μοντέλα ποντικών με επαγόμενη καρδιακή υπερτροφία (χρήση Ισοπροτερενόλης), έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *Fgf21* στην καρδιά. Ο β-klotho εκφράζεται στην καρδιά και η δημιουργία του συμπλόκου FGF21/FGFR1c/β-klotho ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του MAPK που είναι και ένας από τους μηχανισμούς προστασίας έναντι της καρδιακής υπερτροφίας[102]. Ο FGF21 προάγει επίσης την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων (*Ucp2/3*, superoxide dismutase-2) και αναστέλλει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS)[103]. Αντιθέτως, τα ποντίκια με ανεπάρκεια στον FGF21, ύστερα από επαγωγή καρδιακού στρες (χορήγηση Ισοπροτερενόλης, Ισχαιμία του Μυοκαρδίου, Εγκάρσια Αορτική Στένωση) έχουν καρδιές με μεγαλύτερο βάρος, παρουσιάζουν έντονη και σοβαρή καρδιακή δυσλειτουργία και επάγουν την έκφραση πολλών φλεγμονωδών δεικτών. Η έγχυση ανασυνδυασμένου FGF21 αποτρέπει την υπερτροφική βλάβη που προκαλεί η χορήγηση Ισοπροτερενόλης στα ποντίκια[55].

Ο FGF21 μπορεί να διορθώσει την καρδιακή λειτουργία και την υπερτροφία που επάγεται με έγχυση AngII σε ποντίκια, μέσω ενεργοποίησης της SIRT1[104]. Σε αυτή την περίπτωση, κατά την ανάπτυξη της καρδιακής υπερτροφίας σημειώνεται μετάβαση από ομόκεντρη υπερτροφία σε εκκεντρική. Η AngII αναστέλλει τους μηχανισμούς επιβίωσης των κυττάρων αυξάνοντας την παραγωγή ROS και κατά συνέπεια την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και την καρδιακή ίνωση που τελικά οδηγούν σε καρδιακή ανεπάρκεια. Με την επαγωγή της SIRT1 ενεργοποιούνται μονοπάτια που οδηγούν στη μείωση των φλεγμονωδών αντιδράσεων και στην προαγωγή της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Επιπλέον, ο FGF21, μέσω της SIRT1, ενεργοποιεί την AMPK και τα εξαρτώμενα από αυτή

σηματοδοτικά της μονοπάτια που βοηθούν στην αποκατάσταση της ενεργειακής ισορροπίας και τελικά την επιβίωση των κυττάρων[104].



**Εικ.4:** Ενδεικτικό σχεδιάγραμμα μονοπατιών δράσης του FGF21. Ο FGF21 καταστέλλει τη δράση του NF-κB που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση φλεγμονής. Επιπλέον, ενεργοποιεί την ERK που αποτελεί κεντρικό παράγοντα σε πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία ανήκουν το μονοπάτι πρόσληψης της γλυκόζης από τους ιστούς μέσω του GLUT1 και το μονοπάτι ενεργοποίησης της p38 MAPK που καταλήγει στη μείωση της απόπτωσης των κυττάρων. Ακόμα μια δράση του FGF21 είναι η μείωση του οξειδωτικού στρες μέσα από ένα θετικό βρόχο ανάδρασης που περιέχει τον PPARα (μεταγραφικός παράγοντας του FGF21).

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 1. Τα ποντίκια ως μοντέλο μελέτης

Ένας αξιόπιστος τρόπος για να κατανοηθεί η σημασία ύπαρξης και δράσης ενός γονιδίου σε μια παθολογική κατάσταση είναι η σύγκριση ανάμεσα σε φαινοτύπους όπου το γονίδιο εκφράζεται φυσιολογικά ή συνεχώς και σε φαινοτύπους όπου υπάρχει ιστοειδική ή συστημική σίγαση του γονιδίου.

Το ποντίκι αποτελεί ιδανικό μοντέλο για τέτοιου είδους μελέτες καθώς το γονιδίωμά του παρουσιάζει περίπου 98% ομοιότητα με το ανθρώπινο, η συντήρησή του σε ζωοτροφεία έχει λογικό κόστος και είναι πιο εύκολη σε σχέση με άλλα θηλαστικά όπως μαϊμούδες, πιθήκους, γουρούνια κοκ, αναπαράγεται με μεγάλη συχνότητα και δίνει σχετικά μεγάλο αριθμό απογόνων. Συγκεκριμένα, στην ηλικία των 6-7 εβδομάδων τα θηλυκά είναι ώριμα και έτοιμα για αναπαραγωγή, η περίοδος κύησης διαρκεί 19-21 ημέρες, η κάθε γέννα μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 20 κουτάβια, αν και ο μέσος όρος είναι 4-12, και οι μητέρες αμέσως μετά τη γέννα μπορούν να γονιμοποιηθούν ξανά.

Για να προκύψουν οι επιθυμητοί γονότυποι των ποντικιών γίνονται συγκεκριμένες διασταυρώσεις γονέων. Τα κουτάβια που γεννιούνται παραμένουν με τη μητέρα τους για περίπου 21 μέρες και μετά διαχωρίζονται ανάλογα με το φύλο σε κλουβιά ανά 5 (weaning). Το καθένα επισημαίνεται με ειδικό ταμπελάκι στο αυτί πάνω στο οποίο αναγράφεται ένας ειδικός αριθμός, που αποτελεί και την ταυτότητα του ποντικιού, και αφαιρείται ένα πολύ μικρό κομμάτι από την ουρά του για να χρησιμοποιηθεί στον γονοτυπικό προσδιορισμό. Σε κάθε κλουβί υπάρχει τροφή και νερό που ελέγχονται και ανανεώνονται καθημερινώς και τα κλουβιά βρίσκονται σε ειδικές εγκαταστάσεις που τηρούνται αυστηροί κανόνες υγιεινής και ένας κύκλος φωτός/σκότους 12 ωρών.

Η φροντίδα, η συντήρηση και οι πειραματικές μελέτες στα ποντίκια πραγματοποιήθηκαν με βάση τις οδηγίες των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των ΗΠΑ (National Institutes of Health – NIH) και εγκρίθηκαν από την αρμόδια επιτροπή περίθαλψης και προστασίας των ζώων του Πανεπιστημίου του Temple. Ακολουθώντας τον βασικό κανόνα βιοηθικής των 3Rs (αντικατάσταση, μείωση, βελτίωση) χρησιμοποιήθηκε ο ελάχιστος δυνατός αριθμός ποντικών και οι συνθήκες διαβίωσής τους ήταν οι βέλτιστες.

## II. Το σύστημα Cre-LoxP

Καθώς το ήπαρ είναι η κύρια πηγή παραγωγής του κυκλοφορικού FGF21, εξετάστηκε αν η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από αυτόν τον ιστό επιφέρει επιπτώσεις στη δομή και στη λειτουργία των υπερτροφικών καρδιών των ποντικών. Επίσης, διερευνήθηκε αν και κατά πόσο η διακοπή έκφρασης του γονιδίου *Fgf21* από ιστούς που συνεισφέρουν σε μικρότερη κλίμακα στη συνολική παραγωγή FGF21, επηρεάζει το υπερτροφικό προφίλ των ποντικών. Ακολουθώντας αυτή τη λογική, στοχεύθηκε και το γονίδιο *Fgf21* στους σκελετικούς μύες.

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη FGF21 σε διακριτούς ιστούς εφαρμόστηκε το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα Cre-LoxP. Το σύστημα ανασυνδυασμού Cre-LoxP είναι ένα εργαλείο που προήλθε από τον βακτηριοφάγο P1 και δίνει τη δυνατότητα τροποποίησης του DNA μέσω διαγραφής, προσθήκης ή μετατόπισης τμημάτων του. Η Cre ρεκομπινάση είναι ένα ένζυμο που αναγνωρίζει και συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (τμήματα LoxP). Όταν τις αναγνωρίζει, είναι ικανή να κόβει την αλληλουχία του DNA και να επανασυνδέει (recombine) τις εναπομείναντες αλληλουχίες. Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την *Jackson Laboratories*, περιέχουν δύο ένθετες «κασέτες» LoxP στο γονίδιο του FGF21 που έχουν τοποθετηθεί εκατέρωθεν των εξωνίων του γονιδίου (πριν από το 1<sup>ο</sup> εξώνιο και μετά από το 3<sup>ο</sup> εξώνιο) (ποντίκια *Fgf21<sup>LoxP/LoxP</sup>*). Έτσι, η Cre ρεκομπινάση εξαλείφει την περιοχή που

βρίσκεται αναμεσά τους και επανασυνδέει την αλληλουχία που βρίσκεται εξωτερικώς των LoxP περιοχών.

Για να εξασφαλιστεί η διαγραφή του επιθυμητού γονιδίου σε συγκεκριμένους ιστούς, ποντίκια *Fgf21<sup>LoxP/LoxP</sup>* διασταυρώθηκαν με ποντίκια που εκφράζουν το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης (π.χ. δίπλα στον εκκινητή) ενός γονιδίου που εκφράζεται ειδικώς στον ιστό-στόχο. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που εξέφραζαν την Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του γονιδίου της αλβουμίνης (Albumin; Alb), το οποίο εξασφαλίζει ηπατοειδική έκφραση, και του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας μυοσίνης (Myosin Light Chain; MLC), το οποίο εξασφαλίζει έκφραση στις σκελετικές μυϊκές ίνες.

Στη συνέχεια συζεύξεις μεταξύ των *Fgf21<sup>LoxP/LoxP</sup>* ποντικών και των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* ή *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* ποντικών οδήγησαν στη δημιουργία ποντικών που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη FGF21 στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες αντίστοιχα.

Οι γονότυποι των ποντικών, το πλήθος και οι ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Ποντίκια ελέγχου που διαθέτουν τις περιοχές LoxP εκατέρωθεν του γονιδίου του *Fgf21*: floxed/floxed (fl/fl)
- Ποντίκια ελέγχου ετερόζυγα ως προς την έκφραση της Cre ρεκομπινάσης στο ήπαρ: *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*
- Ποντίκια ελέγχου ετερόζυγα ως προς την έκφραση της Cre ρεκομπινάσης στον σκελετικό μυ: *MLC-Cre<sup>+/-</sup>*
- Ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου *Fgf21* στο ήπαρ: *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>*
- Ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου *Fgf21* στον σκελετικό μυ: *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*

### III. Ηχωκαρδιογράφημα

Η εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας και ο υπολογισμός του πάχους των τοιχωμάτων της πραγματοποιήθηκε με διαθωρακικό ηχωκαρδιογράφημα (echocardiography) χρησιμοποιώντας το σύστημα Veno 2100 (Visual Sonics). Πριν την εξέταση, αφαιρέθηκε από το ποντίκι το τρίχωμα από το στήθος με ειδική κρέμα (Nair) και το ποντίκι υπεβλήθη σε πτητική αναισθησία με ισοφλουράνιο (3% Isoflurane). Κατά τη διάρκεια του ηχωκαρδιογραφήματος το ποντίκι διατηρούνταν ακίνητο σε θερμαινόμενη τράπεζα (37<sup>0</sup>C) υπό το φως λάμπας με τη δόση αναισθησίας μειωμένη στο 0.5% και συνολικό χρόνο εξέτασης περίπου 6 με 10 λεπτά. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όταν ο καρδιακός ρυθμός των ποντικών ήταν μεταξύ 450 και 550 σφυγμών ανά λεπτό (beats per minute; bpm).

Η λήψη εικόνων πραγματοποιήθηκε κατά μήκος του οριζοντίου ή διαμήκους άξονα του στέρνου.

Η μέτρηση κατά τον οριζόντιο ή μικρό άξονα (short axis) πραγματοποιήθηκε με κατεύθυνση της κεφαλής των υπερήχων προς τη βάση του μυοκαρδίου. Η θέση των θηλωδών μυών χρησιμοποιήθηκε ως σταθερό σημείο εστίασης για όλες τις αναλύσεις σε αυτό τον άξονα.

Για τον διαμήκη ή μεγάλο άξονα (long axis), η κεφαλή των υπερήχων στράφηκε 90<sup>0</sup> σε σχέση με την προηγούμενη θέση της. Σε αυτή τη θέση αποτυπώνεται ολόκληρο το αριστερό ενδοκάρδιο και μυοκάρδιο και ως ορόσημα χρησιμοποιήθηκαν ο αριστερός κόλπος και η μητροειδής βαλβίδα[105].

Για τον προσδιορισμό της καρδιακής λειτουργίας χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικοί τρόποι ανάλυσης. Για την ανάλυση της καρδιακής λειτουργίας ως προς τον μικρό άξονα ακολουθήθηκε η

κίνηση του στίγματος του ενδοκαρδίου (speckle tracking analysis; B-mode)[105]. Για την ανάλυση της καρδιακής λειτουργίας ως προς τον μεγάλο άξονα, χρησιμοποιήθηκε ο εντοπισμός του ίχνους της αριστερής κοιλίας (LV trace analysis M-mode). Στην ανάλυση του μικρού άξονα σε B-mode υπολογίστηκε το κλάσμα εξώθησης (Ejection Fraction; EF), το κλάσμα βράχυνσης (Fractional Shortening; FS), ο τελικός διαστολικός και συστολικός όγκος (End Diastolic Volume; EDV, End Systolic Volume; ESV), ο όγκος αίματος που εξωθείται μόνο κατά ένα καρδιακό παλμό (Stroke Volume; SV) και η καρδιακή παροχή (Cardiac Output; CO). Στην ανάλυση κατά τον μεγάλο άξονα (LV trace analysis M-mode) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό VenoStrain. Αρχικώς, προσδιορίστηκαν οι ίδιες παράμετροι που αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης του ίχνους του ενδοκαρδίου κατά τον μικρό άξονα. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το ολικό εγκάρσιο και επίμηκες στίγμα (global radial and longitudinal strain) που υπολογίζεται από τη μετακίνηση του στίγματος του κορυφαίου, μέσου και βασικού τμήματος του οπίσθιου και πρόσθιου αριστερού ενδοκαρδίου (μέσος όρος 6 διαφορετικών τμημάτων).

Το κλάσμα εξώθησης, το οποίο απεικονίζει τη δύναμη της συστολής της καρδιάς, προκύπτει από τον ποσοστιαίο λόγο του υπολοίπου του όγκου αίματος που βρίσκεται στην κοιλία κατά τη συστολή μείον του όγκου που υπήρχε κατά τη διαστολή προς τον όγκο που υπήρχε κατά τη διαστολή.

$$EF(\%) = 100 \times \frac{Vd - Vs}{Vd}$$

Το κλάσμα βράχυνσης είναι δείκτης της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου. Προσδιορίζεται μέσω του ποσοστιαίου λόγου της απόστασης του ενδοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή μείον της ίδιας απόστασης κατά τη συστολή προς την απόσταση κατά τη διαστολή.

$$FS(\%) = 100 \times \frac{l_d - l_s}{l_d}$$



Ο παράγοντας SV δείχνει τον όγκο αίματος που εξωθεί προς την κυκλοφορία η αριστερή κοιλία ανά καρδιακό παλμό και το CO δείχνει τον όγκο αίματος που διοχετεύει η αριστερή κοιλία στο κυκλοφορικό σύστημα ανά λεπτό ( $CO=SV \times bpm$ ).

