



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

**“Ο Ρόλος Κυτταροκινών που σχετίζονται με την όρεξη στα επίπεδα
φυσικής δραστηριότητας”**

Μεταπτυχιακή εργασία

Σκαρμαλιωράκης Ιωάννης

Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL OF HEALTH AND EDUCATION SCIENCES

DEPARTMENT OF DIETICS - NUTRITION

PROGRAM OF POST – GRADUATE STUDIES

«APPLIED DIETICS - NUTRITION»

“The Role of appetite-inducing cytokines in physical activity levels”

Master Thesis

Skarmaliorakis Ioannis

Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναστασίου Κωνσταντίνος (Επιβλέπων)

**Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπιο Πανεπιστήμιο**

Νομικός Τζώρτζης

**Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπιο Πανεπιστήμιο**

Γιαννακούλια Μαρία

**Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπιο Πανεπιστήμιο**

Ο Σκαρμαλιωράκης Ιωάννης

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.
- 3) Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και επιβλέπων κ. Αναστασίου Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια και τον χρόνο που αφιέρωσε στην επίβλεψη μου μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις προπτυχιακές φοιτήτριες κα. Δήμητρα Καβαρινού και Σταματία Φυλακτού για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο περιβάλλον που επικράτησε καθ'όλη την διάρκεια της μελέτης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....σελ 8	σελ 8
Περίληψη στα Αγγλικά.....σελ 9	σελ 9
Κατάλογος Εικόνων.....σελ 10	σελ 10
Κατάλογος Πινάκων.....σελ 11	σελ 11
Κατάλογος Σχημάτων.....σελ 12	σελ 12
Συντομογραφίες.....σελ 13	σελ 13
Εισαγωγή.....σελ 15	σελ 15
Κεφ.1 FGF21.....σελ 15	σελ 15
1.1 FGF21 και οικογένεια FGF.....σελ 15	σελ 15
1.2 FGF21 και Μεταβολισμός.....σελ 17	σελ 17
1.3 FGF21 Έκφραση και Ρύθμιση.....σελ 18	σελ 18
1.4 Επίπεδα ορού FGF 21 σε ποντίκια.....σελ 20	σελ 20
1.5 FGF 21 σε καρδιακό και σκελετικό μυ.....σελ 21	σελ 21
1.6 FGF 21 και Φυσική Δραστηριότητα.....σελ 27	σελ 27
Κεφ.2 Γκρελίνη.....σελ 28	σελ 28
2.1 Δομή της Γκρελίνης.....σελ 28	σελ 28
2.2 Μορφές της Γκρελίνης.....σελ 29	σελ 29
2.3 Απελευθέρωση της Γκρελίνηςσελ 30	σελ 30
2.4 Επιδράσεις στην όρεξη και την εναπόθεση λίπους.....σελ 30	σελ 30
2.5 Ρόλος στον μεταβολισμό.....σελ 31	σελ 31
2.6 Ενδοκρινικός ρόλος της γκρελίνης.....σελ 33	σελ 33
2.7 Υποδοχέας της Γκρελίνης.....σελ 35	σελ 35
2.8 Σύνδεση στον Υποδοχέα.....σελ 35	σελ 35
2.9 Γκρελίνη και Φυσική Δραστηριότητα.....σελ 35	σελ 35
Κεφ. 3 Λεπτίνη.....σελ 36	σελ 36
3.1 Ανακάλυψη και Βιολογική λειτουργία.....σελ 36	σελ 36
3.2 Συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα σε σχέση με το φύλο, την κατανομή λίπους και της διατροφικής κατάστασης.....σελ 38	σελ 38
3.3 Ορμονική και διατροφική έκφραση της λεπτίνης.....σελ 41	σελ 41
3.4 Μεταγραφικοί και Μεταφραστικοί Μηχανισμοί που ελέγχουν την παραγωγή Λεπτίνης.....σελ 42	σελ 42
3.5 Ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της Λεπτίνης και είσοδος στον εγκέφαλο.....σελ 45	σελ 45
3.6 Λεπτίνη και Φυσική Δραστηριότητα.....σελ 48	σελ 48
Κεφ. 4 GLP-1.....σελ 49	σελ 49
4.1 Έκφραση και ρύθμιση του μορίου GLP-1.....σελ 49	σελ 49
4.2 Το GLP-1 ως σήμα κορεσμού.....σελ 49	σελ 49

4.3 GLP-1 και φυσική Δραστηριότητα.....σελ	51
Κεφ.5 Ιντερλεφκίνη 18 (IL-18).....σελ	52
5.1 Παραγωγή IL-18.....σελ	52
5.2 Η IL-18 στην μεταβολική ομοιόσταση.....σελ	53
5.3 Η ρύθμιση της πρόσληψης τροφής από την IL-18.....σελ	55
5.4 Η ρύθμιση της ενεργειακής δαπάνης από την IL-18 μέσω ενεργοποίησης της θερμογένεσης του λιπώδη ιστού.....σελ	56
5.5 Ενεργοποίηση της IL-18 της AMPK και της οξείδωσης των λιπιδίων στο σκελετικό μυ.....σελ	57
5.6 IL-18 και Φυσική Δραστηριότητα.....σελ	58
Σκοπός.....σελ	59
Μεθοδολογία.....σελ	60
Σχεδιασμός Μελέτηςσελ	60
Δείγμα.....σελ	61
Ανθρωπομετρικές μετρήσεις.....σελ	61
Σύσταση Σώματος.....σελ	61
Εκτίμηση Φυσικής Δραστηριότητας.....σελ	61
Βιοχημικές μετρήσεις.....σελ	61
Προσδιορισμός Ορμονών με την τεχνική ELISA.....σελ	64
Προσδιορισμός Ινσουλίνης.....σελ	64
Προσδιορισμός FGF-21.....σελ	65
Προσδιορισμός IL -18.....σελ	67
Προσδιορισμός Λεπτίνης.....σελ	69
Προσδιορισμός GLP-1.....σελ	71
Προσδιορισμός Γκρελίνης.....σελ	73
Αποτελέσματα.....σελ	74
Συζήτηση.....σελ	80
Συμπεράσματα.....σελ	84
Βιβλιογραφία.....σελ	85

Περίληψη στα Ελληνικά

Εισαγωγή: Ο Αναπτυξιακός Παράγοντας των Ινοβλαστών 21 (Fibroblast Growth Factor 21, FGF-21), η Λεπτίνη, η Γκρελίνη, η Ιντερλευκίνη-18 και ο GLP-1 αποτελούν κυτταροκίνες της όρεξης που ρυθμίζουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και του ισοζυγίου ενέργειας μέσω των ορεξιογόνων ή ανορεξιογόνων δράσεών τους. Η επιστημονική βιβλιογραφία έχει ελάχιστες μελέτες οι οποίες να διερευνούν την επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα των ορμονών αυτών στους ανθρώπους.

Στόχος: Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι να διερευνήσει σε προκαταρκτικό στάδιο τον ρόλο του κυταροκινών που σχετίζονται με την όρεξη στα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας. Στην παρούσα μελέτη θα διερευνηθεί ο ρόλος του FGF-21, του GLP-1, της Λεπτίνης, Της Γκρελίνης και της Ιντερλευκίνης 18 στα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σε μια συγχρονική μελέτη μεσήλικων αντρών και γυναικών, σε ένα ευρύ φάσμα Δείκτη Μάζας Σώματος (25-35).

Μεθοδολογία: Οι μετρήσεις περιλαμβάνουν τον FGF-21, την IL-18, την λεπτίνη, την γκρελίνη και ινσουλίνης νηστείας τα οποία υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την Ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσοφυτική δοκιμή (μεθοδος ELISA), το λιπιδαιμικό προφίλ και την γλυκόζη νηστείας που υπολογίστηκαν με βιοχημικές μεθόδους, και την εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας το ερωτηματολόγιο IPAQ.

Αποτελέσματα: Οι εθελοντές που συμμετείχαν στην έρευνα έχουν χαμηλά επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο IPAQ και πιο συγκεκριμένα για τον πλυθισμό έχουμε πως: Metmin_vigorous = 938,76 (+/- 1495,05), Metmin_moderate=688,84 (+/- 1208,41), Metmin_walking=983,97 +/- 1120,67) και Metmin_total=2611,58 (+/- 2848,25). Τα επίπεδα ινσουλίνης, γκρελίνης,λεπτίνης, FGF-21 και IL-18 δεν έδειξαν καμία σημαντική διαφοροποίηση σε διαφορετικά επίπεδα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας

Συμπέρασμα: Καμία ορμόνη δεν συσχετίστηκε σημαντικά με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας

Abstract

Introduction: Fibroblast Growth Factor 21 (FGF-21), Leptin, Ghrelin, Interleukin-18 and GLP-1 are appetite cytokines that regulate various biological functions of the body and energy balance through their appetogenic or anorexigenic actions. The scientific literature has few studies investigating the effect of physical activity on the levels of these hormones in humans.

Aim: The aim of the present research work is to investigate at a preliminary stage the role of appetite-related cytokines on physical activity levels. This study will investigate the role of FGF-21, GLP-1, Leptin, Ghrelin and Interleukin 18 on physical activity levels in a synchronic study of middle-aged men and women, across a wide range of Body Mass Index (BMI) (25-35).

Methodology: Measurements included FGF-21, IL-18, leptin, ghrelin and fasting insulin which were calculated using the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA method), lipid profile and fasting glucose calculated by biochemical methods, and physical activity assessment using the IPAQ questionnaire.

Results: The volunteers who participated in the study have low levels of physical activity according to the IPAQ questionnaire and more specifically for walking we have that: Metmin_vigorous = 938.76 (+/-1495.05), Metmin_moderate=688.84 (+/-1208.41), Metmin_walking=983.97 +/- 1120.67) and Metmin_total=2611.58 (+/-2848.25). Insulin, ghrelin, leptin, FGF-21 and IL-18 levels showed no significant differences at different levels of physical activity levels

Conclusion: No hormone was significantly correlated with physical activity levels

Conclusion: No hormone was significantly correlated with physical activity levels

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την έκφραση του FGF21 στους σκελετικούς μύες και την μεταβολική επίδραση του FGF21 σε διάφορους ιστούς.....	σελ.26
Εικ.2: Μορφή της γκρελίνης σε ανθρώπους και ποντίκια.....	σελ.29
Εικ.3: Ισοροπία των επιπέδων γρελίνης, λεπτίνης και ινσουλίνης	σελ.31
Εικ.4: Ο ρόλος της γκρελίνης	σελ.35
Εικ.5: Ο υποδοχέας της λεπτίνης	σελ.45
Εικ.6: Το σήμα της IL-18.....	σελ.52
Εικ.7: Σχηματική αναπαράσταση αρχής μεθόδου ELISA.....	σελ.68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά.....σελ 74
Πίν.2: Συσχετίσεις Μεταβλητών Φυσικής Δραστηριότητας με τα επίπεδα ορμονώνσελ 79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχημα 1. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων ινσουλίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας.....σελ 74	
Σχημα 2. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων FGF-21 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας.....σελ 75	
Σχημα 3. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων Λεπτίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας.....σελ 76	
Σχημα 4. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων Γκρελίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας.....σελ 77	
Σχημα 5. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων GLP-1 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας.....σελ 78	
Σχημα 6. συσχέτιση των μέσων όρων των επιπέδων IL-18 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας.....σελ 79	

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

FGF-21	Fibroblast Growth Factor 21-Αναπτυξιακός παράγοντας ινοβλαστών 21
IL – 6	Interleukin 6-Ιντερλεφκίνη 6
ER Stress	Endoplasmic reticulum stress-Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου
RT-PCR	Real time Polymerase Chain Reaction-Αλυσιδωτή αντίδραση πολύμεράσης πραγματικού χρόνου
ob/ob	obese/obese-μοντέλο ποντικών obese obese
db/db	mise diabetic/diabetic-μοντέλο προσημείωσης διαβήτη σε τρωκτικά
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-Υποδοχέας άλφα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή του περοξισώματος
UPR	unfolded protein response-αναδιπλωμένη πρωτεϊνική απόκριση
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease-Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
PERK	Protein Kinase R-like ER Kinase-Πρωτεϊνική κινάση R ενδοπλασματικού δικτύου
ELF2a	Eukaryotic Initiation Factor 2a-Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 2a
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1-κινάση σερίνης/θρεονίνης 1
HFG	High Fat Diet-Δίαιτα υψηλή σε λιπαρά
ATF4	Activating transcription factor 4-ενεργοποιητικός παράγοντας μεταγραφής 4
TSC1	tuberous sclerosis complex 1-σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης 1
mTOR	mammalian target of rapamycin-θηλαστικός στόχος της ραπαμυκίνης
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1-Πρωτεΐνη 1 που δεσμεύει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4E)
UCP1	Uncoupling protein 1-Πρωτεΐνη αποσύνδεσης 1
WAT	White adipose Tissue-Λευκός λιπώδης ιστός
OPA1	OPA1 Mitochondrial Dynamin Like GTPase-OPA1 Μιτοχονδριακή Dynamin Like GTPase
mtDNA	Mitochondrial DNA-Μιτοχονδριακό DNA
ROS	Reactive oxygen species-Οξειδοτικές ρίζες

P21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1-αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 1
SA-B-gal	Senescence-associated beta-galactosidase-Συνδεδεμένη με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάση
Nf-kb	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-Πυρηνικός παράγοντας kappa-φωτεινή αλυσίδα-ενισχυτής των ενεργοποιημένων κυττάρων B
GDF15	Growth/differentiation factor 15-Παράγοντας ανάπτυξης/διαφοροποίησης 15
MCFAs	Medium-chain fatty acids-Λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας
GH	Ghrelin-Γκρελίνη
GHSR-1a	Growth hormone secretagogue receptor type 1A-Υποδοχέας έκκρισης αυξητικής ορμόνης τύπου 1A
fosl2 FOS Like 2, AP-1 Transcription Factor Subunit	FOS Like 2-Υπομονάδα μεταγραφικού παράγοντα AP-1
TSS	Transcriptional start site- Θέση έναρξης της μεταγραφής

Εισαγωγή

Η όρεξη ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ αυτών και κάποιες κυτταροκίνες που εκκρίνονται από διαφορετικά σημεία του οργανισμού αλλά φαίνεται να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ρύθμιση του σωματικού βάρους. Οι κυτταροκίνες αυτές φαίνεται να επηρεάζουν όλες τις πτυχές του ενεργειακού ισοζυγίου, συμπεριλαμβανομένης και της ενεργειακής κατανάλωσης μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης. Παρακάτω επισκοπούνται οι κύριες αυτές κυτταροκίνες.