Για την παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν ηχοκαρδιογραφήματα σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία. Αρχικά, μία εβδομάδα μετά την επέμβαση προσδιορίστηκε η πίεση στο σημείο της στένωσης (TAC Gradient) για να ελεγχθεί η επιτυχής εφαρμογή της επέμβασης. Μετά το πέρας 8 εβδομάδων από τη στένωση, καταγράφησαν οι διαστάσεις της καρδιάς και το λειτουργικό προφίλ με νέα ηχοκαρδιογραφήματα.

#### IV. Συλλογή Ιστών

Για τη συλλογή των ιστών, το ποντίκι αναισθητοποιείται πλήρως με ισοφλουράνιο (3%), ζυγίζεται και τοποθετείται σε ειδική τράπεζα. Ακίνητοποιείται και ελέγχεται η ύπαρξη αντανακλαστικών ασκώντας πίεση στην ουρά ή σε κάποιο από τα άκρα του. Γίνεται συλλογή αίματος από την καρδιά (600-700μl), τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf (1.5 ml) με 10 μl EDTA (0.5M; pH 8; Research Product International), ανακινείται καλά και μεταφέρεται σε πάγο (4<sup>0</sup>C). Στη συνέχεια, εγχύεται ποσότητα αποστειρωμένου Phosphate Buffer Solution (PBS; pH 7.4 ; Thermo Fischer Scientific) για να απομακρυνθεί το υπόλοιπο αίμα από τους ιστούς. Κάθε ιστός που αφαιρείται τοποθετείται ξανά σε διάλυμα 1xPBS ώστε να ξεπλυθεί, μεταφέρεται σε ειδικά eppendorfs και αμέσως σε υγρό άζωτο όπου διατηρείται στη θερμοκρασία των -80<sup>0</sup>C. Η καρδιά αφότου καθαριστεί ζυγίζεται και έπειτα αφαιρούνται οι κόλποι της, κόβεται σε 4 κομμάτια και μοιράζεται σε διαφορετικά eppendorfs.

Για την απομόνωση πλάσματος από το περιφερικό αίμα με EDTA, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 4.000 στροφές/λεπτό στους 4<sup>0</sup>C (accuSpin Micro 17R; Thermo

Fisher Scientific). Το υπερκείμενο που αποτελεί το πλάσμα μεταφέρεται σε νέα erpendorfs (1.5ml) και αποθηκεύεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## V. Απομόνωση ολικού mRNA ιστών

Η απομόνωση RNA από τους ιστούς για τη σύνθεση cDNA και τον προσδιορισμό της έκφρασης ξεκίνησε με τη διάλυση του ιστού σε 1ml διαλύματος τριζόλης (Ambion; Life Technologies). Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με τη βοήθεια μεταλλικών σφαιριδίων και τη χρήση ομογενοποιητή (Bead Mill; VWR) για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο και ακολούθησε έντονη ανάδευση ώστε η τριζόλη και το χλωροφόρμιο να ομογενοποιηθούν. Τα δείγματα επώαστηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$  (accuSpin Micro 17R; ThermoFisher Scientific) ώστε να διαχωριστούν δύο φάσεις. Το RNA είναι στην υπερκείμενη υδατική φάση, οι πρωτεΐνες στην υποκείμενη οργανική φάση και το DNA βρίσκεται στη διεπιφάνεια των δύο. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf 1.5 ml που ήταν αποστειρωμένοι και είχαν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία για 10 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης και ανακίνηση για 10 δευτερόλεπτα (vortex). Τα δείγματα επώαστηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντριση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$ , με αποτέλεσμα την παραγωγή ιζήματος που αποτελεί το RNA. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl αιθανόλης (70%) και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμα μία φορά και απομακρύνεται το

υπερκείμενο. Τέλος, το ίζημα διαλύεται σε 20μl αποστειρωμένου νερού (χωρίς νουκλεάσες; DEPC νερό) και επωάζεται στους 65°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του mRNA κάθε δείγματος προσδιορίστηκαν φασματομετρικά με τη χρήση του NanoDrop 2000 Spectrometer (ThermoFisher Scientific). Το μήκος κύματος που εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για τα νουκλεϊκά οξέα είναι τα 260nm ενώ για τις πρωτεΐνες τα 280nm. Για την εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων προσδιορίζεται η απορρόφηση και στα δύο προαναφερθέντα μήκη κύματος και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος των δύο απορροφήσεων (260nm/280nm). Λόγος μεταξύ 1,8 με 2 είναι ικανοποιητικός.

#### VI. Σύνθεση cDNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR)

Το mRNA που απομονώθηκε από τους ιστούς και επώαστηκε με το ένζυμο DNase I (#18068015; DNaseI amplification grade kit; Invitrogen; ThermoFischer Scientific). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 0,2ml αναμειγνύονται 1μg RNA, 0,5μL DNase Buffer, 1μL DNase I και νερό απαλλαγμένο από DNAσες και RNAσες (DEPC-H<sub>2</sub>O) μέχρι όγκου 5μL. Τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να δράσει η DNAση και να αποσυντεθεί τυχόν εναπομείναν DNA. Μετά την επώαση, προστίθεται 1μL EDTA (25mM) σε κάθε δείγμα και ακολουθεί ανακίνηση και επώαση στους 65°C για 10 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση της δράσης της DNAσης.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του HighCapacity cDNA reverse transcription kit (#4368814; Applied Biosystems; ThermoFischer Scientific) δημιουργείται για κάθε δείγμα ένα μείγμα 14μL που περιέχει 2μL Buffer, 0,8 μL δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPS; dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2μL μη ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως εκκινήτες, 1μL από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης και 8,2μL DEPC νερού. Τα δείγματα ανακινούνται (τελικός όγκος 20μL) και μεταφέρονται στον θερμοκυκλοποιητή όπου επωάζονται στις ακόλουθες συνθήκες: 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 2 ώρες,

85°C για 5 λεπτά και τέλος διατηρούνται στους 6°C. Τα mRNAs που κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες έχουν μια χαρακτηριστική πολυαδενυλική ουρά στο 3' άκρο της αλληλουχίας τους, πάνω στην οποία προσδένονται συμπληρωματικά τμήματα από ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που λειτουργούν σαν εκκινητές. Η αντίστροφη μεταγραφάση αναγνωρίζει αυτά τα τμήματα και επεκτείνει την αλληλουχία τους προσθέτοντας DNA βάσεις συμπληρωματικές ως προς την αλληλουχία του εκάστοτε mRNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υβριδικού μορίου DNA-RNA. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος, τα δείγματα αραιώνονται σε 20 μL DEPC νερού, ανακινούνται και φυλάσσονται στους -20°C.

Για τον προσδιορισμό του επιπέδου των αντιγράφων του mRNA ενός γονιδίου στόχου, χρησιμοποιείται η τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR), όπου τα cDNA μόρια στόχου αντιγράφονται μέσω ειδικών, για τον κάθε στόχο, εκκινητών. Συγκεκριμένα, για το PrimePCR Assay kit (#10025636; Bio-Rad) για τον FGF21, για πιάτο 96 θέσεων, παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει 10μL από το έτοιμο διάλυμα SYBR™ Select Master Mix (#4472908; Applied Biosystems; ThermoFischer Scientific), 8μL DEPC νερού, 1 μL δείγματος cDNA που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή 1μg RNA, και 1 μL από τους ειδικούς εκκινητές (τελικός όγκος 20 μL). Το πιάτο φυγοκεντρίζεται και μεταφέρεται στο μηχάνημα StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems; ThermoFischer Scientific) όπου πραγματοποιείται η qPCR.

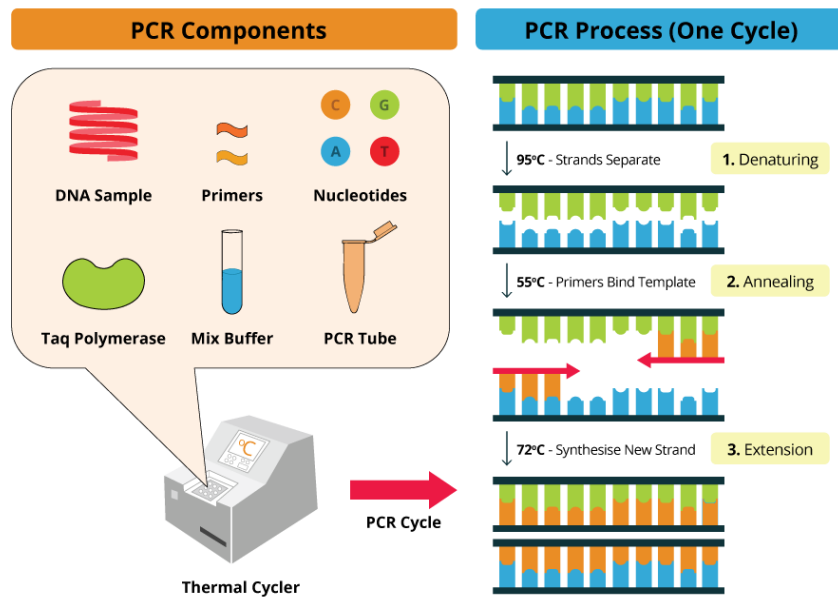
Τα στάδια της qPCR είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του DNA (denaturation): στο αρχικό αυτό στάδιο τα δίκλινα μόρια DNA θερμαίνονται στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα και έτσι σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο έλικες.

- 2) Σύνδεση εκκινητών (annealing): τα μονόκλιωνα πλέον μόρια DNA λειτουργούν σαν καλούπια για τους ειδικούς για κάθε γονίδιο-στόχο εκκινητές οι οποίοι συνδέονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλυσίδες του cDNA (60<sup>0</sup>C για 15 δευτερόλεπτα)
- 3) Επιμήκυνση (elongation): στο τρίτο στάδιο αυξάνεται ξανά η θερμοκρασία (72<sup>0</sup>C για 30 δευτερόλεπτα) ώστε να μπορεί να δράσει η Taq DNA πολυμεράση και να συνθέσει τις συμπληρωματικές αλυσίδες με την προσθήκη νουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5'-> 3'.

Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 40 φορές για να έχουμε αποτελεσματική ενίσχυση των αρχικών προϊόντων. Το SYBR green λειτουργεί ως χρωστική και παρεμβάλλεται στα δίκλιωνα μόρια DNA (dsDNA). Όσο πιο πολλά δίκλιωνα μόρια σχηματίζονται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τόσο πιο πολλά μόρια της παρεμβαλλόμενης χρωστικής SYBR Green προσδένονται στα δίκλιωνα νεοσχηματιζόμενα μόρια DNA με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού.

Τα επίπεδα έκφρασης του FGF21 στο κάθε δείγμα προσδιορίστηκαν βάσει της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς 36-b4 (Reverse Primer: "ATCTGCTGCATCTGCTTGG"; Forward Primer: "GCGACCTGGAAGTCCAACACTAC"; Invitrogen; ThermoFisher Scientific).



Εικ.5: Σχηματική αναπαράσταση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ([www.kentschools.net](http://www.kentschools.net)).

## VII. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του FGF21 στο πλάσμα ακολουθήθηκε η τεχνική της sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) με τη χρήση του Quantikine ELISA Kit (#MF2100; R&D Systems; Bio-Techne). Η τεχνική sandwich ELISA βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος για τον προσδιορισμό της ποσότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης. Το ανωτέρω πραγματοποιείται με την ικανότητα αναγνώρισης του ίδιου αντιγόνου από δύο διαφορετικά αντισώματα που προσδένονται σε ξεχωριστούς επίτοπους του αντιγόνου. Το Quantikine

ELISA Kit διαθέτει ειδική πλάκα 96 θέσεων που είναι επιστρωμένες με μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικά για τον FGF2. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, προστέθηκαν 50μL του αντιδραστηρίου RD1-41, 50μL αραιωμένου πλάσματος (αραίωση 1:1 με το αντιδραστήριο RD6Z) και ακολούθησε κάλυψη της πλάκας και επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση του αντισώματος στην πρωτεΐνη-στόχο (FGF21). Ύστερα από 6 διαδοχικές πλύσεις των βοθρίων με ειδικό διάλυμα (Wash Buffer) με σκοπό την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών-αντιγόνων, προστέθηκαν 100μL διαλύματος πολυκλωνικού αντισώματος, για τον FGF21, συζευγμένο με υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase; HRP), η πλάκα καλύφθηκε ξανά και αφέθηκε για επώαση 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 6 επιπλέον πλύσεις, προσθήκη 100μL διαλύματος υποστρώματος υπεροξειδάσης (HRP) και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και με ειδική κάλυψη για προστασία από το φως. Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα μια ενζυμική αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος και της υπεροξειδάσης του χρένου που είναι συζευγμένη με τα σύμπλοκα (αντίσωμα-αντιγόνο-αντίσωμα) που έχουν δημιουργηθεί με αποτέλεσμα την παραγωγή ανιχνεύσιμου σήματος (χρώμα). Τέλος, προστέθηκαν 100μL από το Stop Solution για να διακοπεί η ενζυμική αντίδραση. Η οπτική απορρόφηση (ένταση του χρώματος) του διαλύματος στα 450 nm, με διόρθωση στα 560 nm, με τον φασματογράφο Infinite F50 microplate reader (Tecan) και το λογισμικό Script-Tecan i-control . Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του FGF21 έγινε αναγωγή της μέτρησης της οπτικής τους απορρόφησης σε καμπύλη δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (πρότυπα δείγματα).