ΚΕΦ.1: FGF - 21

1.1. FGF21 και οικογένεια FGF

Στον άνθρωπο υπάρχουν 22 γονίδια (FGF1 – FGF23) τα οποία μπορούν να χωριστούν φυλογενετικά σε 8 υπο-ομάδες(1).Λειτουργικά, οι FGFs μπορούν να χωριστούν σε 3 υπο-ομάδες: τους ενδοκυτταρικούς FGFs (FGF11 – FGF14) που δεν έχουν κάποιο πεπτίδιο σήματος, τους FGF με χαμηλή ικανότητα δέσμευσης heparin-heparan sulfate, το οποίο υποδηλώνει απελευθέρωση στην κυκλοφορία και συνεπάγεται συστηματική δράση των μορίων (FGF19 και FGF 21) και τα υπόλοιπα FGF που έχουν υψηλή ικανότητα δέσμευσης heparin-heparan sulfate , επομένως έχουν αυτοκρινή/παρακρινή δράση (2)

Ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF 21) είναι μια ορμόνη η οποία ρυθμίζει σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια, εκφράζεται σε πολλά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού και αλληλοεπιδρά με πολλούς ιστούς. Για τον λόγο αυτό, οι λειτουργίες του FGF 21 είναι περίπλοκες και αποτελούν σημείο εκτεταμένης συζήτησης στην επιστημονική κοινότητα, εξαιτίας των πολλών διαφορετικών σημείων έκφρασης αλλά και της δράσης του. Οι μύες αποτελούνται από ιστούς που ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται μπορούν πολύ εύκολα να προσαρμοστούν σε διαφορετικά ερεθίσματα και αποτελούν σημαντική πηγή FGF 21. Η έκφραση και η δημιουργία FGF 21 από τα τους σκελετικούς μυς, συμβαίνει σε ποντίκια αλλά και σε ανθρώπους σε υγιή αλλά και παθολογική κατάσταση, συμπεριλαμβανομένης της άσκησης αλλά και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

Το 40-50% της ολικής μάζας σώματος σε μη-παχύσαρκα θηλαστικά αποτελείται από σκελετικούς μύες. Οι σκελετικοί μύες είναι εύπλαστοι ιστοί που υφίστανται προσαρμοστικές αλλαγές στις δομικές ή λειτουργικές τους ιδιότητες προκειμένου να ανταποκριθούν σε διαφορετικά ερεθίσματα. Παλιότερα, θεωρούνταν κινητικά όργανα μέχρι και το 2000, όπου και αναγνωρίστηκαν και για την εκκριτική τους λειτουργία. Για πρώτη φορά, το 2003 προτάθηκε ότι η IL-6 και άλλες κυτοκίνες προκλήθηκαν και εκκρίθηκαν από τους σκελετικούς μύες στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια φυσικής δραστηριότητας. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα ευρήματα, τα μόρια που εκκρίνονται από σκελετικούς μύς ονομάστηκαν «μυοκίνες». Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο σκελετικός μύς εκκρίνει πληθώρα μορίων όπως κυτοκίνες, miRNA, εξωσώματα, mtDNA, όχι μόνο κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά και σε διάφορες επίκτητες και κληρονομικές ασθένειες. (3,4,5,6,7)

Πλέον, οι σκελετικοί μύες θεωρείται ότι αποτελούν πηγή μυοκινών, μεταβολιτών και μορίων που προέρχονται από τους μύες και μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ απομακρυσμένων οργάνων για την προσαρμογή του μεταβολισμού σε διατροφικές και περιβαλλοντικές αλλαγές. (8,9)

Αυτή η ρύθμιση μπορεί να εξηγήσει γιατί η σωματική δραστηριότητα, και συνεπώς η μυϊκή σύσπαση, έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε διάφορες ασθένειες. Ωστόσο, η φύση και η λειτουργία των περισσότερων μυοκινών και τα μόρια που προέρχονται από τους μύες είναι ακόμη ασαφή.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο FGF21 διεγείρει την οξείδωση των λιπαρών οξέων, την παραγωγή κετονικών σωμάτων και αναστέλλει την λιπογένεση(10,11), γεγονός που καθιστά τον FGF 21 ως ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για μεταβολικές νόσους. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση του FGF21 αποτρέπει τόσο την παχυσαρκία αλλά και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ποντίκια και ανθρώπους (12,13). Παραδόξως, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επίπεδων FGF21 ορού και μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, τα μιτοχονδριακά νοσήματα, και η γήρανση. (14,15). Όλες οι παραπάνω καταστάσεις έχουν ως κοινό παράγοντα την απώλεια μυών. Επίσης, αρκετές αναφορές έχουν αναδείξει ότι ο παθοφυσιολογικός ρόλος του FGF21 περιλαμβάνει:

- Την μυϊκή ατροφία (16), οστεοπενία και μειωμένη οστική πυκνότητα (17).

- Την ικανότητα του να δρά ως μυοκίνη που παράγεται λόγω στρες και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία σε κατάσταση νηστείας, ER stress (στρες ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (18,19,20).

Έτσι, ο FGF21 είναι μια ισχυρή και αμφιλεγόμενη ορμόνη που ανήκει στη λίστα των παραγόντων που ελέγχουν την ενεργειακή ομοιόσταση και τον μεταβολισμό. Όπως περιγράφεται παρακάτω, οι ευεργετικές και/ή οι επιζήμιες δράσεις του FGF21 επηρεάζονται από πολλές μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένης του ιστού προέλευσής του, της συγκέντρωσης του στον ορό, της ηλικίας των ζώων και του παρουσία συνεργιστικών παραγόντων.

1.2. FGF21 και Μεταβολισμός

Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων ινοβλαστών (Fibroblast Growth factor) είναι μια ομάδα σηματοδοτικών μορίων με μια πληθώρα λειτουργιών και αποτελείται από 22 πρωτεΐνες που διαχωρίζονται σε υποομάδες με βάση τις λειτουργίες τους αλλά και τις γενετικές τους ομοιότητες. Η πρώτη αναφορά στο γονίδιο του FGF 21 έγινε στη μελέτη Nishimura et al. (2000) όπου ανιχνεύτηκε σε έμβρυα ποντικών με την τεχνική RT-PCR. Οι λειτουργίες του FGF 21 ήταν άγνωστες, μέχρι και το 2005, όπου προτάθηκε ως ένας νέος μεταβολικός ρυθμιστής και αντιδιαβητικό φάρμακο (21). Στην μελέτη των (Kharitonov et al., 2005) φάνηκε πως η χορήγηση FGF 21 οδήγησε σε μείωση της γλυκόζης πλάσματος και των τριγλυκεριδίων σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα σε ποντίκια ob/ob και db/db για περίπου 24 ώρες. Για πολλά χρόνια μετά, πολλές ομάδες μελέτησαν τον μεταβολικό ρόλο του FGF 21 σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο FGF 21 διαμεσολαβεί την προσαρμογή του οργανισμού σε κατάσταση νηστείας και προκαλεί κετοση, γλυκονεογεννεση, λιπόλυση, και β-οξείδωση (22,23). Μεσα από αυτές τις μελέτες φάνηκε πως η θεραπεία με FGF 21 βελτίωσε τις μεταβολικές παραμέτρους σε παχύσαρκα και διαβητικά μοντέλα ποντικών (24,25). Στους ανθρώπους, ο Fgf 21 είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται λόγω νηστείας. Τα επίπεδα της αυξάνονται μετά από 7 ημέρες νηστείας και ρυθμίζει την χρησιμοποίηση ενεργειακών υποστρωμάτων στην προσπάθεια του οργανισμού να προσαρμοστεί στην τελευταία φάση της απώλειας θρεπτικών συστατικών (26). Ο Fgf 21 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς όπως το ήπαρ (Nishimura et al., 2000), τα λιποκύτταρα (27), το πάγκρεας (28) αλλά και τον εγκέφαλο όπου και μπορεί να διαπεράσει τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό (29). Άλλες μελέτες έχουν εξετάσει την έκφραση του

mRNA FGF 21 στους όρχεις, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μυς, στον καφέ λιπώδη ιστό και την καρδιά (30). Λαμβάνοντας υπ όψιν τον ρόλο του Fgf 21 στην ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων αλλά και την ευρεία του έκκριση από διαφορετικούς ιστούς, η αρχική υπόθεση των ερευνητών ήταν πως ο FGF 21 αποτελεί μια ορμόνη που εκκρίνεται από τον οργανισμό σε απόκριση της προσπάθειας προσαρμογής του σε κατάσταση νηστείας σε ποντίκια. (31). Παρόλα αυτά πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως δεν υπάρχει καμία μειωμένη απόκριση σε ποντίκια FGF 21 knockout κατά την νηστεία (32), επομένως ο FGF 21 δεν είναι απαραίτητος για την φυσιολογική λειτουργία σε κατάσταση νηστείας.

1.3. FGF21 Έκφραση και Ρύθμιση

Η ρύθμιση του FGF21 είναι περίπλοκη λόγω του ότι παράγεται σε διαφορετικούς ιστούς και έχει διάφορες δράσεις. Το ήπαρ θεωρείται ότι είναι το κύρια τοποθεσία παραγωγής FGF21 (33,34). Οι Badman et al και Inagaki et al έδειξαν πως υπάρχει ανεξάρτητη συματοδότηση του FGF21 και PPARα στο ήπαρ κατά τη διάρκεια νηστείας. Η έκφραση του FGF21 αυξήθηκε σε ποντίκια που τρέφονταν είτε με κετογονική δίαιτα είτε σε κατάσταση νηστείας και σε αυτές τις συνθήκες, ο PPARα στρατολογήθηκε σε διαφορετικές περιοχές του προαγωγέα Fgf21. Ωστόσο, αυτό το εύρημα δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες μεταβολικές καταστάσεις οι οποίες θα προκαλούσαν την έκκριση του FGF21, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες μεταγραφής που ενδέχεται επίσης να ρυθμίζουν την ηπατική έκφραση FGF21. Πράγματι, ο Fgf21 βρέθηκε πως ρυθμίζεται από το μονοπάτι της αναδιπλούμενης Πρωτεϊνικής Απόκρισης (UPR) στα ηπατοκύτταρα (35,36). Οι Kim et al παρατήρησαν ότι ο FGF21 αυξήθηκε στο ήπαρ ασθενών που πάσχουν από υπατική στεάτωση και σε μοντέλα παχύσαρκων τρωκτικών καθώς επίσης και σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) ενώ ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε και μεγάλη αύξηση του στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Συμφωβα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, φάνηκε πως η έκφραση του FGF21 εξαρτάται από την PKR-like ER κινάση (PERK)– 2α (eIF2α)– ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα 4 (ATF4) τόσο, in vitro όσο και in vivo (Kim et al., 2015).

Τα ποντίκια FGF21-null εμφάνισαν επαγωγή δεικτών στρες ER στα γονίδια και παρατηρήθηκε περισσότερη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ μετά απο θεραπεία με τουνικαμυκίνη, έναν αναστολέα της βιοσύνθεσης γλυκοπρωτεϊνών που προάγει το στρες

ER (37). Αρκετές μελέτες έχουν πρότεινε ότι εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες μεταγραφής στην ρύθμιση της ηπατικής έκφρασης του FGF21. Οι Adams et al. (2010) ανέφεραν ότι ο υποδοχέας της θυρεοειδικής ορμόνης β, ο οποίος μεσολαβεί στην δράση της τρι-ιωδοθυρονίνης στο ήπαρ, διεγείρει τη λιπόλυση και οξείδωση ηπατικών λιπαρών οξέων μέσω επαγωγής του FGF21. Επιπλέον, αρκετοί ερευνητές έχουν υποθέσει ότι η έκφραση FGF21 ρυθμίζεται από τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος βήτα (RARβ) (38,39,40,41). Αυτό συμβαίνει επειδή η μεταβολική επίδραση του συνδέτη RARβ, ρετινοϊκού οξέος, επί της απώλεια σωματικού βάρους και του μεταβολισμού της γλυκόζης/λιπιδίων είναι παρόμοια με τον FGF21, το οποίο έχει πρόσφατα αποδειχθεί *in vitro* σε καλλιέργεια C2C12(42) αλλά δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί *in vivo*.

Ο ορφανός υποδοχέας που σχετίζεται με τον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος (ROR) α έχει εμπλέκει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων του ανοσοποιητικού συστήματος, της φλεγμονής και του κινκάρδιου ρυθμού. Στην παρούσα μελέτη, ο συνθετικός αγωνιστής RORα/γ SR1078 διεγείρει την παραγωγή και τη γονιδιακή έκφραση του FGF21 σε Μυοσωληνάρια C2C12. Ο FGF21 φαίνεται πως παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της περιφερικής ανοχής στη γλυκόζη και του μεταβολισμού των λιπιδίων βελτιώνοντας παράλληλα τη μεταβολική υγεία.

Επιπλέον, η ρύθμιση του mRNA και η έκφραση της πρωτεΐνης CHOP παρατηρήθηκε σε μυοσωληνάρια C2C12 μετά τη θεραπευτική αγωγή με βαϊκελαΐνη. Επιπλέον, το νοκ ντάουν του RORα εμπόδισε την αύξηση του FGF21 και την ανοδική ρύθμιση του CHOP με απόκριση στη βαϊκελαΐνη στα κύτταρα C2C12. Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η βαϊκελαΐνη διεγείρει την απόκριση στρες ER και την επακόλουθη έκφραση FGF21 μέσω ενός εξαρτώμενου από RORα μηχανισμού στα μυοσωληνάρια C2C12, και υποδεικνύει πως χορήγηση βαϊκελαΐνης είναι μια αποτελεσματική θεραπεία κατά της παχυσαρκίας μέσω της ικανότητάς της να ενισχύει την παραγωγή FGF21 (42). Άλλες αναφορές έχουν δείξει πως η ηπατική έκφραση του FGF21 ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) (Patel et al., 2015), την Πρωτεΐνη H που δεσμεύει το στοιχείο cAMP (CREBH) (43), την πρωτεΐνη δέσμευσης στοιχείων απόκρισης υδατανθράκων (ChREBP) (44), τον PPARγ (45,46), τον farnesoid X receptor (FXR)

(Cyphert et al., 2012) και τον υποδοχέα X του ήπατος (LXR) (47,48) υπό διάφορες συνθήκες.

Διάφοροι εξωηπατικοί ιστοί, όπως οι σκελετικοί μύες, ο λευκός και ο καφέ λιπώδης ιστός ρυθμίζουν τον FGF21 μέσω διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων. Πράγματι, η ενεργοποίηση του PPAR γ αυξάνει την παραγωγή FGF21 στον λευκό λιπώδη ιστό όπου δρα ως αυτοκρινής ή ενδοκρινής παράγοντας για τη βελτίωση της δράσης της ινσουλίνης (49). Στον Καφέ λιπώδη ιστό (BAT), ο FGF21 ρυθμίζεται από τον ATF2 (50) ενώ στους σκελετικούς μύς ελέγχεται από το ATF4 (51) και από το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K–AKT (52).

1.4. Επίπεδα ορού FGF 21 σε ποντίκια

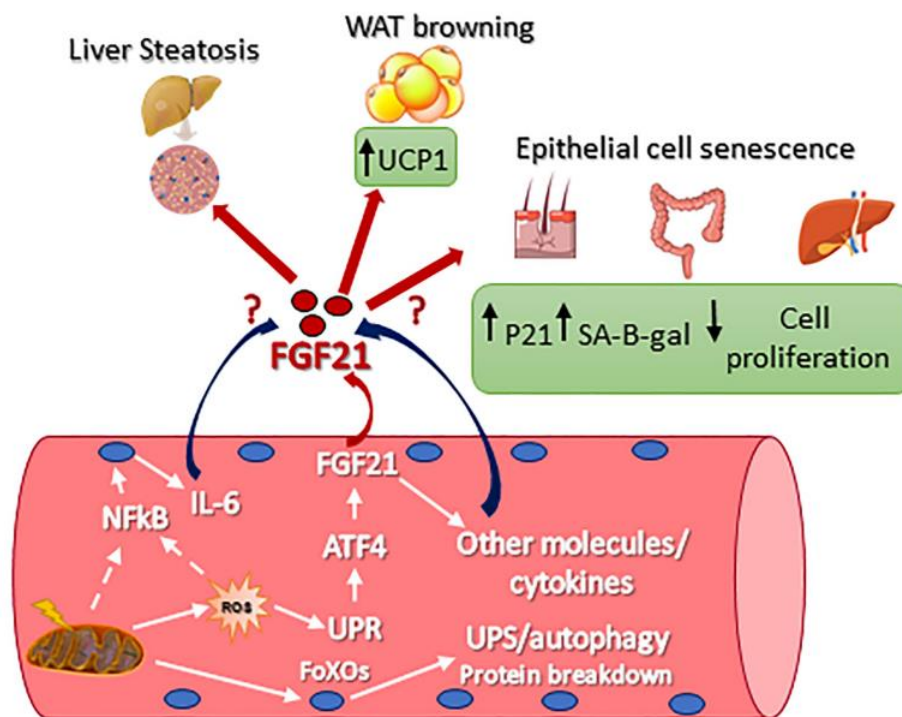
Σε δημοσιευμένες μελέτες, οι συγκεντρώσεις FGF21 στον ορό του αίματος σε ποντίκια κυμαίνονται από 0 έως 3000 ng/mL. (53,54,55,56,57,58). Η διαφορά στα αναφερθέντα επίπεδα ορού FGF21 μπορεί να εξαρτώνται από τα είδη των ποντικών, την ηλικία τους, την ώρα της ημέρας κατά την οποία συλλέχθηκε ο ορός, καθώς και τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων στον ορό. Όλα τα παραπάνω περιπλέκουν την ερμηνεία των δεδομένων, καθώς η συγκέντρωση του FGF 21 στο ορό, καθώς και η αύξηση του, μπορεί να πυροδοτήσουν διαφορετικές μεταβολικές δράσεις. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η αύξηση του FGF21 στο ορό σε ποντίκια νοκ-άουτ/διαγονιδιακά έναντι μαρτύρων και σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες βρίσκονται σε ένα εύρος από 2 έως 100. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές λαμβάνοντας υπόψη ότι το FGF21 είναι ένα μόριο με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής, και ελλείψει συγκεκριμένων ερεθισμάτων, έχει υπολογιστεί ότι βρίσκεται στο σώμα από 1 έως 2 h. (59,60,61). Αυτός ο σύντομος χρόνος ημιζωής στον ορό οφείλεται στην ενζυμική αποικοδόμηση και/ή νεφρική κάθαρση. Στην πραγματικότητα, η πρωτεΐνη ενεργοποίησης των ινοβλαστών α (FAP) αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως η πρωτεάση της σερίνης που διασπά και απενεργοποιεί το FGF21 (62). Είναι ενδιαφέρον ότι η FAP εκκρίνεται επίσης στους ανθρώπινους μύς κατά τη διάρκεια της άσκησης (63). Επομένως, επειδή ο FGF21 εκκρίνεται από τα νεφρά, έχει μικρό χρόνο ημιζωής και η δραστηριότητά του ρυθμίζεται από την παρουσία του Klotho και του FAP, η απλή παρακολούθηση των επιπέδων στον ορό μπορεί να μην είναι αρκετή για να αποδειχτεί η άμεση δράση του FGF21 σε στοχευμένους ιστούς χωρίς τον έλεγχο της ενεργοποίησης της διαδρομής FGFr.

1.5. FGF 21 σε καρδιακό και σκελετικό μυ

Αρχικά, η καρδιά δεν θεωρούνταν πηγή FGF21 ή στόχος, κυρίως επειδή απαιτείται η ύπαρξη του συνυποδοχέα β -Klotho mRNA για να υπάρξει κυτταρική απόκριση FGF21, και αυτό βρέθηκε να εκφράζεται σε ένα μέτριο βαθμό στην καρδιά (64). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το FGF21 παίζει βασικό ρόλο στην καρδιακή αναδιαμόρφωση. Στην πραγματικότητα, η καρδιά μπορεί να εκφράσει FGFR1, υποδοχέα 1 αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών, β -κλωθο, καθώς και FGF21. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση FGF 21 προστατεύει από την παθολογική καρδιακή υπερτροφία, το οξειδωτικό στρες και το έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ποντίκια (64,65). Στην καρδιά, ο FGF21 δρα με τρόπο αυτοκρινή και ελέγχει την αυτοφαγία σε καρδιομυοπάθεια που προκαλείται από παχυσαρκία (66). Στον σκελετικό μυ, η έκφραση FGF21 βρέθηκε να είναι μη ανιχνεύσιμη ή και περιορισμένη ήταν όταν δεν υπάρχει κάποιο ερέθισμα (67,68,69,70). Ωστόσο, αρκετές φυσιολογικές και/ή παθολογικές καταστάσεις προκάλεσαν την έκφραση του FGF21 σε μυς καθώς και την εμφάνιση του στο αίμα. Αυτό καταδείχθηκε για πρώτη φορά σε διαγονιδιακό AKT1 ειδικά για τους μύες ποντίκια, όπου η ενεργοποίηση του AKT1 επέφερε μείωση του λιπώδους ιστού μέσω έκκρισης του FGF21 (71). Στην μελέτη των Kim et al. (2013), βρέθηκε ότι η αναστολή της αυτοφαγίας, συγκεκριμένα στους σκελετικούς μύες, προστατεύτηκε από την παχυσαρκία και την HFD επειδή τα επίπεδα FGF 21 στους μύες ήταν αυξημένα. Ως συνέπεια της αυτοφαγικής βλάβης, οι μύες συσσωρεύουν δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα την επαγωγή στρες ER, την ενεργοποίηση της UPR και την ταυτόχρονη επαγωγή FGF21 μέσω της μεταγραφής του παράγοντας ATF4. Ομοίως, Η διαγραφή του TSC1 είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTOR. Την ίδια στιγμή, η ανοδική ρύθμιση του FGF21, μέσω UPR, βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη, και οδήγησε σε συσχέτιση με τον πιο αδύνατο φαινότυπο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (72). Η συνεχής έκφραση του ενεργού 4EBP1 στους σκελετικούς μύες προκάλεσε έκκριση FGF21 στην κυκλοφορία, η οποία στη συνέχεια βελτίωσε τον μεταβολισμό των λιπιδίων στον λευκό λιπώδη ιστό μέσω του PPARs (73). Η ήπια μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι επακόλουθη της έκφρασης της UCP1(Πρωτεΐνη αποσύνδεσης 1) στους σκελετικούς μύες με αποτέλεσμα την έκφραση του FGF21 και τη μείωση του μεγέθους μυοϊνών, αλλά ταυτόχρονα την

βελτίωση του μεταβολικό προφίλ λόγω της αμαύρωσης (browning) του WAT (74). Παραπάνω φαίνεται πως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οφείλεται στην αφαίρεση του OPA1 στους σκελετικούς μυς και πυροδοτεί μια δραματική αύξηση των επιπέδων μεταγραφής μυϊκού FGF21 και στον ορό του αίματος (75,76). Αυτή η σημαντική επαγωγή του FGF21 προκαλείται λόγω μιτοχονδριακά εξαρτώμενου οξειδωτικό στρες που επάγει την ενεργοποίηση UPR (71,72), το στρες ER, την μυϊκή ατροφία και ως εκ τούτου την ανοδική ρύθμιση του FGF21 που βρέθηκε σε αρκετά ποντίκια με έλλειψη OPA1 ειδικά για τους μύες, αλλά με διαφορετικούς φαινότυπους. Αυτές οι αποκλίσεις μπορεί είναι συνέπεια της ηλικίας του ζώου στην οποία η OPA1 διαγράφηκε και/ή του βαθμός της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, και/ή των επιπέδων του FGF21 στο αίμα (74,75). Στη μελέτη των Tezze et al. (2017) (Πίνακας 1) βλέπουμε αύξηση των επιπέδων FGF21 στο αίμα μετά από οξεία διαγραφή του OPA1 σε ποντίκια ηλικίας 5 μηνών, προκαλώντας πολλές επιζήμιες συστηματικές επιπτώσεις. Η αναστολή του OPA1 προκάλεσε σημαντικές μεταβολικές αλλαγές και πρόωρη γήρανση των επιθηλιακών ιστών, μια συστηματική φλεγμονώδης απόκριση και πρόωρο θάνατο του ζώου (Εικόνα 1). Η διαγραφή του FGF21 σε ποντίκια OPA1-null επανέφερε σχεδόν όλα τα επιζήμια χαρακτηριστικά της πρόωρης γήρανση, ενώ η απώλεια μυών και λευκού λιπώδους στα διπλά νοκ-άουτ FGF21/OPA1 ,αν και ακόμη υπαρκτή, είχε υποχωρήσει. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα των β klotho και οι FGFR αυξήθηκαν σε σκελετικούς μύες με έλλειψη OPA1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου υποστηρίζοντας το ρόλο αυτής της οδού στη ρύθμιση της μυϊκή μάζα (74). Παρόμοια με τους Tezze et al. (2017), και οι Rodríguez-Nuevo et al. (2018) έδειξαν πρόωμο θάνατο και συστηματική φλεγμονώδη απόκριση σε ποντίκια με την διαγραφή του OPA1. Σε αυτή την εργασία, η ομάδα του Zorzano χρησιμοποίησε μια διαγονιδιακή σειρά ποντικών Cre που προέρχεται από το μυογόνο, για να διαγράψει το OPA1 στους ανεπτυγμένους μυς. Η διαπίστωση ότι ο φαινότυπος αυτών των νοκ-άουτ ποντικών δεν διασώθηκαν από την αναστολή FGF21 και αυτό πιθανώς οφείλεται στην εξάρτησή του από άγνωστα βιοενεργειακά ζητήματα. Στην πραγματικότητα, η παρουσία μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στους αναπτυσσόμενους μύες είναι επίσης βιοενεργειακά επιζήμια για να αντιμετωπιστεί με ταυτόχρονη αφαίρεση FGF21. Εναλλακτικά, το εκκριτικό πρότυπο που προκαλείται από ένα μιτοχονδριακό

ελάττωμα σε νεογέννητα ποντίκια δεν είναι ούτε το ίδιο των ενήλικων μυών ούτε είναι επαρκής για την προώθηση της γήρανσης των ιστών. Η ομάδα Dale έχει επίσης δημιουργήσει μια επαγώγιμη ,ειδική για τους μύες σειρά νοκ-άουτ ποντικών που παρουσιάζει ήπια μυϊκή απώλεια και, παραδόξως, αρκετές ευεργετικές μεταβολικές αλλαγές όσον αφορά την αντίσταση στην παχυσαρκία όταν τα ζώα έφαγαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Ωστόσο, η διαγραφή του OPA1 προκλήθηκε σε πολύ νεαρά ποντίκια (ηλικίας 4 εβδομάδων) και όχι σε ενήλικα ζώα [12 εβδομάδες στο Tezze et al. (2017)] και η μείωση του OPA1 ήταν μερική (περίπου 50–70%). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν βλαστοκύτταρα μυών που εξακολουθούν να είναι συγχωνευμένα με τα μυοϊνίδια, φέρνοντας το γονίδιο OPA1 μέσα στις ίνες νοκ-άουτ και προκαλώντας την μερική αναστολή του OPA1 που επηρεάζει ήπια τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Στην πραγματικότητα, τα μιτοχονδριακά αναπνευστικά σύμπλοκα και υπερσυμπλέγματα, όπως και το μιτοχονδριακό DNA και η κιτρική συνθάση, ήταν ανεπηρέαστα στα νοκ-άουτ ποντίκια. Η μερική αναστολή του OPA1 προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές (πρήξιμο) και μικρές αλλοιώσεις της αναπνοής. Αυτός ο ήπιος μιτοχονδριακός φαινότυπος έχει ως αποτέλεσμα μια μικρή αύξηση στα επίπεδα του FGF21 στον ορό και διαφέρει από το ζωικό μας μοντέλο στο οποίο η διαγραφή OPA1 εμφανίστηκε σε ενήλικα ποντίκια (ηλικίας 3–5 μηνών) και είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του mtDNA, των αναπνευστικών συμπλεγμάτων και των υπερσυμπλεγμάτων, της σύνθετη δραστηριότητας αναπνοή, του δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης και την αύξηση της παραγωγής ROS. Συνολικά οι μιτοχονδριακές αλλαγές οδήγησαν σε δραματική αύξηση του FGF21 στους μυς και στον ορό ,το εύρος του οποίου έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με μιτοχονδριακά νοσήματα (76) και ανθυγιεινή γήρανση (72). Επομένως, τα ευεργετικά ή επιζήμια χαρακτηριστικά του FGF 21 εξαρτώνται από την ηλικία, την δόση, τον χρόνο αλλά και τον εκάστοτε ιστό που παρατηρούμε.



Σχήμα 1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την έκφραση του FGF21 στους σκελετικούς μύες και την μεταβολική επίδραση του FGF21 σε διάφορους ιστούς.