- *Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την τεχνική Western Blot*

Η τεχνική Western Blot διεξήχθη με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών στους ιστούς του εκάστοτε ποντικίου. Για κάθε ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 30μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific). Η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western χωρίζεται σε τρία βασικά βήματα,

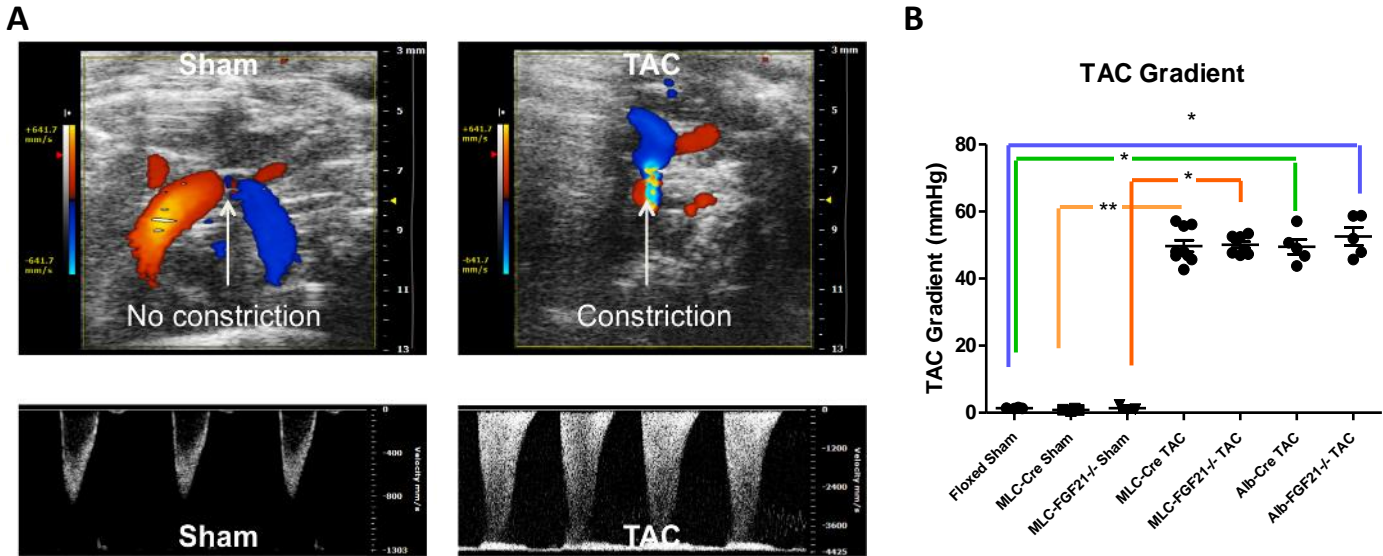
στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, στην ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών και στην ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών αντιγόνων. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών γίνεται παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) που εξυπηρετεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού έχει συγκέντρωση 10% και έγινε χρήση των Mini Protean TGX-Precast Gels (Biorad). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTris/Glycine/SDS, με σταθερό ηλεκτρικό ρεύμα 25mA ανά gel στη συσκευή Mini Protean Tetra System (Biorad). Για το δεύτερο στάδιο, την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Mini/Midi Format, 0.2µm Nitrocellulose, Single Application; Trans-Blot Turbo™ Transfer Pack, Bio-Rad) και τη συσκευή Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 1A για 7 λεπτά . Οι μεταφερθείσες πρωτεΐνες δεσμεύονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χωρίς να χάνουν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και διατηρούν την ίδια διάταξη που έχουν λάβει κατά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό. Για το τελικό στάδιο , την ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνικών αντιγόνων, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με blocking buffer (Odyssey; LI-COR) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 1 ώρα. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το blocking buffer και προστέθηκε διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος (συγκέντρωση 1:10.000 σε TBS) ειδικό για τον FGF21 της εταιρείας Invitrogen (#MA5-32652) που είχε παραχθεί σε κουνέλι. Η δέσμευση του πρωτεύοντα αντισώματος με το αντιγόνο-στόχο πραγματοποιήθηκε στους 4<sup>0</sup>C υπό ανάδευση για 16 ώρες. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα Tris-Buffered Saline με 0.1% Tween-100 (TBS-T) για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων αντισωμάτων. Στη συνέχεια, προστέθηκε δευτερεύον αντίσωμα (συγκέντρωση 1:2.000 σε TBS) που είχε αναπτυχθεί σε κασίικα, έναντι αντιγόνων κουνελιού (#925-68071; LI-COR). Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBS-T. Το τελικό δημιουργηθέν σύμπλοκο «αντιγόνο - πρωτεύον αντίσωμα - δευτερεύον αντίσωμα» ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο του φθορισμού



και τη χρήση του Odyssey Infrared Imager (LI-COR) και του λογισμικού Image Studio Ver 2.0. Τα σχετικά επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στόχων υπολογίσθηκαν μέσω του πυκνομετρικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών στόχου και εξομαλύνθηκαν με βάση τα επίπεδα της πρωτεΐνης αναφοράς (β-ακτίνη; #sc-47778; Santa Cruz Biotechnology) με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

### 3. Αποτελέσματα

Στην αρχή, προκαλέσαμε Εγκάρσια Αορτική Στένωση (TAC) σε ποντίκια ελέγχου *Alb-Cre<sup>+/+</sup>* και *MLC-Cre<sup>+/+</sup>*, και σε ποντίκια KO για τους αντίστοιχους ιστούς (*Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* και *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*). Μία εβδομάδα μετά τη χειρουργική επέμβαση, κάναμε ηχοκαρδιογράφημα στα ποντίκια και επιβεβαιώσαμε την επιτυχία της στένωσης στην αορτή μέσω ανάλυσης Doppler σε B-Mode. Προσδιορίσαμε τη ροή του αίματος πλησίον του σημείου εφαρμογής της στένωσης όπου για τα ποντίκια που τους έγινε διάνοιξη της θωρακική κοιλότητας αλλά δεν προκαλέσαμε TAC (ψευδής επέμβαση– sham) σημειώσαμε τιμές ταχύτητας γύρω στα 600mm/s ενώ για τα ποντίκια με TAC καταγράψαμε τιμές ταχύτητας μεγαλύτερες από 3000mm/s (Εικ. 6A). Επιπλέον, υπολογίσαμε τη διαφορά πίεσεως στην ροή του αίματος (Εικ. 6B). Οι ομάδες ποντικίων με ψευδή εγχείρηση είχαν πίεση γύρω στο 1mmHg ενώ οι ομάδες ποντικίων που τους εφαρμόστηκε TAC εμφάνισαν εξαιρετική αύξηση πίεσεως της τάξης των 50mmHg. Με την παραπάνω ανάλυση επιβεβαιώσαμε ότι η στένωση ήταν επιτυχής ως προς την ικανότητα να προκαλέσει καρδιακή υπερτροφία. Μετά από άλλες 7 εβδομάδες, και πριν θυσιάσουμε αυτά τα ποντίκια, κάναμε ηχοκαρδιογράφημα της καρδιακής τους λειτουργίας και στη συνέχεια προσδιορίσαμε την επαγόμενη καρδιακή υπερτροφία. Οι ιστοί που συλλέξαμε χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές αναλύσεις.



**Εικ.6: Έλεγχος αποτελεσματικότητας της επέμβασης Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης (TAC).**

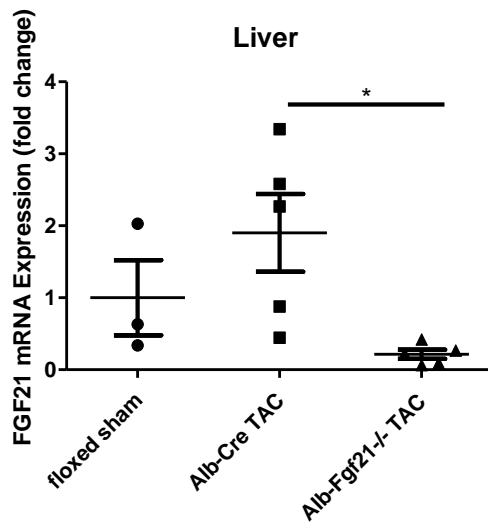
**(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από ανάλυση Doppler σε B-Mode σε ποντίκια με ψευδή εγχείρηση (sham) και σε ποντίκια με Εγκάρσια Αορτική Στένωση (TAC), 1 εβδομάδα μετά την επέμβαση. Η αυξημένη πίεση στο σημείο εφαρμογής της στένωσης αποτυπώνεται σαν ένας στρόβιλος χρωμάτων όπως φαίνεται στην εικόνα δεξιά. Μέσω της ανάλυσης Doppler προσδιορίστηκε η ροή του αίματος πλησίον του σημείου εφαρμογής της στένωσης. **(Β)** Προσδιορισμός και σύγκριση της διαφορά πιέσεως (TAC Gradient) στη ροή του αίματος μεταξύ των ποντικίων με ψευδή εγχείρηση και των ποντικίων με TAC. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου  $*p < 0.05$  και  $**p < 0.01$ . Ομάδες ποντικίων με ψευδή εγχείρηση: floxed (n=4), MLC-Cre<sup>+/-</sup> (n=4), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=3). Ομάδες ποντικίων με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: MLC-Cre<sup>+/-</sup> (n=8), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=8), Alb-Cre<sup>+/-</sup> (n=5), Alb-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=5). Η εγχείρηση Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης στα ποντίκια αύξησε επιτυχώς την πίεση γύρω από το σημείο στένωσης.

Στη συνέχεια διεξαγάγαμε αναλύσεις στα Alb-Cre<sup>+/-</sup> ποντίκια και στα ποντίκια Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>. Και στις δύο ομάδες είχε γίνει εγχείρηση Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης. Για ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τα floxed sham ποντίκια.

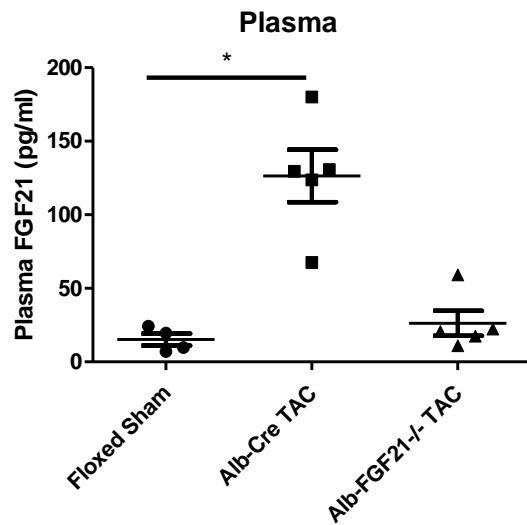
Η γονιδιακή έκφραση του FGF21 έδειξε αυξητική τάση των επιπέδων ηπατικού mRNA του FGF21 στα Alb-Cre<sup>+/-</sup> ποντίκια με TAC συγκριτικά με τα floxed sham, ενώ στα Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>, όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση μειώθηκε δραματικά/ ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη (Εικ. 7Α). Η ανάλυση στο πλάσμα των Alb-Cre<sup>+/-</sup> ποντικίων που υπέστησαν TAC έδειξε ότι τα επίπεδα του FGF21 ήταν αυξημένα κατά 6 φορές σε σχέση με τα floxed ποντίκια που είχαν δεχθεί ψευδή εγχείρηση. Συγκρίνοντας, επίσης, τις δύο

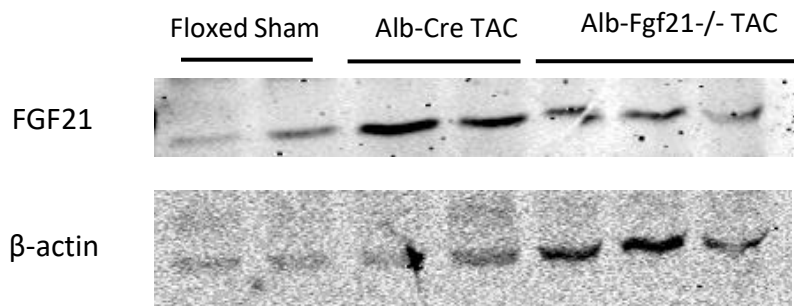
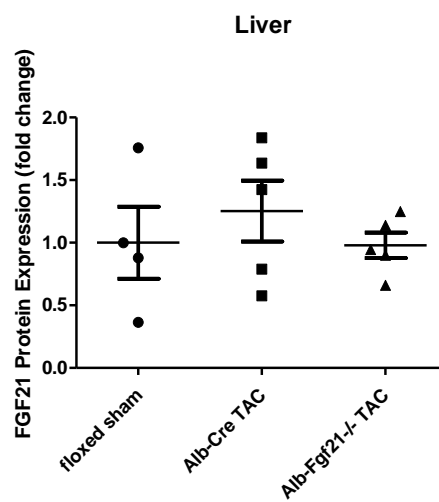
ομάδες ποντικών με TAC, είδαμε ότι τα επίπεδα FGF21 στο πλάσμα των ποντικών *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* ήταν 5 φορές χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ήπαρ είναι η κύρια πηγή έκκρισης FGF21 στην καρδιακή υπερτροφία (Εικ. 7B). Η ανάλυση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ήπατος ανέδειξε μια αυξητική τάση των επιπέδων του FGF21 στα *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* ποντίκια με TAC σε σχέση με τα floxed sham ποντίκια. Στα ποντίκια *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* τα επίπεδα της πρωτεΐνης του FGF21 στο ήπαρ ήταν ανάλογα με αυτά των floxed sham (Εικ. 7Γ,Δ).

**A**



**B**



**Γ****Δ**

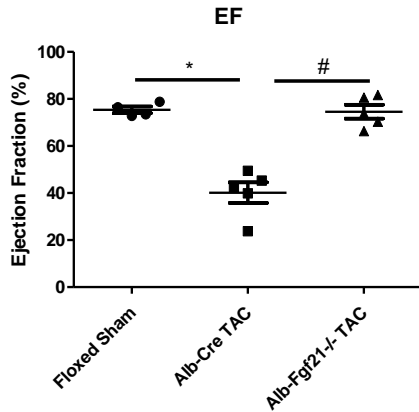
**Εικ.7: Βιοχημικές αναλύσεις ηπατικού ιστού και αίματος των ποντικών.**

**(Α)** Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης mRNA του FGF21 στο ήπαρ. **(Β)** Προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης FGF21 στο πλάσμα του αίματος. **(Γ)** Αντιπροσωπευτικό Western Blot για την πρωτεΐνη του FGF21 στο ήπαρ. **(Δ)** Ανάλυση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του FGF21 από το ήπαρ των ποντικών. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου  $*p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: floxed sham (n=4). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: Alb-Cre<sup>+/+</sup> (n=5) και Alb-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=5). Τα επίπεδα κυκλοφορικού FGF21 αυξάνονται μετά την επέμβαση TAC και το ήπαρ φαίνεται να είναι κύρια πηγή έκκρισης.

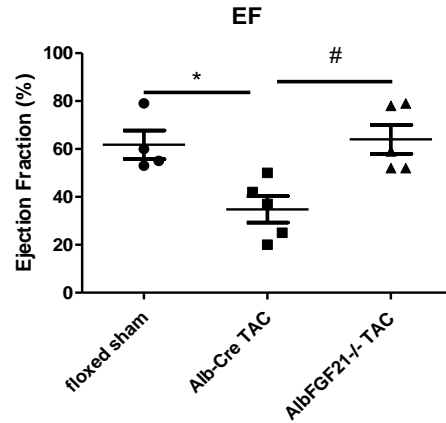
Οκτώ εβδομάδες μετά την επέμβαση, και πριν θυσιάσουμε τα ποντίκια, προσδιορίσαμε την καρδιακή τους λειτουργία μέσω της ανίχνευσης ίχνους της αριστερής κοιλίας (μεγάλος άξονας) και μέσω του στίγματος του ενδοκαρδίου (μικρός άξονας). Τα ποντίκια Alb-Cre<sup>+/+</sup> με TAC παρουσίασαν και στους δύο άξονες ανάλυσης σημαντικά μειωμένο κλάσμα εξώθησης-EF (Εικ. 8Α,Γ) και κλάσμα βράχυνσης-FS (Εικ. 8Β,Δ) σε σχέση με τα floxed sham ποντίκια, όπως είναι αναμενόμενο για τα μοντέλα αορτικής στένωσης. Συγκεκριμένα, στον μικρό άξονα για τα ποντίκια Alb-Cre<sup>+/+</sup>, καταγράψαμε EF≈40% και FS≈20% και για τα floxed sham EF≈75% και FS≈45%. Οι αντίστοιχες τιμές στον μεγάλο άξονα ήταν EF≈35% και FS≈15% για τα ποντίκια Alb-Cre<sup>+/+</sup>, ενώ για τα floxed sham EF≈62% και FS≈34%. Αντιθέτως, η αντίστοιχη ανάλυση των EF και FS στα ποντίκια Alb-Fgf21<sup>-/-</sup> με TAC έδειξε ότι είχαν φυσιολογική

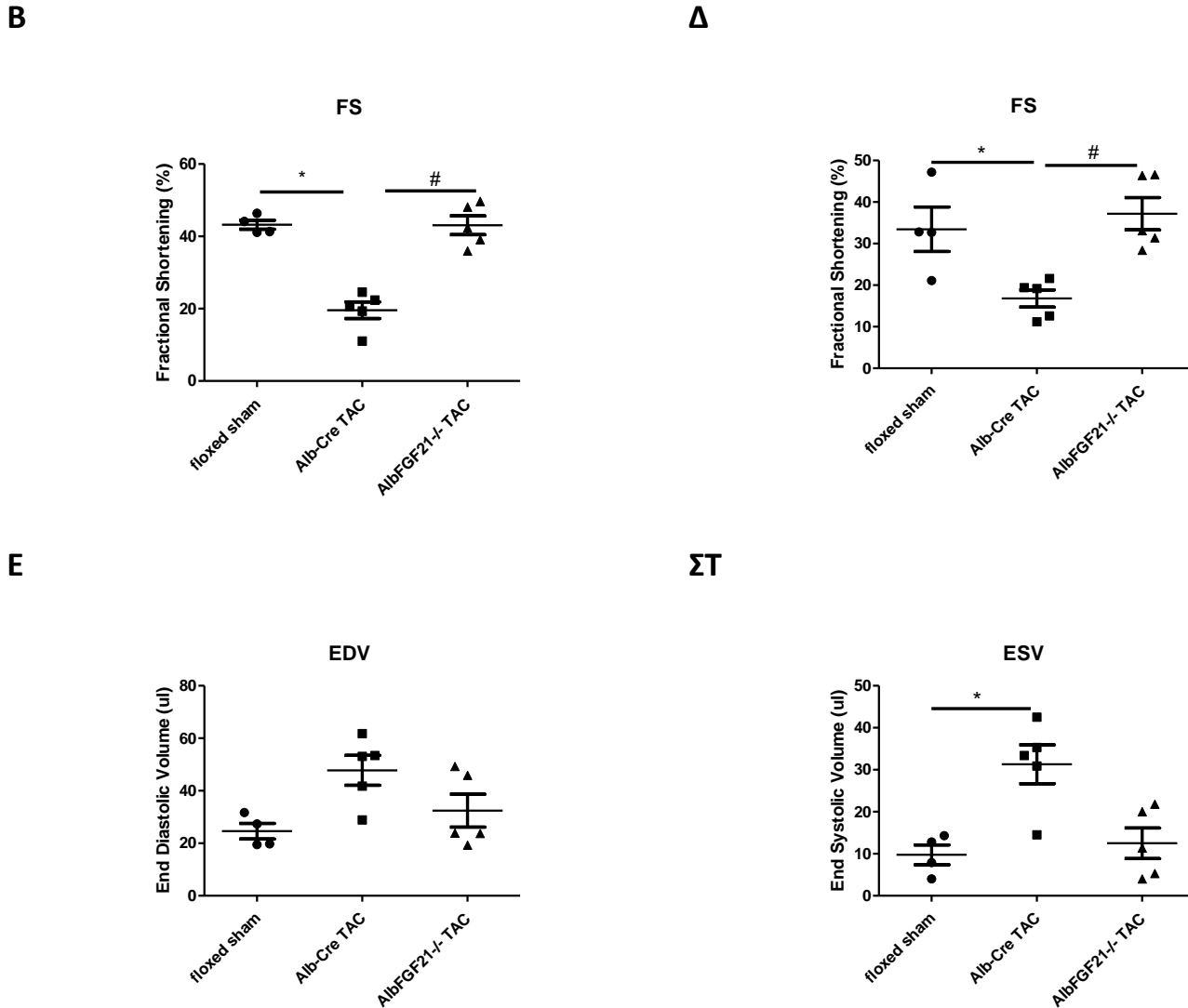
συστολική καρδιακή λειτουργία (Εικ. 8Α-Δ) και οι τιμές αυτών των παραμέτρων ήταν ανάλογες με τις τιμές των υγιών floxed sham ποντικών. Στον μικρό άξονα καταγράψαμε EF≈74% και FS≈45% και στον μεγάλο άξονα EF≈64% και FS≈38%. Επιπλέον, συγκρίνοντας τους τελικούς όγκους διαστολής-EDV (Εικ.8Ε) και συστολής-ESV (Εικ.8ΣΤ) μεταξύ των υγιών ποντικών με ψευδή εγχείρηση και των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* με TAC, παρατηρήσαμε ότι η στένωση προκαλεί αύξηση και των δύο παραμέτρων, ιδιαιτέρως του ESV. Και σε αυτήν την περίπτωση, τα ποντίκια που είχαν υποστεί διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ είχαν τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων σε φυσιολογικά επίπεδα παρά την επέμβαση TAC (Εικ. 8Ε,ΣΤ). Για τα ποντίκια *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*, καταγράψαμε EDV≈50μL και ESV≈32μL, για τα floxed sham EDV≈25μL και ESV≈10μL και για τα ποντίκια *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* EDV≈30μL και ESV≈12μL.

A



Γ

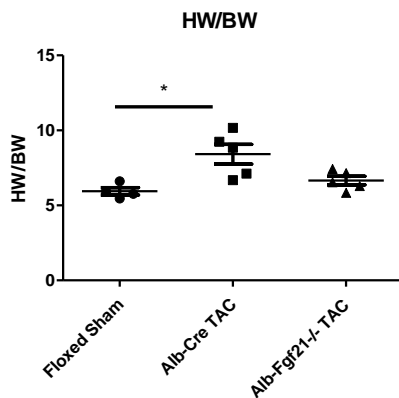




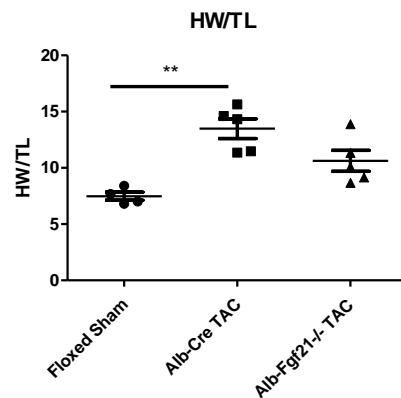
**Εικ.8: Ανάλυση ηχωκαρδιογραφήματος για τον προσδιορισμό της καρδιακής λειτουργίας των ποντικών.** Η ανάλυση στον μεγάλο άξονα έγινε με βάση την κίνηση του στίγματος του ενδοκαρδίου σε B-mode (speckle tracking analysis) και στον μικρό άξονα χρησιμοποιήθηκε ο εντοπισμός του ίχνους της αριστερής κοιλίας σε M-mode (LV trace analysis), 8 εβδομάδες μετά την επέμβαση. **(Α,Γ)** Κλάσμα εξώθησης-EF. **(Β,Δ)** Κλάσμα βράχυνσης-FS **(Ε)** Τελικός Διαστολικός Όγκος-EDV της αριστερής κοιλίας. **(ΣΤ)** Τελικός Συστολικός Όγκος-ESV της αριστερής κοιλίας. **Α,Β:** ανάλυση ως προς τον μικρό άξονα, **Γ,Δ:** ανάλυση ως προς τον μεγάλο άξονα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου \* $p < 0.05$  και # $p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: floxed (n=4). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: Alb-Cre<sup>+/-</sup> (n=5) και Alb-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=5). Η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ των ποντικών προστατεύει από την καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλεί η Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης στα ποντικά.

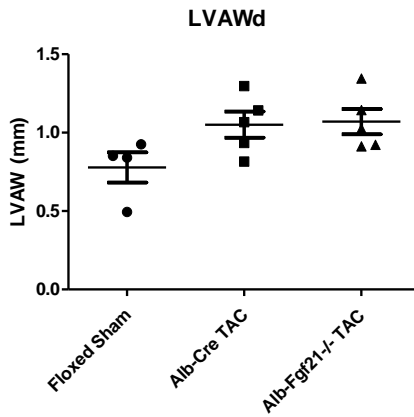
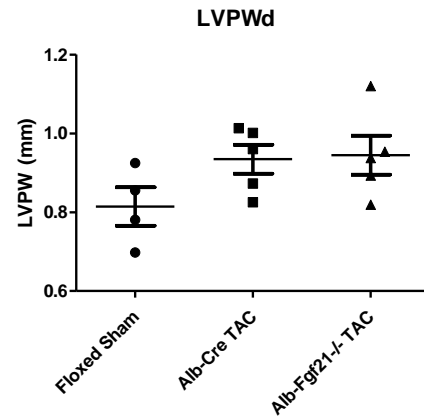
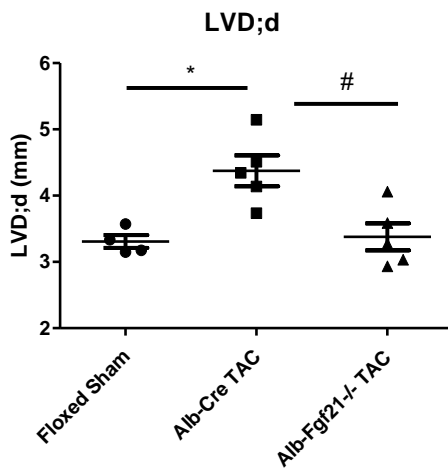
Εκτός από την καρδιακή λειτουργία, εξετάσαμε και την υπερτροφία της καρδιάς των εν λόγω ποντικών. Είδαμε πως το πάχος του πρόσθιου (Εικ.9Γ) και οπίσθιου (Εικ.9Δ) τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας ήταν αυξημένα περίπου κατά 0.3mm και 0.15mm, αντίστοιχα, και στις δύο ομάδες ποντικών με TAC, χωρίς όμως οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με τα sham ποντίκια. Όσον αφορά στην απόσταση του ενδοκαρδίου κατά τη διαστολή (διάμετρος), παρατηρήσαμε ότι ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στα ποντίκια *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* με TAC (4.3mm), σε σχέση και με τα floxed sham (3.3mm) αλλά και με τα ποντίκια *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* με TAC (3.4mm) (Εικ.9Ε). Ολοκληρώσαμε την ανάλυση υπολογίζοντας τους λόγους του βάρους της καρδιάς προς το βάρος του σώματος (Heart Weight/ Body Weight; HW/BW) (Εικ.9Α) και προς το μήκος την κνήμης (Heart Weight/Tibial Length; HW/TL) (Εικ.9Β). Η μέτρηση HW/TL χαρακτηρίζεται ως περισσότερο αξιόπιστη καθώς το μέγεθος και το βάρος των ποντικών επηρεάζεται σημαντικά από το φύλο και την ηλικία. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, τα *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* ποντίκια είχαν αυξημένους και τους δύο λόγους [(HW/BW)≈8.5 και (HW/TL)≈14] σε σχέση με τα floxed sham ποντίκια [(HW/BW)≈6.5 και (HW/TL)≈7], ενώ τα ποντίκια *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* είχαν μειωμένη καρδιακή υπερτροφία [(HW/BW)≈7 και (HW/TL)≈11].