Σε υγιείς ανθρώπους, υπάρχει μεγάλη διακύμανση του επιπέδου FGF21 στον ορό μεταξύ ατόμων, που κυμαίνονται από 5 pg/mL έως 5 ng/mL (25,26,27,28). Αυτό το εύρημα είναι παρόμοιο με το δεδομένα τρωκτικών και υπογραμμίζει περαιτέρω ένα πρόβλημα στη μέθοδο της ποσοτικοποίησης του FGF21 ή/και την μεταβλητότητα σε όρους (Pedersen et al., 2003). Για χρόνια η αναζήτηση του ερεθίσματος που ξεκινά και διατηρεί την αλλαγή της διεγερσιμότητας ή της ευαισθησίας των ρυθμιστικών κέντρων στην άσκηση έχει προχωρήσει. Επειδή όμως ακόμη υπάρχουν πολλά ερευνητικά κενά, χρησιμοποιείται ευρέως ο όρος «ο παράγοντας άσκησης». Με άλλα λόγια, μια μεγάλη πρόκληση για τους φυσιολόγους μυών και άσκησης ήταν ο καθορισμός του πώς οι μύες στέλνουν σήμα στα κεντρικά και περιφερειακά όργανα. Εδώ, συζητάμε την πιθανότητα ότι η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) θα μπορούσε μεσολαβεί ορισμένες από τις ευεργετικές επιπτώσεις της άσκησης στην υγεία. Σε μους σε ηρεμία, το γονίδιο IL-6 είναι σιωπηλό, αλλά ενεργοποιείται γρήγορα με συσπάσεις και η IL-6 απελευθερώνεται από τους μύες στην κυκλοφορία σε υψηλές ποσότητες. Η παραγωγή IL6 ρυθμίζεται από την περιεκτικότητα σε γλυκογόνο στους μύες και λειτουργεί ως αισθητήρας ενέργειας. Η IL-6 ασκεί την επίδρασή της στον

λιπώδη ιστό, προκαλώντας λιπόλυση και γονιδιακή μεταγραφή σε κοιλιακό υποδόριο λίπος και αυξάνει την οξείδωση λιπιδίων ολόκληρου του σώματος. Επιπλέον, η IL-6 αναστέλλει την χαμηλής ποιότητας παραγωγή TNF-άλφα και μπορεί έτσι να αναστέλλει και την επαγόμενη από TNF-άλφα αντίσταση στην ινσουλίνη και αθηροσκλήρωση. Η IL-6 και άλλες κυτοκίνες, οι οποίες παράγονται και απελευθερώνονται από σκελετικούς μύες, ασκώντας τα αποτελέσματά τους σε άλλα όργανα του σώμα, ονομάζονται πλέον «μυοκίνες» (Pedersen et al., 2003). Το γονίδιο Fgf21 σε φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται ότι εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, και σε πολύ μικρότερο βαθμό, επίσης στον εγκέφαλο (Kharitonovskiy και Adams, 2014) και στο πάγκρεας (Fon Tacer et al., 2010). Παρόμοια με τα ποντίκια, το στοιχείο απόκρισης PPARα ταυτοποιείται και στους ανθρώπινους προαγωγείς FGF21 που σημαίνει ότι μπορεί να ρυθμίζει και την έκφραση του FGF21 (Lundasen et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι ιστοί που συμβάλλουν στα επίπεδα του FGF21 στο αίμα σε φυσιολογικές καταστάσεις. Στους σκελετικούς μυς, ο FGF21 εκφράζεται ως απόκριση στη διέγερση της ινσουλίνης, υποδηλώνοντας ότι ο FGF21 είναι μια ινσουλινορυθμιζόμενη μυοκίνη (Hojman et al., 2009) και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της χρόνιας υπερινσουλιναϊμίας και των επιπέδων του FGF21 στους ανθρώπους (Hojman et al., 2009). Οι Fazeli et al. (2015) έδειξαν ότι η FGF21 λειτουργεί ως ορμόνη που προκαλείται από τη νηστεία για την προσαρμοστική αντίδραση στην πείνα και για την αξιοποίηση ενεργειακών υποστρωμάτων που προέρχονται από τη διάσπαση των ιστών. Μια άλλη μερίδα επιστημόνων, ισχυρίζονται πως τα επίπεδα του FGF21 στον ορό σχετίζονται στενά με το λίπος, τα λιπίδια μεταβολισμού και χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτης ηπατικής βλάβης αλλά όχι έκκρισης και ευαισθησίας της ινσουλίνης (Li et al., 2009). Παρά την ευεργετική δράση του FGF21 στα τρωκτικά, η βιβλιογραφία στον άνθρωπο δεν είναι ομοιογενής και υποστηρίζει ορισμένες επιβλαβείς επιπτώσεις. Για παράδειγμα, τα επίπεδα FGF21 στον ορό είναι αυξημένα σε ασθενείς με μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA στους σκελετικούς μύες αλλά όχι όταν παρόμοιες μεταλλάξεις συσσωρεύονται σε άλλα όργανα. Λόγω αυτής της ιδιαιτερότητας ο FGF 21 προτάθηκε ως βιοδείκτης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στους σκελετικούς μύες και χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό τεστ για αυτές τις κληρονομικές διαταραχές (Suomalainen et al., 2011, σελ. 21). Σε άλλες συνθήκες τα επίπεδα του

FGF 21 στον ορό έχουν χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας εξέλιξης της νόσου. Για παράδειγμα, τα υψηλότερα επίπεδα FGF21 στην κυκλοφορία έχουν συσχετιστεί με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (Kohara et al., 2017). Επίσης, τα υψηλά επίπεδα FGF 21 στον ορό, έχουν αναφερθεί και σε ασθενείς με διαστολική δυσλειτουργία καρδιακής ανεπάρκειας που έχουν διατηρήσει το κλάσμα εξώθησης (Chou et al., 2016), αλλά έχει επίσης βρεθεί πως πρόκειται για έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της στεφανιαίας νόσου (Lee et al., 2017). Επιπλέον, Τα επίπεδα FGF21 είναι αυξημένα σε διάφορες καταστάσεις μεταβολικής νόσου, όπως στην παχυσαρκία, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Zhang et al., 2008; Chavez et al., 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 έχουν επίσης αυξημένα επίπεδα FAP στην κυκλοφορία, και αυτό σχετίζεται με μειωμένη αναλογία βιοενεργού προς ολικό FGF21 ως απόκριση σε ένα τεστ ανοχής γλυκόζης από το στόμα (Samms et al., 2017). Η αύξηση των επιπέδων του FGF21 στο πλάσμα συσχετίστηκαν με τη ολική σωματική (μυική κυρίως) και ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη (Chavez et al., 2009). Απροσδόκητα, σε παχύσαρκους ανθρώπους, τα επίπεδα του FGF21 δεν άλλαξαν μετά από χρόνια άσκηση (Besse-Patin et al., 2014) παρά τη γνωστή ευεργετική επίδραση της σωματικής δραστηριότητας. Αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με το επίπεδο της μυοκίνης FAP, το οποίο είναι γνωστό ότι αυξάνεται κατά τη διάρκεια της άσκησης (Parmar et al., 2018). Αυξημένο FAP θα μπορούσε να αποδυναμώσει την αναλογία του βιοενεργού FGF21 στην παχυσαρκία καθώς και σε ασθενείς με T2DM. Επιπλέον, βρήκαμε ότι τα επίπεδα του FGF21 στον ορό συσχετίστηκαν θετικά και σημαντικά με την ηλικία (Tezze et al., 2017; Conte et al., 2018). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η παρουσία υψηλών επιπέδων FGF21 στον ορό σε συνδυασμό με GDF15 και ανθρωπίνη, τα οποία είναι δύο άλλοι δείκτες της μιτοχονδριακής λειτουργίας, είχαν βρεθεί ότι είναι ένας προγνωστικός παράγοντας νοσηρότητας και θνησιμότητας (Conte et al., 2018).

Ο FGF21 είναι μια σημαντική μυοκίνη με αρκετές μεταβολικές επιδράσεις αλλά αν η δράση του είναι ευεργετική ή επιζήμια σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις είναι ακόμα ασαφής, ειδικά στους ανθρώπους. Υπάρχουν πολλά ζητήματα που

πρέπει να αντιμετωπιστούν και να διευκρινιστούν σύντομα. Το πιο προβληματικό και επείγον σχετίζεται με την μεγάλη μεταβλητότητα στις μετρήσεις των επιπέδων στο αίμα μεταξύ διαφορετικών μελετών, τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους. Ως εκ τούτου, απαιτείται μια τυποποίηση της διαδικασίας μέτρησης του FGF21 για να κατανοηθεί εάν ένα όριο συγκεντρώσεων στον ορό είναι καθοριστικό για τις διαφορετικές του ενέργειες. Ωστόσο, έχουμε μια ξεκάθαρη εικόνα για την πηγή των διαφορετικών ιστών και στόχων που εμπλέκονται στην επίδραση του FGF21 όπως επίσης και τις συνθήκες που σηματοδοτούν την έκφραση του FGF 21 στους σκελετικούς μυς (π.χ μυτοχονδριακή δυσλειτουργία και στρες ER)

1.6 FGF21 και Φυσική Δραστηριότητα

Τα αυξημένα επίπεδα FGF21 στην κυκλοφορία μπορούν να θεωρηθούν ως αντισταθμιστική απάντηση επιβίωσης για την καταπολέμηση διαφόρων παραγόντων στρες ή ως μείωση των υποδοχέων του FGF21 (δηλαδή, αντίσταση στον FGF21) (Salminen et al., 2017). Η προπόνηση αερόβιας άσκησης βελτιώνει τη μείωση των επιπέδων των υποδοχέων FGF21 σε παχύσαρκα ποντίκια που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Geng et al., 2019). Επιπλέον, οι διάφορες μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από τα αυξημένα επίπεδα FGF21 στην κυκλοφορία (διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων, φλεγμονή και οξειδωτικό στρες) έχουν επίσης βελτιωθεί με τη συνήθη εκτέλεση σωματικής δραστηριότητας (Charansonney, 2011- Kasapis and Thompson, 2005, Vicencio et al., 2019). Στην μελέτη των Masahiro et al. φάνηκε πως ο χρόνος που αφιερώνεται σε μέτρια προς έντονη φυσική δραστηριότητα φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προσδιοριστικό παράγοντα των επιπέδων FGF21 στην κυκλοφορία και ότι η αύξηση των επιπέδων FGF21 στον ορό που σχετίζεται με την ηλικία μπορεί να αμβλυνθεί με τη συνήθη εκτέλεση μέτριας προς έντονης φυσικής δραστηριότητας (Μασατσουκι et al.). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα καθημερινής σωματικής δραστηριότητας θα μπορούσαν να μειώσουν τα κυκλοφορούντα επίπεδα FGF21. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της καθημερινής σωματικής δραστηριότητας και των επιπέδων FGF21 στην κυκλοφορία είναι στην πραγματικότητα ασαφής.

ΚΕΦ.2: Γκρελίνη

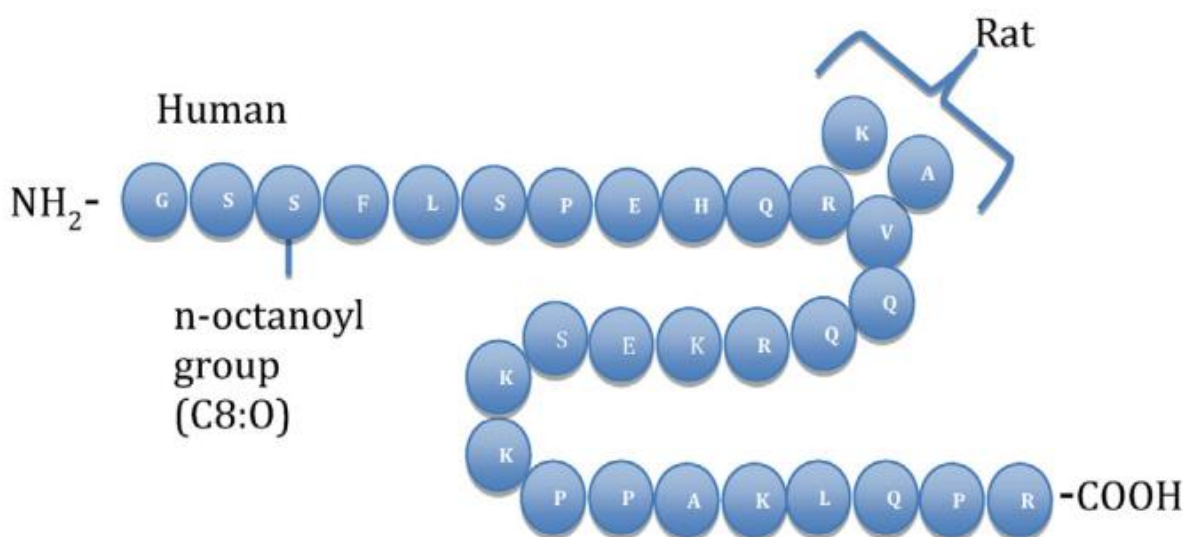
2.1. Δομή της γκρελίνης

Η γκρελίνη είναι ένα πεπτίδιο μήκους 28 αμινοξέων που απομονώθηκε από το στομάχι αρουραίου ως ενδογενής συνδέτης του υποδοχέα γκρελίνης (Εικ. 1). και αναγνωρίζεται ευρέως ως εκκριτικό της αυξητικής ορμόνης (GHS) [78]. Η ανθρώπινη γκρελίνη και η γκρελίνη του αρουραίου είναι ομόλογες μεταξύ τους με το διαφορά δύο αμινοξέων [79]. Τα Ενδοκρινικά κύτταρα X/A-like του βυθού βλεννογόνου που αποτελούν σχεδόν το 20% του ανθρώπινου γαστρικού βλεννογόνου είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της γκρελίνης [80]. Στον άνθρωπο, το γονίδιο της προπρογκρελίνης χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3q26.31 και είναι παρόν σε όλο το σώμα, ακόμη και στους όγκους και στις μεταστάσεις [81,82]. Μετά τη συγκόλληση, το mRNA της γκρελίνης μεταφράζεται σε πρόδρομη ουσία προπρογκρελίνης 117 αμινοξέων, η οποία τελικά σχηματίζει τη γκρελίνη [83]. Το γονίδιο GHS-R έχει δύο εξώνια. Η διαμεμβράνη-1 έως διαμεμβράνη-5 κωδικοποιείται από το πρώτο εξώνιο, ενώ το δεύτερο εξώνιο κωδικοποιεί τα TM-6 και TM-7 [84]. Η Γκρελίνη μπορεί να εμφανίζει τόσο ενδοκρινικές όσο και παρακρινικές επιδράσεις, επειδή εκφράζεται σε πολλά όργανα όπως το στομάχι, την καρδιά [85,86], τους πνεύμονες, τις ωοθήκες [87], τους νεφρούς, τους όρχεις [88], το πάγκρεας [89], το δωδεκαδάκτυλο, το έλκτρο, τον ειλεό, το παχύ έντερο [84], την υπόφυση και τον υποθάλαμο [90].