**A**



**B**



**Γ****Δ****Ε**

**Εικ.9: Ανάλυση χαρακτηριστικών της καρδιάς των ποντικών για τον έλεγχο ύπαρξης καρδιακής υπερτροφίας.**

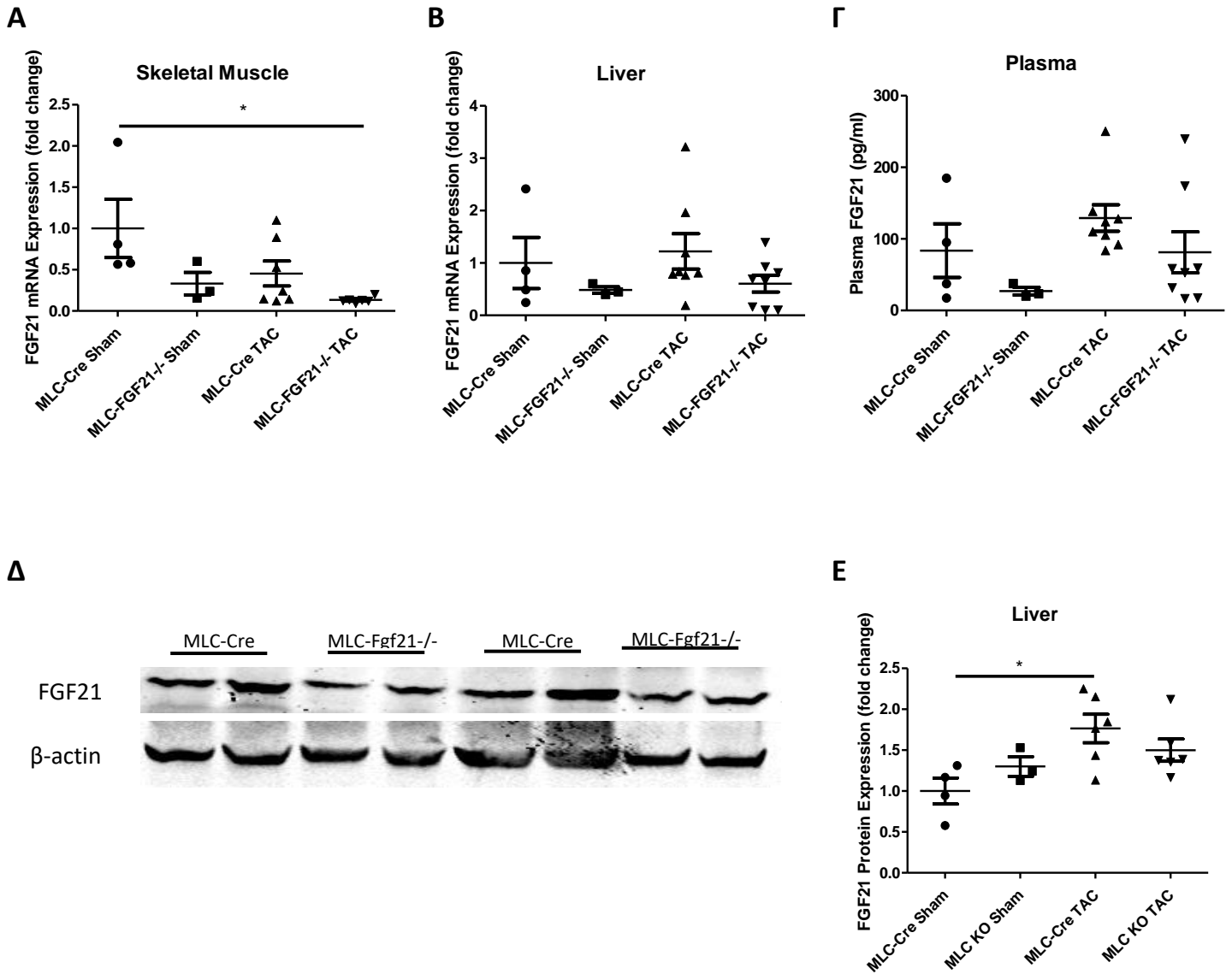
**(Α)** Βάρος της καρδιάς προς το βάρος του σώματος-HW/BW. **(Β)** Βάρος της καρδιάς προς το μήκος της κνήμης-HW/TL. **(Γ)** Πάχος του πρόσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVAWd. **(Δ)** Πάχος οπίσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVPWd. **(Ε)** Διάμετρος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVDd. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου  $*p < 0.05$  και  $\#p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: floxed (n=4). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: Alb-Cre<sup>+/-</sup> (n=5) και Alb-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=5). Left Ventricle Anterior Width in diastole;LVAWd, Left Ventricle Posterior Width in diastole;LVPWd, Left Ventricle Diameter in diastole;LVDd Η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ των ποντικών προστατεύει από την καρδιακή υπερτροφία που έπεται της Εγχείρησης Αορτικής Στένωσης στα ποντίκια.



Στο επόμενο στάδιο της μελέτης, ερευνήσαμε την επίδραση του FGF21 που προέρχεται από τους σκελετικούς μύες στην καρδιακή υπερτροφία. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ποντίκια που δεν εξέφραζαν FGF21 στους σκελετικούς μύες (*MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*) και ποντίκια ελέγχου που εξέφραζαν Cre στους σκελετικούς μύες (*MLC-Cre<sup>+/-</sup>*) και τα υποβάλαμε σε sham χειρουργείο ή σε χειρουργείο TAC.

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του FGF21 στον σκελετικό μυ αυτών των ποντικιών έδειξε ότι στα ποντίκια *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*, τα οποία υπεβλήθησαν είτε σε επέμβαση sham ή σε TAC, η έκφραση του FGF21 ήταν σημαντικά χαμηλή σε σχέση με τα *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* sham (*Εικ. 10Α*). Το ίδιο χαμηλά επίπεδα παρατηρήθηκαν και στην ομάδα των ποντικιών *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* με TAC υποδηλώνοντας ότι η αορτική στένωση δεν επηρεάζει την έκφραση του FGF21 στον σκελετικό μυ (*Εικ.10Α*). Προσδιορίσαμε επιπλέον για όλες τις ομάδες των ποντικιών την έκφραση του FGF21 στο ήπαρ και παρατηρήσαμε μια τάση προς αύξηση στο group των ποντικιών *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* με TAC (*Εικ.10Β*). Μελετώντας και συγκρίνοντας το πλάσμα των ποντικιών με ή χωρίς αορτική στένωση είδαμε ότι τα επίπεδα του FGF21 είχαν αυξητική τάση στα ποντίκια με TAC σε σχέση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου που είχαν δεχθεί sham χειρουργείο (*Εικ. 10Γ*).

Από την ανάλυση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του FGF21 από το ήπαρ των ποντικιών, είδαμε πως τα *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* ποντίκια με TAC παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του FGF21 συγκριτικά με τα ποντίκια ελέγχου (*MLC-Cre<sup>+/-</sup>* sham). Αυτή η αύξηση παρατηρήθηκε σε μικρότερο βαθμό και στα ποντίκια *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* που είχαν υποστεί αορτική στένωση (*Εικ.10Δ,Ε*).

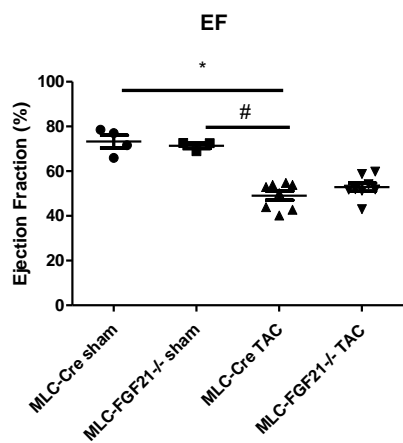


**Εικ.10: Βιοχημικές αναλύσεις ιστού ήπατος, σκελετικού μύος και αίματος των ποντικών.**

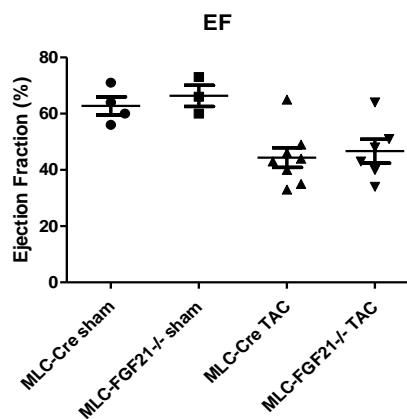
**(A,B)** Σχετική γονιδιακή έκφραση του *FGF21* στον σκελετικό μυ(A) και στο ήπαρ(B). **(Γ)** Επίπεδα πρωτεΐνης του *FGF21* στο πλάσμα. **(Δ)** Αντιπροσωπευτικό Western Blot για την πρωτεΐνη του *FGF21* στο ήπαρ των ποντικών. **(Ε)** Ανάλυση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στο ήπαρ. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου  $*p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* (n=4), *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* (n=3). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* (n=8), *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* (n=8). Ο σκελετικός μυς δε συνεισφέρει στα επίπεδα κυκλοφορικού *FGF21* που αυξάνονται μετά την επέμβαση TAC.

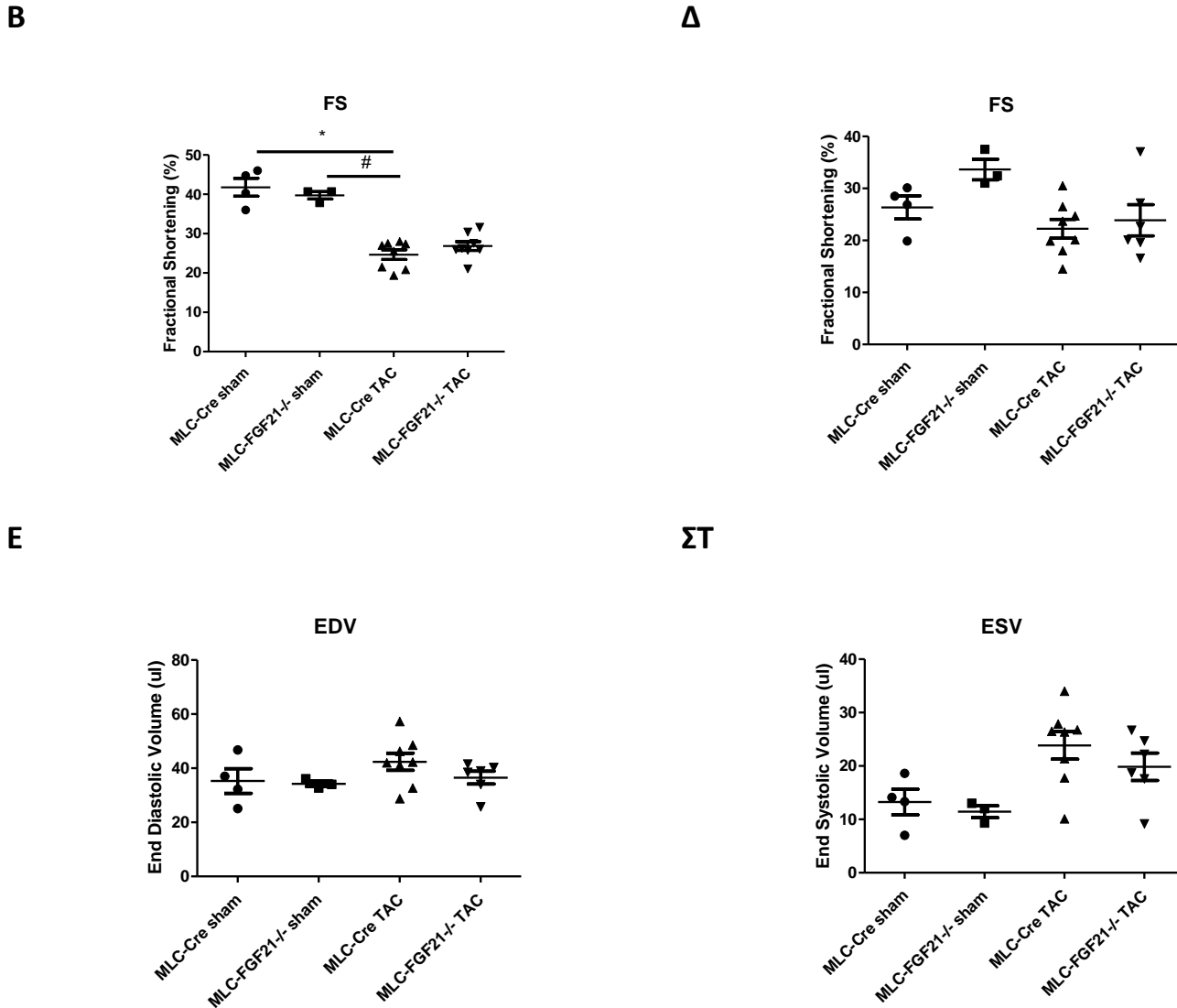
Σε αντιδιαστολή με τα ποντίκια *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>* με TAC, τα ποντίκια *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* με TAC δεν εμφάνισαν βελτίωση της συστολικής καρδιακής λειτουργίας (Εικ.11Α-ΣΤ). Πιο αναλυτικά, τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* και *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*, που είχαν υποστεί επέμβαση TAC, είχαν μειωμένο EF (Εικ.11Α,Γ) και FS (Εικ.11Β,Δ) σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση. Τα ευρήματα αυτά ήταν σε συμφωνία και με τις δύο μεθόδους (άξονες) ανάλυσης. Στον μικρό άξονα, για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* TAC καταγράψαμε EF≈50% και FS≈24%, για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* TAC EF≈53% και FS≈25%, για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* sham EF≈75% και FS≈41% και για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* sham EF≈72% και FS≈39%. Οι αντίστοιχες τιμές στον μεγάλο άξονα για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* TAC ήταν EF≈47% και FS≈23%, για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* TAC EF≈49% και FS≈25%, για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* sham EF≈62% και FS≈27% και για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* sham EF≈68% και FS≈34%. Επιπλέον, είδαμε πως οι τελικοί συστολικοί (Εικ.11ΣΤ) και διαστολικοί (Εικ.11Ε) όγκοι παρουσίαζαν τάση προς αύξηση, παρόλα αυτά η διαγραφή του FGF21 από τον σκελετικό μυ δεν βοήθησε στην αντιμετώπιση της δυσλειτουργίας της καρδιάς, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ευρήματα στην περίπτωση των *Alb-Fgf21<sup>-/-</sup>*.

A



Γ



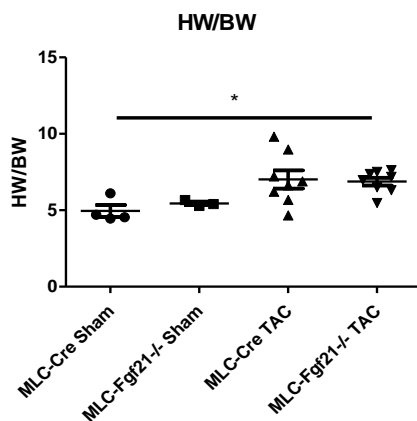


**Εικ.11: Ανάλυση ηχωκαρδιογραφήματος για τον προσδιορισμό της καρδιακής λειτουργίας των ποντικών.** Η ανάλυση στον μεγάλο άξονα έγινε με βάση την κίνηση του στίγματος του ενδοκαρδίου σε B-mode (speckle tracking analysis) και στον μικρό άξονα χρησιμοποιήθηκε ο εντοπισμός του ίχνους της αριστερής κοιλίας σε M-mode (LV trace analysis), 8 εβδομάδες μετά την επέμβαση. **(Α,Γ)** Κλάσμα εξώθησης-EF. **(Β,Δ)** Κλάσμα βράχυνσης-FS **(Ε)** Τελικός Διαστολικός Όγκος-EDV της αριστερής κοιλίας. **(ΣΤ)** Τελικός Συστολικός Όγκος-ESV της αριστερής κοιλίας. **Α,Β:** ανάλυση ως προς τον μικρό άξονα, **Γ,Δ:** ανάλυση ως προς τον μεγάλο άξονα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου \* $p < 0.05$  και # $p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: MLC-Cre<sup>+/+</sup> (n=4), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=3). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: MLC-Cre<sup>+/+</sup> (n=8), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=8). Η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από τον σκελετικό μυ των ποντικών δεν προστατεύει από την καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλεί η Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης στα ποντίκια.