2.2. Μορφές της γκρελίνης

Η γκρελίνη έχει δύο κύριες μορφές: την ακυλιωμένη μορφή (n-οκτανοκυλιωμένη) και τη μη ακυλιωμένη (μη οκτανοκυλιωμένη) μορφή και το 20% της γκρελίνης εντοπίζεται ως οκτανοκυλιωμένη στο αμινοξύ-3 [91,92]. Η απο-ακυλιωμένη γκρελίνη είναι ανεξάρτητη από τις φυσιολογικές λειτουργίες της [93]. Η εστεροποίηση ενός λιπαρού οξέος (n-οκτανοϊκό ή μερικές φορές, n-δεκανοϊκό) στο 3ο κατάλοιπο σερίνης είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της ακυλιωμένης γκρελίνης [94]. Η O-ακυλοτρανσφεράση της γκρελίνης (GOAT) καταλύει την αντίδραση αυτή. [95,96] και προκαλεί την οκτανυλίωση δεσμεύοντας μια μεσαίας αλυσίδας λιπαρό οξύ (MCFA) μήκους 8 ανθράκων (οκτανοϊκό) στον άνθρακα 3. Η ακυλομάδα αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την επαγόμενη από τη γκρελίνη απελευθέρωση GH από την υπόφυση και τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα GHS. Τα MCFAs οργανώνουν υπόστρωμα για την GOAT και η μεγαλύτερη πρόσληψη διατροφικού οκτανοϊκού αυξάνει το επίπεδο της ακυλο-γκρελίνης [97]. Η

μεταγραφική ρύθμιση της τροποποίησης του οκτανουλίου είναι το κλειδί για τον έλεγχο και τη διαμόρφωση των βιολογικών δραστηριοτήτων της γκρελίνης.



Σχήμα 2: Μορφή της γρελίνης σε ανθρώπους και ποντίκια

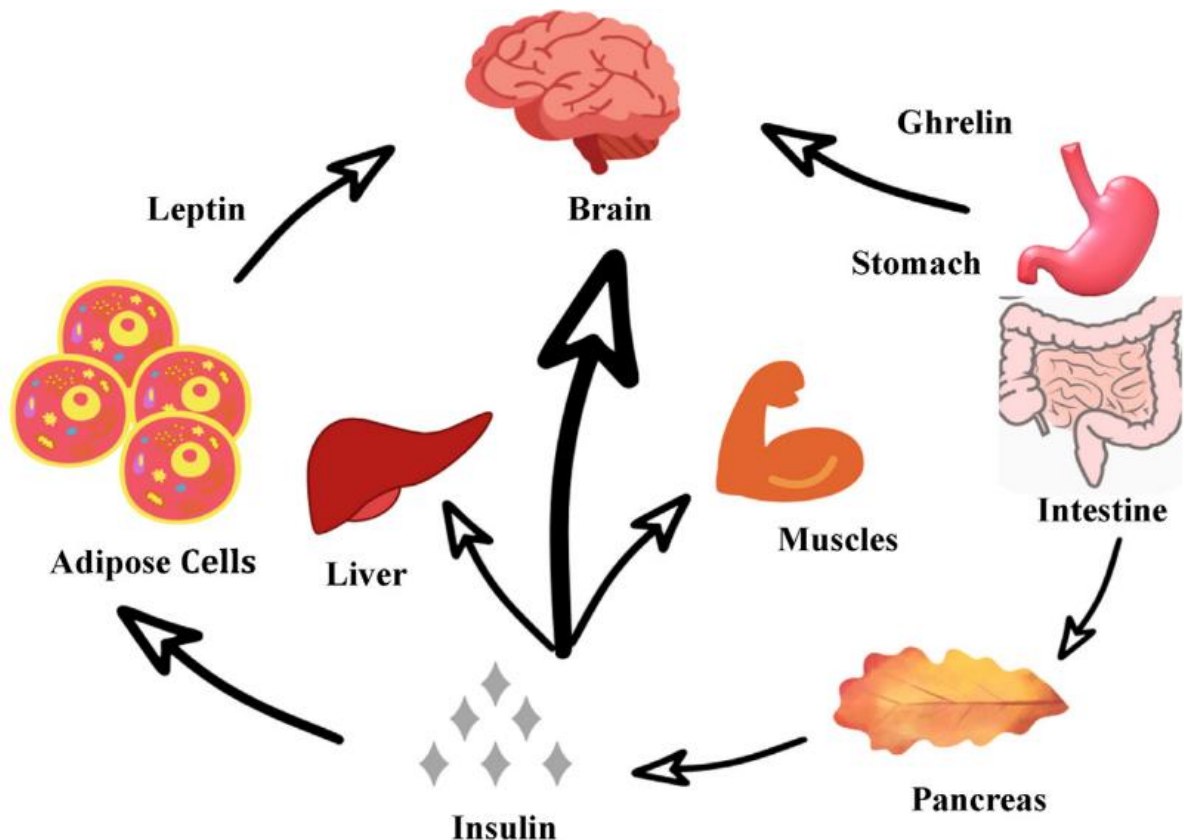
2.3. Απελευθέρωση της γκρελίνης

Η απελευθέρωση της GH και η διέγερση της όρεξης είναι από τις πιο αξιοσημείωτες και γνωστές πρώιμες επιδράσεις της γκρελίνης μετά την ανακάλυψή της [80]. Στα σωματοτροφικά κύτταρα της υπόφυσης, η προσκόλληση της γκρελίνης στον GHSR-1a προκαλεί την απελευθέρωση της GH [98,99]. Οι συνέπειες της φυσιολογικής, παθολογικής, διαγνωστικής και θεραπευτικής λειτουργίας της γκρελίνης μπορεί να συνδέονται με την ενεργοποίηση της απελευθέρωσης της. In vivo, οι άμεσες επιπτώσεις της γκρελίνης από τις εν λόγω επιδράσεις που συνδέονται με την απελευθέρωση της ,μπορεί να μην είναι εύκολο να διαχωριστούν. Μια σταθερή σύνδεση αναφέρθηκε σε μια μελέτη μεταξύ της γκρελίνης και της ανθρωπομετρικής μέτρησης στην πρώιμη ζωή στη μήτρα ή στο αυγό και παρέχει μια ισχυρή υποστήριξη στη θεωρία της επίδρασης της γκρελίνης στην ανάπτυξη [100]. Η διακοπή της σηματοδότησης της γκρελίνης μπορεί να σχετίζεται με μερικές κλινικές εκβάσεις που σχετίζονται με την ανεπαρκή απελευθέρωση GH στον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα, στη γήρανση και στο κοντό αναστήμα [101]. Η σχέση μεταξύ του οικογενειακού ιστορικού κοντού αναστήματος και των μεταλλάξεων στην GHS-R1a υποστηρίζει το παραπάνω εύρημα [102,103].

2.4. Επιδράσεις στην όρεξη και την εναπόθεση λίπους

Ο ρόλος της γκρελίνης στη ρύθμιση της όρεξης και του βάρους του σώματος υποστηρίζεται από την έγχυσή της τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους και προκαλεί ενστικτώδη πρόσληψη τροφής [104,105]. Η βιολογική οδός υπό την ορεξιγόνο δράση της γκρελίνης περιλαμβάνει είτε την ενεργοποίηση των κολπικών προσαγωγών [106] είτε των σημάτων που φθάνουν στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος [107]. Η γκρελίνη επηρεάζει πολλά μέρη του εγκεφάλου κυρίως τον υποθάλαμο [43] ο οποίος ρυθμίζει την όρεξη και την ενδοκρινική λειτουργία [108]. Οι περιοχές του εγκεφάλου που αποτελούν στόχο για τη γκρελίνη προστατεύονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) και η γκρελίνη χρειάζεται ιδιότυπους κορεστούς μεταφορείς για να περάσει αυτόν τον φραγμό. Μια μελέτη υποστήριξε ότι η δεσ-ακυλική γκρελίνη έχει τη δυνατότητα να φτάσει εύκολα στον εγκέφαλο μέσω μη κορεστής διάχυσης, γεγονός που προσδιορίζει τη σημασία της μετα-μεταφραστικής οκτανουλίωσης [109]. Επηρεάζει τους βλαστικούς πυρήνες του εγκεφάλου και του υποθαλάμου για να ενισχύσει την όρεξη και να μειώσει τη διάχυση ενέργειας [110]. Στον υποθάλαμο, ενεργοποιούνται τα νευροπεπτίδια του νευροπεπτιδίου Υ που περιέχουν ορεξιγόνα πεπτίδια και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αγκουτί. Ταυτόχρονα η δραστηριότητα των ανορεξιγόνων πεπτιδίων που περιέχουν νευρώνες κοκαΐνης, της προοπιομελανοκορτίνης και της σχετιζόμενης με την αμφεταμίνη διακόπτεται [111]. Η λεπτίνη και η γκρελίνη είναι αναπόσπαστοι παράγοντες ενός ρυθμιστικού συστήματος και έχουν αντίθετες λειτουργίες στους ίδιους νευρώνες. Και οι δύο ενημερώνουν το κεντρικό νευρικό σύστημα σχετικά με την ενέργεια και το βάρος [112]. Οι τοξοειδείς νευρώνες προεξέχουν σε άλλους πυρήνες, μαζί με τους πλευρικούς υποθαλαμικούς νευρώνες που περιέχουν ορεξίνη για την ενεργοποίηση της όρεξης [113]. Η γκρελίνη ελέγχει τη λιπώδη ανάπτυξη και τα επίπεδά της αυξάνονται ως αποτέλεσμα της απώλειας βάρους από τη χρήση δίαιτας με χαμηλές θερμίδες [114], μεταβλητές κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες [115], τη νόσο του Huntington και πολλές άλλες κλινικές καταστάσεις [116]. Η αύξηση των επιπέδων γκρελίνης ενισχύει την αδιπογένεση [117]. Μειώνουν την κατανάλωση ενέργειας [118], τη λιπόλυση [89,119], την απόπτωση των λιποκυττάρων [120], τη θερμοκρασία της σώματος [121], τη σύνθεση

προφλεγμονωδών κυτταροκινών [122] και τη δραστηριότητα των κινητήρων [123]. Αντίθετα, ορισμένες κλινικές και κοινωνικοοικονομικές συνθήκες [52], οι λιπαρές δίαιτες [124] και η αναγκαστική υπερτροφή [125] προκαλούν μείωση των επιπέδων της γκρελίνης και προάγει την αύξηση του βάρους. Η χαμηλή γκρελίνη σχετίζεται με τη μερική ή την ολική γαστρεκτομή [126]. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται μια σχέση ισορροπίας μεταξύ της γκρελίνης, της λεπτίνης και της ινσουλίνης.



Σχήμα Τα φυσιολογικά επίπεδα βάρους και όρεξης είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας των επιπέδων γρελίνης, λεπτίνης και ινσουλίνης.

2.5 Ρόλος στο μεταβολισμό

Νέες Έρευνες υποστηρίζουν ότι η γκρελίνη επηρεάζει την μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Η γκρελίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης και μειώνει την έκκριση ινσουλίνης στον άνθρωπο [127]. Η γκρελίνη έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει ή να ενεργοποιεί την έκκριση ινσουλίνης σε σπονδυλωτά [64e66]. Το ενδοκρινές πάγκρεας των ζώων και του ανθρώπου περιέχει GHS-R1a, GHS-R1b και γκρελίνη [128,129]. Τα επίπεδα ινσουλίνης και γκρελίνης σε φυσιολογικά άτομα συσχετίζονται αρνητικά μεταξύ τους [69e71]. Η

ινσουλίνη ρίχνει τα επίπεδα της γκρελίνης [130] και η γκρελίνη εμποδίζει την απελευθέρωση της ινσουλίνης [131,132]. Έτσι, παρατηρείται αύξηση της βασισμένης στη γκρελίνη ,παραγωγή ηπατικής γλυκόζης [133] και ρυθμίζεται ο έλεγχος της βασισμένης στην ινσουλίνη ,σύνθεσης της ενδογενούς γλυκόζης [134]. Η αφαίρεση της GOAT, GHSR ή της γκρελίνης αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης [80]. Η οξεία χορήγηση γκρελίνης στον άνθρωπο ενισχύει τη γλυκόζη πλάσματος και αυξάνει την υπεργλυκαιμική δράση της αργινίνης [135]. Στον διαβήτη τύπου 2, ο ανταγωνισμός του υποδοχέα της γκρελίνης μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα [136]. Η σύνθεση γλυκογόνου και η γλυκονεογένεση μπορεί να προκαλούν την υπεργλυκαιμική δράση της γκρελίνης [137]. Σε αντίθεση με αυτό, η υψηλή γλυκόζη μειώνει τη γκρελίνη [138]. Η γλυκόζη και η ινσουλίνη έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην απελευθέρωση της γκρελίνης, γεγονός που δείχνει μια σύνδεση μεταξύ των ενδοκρινικών του παγκρέατος, της γκρελίνης και του μεταβολισμού της γλυκόζης [139]. Η λειτουργία της γκρελίνης σε διαβητικές καταστάσεις δείχνει ότι η χαμηλή γκρελίνη σχετίζεται με αντίσταση στην ινσουλίνη,τον διαβήτη τύπου II και την υπέρταση [140]. Οι πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη σχετίζονται επίσης με τον πολυμορφισμό στο γονίδιο της γκρελίνης [141]. Η γκρελίνη διεγείρει την αναγέννηση των β-κυττάρων σε νεογέννητα ποντίκια που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με στρεπτοζοκίνη, και παρεμποδίζει την εξέλιξη του διαβήτη μετά απο την απώλεια β-κύτταρων [142]. Όλες οι παραπάνω μελέτες υπογραμμίζουν την κρίσιμη συμμετοχή της γκρελίνης στην παθολογία του διαβήτη και τις θεραπευτικές της δυνατότητες για τη θεραπεία του. Η γκρελίνη ενεργοποιεί την έκφραση λιπογενετικών γονιδίων στο ήπαρ με την μειωμένη λειτουργία της AMPK, η οποία είναι ένας διεγέρτης οξείδωσης των λιπαρών οξέων [80]. Στους γαστροκνημίους μύες, η γκρελίνη μειώνει την περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια, προκαλεί τη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών οξειδωτικών ενζύμων και παράγει περισσότερο mRNA της πρωτεΐνης αποσύνθεσης 2 [80]. Επιπλέον, επάγει τη λιπογένεση δρώντας άμεσα στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα με την αύξηση των επιπέδων του PPAR γ τόσο in vitro όσο και in vivo [143,144]. Η γκρελίνη ανταγωνίζεται τη λιπόλυση [145] και ενισχύει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των προαδικοκυττάρων [146].

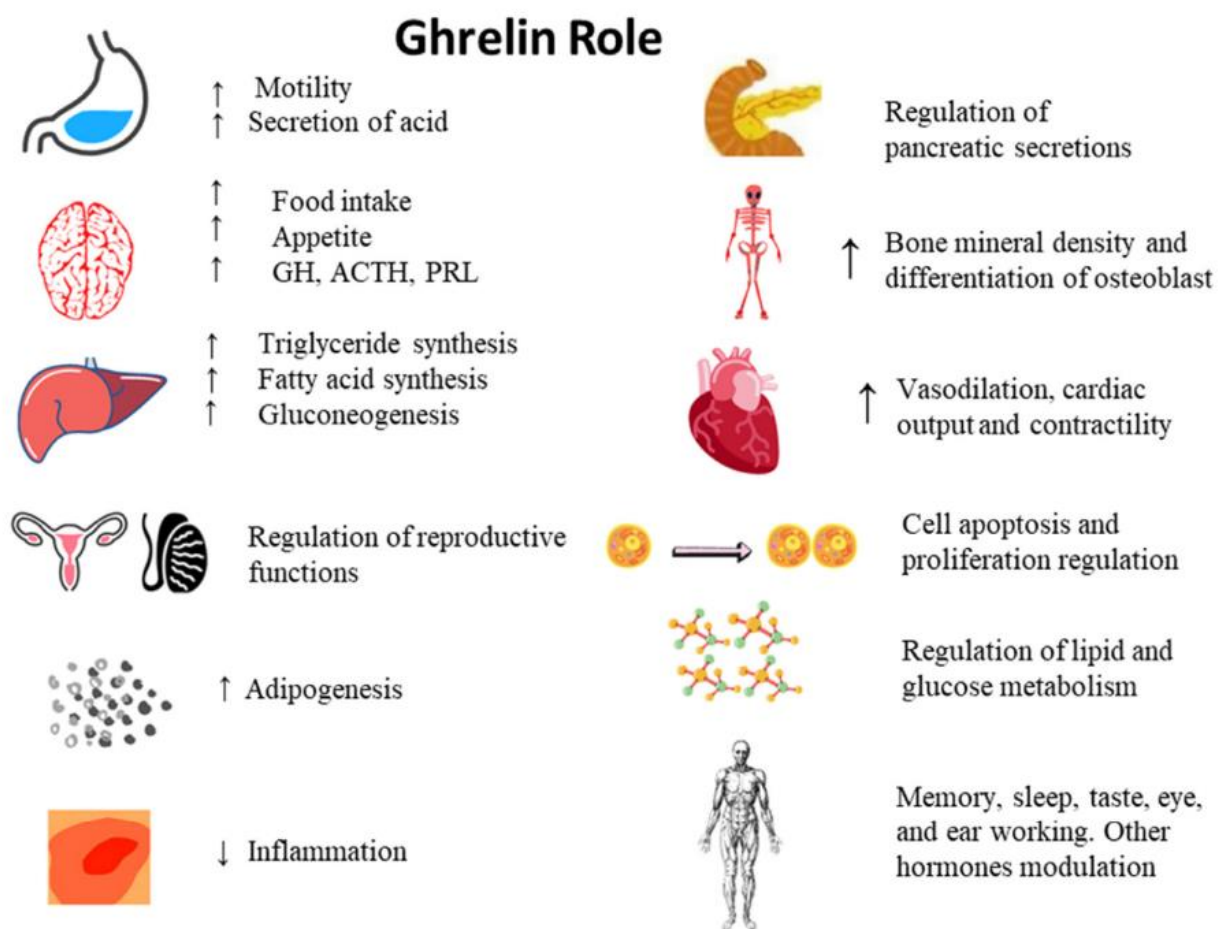
2.6 Ενδοκρινικός ρόλος της γρελίνης

Η γκρελίνη ρυθμίζει την κορτικοτροπική και γαλακτοτροπική δραστηριότητα και ενεργοποιεί την απελευθέρωση της προλακτίνης, της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης και της κορτιζόλης. Επηρεάζει επίσης τη βαζοπρεσίνη και την ωκυτοκίνη [147]. Μειώνει την έκκριση θυρεοειδικής ορμόνης και επηρεάζει τη γλυκαγόνη, την ινσουλίνη και την έκκριση τεστοστερόνης [148]. Η γκρελίνη μπορεί να ελέγχει πολλές ανώτερες λειτουργίες του εγκεφάλου, όπως η μάθηση, η κατανόηση, η μνήμη και η επιθυμία ανταμοιβής [149]. Βοηθά στην τον κύκλο ύπνου και αφύπνισης, τη λειτουργία της γεύσης, των ματιών και των αυτιών. Επιπλέον, η βελτιώνει την επούλωση των πληγών, παρεμποδίζει την εφηβεία και ενισχύει τους εμβρυϊκούς πνεύμονες ανάπτυξη του πνεύμονα. Οι νεοπλασματικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές απαιτούν γκρελίνη για τον κατάλληλο πολλαπλασιασμό τους [85]. Υπάρχει ένας μακρύς κατάλογος των λειτουργιών της γκρελίνης στα σπονδυλωτά. Η Γκρελίνη επηρεάζει πολλαπλά όργανα, από τον εγκέφαλο έως την κοιλιακή χώρα και εκτελεί ποικίλες λειτουργίες, όπως απεικονίζεται στην Εικ. 3. Αυτές οι λειτουργίες ευρέος φάσματος της γκρελίνης, όπως η ενεργοποίηση της όρεξης, η προώθηση της ενδοθηλιακής δραστηριότητας, η αντιφλεγμονώδης δραστηριότητα, οι ευεργετικές καρδιαγγειακές επιδράσεις και πολλά άλλα έχουν καταστήσει τη γκρελίνη και τα ανάλογα της ένα σημαντικό υποψήφιο για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών [85]. Ωστόσο, η φυσιολογία και η παθογένεια πολλών από τις προαναφερθείσες επιδράσεις δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή.

2.7 Υποδοχέας γκρελίνης

Οι εκριματοδότες αυξητικής ορμόνης (GHS) εκφράζουν δραστηριότητα απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GH) και είναι τεχνητά παράγωγα της εγκεφαλίνης [119]. Ο πρώτος GHS-R τύπου 1a (GHS-R1a) είναι ένας υποδοχέας συνδεδεμένος με G-πρωτεΐνη (GPCR), κωδικοποιεί επτά διαμεμβρανικές περιοχές (7-TMDs) [120] και ανακαλύφθηκε στον άνθρωπο και στους χοίρους [2]. Έχει συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης στους δύο πρώτους εξωκυτταρικούς βρόγχους,

μια αρωματική τριπλή αλληλουχία (E/DRY) που βρίσκεται μετά το TM-3 εντός του δεύτερου ενδοκυττάριου βρόγχου, και πολλές μετα-μεταφραστικής θέσεις τροποποίησης φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης συνδεδεμένες με άζωτο [30]. Οι GHSs προσδένονται σε αυτόν τον υποδοχέα και αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} [81]. Ο GHS-R1a αποτελείται από 336 αμινοξέα και το πρώτο εξώνιο ή εξώνιο 1 κωδικοποιεί τα πρώτα 265 αμινοξέα που κυμαίνονται από το TMD1-5. Το υπόλοιπα 101 αμινοξέα καλύπτουν τα TMD 6 και 7 και κωδικοποιούνται από το δεύτερο εξώνιο 2 [149]. Το άλλο GHS-R τύπου 1b (GHS-R1b) είναι προϊόν ενός εναλλακτικού μηχανισμού ωρίμανσης. Ο υποδοχέας τύπου 1b είναι μια καρβοξυ-τελική αποκομμένη μορφή του υποδοχέα τύπου 1a και μεταγράφεται μόνοι από το πρώτο εξώνιο και μέρος του ιντρονίου. Διαθέτει πέντε από τα επτά TM τομείς και είναι φαρμακολογικά ανενεργός [81]. Ο υποδοχέας της γκρελίνης είναι υπαρκτός σε όλα τα σπονδυλωτά, από τα ψάρια έως τα θηλαστικά, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του στην διατήρηση της φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού [150]. Ο GHSR έχει πολλά ομόλογα. Οι ενδογενείς συνδέτες τους είναι είτε γαστρεντερικά πεπτίδια ή νευροπεπτίδια. Η υπεροικογένεια του υποδοχέα της γκρελίνης περιλαμβάνει τους υποδοχείς για τη γκρελίνη, τη μοτιλίνη, τη νευρομεδίνη U [151], τη νευροτενσίνη [152] και έναν ορφανό υποδοχέα GPR39 [153]. Όλα αυτά τα πεπτίδια είναι παρόντα στα γαστρεντερικά όργανα, ελέγχουν την γαστρεντερικές κινήσεις και επιτελούν και άλλες λειτουργίες. Τα δύο ενδογενή πεπτίδια που απελευθερώνουν την GH είναι η γκρελίνη και η GHRH. Η GHRH δεσμεύει τον υποδοχέα GHRH και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση αυξάνοντας τα επίπεδα της ενδοκυττάριας cAMP. Η cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A αποκαλύπτοντας ότι ο GHRH υποδοχέας είναι συνδεδεμένος με την υπομονάδα Gs [154]. Αντίθετα, η γκρελίνη συνδέεται με το GHS-R και ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C που παράγει διακυλογλυκερόλη και IP3. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται αύξηση του ενδοκυττάρια Ca^{2+} , γεγονός που δείχνει ότι ο υποδοχέας της γκρελίνης είναι συνδέεται με την υπομονάδα Gq [154]. Στο Σχ. 4 παρουσιάζονται οι υποδοχείς γκρελίνης στα σπονδυλωτά. Οι αντισπασμωδικές επιδράσεις του υποδοχέα της γκρελίνης εξετάστηκαν πρόσφατα από τους Buckinx et al. οι οποίοι συγκέντρωσαν τις υπάρχουσες γνώσεις και ανέλυσαν τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης [155].



Σχήμα 4 Ο ρολος της γκρελίνης

2.8 Σύνδεση του υποδοχέα

Η γκρελίνη είναι μια νευροενδοκρινής ορμόνη που συντίθεται κυρίως στο στομάχι. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες αυτού του πεπτιδίου αποδίδονται στον εκκριτικό υποδοχέα τύπου 1α (GHS-R1a). Η γκρελίνη και ο υποδοχέας της έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες έρευνας στον τομέα του μεταβολισμού και στους νευροενδοκρινικούς τομείς. Αυτή η αναδυόμενη έρευνα έχει επιπτώσεις σε τομείς της εσωτερικής ιατρικής, όπως της ογκολογίας, της καρδιολογίας και της Γαστρεντερολογίας. Οι συνθετικοί, πεπτιδυλικοί και μη πεπτιδυλικοί συνδέτες GHSR1a ως αγωνιστές, μερικοί αγωνιστές, ανταγωνιστές ή αντίστροφοι αγωνιστές μπορεί να έχουν πολλές κλινικές και θεραπευτικές δυνατότητες [156]. Η ανακάλυψη της γκρελίνης αποτελεί κλασικό παράδειγμα αντίστροφης φαρμακολογίας, καθώς τα συνθετικά ανάλογα της γκρελίνης, εκκριματογόνα της αυξητικής ορμόνης, αναφέρθηκαν πρώτα. Χρειάστηκαν περισσότερα από 30 χρόνια για να αποκαλυφθεί ο υποδοχέας

GHSR1a, ο ενδογενής συζευκτής της γκρελίνης, και ο ρόλος της γκρελίνης στην διαμόρφωση της ενεργειακής ισορροπίας [157].

2.7 Γκρελίνη και φυσική Δραστηριότητα

Η οξεία επίδραση της άσκησης στα επίπεδα της γκρελίνης είναι αρκετά αμφισβητήσιμη στις μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής. Η πλειονότητα των μελετών διαπίστωσε ότι τα επίπεδα της γκρελίνης δεν μεταβάλλονται μετά την άσκηση, [158, 159,160], ενώ ορισμένες άλλες μελέτες ανέφεραν αύξηση ή ακόμα και μείωση των επιπέδων της γκρελίνης [161, 162, 163]. Μια έρευνα των Stokes et al. [164, 165] διαπίστωσε ότι τα επίπεδα της γκρελίνης μειώθηκαν μετά την άσκηση. Η διαφορά μεταξύ των μελετών των Stokes et al. έναντι άλλων μελετών επί του θέματος ήταν ότι οι άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν πρωτόκολλα άσκησης που επηρεάζουν το αερόβιο ενεργειακό σύστημα ενώ οι Stokes et al. βασίστηκαν στο αναερόβιο σύστημα ενέργειας με ασκήσεις μικρής διάρκειας και υψηλής έντασης. Παρόμοια αντιφατικά αποτελέσματα μπορούμε να δούμε και σε μελέτες οι οποίες εξετάζουν την βραδεία επίδραση της άσκησης.

Κεφ. 3 Λεπτίνη

3.1 Ανακάλυψη και βιολογική λειτουργία

Η ανακάλυψη της λεπτίνης στα ποντίκια και στους ανθρώπους παρείχε ένα σημείο εισόδου στα μοριακά και κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παχυσαρκία, μια μεταβολική ασθένεια που δεν είχε προηγουμένως ουσιαστική φυσιολογική και μοριακή βάση. Καμία προηγούμενη ιατρική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας δεν είχε αναγνωρίσει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενεργειακών αποθεμάτων του σώματος και του νευρικού ελέγχου της σίτισης και της χρήσης υποστρωμάτων. Η λειτουργική συμπλήρωση (147) με εξωγενή λεπτίνη ή διαγονιδιακά εκφραζόμενο υποδοχέα λεπτίνης (LEPR) (148) χρησιμοποιήθηκε για να παράσχει ουσιαστικές

αποδείξεις ότι ο θεσμός της σηματοδότησης της λεπτίνης θα μπορούσε να διορθώσει την παχυσαρκία των μεταλλαγμένων ποντικών. Ενώ τα περισσότερα βιολογικά συστήματα είχαν κατανοηθεί ότι είναι αμφίδρομα, δηλαδή αύξηση της αποκρίσης με αυξανόμενη διέγερση, στη λεπτίνη έχει αποδειχθεί ότι οι αποκρίσεις εμφανίζονται όταν οι συγκεντρώσεις της μειώνονται ενώ οι χρόνιες αυξήσεις της λεπτίνης οδηγούν σε κατάσταση ανθεκτικότητας στη λεπτίνη (149). Η ανάπτυξη της ανθεκτικής κατάστασης θα συζητηθεί αργότερα και είναι αποτέλεσμα των μοριακών στόχων της δράσης της λεπτίνης. Εναλλακτικά, η ανικανότητα των νευρώνων να ανταποκριθούν στη λεπτίνη μπορεί απλώς να είναι αποτέλεσμα κυτταρικής δυσλειτουργίας και όχι κάποιας συγκεκριμένης πτυχής της σηματοδότησης της λεπτίνης. Η ανθεκτικότητα στη λεπτίνη φαίνεται να είναι ένα αναπόφευκτο αποτέλεσμα της χρόνιας σηματοδότησης της λεπτίνης και προκαλεί μια αυτοδιαιωσιζόμενη κατάσταση που είναι εξαιρετικά δύσκολο να διακοπεί. Η λεπτίνη βρέθηκε ότι εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον λιπώδη ιστό (τόσο στον λευκό λιπώδη ιστό όσο και στον καφέ λιπώδη ιστό) στα θηλαστικά. Οι κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις της λεπτίνης συσχετίζονται εξαιρετικά καλά με την απόλυτη μάζα του λιπώδους ιστού, υποδεικνύοντας ότι η λεπτίνη είναι ένας εξαιρετικός βιοδείκτης για το περιεχόμενο σωματικό λίπος. Ενώ η λεπτίνη εκφράζεται σε μη λιπώδη ιστό, η κύρια πηγή λεπτίνης στην κυκλοφορία προέρχεται από το λιπώδη ιστό. Οι λιποδυστροφίες έχουν διάφορους βαθμούς απώλειας λιπώδους ιστού και οι συγκεντρώσεις λεπτίνης στο αίμα μειώνονται αναλογικά (150, 151, 152). Ενώ τα λιποδυστροφικά άτομα δεν είναι παχύσαρκα (έχουν ελάχιστο λιπώδη ιστό και εμφανίζονται ιδιαίτερα αδύνατα), εμφανίζουν υπερφαγία, αντίσταση στην ινσουλίνη, και μεταβλητούς βαθμούς δυσανεξίας στη γλυκόζη, καθώς και αποτυχία της εφηβικής ανάπτυξης. Όλες αυτές οι εκδηλώσεις μπορεί να είναι ανατρέψιμες με τη θεραπεία με λεπτίνη (153, 154), υποδεικνύοντας ότι η λεπτίνη είναι ο κύριος παράγοντας ανεπάρκειας που οδηγεί στην παραγωγή των μεταβολικών και ενδοκρινολογικών ελαττωμάτων σε κατάσταση λιποδυστροφίας.