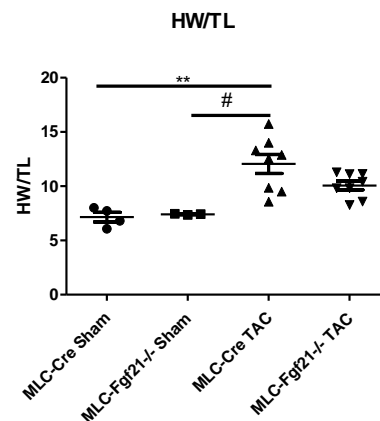
Εξετάζοντας την υπερτροφία καρδιάς αυτών των ποντικών, είδαμε πως οι μετρήσεις του πάχους του πρόσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας των ποντικών με TAC ήταν αυξημένες κατά 0.4mm περίπου για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* και κατά 0.2mm για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*, συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου (Εικ. 12Γ,Δ). Το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας των ποντικών με TAC υπολογίσαμε ότι ήταν περίπου 1mm για τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* και 0.99mm για τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>*, ενώ στις ομάδες των ποντικών με ψευδή εγχείρηση ήταν 0.75mm και 0.76mm αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, και οι δύο ομάδες ποντικών που δέχθηκαν επέμβαση TAC, ανεξαρτήτως αν εξέφραζαν FGF21 στους σκελετικούς μύες ή όχι, είχαν αυξημένη απόσταση του ενδοκαρδιακού ίχνους της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή (4.2mm και 3.9mm) (Εικ. 12Ε) σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου (3.6mm και 3.4mm).

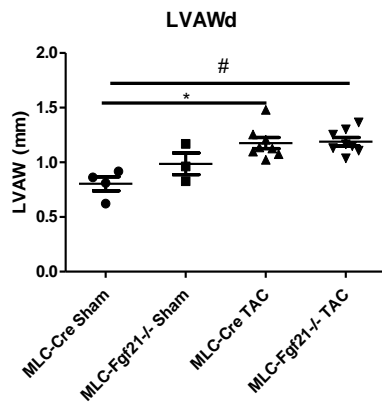
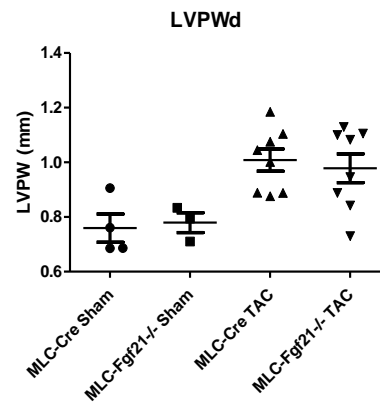
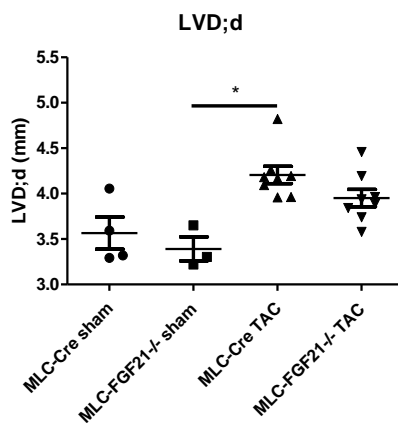
Μετρώντας το σωματικό βάρος των ποντικών, το βάρος των καρδιακών ιστών τους αλλά και το μήκος των κνήμεων υπολογίσαμε τους λόγους HW/BW (Εικ.12Α) και HW/TL (Εικ.12Β) για να προσδιορίσουμε την καρδιακή υπερτροφία. Βρήκαμε ότι στα ποντίκια με επέμβαση TAC, τα *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* είχαν (HW/BW)≈7 και (HW/TL)≈13, τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* είχαν (HW/BW)≈7 και (HW/TL)≈9 και στα ποντίκια με ψευδή εγχείρηση, τα *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* είχαν (HW/BW)≈5 και (HW/TL)≈7.5 και τέλος, τα *MLC-Fgf21<sup>-/-</sup>* είχαν (HW/BW)≈5.5 και (HW/TL)≈7.5.

**A**



**B**



**Γ****Δ****Ε**

**Εικ.12: Ανάλυση χαρακτηριστικών της καρδιάς των ποντικών για τον έλεγχο ύπαρξης καρδιακής υπερτροφίας. (Α)** Βάρος της καρδιάς προς το βάρος του σώματος-HW/BW. **(Β)** Βάρος της καρδιάς προς το μήκος της κνήμης-HW/TL. **(Γ)** Πάχος του πρόσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVAWd. **(Δ)** Πάχος οπίσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVPWd. **(Ε)** Διάμετρος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή-LVDd. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο two-way ANOVA όπου \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  και # $p < 0.05$ . Ομάδες ποντικών με ψευδή εγχείρηση: MLC-Cre<sup>+/-</sup> (n=4), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=3). Ομάδες ποντικών με Εγχείρηση Αορτικής Στένωσης: MLC-Cre<sup>+/-</sup> (n=8), MLC-Fgf21<sup>-/-</sup> (n=8). Left Ventricle Anterior Width in diastole;LVAWd, Left Ventricle Posterior Width in diastole;LVPWd, Left Ventricle Diameter in diastole;LVDd. Η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από τον σκελετικό μυ των ποντικών δεν προστατεύει από την καρδιακή υπερτροφία που έπεται της Εγχείρησης Αορτικής Στένωσης στα ποντίκια.

## 4. Συζήτηση

Η καρδιά αναπτύσσει υπερτροφία όταν βρίσκεται υπό συνθήκες stress, οι οποίες συνήθως σχετίζονται με αυξημένες απαιτήσεις για μεταφορά αίματος και οξυγόνου στο υπόλοιπο σώμα που τα φυσιολογικά καρδιομυοκύτταρα αδυνατούν να ανταπεξέλθουν. Σε αυτές τις περιπτώσεις η καρδιά εμφανίζει υπερτροφική ανάπτυξη σαν ένα μηχανισμό απόκρισης. Η υπερτροφία αρχικά μπορεί να είναι προσαρμοστική αλλά όταν μετατρέπεται σε χρόνια κατάσταση, γίνεται παθολογική που αποτελεί βασικό παράγοντα νοσηρότητας και θνησιμότητας. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η αυξημένη αρτηριακή πίεση που αναγκάζει την αριστερή κοιλία της καρδιάς (θάλαμος άντλησης αίματος προς τη μεγάλη κυκλοφορία) να δουλεύει εντονότερα. Για την κάλυψη αυτής της ανάγκης, ο μυϊκός ιστός του τοιχώματος του θαλάμου πυκνώνει. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας στηρίζεται στην αύξηση του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων[13],[106] εφόσον αυτά παύουν να έχουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό έπειτα από 1 με 2 κύκλους[107]. Η διεύρυνση του καρδιακού μυός κάνει την καρδιά λιγότερο ελαστική και την καθιστά ανίκανη να αντλεί όσο αίμα χρειάζεται.

Η φυσιολογική υπερτροφία, η οποία αντιστοιχεί σε ήπια αύξηση της καρδιακής μάζας, παρατηρείται κατά την ανάπτυξη, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και στους αθλητές. Γενικά είναι μια αντιστρέψιμη κατάσταση. Ωστόσο, η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο αιφνίδιου καρδιακού θανάτου[108],[109],[110],[111]. Απεναντίας, η παθολογική υπερτροφική ανάπτυξη συνοδεύεται από έντονη αύξηση του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων, ίνωση και καρδιακή αναδιαμόρφωση. Συνδυαστικά αυτά τα χαρακτηριστικά οδηγούν σε μη αντιστρέψιμη καρδιακή δυσλειτουργία.

Στο πέρας των χρόνων, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα ζώων που μιμούνται την παθοφυσιολογία διαφορετικών καρδιαγγειακών παθήσεων με σκοπό την κατανόηση της βιολογίας και

των μηχανισμών που διέπουν την εκάστοτε νόσο. Για την προσομοίωση καρδιακής υπερτροφικής ανάπτυξης χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στη φυσιολογική ανάπτυξη της καρδιάς[19],[20],[22] επέμβαση Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης[16], χορήγηση δόσης Αγγειοτενσίνης[101], χορήγηση Ισοπροτερενόλης[55]. Η έρευνα μας βασίστηκε στο μοντέλο της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης που προκαλεί υπερτροφία της καρδιάς λόγω αυξημένης πίεσης.

Η ιδέα για τη μελέτη του ρόλου του FGF21 στην υπερτροφία βασίστηκε σε δύο ξεχωριστές έρευνες. Αρχικά, το εργαστήριο του Δρ. Δροσάτου, σε προηγούμενη έρευνα που αφορούσε στο ρόλο του KLF5 στη δυσλειτουργία της καρδιάς, είχε ανακαλύψει πως η διαγραφή του μεταγραφικού παράγοντα Kruppel-like factor 5 (KLF5) από την καρδιά ποντικών ( *$\alpha$ MHC-KLF5<sup>-/-</sup>*) οδηγεί, μετά τους 6 μήνες, στην ανάπτυξη καρδιακής δυσλειτουργίας[112]. Μελέτη της ίδιας ομάδας έδειξε πως τα  *$\alpha$ MHC-KLF5<sup>-/-</sup>* ποντίκια που ακολουθούν δίαιτα υψηλή σε λιπαρά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης FGF21 στο πλάσμα του αίματος και υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA του FGF21 στην καρδιά[113]. Παράλληλα, τα εργαστήρια των Δρ. Δράκου και Δρ. Chaudhuri παρατήρησαν υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης του FGF21 στο πλάσμα ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Έτσι λοιπόν, γεννήθηκε το ερώτημα αν τα αυξημένα επίπεδα του FGF21 είναι κομμάτι της παθολογίας της Καρδιακής Υπερτροφίας ή είναι κομμάτι των προστατευτικών μηχανισμών απόκρισης του οργανισμού.

Ο FGF21 είναι μία πεπτιδική ορμόνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ[28] και σε μικρότερο βαθμό από τον θύμο αδένα, τον σκελετικό μυ[114], τους λιπώδεις ιστούς, το πάγκρεας και την καρδιά. Η ορμόνη αυτή συμβάλει στην προσαρμογή ολόκληρου του οργανισμού σε πολλαπλές φυσιολογικές ή μη προκλήσεις όπως για παράδειγμα όταν υπάρχει περιορισμός στα θρεπτικά συστατικά, αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων, έκθεση σε κρύο και στρες. Σε αντίθεση με άλλες ορμόνες, ο ρόλος του FGF21 δεν περιορίζεται σε έναν ιστό και τα μονοπάτια σηματοδότησης του ρυθμίζουν πολυάριθμες διαδικασίες. Ανάλογα με το βιολογικό ερέθισμα και τον ιστό παραγωγής, ο FGF21 δύναται να έχει ενδοκρινή[88],[101],[113], παρακρινή[47],[85] αλλά και αυτοκρινή



δράση[47],[85],[55] . Ορισμένες από τις βασικές του λειτουργίες είναι ο συντονισμός της κετογένεσης και της ηπατικής γλυκονογένεσης, η ενεργοποίηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων και η διέγερση της πρόσληψης της γλυκόζης στους λιπώδης ιστούς, στον σκελετικό μυ και στην καρδιά. Επιπρόσθετα, είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή του λευκού λιπώδους ιστού σε φαιό και την ενεργοποίηση της θερμογένεσης στον φαιό λιπώδη ιστό[47]. Παρουσιάζει επίσης αντιφλεγμονώδη ρόλο[50],[51],[52],[53]. Ο FGF21, για να δράσει στους διάφορους ιστούς, προσδέεται στον ειδικό υποδοχέα του (FGFR1). Επειδή αυτή η πρόσδεση έχει χαμηλή συγγένεια, απαιτείται η συμμετοχή ενός συνυποδοχέα, του β-klotho. Η ένωση των τριών αυτών παραγόντων οδηγεί στη δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου που επιτρέπει πλέον τη μεταγωγή σήματος. Η έκφραση του β-klotho σ' έναν ιστό τον καθιστά πιθανό ιστό-στόχο του FGF21.

Ο ρόλος του FGF21 στην παθοφυσιολογία ασθενειών θεωρείται αμφιλεγόμενος καθώς επηρεάζεται από το βιολογικό ερέθισμα αυτό καθαυτό, από τη μέθοδο πρόκλησης της πάθησης και από το χρονικό πλαίσιο μελέτης της αντίδρασης του οργανισμού ως απόκριση στη σηματοδότηση του FGF21 (μακροπρόθεσμη ή βραχυπρόθεσμη μελέτη). Αν πρόκειται για έρευνα με χορήγηση ανασυνδυασμένου FGF21, σημαντική παράμετρος είναι η δόση και η συχνότητα χορήγησής του. Στις μελέτες απώλειας λειτουργίας («loss-of-function»), τα αποτελέσματα εξαρτώνται από είδος της γονιδιακής απαλοιφής (ολική ή ιστοειδική) ή από τον τρόπο που γίνεται η σίγαση του γονιδίου (siRNA,shRNA).

Άξιο αναφοράς είναι και το γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα του FGF21 σε μια νοσηρή κατάσταση έχουν περιγραφεί ως στοιχείο ανθεκτικότητας στη δράση του FGF21 ή συμμετοχής του στην παθολογία της ασθένειας.

Συγκεκριμένα, έρευνες σε μοντέλα παχυσαρκίας ποντικών (DIO, ob/ob, db/db) έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της κυκλοφορούσας ορμόνης είναι πολύ υψηλή[115],[116],[117]. Μελέτη με DIO ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε FGF21 έδειξε εξασθενημένη σηματοδότηση τόσο στο ήπαρ όσο και

στον λευκό λιπώδη ιστό. Αντίστοιχα, οι συγκεντρώσεις των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (Non-Esterified Fatty Acids;NEFAs) και της γλυκόζης παρουσίαζαν ελάχιστη μείωση, το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι ο FGF21 αδυνατεί να συμβάλει στην ομοίωση και την εξισορρόπηση της γλυκόζης και την αποτελεσματική οξείδωση των λιπιδίων λόγω μειωμένης σηματοδότησης. Τα υψηλά επίπεδα FGF21 στον οργανισμό των ποντικών με DIO σε συνδυασμό με την αδυναμία απόκρισης στις εξωγενείς δόσεις, θεωρήθηκαν ως ένδειξη ανθεκτικότητας της παχυσαρκίας στη δράση του FGF21[118].