3.2 Συγκέντρωση λεπτίνης πλάσματος σε σχέση με τη λιπώδη μάζα, το φύλο, το σωματικό λίπος Κατανομή και διατροφική κατάσταση

Τα λιποκύτταρα είναι η κύρια πηγή της κυκλοφορούσας λεπτίνης (258). Άλλοι ιστοί, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινικών κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος, οι μύες και ο εγκέφαλος έχουν επίσης αναφερθεί ότι εκφράζουν λεπτίνη (155, 156). Οι συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τη λιπώδη μάζα σε ένα ευρύ φάσμα λιπώδους μάζας τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια (157,158). Επιπλέον, τα επίπεδα και ποσοστά της έκκρισης mRNA λεπτίνης συσχετίζονται θετικά με το μέσο μέγεθος (όγκο) των λιποκυττάρων του ιστού σε κατάσταση σίτισης (μεταγευματική κατάσταση) μεταξύ των ατόμων (159, 160, 161). Επιπλέον, τα επίπεδα mRNA της λεπτίνης συσχετίζονται θετικά με το μέγεθος των λιποκυττάρων που έχουν απομονωθεί από ένα μόνο λιπώδες επιθηλίο (162), γεγονός που εξαλείφει τους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες που σχετίζονται με τις ατομικές διαφορές όταν συγκρίνεται λιπώδης ιστός από διαφορετικά άτομα. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές που σχετίζονται με τις αποθήκες στη γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης. Στους ανθρώπους, τα επίπεδα mRNA της λεπτίνης είναι τριπλάσια έως πενταπλάσια στον υποδόριο από ό,τι στον λιπώδη ιστό του οσχέου τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παχύσαρκα άτομα. (145, 155, 190, 230). Στα ποντίκια, τα επίπεδα mRNA της λεπτίνης είναι υψηλότερα στον γοναδικό και οπισθοπεριτοναϊκό (ενδοκοιλιακό) από ότι στους βουβωνικούς (υποδόριους) λιπώδεις ιστούς σε νεαρά ενήλικα ζώα (163, 165, 166). Οι διαφορές που σχετίζονται με την αποθήκη στη γονιδιακή έκφραση μπορούν να αποδοθούν, σε μεγάλο βαθμό, σε διαφορές στο μέγεθος των κυττάρων (167, 168). Ωστόσο, οι διαφορές στην ευαισθησία των λιποκυττάρων σε ρυθμιστικές ορμόνες, όπως η ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή (169) οι αδρενεργικές ορμόνες συμβάλλουν επίσης στις διαφορές που σχετίζονται με τις αποθήκες (170). Για παράδειγμα, σε νεαρούς αρουραίους και ποντίκια, η ολονύκτια νηστεία μειώνει δραματικά τα επίπεδα mRNA της λεπτίνης στο επιδιδυμικό και οπισθοπεριτοναϊκό λιπώδη ιστό, αλλά έχει μικρή επίδραση στα επίπεδα mRNA λεπτίνης στον βουβωνικό λιπώδη ιστό (171). Η χορήγηση ινσουλίνης αποτρέπει τη μείωση των επιπέδων mRNA λεπτίνης στα

επιδιδυμικά και οπισθοπεριτοναϊκά λιποκύτταρα που προκαλείται από τη νηστεία (172), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι διαφορές που σχετιζόμενες με την αποθήκη λίπους στην ευαισθησία στην ινσουλίνη μπορεί να ευθύνονται για την διαφορές στην έκφραση της λεπτίνης και την απόκρισή της στη στέρηση τροφής μεταξύ αυτών των λιποαποθηκών. Η λεπτίνη εκφράζεται επίσης σε καφέ λιπώδη ιστό (173). Σε ενήλικα ποντίκια, το επίπεδο mRNA της λεπτίνης είναι πολύ χαμηλότερο στον καφέ λιπώδη ιστό σε σύγκριση με τον λευκό λιπώδη ιστό (174). Αντίθετα, σε νεογνήτους αρουραίους, η έκφραση της λεπτίνης στον καφέ λιπώδη ιστό είναι υψηλότερη από εκείνη του βουβωνικού λιπώδους ιστού και αποτελεί τον κύριο προσδιοριστικό παράγοντα της κυκλοφορούσας επίπεδο της λεπτίνης.

Η συγκέντρωση της λεπτίνης στο πλάσμα παρουσιάζει επίσης σημαντικές διαφορές στον λιπώδη ιστό ανεξάρτητα από το φύλο. Στους ενήλικες ανθρώπους, η συγκεντρώση λεπτίνης στο πλάσμα ανά μονάδα λιπώδους μάζας είναι περίπου τριπλάσιες στις γυναίκες από ό,τι στους άνδρες (175). Οι διαφορές που σχετίζονται με το φύλο είναι πιθανό να οφείλονται σε διαφορές στην κατανομή του σωματικού λίπους μεταξύ ανδρών και γυναικών, καθώς και από διαφορές που σχετίζονται με τις αποθήκες στην έκφραση της λεπτίνης που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στους ενήλικες ανθρώπους, οι υποδόριοι λιπώδεις ιστοί περιέχουν συνήθως μεγαλύτερα λιποκύτταρα και εκφράζουν υψηλότερη λεπτίνη ανά μονάδα λιπώδους μάζας καθώς οι γυναίκες έχουν σχετικά περισσότερο υποδόριο λίπος από τους άνδρες (176). Οι συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα ανά μονάδα λιπώδους μάζας δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ προεφηβικών αγόριων και κορίτσιων, αλλά αυξάνονται στα κορίτσια και μειώνονται στα αγόρια καθώς εξελίσσεται η διαδικασία της εφηβείας, και σύμφωνα με τα στάδια ενηλικίωσης Tanner IV και V, φθάνουν σε παρόμοιο πρότυπο με αυτό των ενηλίκων (177).

Επιπλέον, οι ατομικές διαφορές στη συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα ανά μονάδα λιπώδους μάζας έχουν επίσης παρατηρηθεί. Μια πρόσφατη μελέτη μελετών συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (GWAS) εντόπισε αρκετούς τόπους που επηρεάζουν τα επίπεδα λεπτίνης πλάσματος (178). Οι φυσιολογικές συνέπειες αυτών των διαφορών παραμένουν ασαφείς. αν και ένα χαμηλότερο επίπεδο λεπτίνης πλάσματος ανά μονάδα λιπώδους μάζας έχει έχει αποδειχθεί ότι

προβλέπει αυξημένη παχυσαρκία σε νεαρούς Pima Ινδιάνων (179). Η γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξύ αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο, ανεξάρτητα από το μακροπρόθεσμο ενεργειακό ισοζύγιο (λιπώδες). Η βραχυπρόθεσμη νηστεία μειώνει το mRNA λεπτίνης και τις συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα κατά περισσότερο από 60%. προτού να έχει σημαντική επίδραση στις συνολικές αποθήκες λίπους ή στην μέγεθος των λιποκυττάρων (180, 181). Γρήγορη επανασίτιση αποκαθιστά το επίπεδο mRNA της λεπτίνης (182). Αντίθετα, οι οξείες αυξήσεις στο θερμιδικό ισοζύγιο που προκύπτουν από έγχυση γλυκόζης και ενδολιπιδίου ή κατανάλωση δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά αυξάνει το γονίδιο της λεπτίνης έκφραση σταδιακά σε αναλογία με τις αυξήσεις της λιπώδους μάζας στους ανθρώπους (183, 184, 185). Οι ασύμμετρες αλλαγές στην συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα ως απόκριση σε οξείες αλλαγές σε θετικό και αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο υποδηλώνουν ότι η λεπτίνη μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά ως προς την απώλεια λίπους και ως εκ τούτου την απώλεια βάρους . Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν επίσης ότι η γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης φθάνει στο μέγιστο στην κατάσταση σίτισης, η οποία πιθανότατα περιορίζεται από την κυτταρική μεταβολική λειτουργία και/ή το επιγενετικό τοπίο που είναι σύμφωνο με το μέγεθος των λιποκυττάρων (186, 187, 188).

Τέλος, η συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα στους ανθρώπους ακολουθεί έναν ημερήσιο ρυθμό, με το ναδίρ γύρω στο μεσημέρι έως τα μέσα του απογεύματος, και το ζενίθ γύρω στα μεσάνυχτα και νωρίς το πρωί (189). Η συγκέντρωση της λεπτίνης στο πλάσμα εμφανίζει επίσης υπερχρονική ταλάντωση με συχνότητα 32 παλμών ανά 24 ώρες (190). Οι συχνότητες της ταλάντωσης είναι παρόμοιες μεταξύ άπαχων και παχύσαρκων άτομα ή μεταξύ ανδρών και γυναικών, αλλά τα ύψη των παλμών είναι διαφορετικά και ευθύνονται για τις διαφορές στη συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα μεταξύ άπαχων και παχύσαρκων, αλλά και γυναικών και ανδρών (191). Οι υποκείμενες κινητήριες δυνάμεις και η φυσιολογική σημασία της παλμικής απελευθέρωσης της λεπτίνης δεν είναι καλά κατανοητές.

3.3 Ορμονική και διατροφική ρύθμιση της έκφρασης της λεπτίνης

Τόσο τα ορμονικά όσο και τα διατροφικά σήματα είναι πιθανό να εμπλέκονται στην ρύθμιση της έκφρασης της λεπτίνης σε απόκριση αλλαγών στο ενεργειακό ισοζύγιο. Η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τα επίπεδα του mRNA της λεπτίνης, ενώ οι κατεχολαμίνες τα μειώνουν (192, 193, 194,). Η ινσουλίνη διεγείρει επίσης την έκκριση της λεπτίνης (195, 196). Οι επιδράσεις της ινσουλίνης στη γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης μπορεί να είναι δευτερεύουσες σε σχέση με τις αναβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Η 2-δεοξυγλυκόζη, η οποία είναι ένας μη-μεταβολίσιμος ανταγωνιστής της χρήσης της γλυκόζης, εμποδίζει τις διεγερτικές επιδράσεις της ινσουλίνης στη γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης (197, 198). Η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον ρυθμό λιπόλυσης στα λιποκύτταρα. Η μεταγραφή της λεπτίνης καταστέλλεται από ορμόνες και παράγοντες που επάγουν τη λιπόλυση, όπως οι κατεχολαμίνες και η αυξητική ορμόνη (199, 200), και διεγείρεται από αντιλιπολυτικούς παράγοντες, όπως η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) (201, 202). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα μεταβολικά ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόζης και λιπιδίων μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης.

Η λεπτίνη φαίνεται επίσης να ρυθμίζει αρνητικά τη δική της γονιδιακή έκφραση. Η μετάλλαξη της *Lep^{rfa}* οδηγεί σε δοσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης σε νεογνά ποντίκια ηλικίας 10 ημερών (203). Οι επιπτώσεις της μετάλλαξης είναι ανεξάρτητες από τη λιπώδη μάζα και τη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα και πιθανώς διαμεσολαβούνται μέσω των κεντρικών δράσεων της λεπτίνης (204). Η βιοσυνθετική οδός της εξαζαμίνης είναι ένας γνωστός μηχανισμός ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών στα λιποκύτταρα (205). Στο ανθρώπινο υποδόριο λιπώδη ιστό, το επίπεδο της UDP-νακετυλογλυκοζαμίνης, του τελικού προϊόντος της βιοσυνθετικής οδού της εξαζαμίνης, συσχετίζεται θετικά με το δείκτη μάζας σώματος (206). Οι χειρισμοί που επηρεάζουν αυτή τη συνθετική οδό έχουν αποδειχθεί ότι μεταβάλλουν την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στα λιποκύτταρα (207). Ωστόσο, η αναστολή της σύνθεσης της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης από έναν ανταγωνιστικό αναστολέα, την 6-διαζο-5-οξο-L-