Η παχυσαρκία συχνά ακολουθείται από ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας. Έρευνα σε παχύσαρκους αρουραίους Zucker έδειξε πως το βάρος της αριστερής κοιλίας, ο λόγος HW/TL και το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας ήταν αυξημένα συγκριτικά με τους αρουραίους της ομάδας ελέγχου (λεπτοί υγιείς αρουραίοι). Επιπλέον, τα επίπεδα πρωτεΐνης των ANP, BNP και TNFα, που λειτουργούν ως δείκτες ύπαρξης καρδιακής υπερτροφίας, ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στις καρδιές των παχύσαρκων αρουραίων[119]

Σύμφωνα με έρευνα σε ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια *FGF21<sup>-/-</sup>* (ολική διαγραφή γονιδίου σε όλους τους ιστούς) που τρέφονταν με κανονική δίαιτα ή δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, η έλλειψη του FGF21 στα παχύσαρκα ποντίκια οδήγησε στην ανάπτυξη πιο σοβαρής καρδιακής υπερτροφίας σε σχέση με αυτή που είχαν τα παχύσαρκα ποντίκια αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, το βάρος της καρδιάς και ο λόγος HW/TL ήταν αυξημένα και στις δύο ομάδες παχύσαρκων ποντικών σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου (λεπτά υγιή ποντίκια αγρίου τύπου και *FGF21<sup>-/-</sup>*) αλλά τα παχύσαρκα ποντίκια *FGF21<sup>-/-</sup>* σημείωσαν μεγαλύτερες ενδείξεις και σε σχέση με τα παχύσαρκα ποντίκια αγρίου τύπου. Επιπρόσθετα, τα δεδομένα από τα ηχοκαρδιογραφήματα έδειξαν πως στα παχύσαρκα *FGF21<sup>-/-</sup>*, το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος του μυοκαρδίου, η εσωτερική διάμετρος της αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή και τη διαστολή, όπως επίσης και οι τελικοί συστολικοί και διαστολικοί όγκοι, ήταν ιδιαίτερος αυξημένα συγκριτικά με τα ποντίκια *FGF21<sup>-/-</sup>* σε κανονική δίαιτα αλλά και συγκριτικά με τα παχύσαρκα ποντίκια αγρίου τύπου που παρουσίαζαν επίσης υψηλές τιμές.

Ο FGF21 έχει προστατευτικό ρόλο και σε άλλα μοντέλα προκαλούμενης υπερτροφίας. Η επώαση καρδιομυοκυττάρων με φαινυλεφρίνη έπεται αύξηση του μεγέθους τους (δείκτης υπερτροφίας). Η προ-θεραπεία καρδιομυοκυττάρων νεογνού αρουραίου με FGF21 προλαμβάνει την επίδραση της φαινυλεφρίνης στο μέγεθος των κυττάρων. Επιπλέον, μετριάζει τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. (Planavila 2013) Η δράση του FGF21 περιορίζει επίσης την υπερτροφία που προκαλείται σε ποντίκια και καρδιομυοκύτταρα νεογνού αρουραίου ύστερα από χορήγηση AngII. [104]

Έχει αποδειχθεί επίσης ότι ο FGF21 που προέρχεται από τους μύες μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι της καρδιακής αναδιαμόρφωσης που έπεται της ισχαιμίας του μυοκαρδίου (Myocardial Ischemia;MI). Ανάμεσα σε ομάδες ποντικών που έχουν υποστεί MI και σε ποντίκια ελέγχου με ψευδή εγχείρηση χορηγήθηκε είτε αδενοϊός που περιείχε το γονίδιο του FGF21 υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (ισχυρός υποκινητής που χρησιμοποιείται για την οδηγούμενη έκφραση γονιδίων) είτε αδενοϊός που εκφράζει τη β-γαλακτοσιδάση. Η χορήγηση έγινε στους μύες των προσαγωγών των ποντικών με σκοπό την έκφραση του FGF21 από του σκελετικούς μύες. Τα ποντίκια ελέγχου με MI παρουσίασαν αυξημένο λόγο HW/BW σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου με ψευδή εγχείρηση και μεγαλύτερη διάμετρο της αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή. Επιπλέον, το κλάσμα βράχυνσης (FS) ήταν εξαιρετικά μειωμένο στην ομάδα ποντικών με MI. Όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι ήταν βελτιωμένες στην ομάδα των ποντικών που είχαν υποστεί MI και εξέφραζαν περισσότερο FGF21 από τους μύες.[114]

Η σπουδαιότητα του FGF21 στις καρδιαγγειακές παθήσεις και η συμβολή του ήπατος και του σκελετικού μύος στη δράση του, πυροδότησαν το ενδιαφέρον μας και συνέβαλαν στη δημιουργία του αρχικού μας πλάνου. Αναλύσαμε τα επίπεδα του FGF21 στο μοντέλο της καρδιακής υπερτροφίας που προκαλείται από αυξημένη πίεση και την επίδραση της απώλειας δράσης του FGF21 στην υπερτροφία. Αρχικά, εξετάσαμε τη συμβολή του ηπατικού FGF21 στην καρδιακή υπερτροφία που προκαλείται από επέμβαση Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης και την απόκριση του οργανισμού στην περίπτωση που το

ήπαρ δεν παράγει την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, ερευνήσαμε αν και κατά πόσο οι σκελετικοί μύες συμβάλλουν στα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο αίμα και στην παθολογία της νόσου.

Η επέμβαση της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του FGF21 στο ήπαρ των ποντικών *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*, σημειώθηκε αυξητική τάση στο ήπαρ των ποντικών *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* και *MLC-FGF21<sup>-/-</sup>* ενώ στα *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* τα επίπεδα έκφρασης του mRNA ήταν σχεδόν μηδενικά, όπως ήταν αναμενόμενο.

Η ανάλυση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από το ήπαρ των ποντικών έδειξε μια τάση προς αύξηση στην ομάδα των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* TAC συγκριτικά με τα ποντίκια floxed sham. Στα ποντίκια *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* με TAC τα επίπεδα πρωτεΐνης του ηπατικού FGF21 ήταν ανάλογα με αυτά των floxed sham. Απεναντίας, τα ποντίκια *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* TAC βρέθηκαν να έχουν ιδιαιτέρως αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης FGF21 στο ήπαρ και τα *MLC-FGF21<sup>-/-</sup>* TAC μια τάση για αύξηση. Η διαφορά μεταξύ των δύο διαγονιδιακών μοντέλων πιθανόν να έγκειται στο μικρό αριθμό floxed sham ποντικών που χρησιμοποιήσαμε σαν ομάδα ελέγχου για τα *Alb-Cre<sup>+/-</sup>* TAC και στη μεγάλη απόκλιση που υπάρχει μεταξύ διαφορετικών ποντικών floxed που υπέστησαν εγχείρηση sham. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης FGF21 στο πλάσμα παρουσίασε αύξηση ή τάση για αύξηση σε όλες τις ομάδες ποντικών με στένωση στην αορτή. Πιο έντονη ενίσχυση σημείωσε η ομάδα των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*. Η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ φαίνεται να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα πρωτεΐνης του στην κυκλοφορία του αίματος. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η επέμβαση της Εγκάρσιας Αορτικής Στένωσης οδηγεί σε ενισχυμένη έκκριση του FGF21 από το ήπαρ.

Εξέταση της καρδιακής λειτουργίας των ποντικών επιβεβαίωσε πως η εγχείρηση TAC προκάλεσε ιδιαίτερα αυξημένη πίεση στην περιοχή στένωσης της αορτής, η οποία με τη σειρά της επηρέασε αρνητικά τη λειτουργία της καρδιάς των *Alb-Cre<sup>+/-</sup>*, *MLC-Cre<sup>+/-</sup>* και *MLC-FGF21<sup>-/-</sup>* ποντικών. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* ποντίκια, παρά την εγχείρηση TAC, είχαν φυσιολογικές τιμές για τις παραμέτρους EF, FS και ESV ενώ ο Τελικός Διαστολικός Όγκος ήταν ελάχιστα αυξημένος σε

σχέση με τον αντίστοιχο όγκο των ποντικών ελέγχου (floxed sham). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ ποντικών που έχουν δεχθεί εγχείρηση αορτικής στένωσης συμβάλλει στην προστασία και διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας της καρδιάς τους.

Τέλος, από τη μελέτη του υπερτροφικού προφίλ των ποντικών είδαμε ότι η εγχείρηση TAC οδήγησε στην ενίσχυση του πάχους του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας καθώς επίσης και στη διεύρυνση της διαμέτρου της κοιλίας. Ωστόσο, τα ποντικά *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* δεν εμφανίζουν την ίδια απόσταση ενδοκαρδίου κατά τη διαστολή. Παρόλου που οι καρδιές των *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* τείνουν να αναπτύξουν υπερτροφία, δεν υπόκεινται διάταση της κοιλίας όπως τα υπόλοιπα ποντικά με στένωση. Επιπλέον, οι λόγοι HW/BW και HW/TL δείχνουν πως δημιουργείται υπερτροφία μετά την επέμβαση, η οποία προλαμβάνεται όταν ο FGF21 δεν εκφράζεται στο ήπαρ.

Βάσει των αποτελεσμάτων μας, προτείνουμε ότι η διαγραφή του FGF21 από το ήπαρ δρα προστατευτικά έναντι της καρδιακής υπερτροφίας που προκαλείται από αυξημένη πίεση ενώ ο FGF21 που προέρχεται από τον σκελετικό μυ δε συμβάλλει με ανάλογο τρόπο.

Τα ποντικά *Alb-FGF21<sup>-/-</sup>* έχουν πολύ χαμηλή συγκέντρωση FGF21 στο πλάσμα και προστατεύονται από την υπερτροφία. Μια διαφορετική ερμηνεία είναι να υπάρχει ένα κατώφλι για τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που όταν ξεπερνιέται αλλάζει τη δράση της σε επιβλαβή (*μέτρον ἄριστον*).

Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από την έρευνα των *Feng Gan et al.* που δούλεψαν με διαβητικούς ασθενείς και ασθενείς με αγγειακή ασβέστωση και είδε πως τα χαμηλά επίπεδα FGF21 στον ορό του αίματος σε αρχικό στάδιο της νόσου αποτελούν πρόγνωση της καλύτερης εξέλιξης της ασθένειας[120]. Ακόμα μία φορά, προτείνεται ότι η υψηλή συγκέντρωση FGF21 αποτελεί δείκτη παθολογίας[121],[122],[123],[124].

## 5. Μελλοντικές Προοπτικές

Μελλοντικά, θα εργαστούμε στο μοντέλο *αMHC-FGF21<sup>-/-</sup>* όπου γίνεται ιστοειδική απαλοιφή του γονιδίου του FGF21 από τα καρδιομυοκύτταρα. Ένας από τους στόχους μας είναι να εξακριβώσουμε αν η υπερτροφία από υπερφόρτωση πίεσης συνοδεύεται με έκκριση της ορμόνης FGF21 από την καρδιά.

Σε μελέτη με διαφορετικό μοντέλο καρδιακής υπερτροφίας έχειδειχθεί ότι ο FGF21 όχι μόνο παράγεται από τα καρδιομυοκύτταρα αλλά δρα και αυτοκρινώς προστατεύοντας από την καρδιακή υπερτροφία [55]. Συγκεκριμένα, προκλήθηκε υπερτροφία με χορήγηση Ισοπροτερενόλης σε ποντίκια που είχαν έλλειψη του γονιδίου του FGF21 εκ γενετής (*Fgf21<sup>-/-</sup>*) και σε ποντίκια αγρίου τύπου. Τα ποντίκια *Fgf21<sup>-/-</sup>* παρουσίασαν αυξημένο βάρος καρδιάς, καρδιακή δυσλειτουργία και ενδείξεις ενισχυμένης διαστολής της καρδιάς σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Η χορήγηση εξωγενούς FGF21 στα KO ποντίκια βελτίωσε σημαντικά όλες τις προαναφερθείσες παραμέτρους. Εμβαθύνοντας στην έρευνα, βρέθηκε πως το μονοπάτι που συνδέει τη SIRT1 με τον PPARα προς επαγωγή της έκφρασης του FGF21 στο ήπαρ, έχει τον ίδιο καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή της έκφρασης και έκκρισης του FGF21 από τα κύτταρα της καρδιάς. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του FGF21 στην καρδιά παρουσίαζαν έντονη αύξηση σαν απάντηση σε διαφορετικά είδη στρες (χορήγηση Ισοπροτερενόλης, Εγκάρσια Αορτική Στένωση, Ισχαμία του Μυοκαρδίου). Ακόμη, δείχθηκε ότι από τα κύτταρα της καρδιάς, τα καρδιομυοκύτταρα είχαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA του FGF21. Τέλος, με δυο σειρές πειραμάτων, αποδείχθηκε πως είναι απαραίτητη η έκφραση και η έκκριση του FGF21 από την καρδιά για την αντιμετώπιση της υπερτροφίας. Είναι σημαντικό να εξετάσουμε αν ο αυτοκρινής τρόπος δράσης του FGF21 που προτείνουν σε αυτή την έρευνα υφίσταται στο δικό μας μοντέλο και αν θα μπορούσε να έχει τον ίδιο προστατευτικό ρόλο. Παρόλο που η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο πλάσμα μειώνεται δραματικά με τη διαγραφή του γονιδίου του FGF21 από το ήπαρ, αυτό δεν αποκλείει την πιθανότητα ο FGF21 να παράγεται από τα καρδιομυοκύτταρα και να δρα άμεσα

σε αυτά χωρίς να μεταφερθεί πρώτα στην κυκλοφορία του αίματος. Επομένως, ο FGF21 που παράγεται στην καρδιά θα μπορούσε να έχει διαφορετικό χρόνο δράσης και διαφορετικά αποτελέσματα σε σύγκριση με αυτόν της ηπατικής προέλευσης.

Στους μελλοντικούς μας στόχους ανήκει και η αναζήτηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη δράση του FGF21. Χορήγηση FGF21 σε ποντίκια με καρδιακή υπερτροφία που προκαλείται από AngII βελτίωσε το υπερτροφικό προφίλ και τη δυσλειτουργία της καρδιάς των ποντικών μέσω της SIRT1. Επιπλέον, μείωσε την έκταση της ίνωσης και την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων[104]. Στο μοντέλο καρδιακής υπερτροφίας που χρησιμοποιήσαμε εμείς, μπορούμε να εξετάσουμε αν η επιβλαβής δράση του FGF21 σχετίζεται με το μονοπάτι ενεργοποίησης της SIRT1. Στην προαναφερθείσα έρευνα, τα ποντίκια με σίγαση του γονιδίου της SIRT1 στην καρδιά εμφανίζουν υπερτροφία και ίνωση. Ερωτήματα που μένει να απαντηθούν αφορούν στο στόχο της SIRT1 και αν αυτοί εκδηλώνουν διαφορετική απόκριση ανάλογα με την αιτία πρόκλησης της υπερτροφίας.

Ο FGF21 έχει αποδεδειγμένα βασικό ρόλο σε πληθώρα ασθενειών[125],[126],[127],[26], εμπλέκεται ενεργά στις καρδιαγγειακές παθήσεις και επηρεάζει την παθοφυσιολογία της καρδιάς[128],[91],[103] οπότε είναι σημαντικό να διερευνηθούν πλήρως τα μονοπάτια και οι μηχανισμοί δράσης του με απώτερο σκοπό τον σχεδιασμό θεραπειών.

## 6. Ακρωνύμια

AKT1	protein kinase B
Alb	Albumin
AMPK	5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
ATF3	Activating transcription factor 3
ATF3	Activating Transcription Factor 3
ATP	Adenosine Triphosphate
BAD	Bcl2 antagonist of cell death
BAT	Brown Adipose Tissue
BNP	B-type natriuretic peptide
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CIP	Cerulein-Induced Pancreatitis
CO	Cardiac Output
CSF	Cerebrospinal fluid
DIO	Diet Induced Obesity
DOX	Doxorubicin
EDV	End Diastolic Volume
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Elk-1	ETS Like-1 protein
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated protein Kinase
ESV	End Systolic Volume
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FGF	Fibroblast Growth Factor
fl/fl	floxed/floxed
FRS2a	FGFR substrate 2 alpha
FS	Fractional Shortening
GLUT1	Glucose Transporter 1
H3	Histone 3
HRP	Horseradish Peroxidase
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin-6
ISR	Integrated Stress Response
KLB	$\beta$ -klotho
KO	Knock Out



LKB1	Liver Kinase B1
MCD	Methionine and Choline Deficient
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MLC	Muscle Light Chain
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non Alcoholic Steatohepatitis
PGC1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PPAR $\alpha$	Proliferate Activated Receptor $\alpha$
RNAi	RNA interference
ROS	Reactive Oxygen Species
SAT	Subcutaneous Adipose Tissue
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIRT1	Sirtuin 1
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SVR	Systemic Vascular Resistance
TAC	Transverse Aortic Constriction
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
UCP1	Uncoupling Protein 1
UCP1-Tg	UCP1-Transgenic
WAT	White Adipose Tissue
WT	Wild Type
$\alpha$ -MHC	Myosin Heavy Chain $\alpha$
$\beta$ -MHC	Myosin Heavy Chain $\beta$

## 7. Βιβλιογραφία

1. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and O.A. Ibrahimi, *Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 107-37.
2. Aaronson, P.I., J.P. Ward, and M.J. Connolly, *The cardiovascular system at a glance*. 2020: John Wiley & Sons.
3. ACHILLES, J.P. and G.W. WITHROW, *Cardiovascular Physiology*. 2013, Philadelphia.
4. Anderson, R.H., R. Razavi, and A.M. Taylor, *Cardiac anatomy revisited*. J Anat, 2004. **205**(3): p. 159-77.
5. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
6. Morganroth, J., et al., *Comparative left ventricular dimensions in trained athletes*. Ann Intern Med, 1975. **82**(4): p. 521-4.
7. Davis, D. and H. Blumgart, *Cardiac hypertrophy-Its relation to coronary arteriosclerosis and congestive heart failure*. Annals of Internal Medicine, 1937. **11**(6): p. 1024-1038.
8. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
9. Nakamura, M. and J. Sadoshima, *Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(7): p. 387-407.
10. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 38-48.
11. Lombardi, M., et al., *Mitochondrial Energetics and Ca<sup>2+</sup>(+)-Activated ATPase in Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy*. J Clin Med, 2020. **9**(6).
12. You, J., et al., *Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(3): p. H552-H562.
13. Dorn, G.W., 2nd, J. Robbins, and P.H. Sugden, *Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. 1171-5.
14. Weiss, A., et al., *Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2958-63.
15. Chopra, S., et al., *Physiology and clinical significance of natriuretic hormones*. Indian J Endocrinol Metab, 2013. **17**(1): p. 83-90.
16. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
17. Kaplan, M.L., et al., *Cardiac adaptations to chronic exercise in mice*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H1167-73.
18. Wiesel, P., et al., *Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice*. Hypertension, 1997. **29**(4): p. 1025-30.
19. Gruver, C.L., et al., *Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice*. Endocrinology, 1993. **133**(1): p. 376-88.
20. Milano, C.A., et al., *Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10109-13.

21. Hunter, J.J., et al., *Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 23173-8.
22. Hirota, H., et al., *Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4862-6.
23. Graham, B.H., et al., *A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 226-34.
24. Oulion, S., S. Bertrand, and H. Escriva, *Evolution of the FGF Gene Family*. Int J Evol Biol, 2012. **2012**: p. 298147.
25. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family*. Dev Dyn, 2008. **237**(1): p. 18-27.
26. Fisher, F.M. and E. Maratos-Flier, *Understanding the Physiology of FGF21*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 223-41.
27. Nishimura, T., et al., *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(1): p. 203-6.
28. Kharitonov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1627-35.
29. Ge, X., et al., *Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34533-41.
30. Xu, J., et al., *Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 250-9.
31. Li, H., et al., *Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 272.
32. Badman, M.K., et al., *Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 4931-40.
33. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.
34. Puigserver, P. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator*. Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 78-90.
35. Rhee, J., et al., *Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4012-7.
36. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
37. Huang, T.Y., et al., *Overexpression of PGC-1alpha increases peroxisomal activity and mitochondrial fatty acid oxidation in human primary myotubes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2017. **312**(4): p. E253-E263.
38. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(10): p. 992-1003, 1-15.
39. Fisher, F.M., et al., *Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo*. Endocrinology, 2011. **152**(8): p. 2996-3004.

40. Potthoff, M.J., et al., *FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10853-8.
41. Li, H., et al., *Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3*. Diabetes, 2012. **61**(4): p. 797-806.
42. De Sousa-Coelho, A.L., et al., *FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation*. J Lipid Res, 2013. **54**(7): p. 1786-97.
43. Chau, M.D., et al., *Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(28): p. 12553-8.
44. Coskun, T., et al., *Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6018-27.
45. Must, A. and N.M. McKeown, *The Disease Burden Associated with Overweight and Obesity*. 2000.
46. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
47. Fisher, F.M., et al., *FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 271-81.
48. Barbera, M.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1486-93.
49. Li, H., et al., *Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride*. J Hepatol, 2010. **53**(5): p. 934-40.
50. Fisher, F.M., et al., *Fibroblast growth factor 21 limits lipotoxicity by promoting hepatic fatty acid activation in mice on methionine and choline-deficient diets*. Gastroenterology, 2014. **147**(5): p. 1073-83 e6.
51. Hernandez, G., et al., *Pancreatitis is an FGF21-deficient state that is corrected by replacement therapy*. Sci Transl Med, 2020. **12**(525).
52. Kim, C.S., et al., *Deficiency of fibroblast growth factor 21 aggravates obesity-induced atrophic responses in skeletal muscle*. J Inflamm (Lond), 2019. **16**: p. 17.
53. Wang, S., et al., *Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway*. Cell Death Dis, 2017. **8**(8): p. e3018.
54. Liu, T., et al., *NF-kappaB signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**.
55. Planavila, A., et al., *Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2019.
56. Kharitonov, A., et al., *FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 1-7.
57. Kurosu, H., et al., *Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 26687-26695.
58. Johnson, D.E. and L.T. Williams, *Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family*. Adv Cancer Res, 1993. **60**: p. 1-41.
59. Zhang, X., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15694-700.
60. Ornitz, D.M., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15292-7.
61. Yie, J., et al., *FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation*. FEBS Lett, 2009. **583**(1): p. 19-24.

62. Micanovic, R., et al., *Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 227-34.
63. Ding, X., et al., *betaKlotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism*. Cell Metab, 2012. **16**(3): p. 387-93.
64. Adams, A.C., et al., *FGF21 requires betaklotho to act in vivo*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49977.
65. Adams, A.C., et al., *The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue*. Mol Metab, 2012. **2**(1): p. 31-7.
66. Yie, J., et al., *Understanding the physical interactions in the FGF21/FGFR/beta-Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling*. Chem Biol Drug Des, 2012. **79**(4): p. 398-410.
67. Markan, K.R., et al., *Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding*. Diabetes, 2014. **63**(12): p. 4057-63.
68. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 415-25.
69. Li, Y., et al., *Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21*. Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 539-49 e7.
70. Purushotham, A., et al., *Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation*. Cell Metab, 2009. **9**(4): p. 327-38.
71. Lee, K.J., et al., *Expression of Fibroblast Growth Factor 21 and beta-Klotho Regulates Hepatic Fibrosis through the Nuclear Factor-kappaB and c-Jun N-Terminal Kinase Pathways*. Gut Liver, 2018. **12**(4): p. 449-456.
72. BonDurant, L.D. and M.J. Potthoff, *Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis*. Annu Rev Nutr, 2018. **38**: p. 173-196.
73. Dutchak, P.A., et al., *Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones*. Cell, 2012. **148**(3): p. 556-67.
74. van Baak, M.A., et al., *Adipose tissue contribution to plasma fibroblast growth factor 21 and fibroblast activation protein in obesity*. Int J Obes (Lond), 2020. **44**(2): p. 544-547.
75. Muise, E.S., et al., *Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(2): p. 403-12.
76. Holland, W.L., et al., *An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 790-7.
77. Lin, Z., et al., *Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 779-89.
78. Arner, P., et al., *FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1725-30.
79. Li, X., et al., *Inhibition of lipolysis may contribute to the acute regulation of plasma FFA and glucose by FGF21 in ob/ob mice*. FEBS Lett, 2009. **583**(19): p. 3230-4.
80. Tan, B.K., et al., *Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid: relationship with plasma FGF21 and body adiposity*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 2758-62.
81. Bookout, A.L., et al., *FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1147-52.
82. Owen, B.M., et al., *FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1153-6.
83. Sarruf, D.A., et al., *Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats*. Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1817-24.
84. Johnson, C.L., et al., *Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1795-804.



85. Coate, K.C., et al., *FGF21 Is an Exocrine Pancreas Secretagogue*. *Cell Metab*, 2017. **25**(2): p. 472-480.
86. Singhal, G., et al., *Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0148252.
87. Keipert, S., et al., *Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. **306**(5): p. E469-82.
88. Galmozzi, A., et al., *ThermoMouse: an in vivo model to identify modulators of UCP1 expression in brown adipose tissue*. *Cell Rep*, 2014. **9**(5): p. 1584-1593.
89. Izumiya, Y., et al., *FGF21 is an Akt-regulated myokine*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(27): p. 3805-10.
90. Hojman, P., et al., *Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia*. *Diabetes*, 2009. **58**(12): p. 2797-801.
91. Tanajak, P., S.C. Chattipakorn, and N. Chattipakorn, *Effects of fibroblast growth factor 21 on the heart*. *J Endocrinol*, 2015. **227**(2): p. R13-30.
92. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
93. Lin, Z., et al., *Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice*. *Circulation*, 2015. **131**(21): p. 1861-71.
94. Shao, M., et al., *Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92574.
95. Liu, S.Q., et al., *Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2767.
96. Cong, W.T., et al., *Proteomic study on the protective mechanism of fibroblast growth factor 21 to ischemia-reperfusion injury*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013. **91**(11): p. 973-84.
97. Lee, M.M.Y., et al., *Diabetic cardiomyopathy*. *Heart*, 2019. **105**(4): p. 337-345.
98. Zhang, C., et al., *Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway*. *Diabetologia*, 2015. **58**(8): p. 1937-48.
99. Yan, X., et al., *FGF21 deletion exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation*. *J Cell Mol Med*, 2015. **19**(7): p. 1557-68.
100. Semba, R.D., et al., *Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults*. *J Hum Hypertens*, 2013. **27**(6): p. 397-9.
101. Ferrer-Curriu, G., et al., *Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease*. *J Pathol*, 2019. **248**(1): p. 30-40.
102. Itoh, N. and H. Ohta, *Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 247.
103. Planavila, A., et al., *Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress*. *Cardiovasc Res*, 2015. **106**(1): p. 19-31.
104. Li, S., et al., *Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019. **1865**(6): p. 1241-1252.
105. Hoffman, M., et al., *Myocardial Strain and Cardiac Output are Preferable Measurements for Cardiac Dysfunction and Can Predict Mortality in Septic Mice*. *J Am Heart Assoc*, 2019. **8**(10): p. e012260.
106. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. *Circulation*, 2000. **102**(4): p. 470-9.
107. Soonpaa, M.H., et al., *Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9.

108. Haider, A.W., et al., *Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(5): p. 1454-9.
109. Laukkanen, J.A., et al., *Left ventricular mass and the risk of sudden cardiac death: a population-based study*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(6): p. e001285.
110. Shenasa, M., H. Shenasa, and N. El-Sherif, *Left ventricular hypertrophy and arrhythmogenesis*. Card Electrophysiol Clin, 2015. **7**(2): p. 207-20.
111. Cunningham, K.S., D.A. Spears, and M. Care, *Evaluation of cardiac hypertrophy in the setting of sudden cardiac death*. Forensic Sci Res, 2019. **4**(3): p. 223-240.
112. Drosatos, K., et al., *Cardiac Myocyte KLF5 Regulates Ppara Expression and Cardiac Function*. Circ Res, 2016. **118**(2): p. 241-53.
113. Pol, C.J., et al., *Cardiac myocyte KLF5 regulates body weight via alteration of cardiac FGF21*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(9): p. 2125-2137.
114. Joki, Y., et al., *FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **459**(1): p. 124-30.
115. Zhang, X., et al., *Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1246-53.
116. Badman, M.K., et al., *A very low carbohydrate ketogenic diet improves glucose tolerance in ob/ob mice independently of weight loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(5): p. E1197-204.
117. Dushay, J., et al., *Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2010. **139**(2): p. 456-63.
118. Fisher, F.M., et al., *Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2781-9.
119. Chen, W.K., et al., *Cardiac hypertrophy-related pathways in obesity*. Chin J Physiol, 2014. **57**(3): p. 111-20.
120. Gan, F., et al., *Serum level of fibroblast growth factor 21 predicts long-term prognosis in patients with both diabetes mellitus and coronary artery calcification*. Ann Palliat Med, 2020. **9**(2): p. 368-374.
121. Chen, H., N. Lu, and M. Zheng, *A high circulating FGF21 level as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction*. Am J Transl Res, 2018. **10**(9): p. 2958-2966.
122. Knott, M.E., et al., *Circulating Fibroblast Growth Factor 21 (Fgf21) as Diagnostic and Prognostic Biomarker in Renal Cancer*. J Mol Biomark Diagn, 2016. **1**(Suppl 2).
123. Gao, R.Y., et al., *Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Positively Associated with Metabolic Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes*. Int J Endocrinol, 2019. **2019**: p. 5163245.
124. Chow, W.S., et al., *Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent of established cardiovascular risk factors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(10): p. 2454-9.
125. Geng, L., K.S.L. Lam, and A. Xu, *The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic*. Nat Rev Endocrinol, 2020. **16**(11): p. 654-667.
126. Ge, X., et al., *Metabolic actions of FGF21: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012. **2**(4): p. 350-357.
127. Itoh, N., *FGF10: A multifunctional mesenchymal-epithelial signaling growth factor in development, health, and disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **28**: p. 63-9.
128. Zhang, F., et al., *Minireview: Roles of Fibroblast Growth Factors 19 and 21 in Metabolic Regulation and Chronic Diseases*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(10): p. 1400-13.