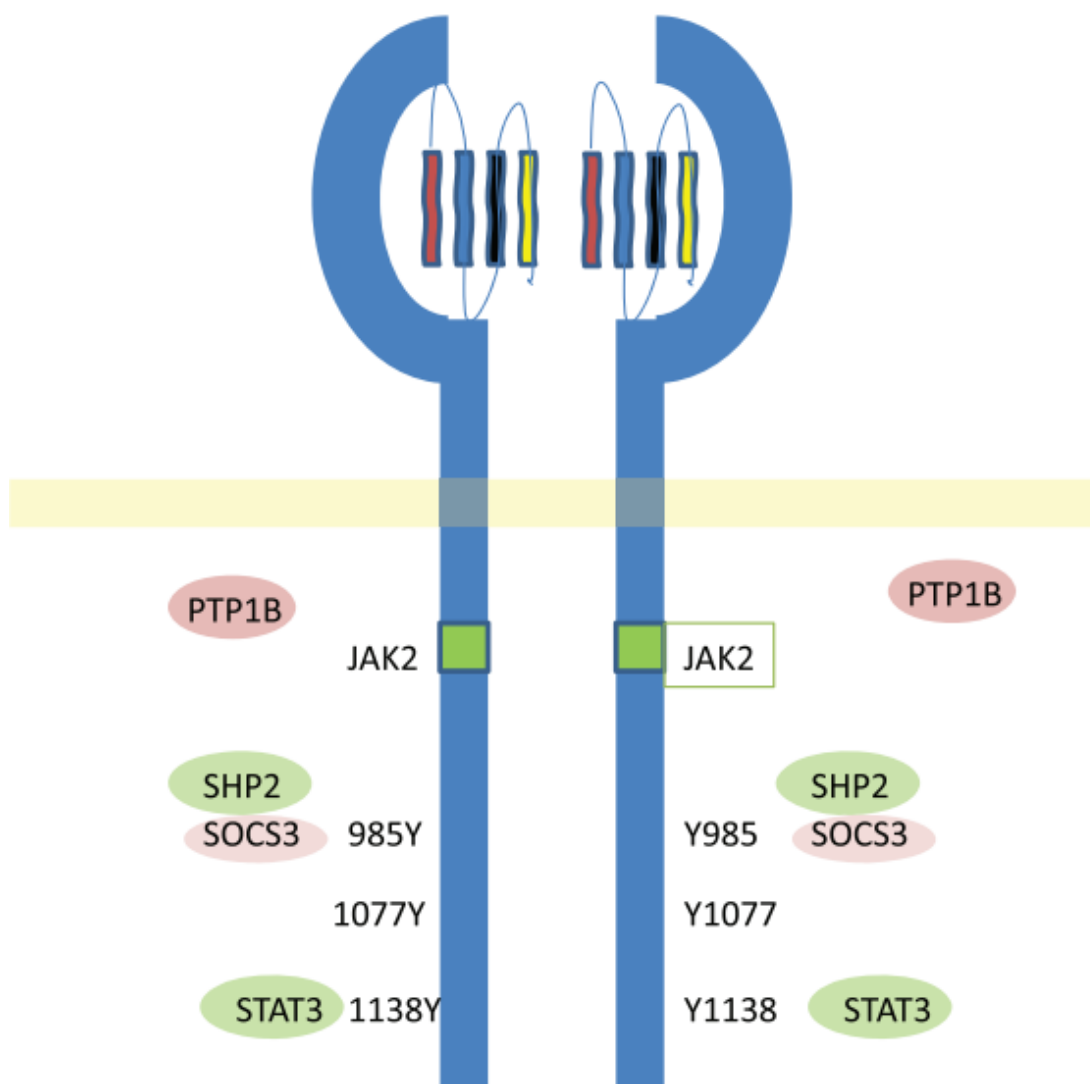
νορλευκίνη (DON), αποτυγχάνει να αναστείλει την απελευθέρωση της λεπτίνης σε διάστημα 24 ωρών σε ανθρώπινα υποδόρια λιποκύτταρα *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να μην είναι το πρωταρχικό μεταβολικό σήμα που ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στα λιποκύτταρα. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα λιπογενετικών ενδιάμεσων προϊόντων, όπως το κιτρικό οξύ, το μηλονύλ-CoA και το κυτταρικό μακράς αλύσου ακυλ-CoA (LC-CoA), αυξάνονται μετά τη σίτιση και έχουν ενοχοποιηθεί για την "ανίχνευση θρεπτικών ουσιών" στο ήπαρ, στα παγκρεατικά β-κύτταρα, στους σκελετικούς μύες και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). (208, 209, 210, 211). Το ιχθυέλαιο και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αναστέλλουν ισχυρά την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης (212). Ομοίως, η επεξεργασία των λιποκυττάρων 3T3-L1 με μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης (213, 214). Η τριασίνη C, ένας ισχυρός αναστολέας της συνθετάσης των ακυλο-CoA, αναστέλλει τη γονιδιακή έκφραση της λεπτίνης στα λιποκύτταρα (215), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και/ή λιπαρά ακυλο CoA μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης.

3.4 Μεταγραφικοί και μεταφραστικοί Μηχανισμοί που ελέγχουν την παραγωγή λεπτίνης

Το γονίδιο της λεπτίνης του ποντικίου βρίσκεται στην εγγύς περιοχή του χρωμοσώματος 6, μια περιοχή που είναι ομόλογη με το ανθρώπινο χρωμόσωμα 7q31.3 (216 , 217). Η θέση πρόσδεσης C/EBP στην εγγύς περιοχή του υποκινητή (-161 bp) διαμεσολαβεί μια 20πλάσια διέγερση στην έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης σε *in vitro* δοκιμασίες αναφορών (218, 219, 220, 221). Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης σε μεταγραφικό επίπεδο (222, 223). Η χαρτογράφηση της διαγραφής του υποκινητή της ανθρώπινης λεπτίνης έχει εντοπίσει τα *cis*-στοιχεία που είναι υπεύθυνα για την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην περιοχή μεταξύ -55 και +31 σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Ωστόσο, η περιοχή αυτή δεν περιέχει σύνδεση για

τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επίδραση μπορεί να μη βασίζεται στον κλασικό μοριακό μηχανισμό δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (224). Υπάρχουν επίσης πολλαπλά αρνητικά cis-στοιχεία ενάντη του εγγύς υποκινητή της λεπτίνης, μεταξύ -750 και -3 kb, και μεταξύ -3 και -4,5 kb (225). Οι θειοζολιδινεδιόνες (TZD), όπως η ροσιγλιταζόνη, ένας ευαισθητοποιητής της ινσουλίνης και συνθετικός αγωνιστής του PPAR γ καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης *in vivo*, παρόλο που αυξάνει την πρόσληψη τροφής και τη μάζα του λιπώδους ιστού (226). Η ροσιγλιταζόνη μειώνει επίσης τα επίπεδα mRNA λεπτίνης *in vitro* στον λιπώδη ιστό και στα λιποκύτταρα 3T3-L1 (227). Η κατασταλτική επίδραση της ροσιγλιταζόνης στην έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης απαιτεί την πρωτεΐνη PPAR-gamma και φαίνεται ότι περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό της δράσης της C/EBP α (228, 229). Αν και ένας εγγύς υποκινητής 750 bp του γονιδίου της λεπτίνης ποντικού μπορεί να οδηγήσει την έκφραση της λεπτίνης στα λιποκύτταρα, η έκφραση δεν είναι ειδική για τα λιποκύτταρα (230). Πρόσφατα, ο μεταγραφικός παράγοντας FOSL2 βρέθηκε ότι μεσολαβεί στην ειδική για τα λιποκύτταρα έκφραση της λεπτίνης (231). Ο FOSL2 συνδέεται με ένα cis-στοιχείο που βρίσκεται περίπου 4,1 kb ενάντη του TSS της λεπτίνης στα ποντίκια και φαίνεται ότι είναι τόσο απαραίτητος όσο και επαρκής για να προσδώσει ειδική για τα λιποκύτταρα έκφραση της λεπτίνης. Ωστόσο, παραμένει να γίνει κατανοητό πώς ο FOSL2, ένας πανταχού παρών μεταγραφικός παράγοντας, προσδίδει την ιστική εξειδίκευση της έκφρασης της λεπτίνης. Το επίπεδο της πρωτεΐνης FOSL2 συσχετίζεται με τα επίπεδα του mRNA της λεπτίνης και το μέγεθος των λιποκυττάρων και είναι υποψήφιος για τη διαμεσολάβηση της. Αντίθετα, ο FOSL2 είναι απίθανο να εμπλέκεται στη διατροφική ρύθμιση της έκφρασης της λεπτίνης. Τα επίπεδα της FOSL2 δεν επηρεάζονται από οξείες μεταβολές της διατροφικής κατάστασης των λιποκυττάρων, όπως η 24ωρη νηστεία και η επανασίτιση, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση της λεπτίνης (232). Η Γνώση της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου έκφραση της λεπτίνης είναι περιορισμένη εν μέρει λόγω της έλλειψης κατάλληλου κυτταρικού μοντέλου που είναι σε θέση να εκφράσει τη λεπτίνη σε συγκρίσιμο επίπεδο. Τα συνήθη χρησιμοποιούμενα *in vitro* λιποκύτταρικά μοντέλα, όπως τα κύτταρα 3T3-L1 και 3T3F442A, εκφράζουν λεπτίνη mRNA σε ποσοστό <1% του ενδογενούς επιπέδου (233, 234, 235). Η χαμηλή

έκφραση της λεπτίνης σε αυτά τα κύτταρα δεν οφείλεται σε εγγενή ελαττώματα που σχετίζονται με τις κυτταρικές σειρές, αλλά καθορίζονται από τις συνθήκες καλλιέργειας *in vitro*. Όταν τα κύτταρα 3T3-F442A μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια, μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους λιπώδεις ιστούς που μοιάζουν πολύ με τους ενδογενείς λιπώδεις ιστούς όσον αφορά τη μορφολογία τους και το επίπεδο έκφρασης της λεπτίνης (236). Οι διαφορές στην κυτταρική μορφολογία και γονιδιακή έκφραση στα λιποκύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* και *in vivo* μπορεί να σχετίζονται με επιγενωμικές διαφορές των κυττάρων ή με τα επίπεδα βασικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι FOSL2 και C/EBP- α . Η υπερέκφραση του FOSL2 αυξάνει σημαντικά την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης σε 3T3-F442A κύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* (237). Σε ανθρώπινα εκθέματα λιπώδους ιστού, η βραχυπρόθεσμη θεραπεία με ινσουλίνη (2 ώρες) αυξάνει τους ρυθμούς βιοσύνθεσης της λεπτίνης κατά δύο έως τρεις φορές, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα mRNA της λεπτίνης (238). Η επίδραση της ινσουλίνης παρεμποδίζεται από την αναστολή της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης ή του στόχου της ραπαμυκίνης των θηλαστικών, γεγονός που συνάδει με την προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η ενεργοποίηση του mTOR διεγείρει την παραγωγή και την έκκριση της πρωτεΐνης της λεπτίνης (LEP) (239,240). Η ινσουλίνη φαίνεται να αυξάνει τη μετάφραση της LEP αυξάνοντας την συσχέτιση του mRNA της λεπτίνης με το πολυσώμα. Η πλήρης επίδραση της ινσουλίνης στην παραγωγή λεπτίνης απαιτεί την παρουσία και των δύο 5'UTR και 3'UTR του μεταγράφου της λεπτίνης (241). Συνεπώς, η φυσιολογική σημασία της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης της λεπτίνης από την ινσουλίνη μένει να αξιολογηθεί.



Σχήμα 5 ο υποδοχέας της Λεπτίνης

3.5 Ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της λεπτίνης και η είσοδος της στον εγκέφαλο

Η λεπτίνη κυκλοφορεί τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή με την ελεύθερη λεπτίνη να είναι βιοδραστική (242, 241 242, 243). Στα παχύσαρκα άτομα, η αναλογία της ελεύθερης προς τη δεσμευμένη λεπτίνη είναι υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των φυσιολογικών ατόμων. Έτσι, η περίσσεια λεπτίνης στα παχύσαρκα άτομα είναι παρούσα κυρίως ως ελεύθερη λεπτίνη. Η διαλυτή LEPR (sLEPR) είναι η κύρια πρωτεΐνη δέσμησης της λεπτίνης στην κυκλοφορία, αν και συνδέεται και με άλλες πρωτεΐνες στην κυκλοφορία (241 242, 243). Η χορήγηση

ανασυνδυασμένης sLEPR μειώνει τη σηματοδοτική δραστηριότητα της λεπτίνης με την οξεία δέσμευση της ελεύθερης λεπτίνης, αλλά το ίδιο το σύμπλοκο λεπτίνης-sLEPR δεν παρεμβαίνει στη σηματοδοτική δραστηριότητα της ελεύθερης λεπτίνης (247). Η sLEPR μειώνει επίσης τη διαπερατότητα της λεπτίνης διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) μειώνοντας τη δέσμευση και την ενδοκυττάρωση της λεπτίνης (226). Από την άλλη πλευρά, η συγχορήγηση ανασυνδυασμένης λεπτίνης και sLEPR σε ποντίκια Leprob/ob με ανεπάρκεια λεπτίνης μειώνει τον ρυθμό κάθαρσης της εξωγενούς λεπτίνης και παρατείνει τα αποτελέσματα της λεπτίνης που μειώνουν το βάρος (221). Έτσι, η συγκέντρωση της sLEPR στο πλάσμα διαμορφώνει την ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης και δεσμευμένων λεπτινών και μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδοτική δραστηριότητα της λεπτίνης και την ενεργειακή ομοιόσταση. Σύμφωνα με αυτή την λογική, στο πλάσμα οι συγκεντρώσεις του sLEPR είναι αισθητά αυξημένες σε κατάσταση νηστείας και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι οποίες πιθανώς συμβάλλουν στην ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου και του μεταβολισμού σε αυτές τις συνθήκες (223, 238). Από την άλλη πλευρά, η διπλάσια αύξηση των συγκεντρώσεων sLEPR στο πλάσμα σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού βάρους και της λιπώδους μάζας, συνοδευόμενη από αυξημένο βασικό μεταβολικό ρυθμό και οξείδωση των λιπιδίων (240). Η λεπτίνη του πλάσματος καθαρίζεται κυρίως από τους νεφρούς στον άνθρωπο και τα ποντίκια (251, 253, 245). Σε διεννεφρεκτομημένο αρουραίους, η κάθαρση της ενδοφλέβιας χορηγούμενης 126I-λεπτίνης είναι μειωμένη κατά περισσότερο από 81%, σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου (261). Τα επίπεδα λεπτίνης στο πλάσμα είναι επίσης αυξημένα σε ασθενείς με αιμοκάθαρση (204). Η λεπτίνη φαίνεται να εξάγεται άθικτη από τους νεφρούς και να υφίσταται εκτεταμένη μεταβολική αποικοδόμηση στο νεφρικό σωληνάριο (261). Μια μελέτη της κινητικής της κάθαρσης της ενδοπεριτοναϊκά χορηγούμενης 125I-λεπτίνης σε Lepob/ob και Lep^{rdb/db} ποντίκια διαπιστώνει ότι υπάρχει υψηλότερη συσσώρευση ραδιενέργειας στους νεφρούς και το ήπαρ σε όλα τα χρονικά σημεία μετά την έγχυση. Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ παρατηρείται υστέρηση στη μεσολάβηση της λεπτίνης στην καταστολή της πρόσληψης τροφής κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 ωρών μετά την έγχυση λεπτίνης στα ποντίκια Lepob/ob, η μεσολάβηση της λεπτίνης

στην καταστολή της πρόσληψης τροφής είναι σημαντική 6 ώρες μετά την έγχυση και παραμένει σημαντική 24 ώρες μετά την έγχυση, όταν το 97% της εγχυθείσας λεπτίνης έχει εξαλειφθεί από το σύστημα (231), γεγονός που υποδηλώνει ότι η επίδραση της λεπτίνης στην πρόσληψη τροφής είναι μεγαλύτερης διάρκειας από τη διάρκεια ζωής της ίδιας στην κυκλοφορία. Στους ανθρώπους, ο χρόνος ημιζωής της κυκλοφορούσας λεπτίνης είναι περίπου 25 λεπτά και δεν διαφέρει μεταξύ φυσιολογικών και παχύσαρκων άτομα, γεγονός που υποδηλώνει και πάλι ότι η αυξημένη παραγωγή λεπτίνης είναι υπεύθυνη για την αυξημένη λεπτίνη του πλάσματος σε παχύσαρκους ασθενείς (118). Οι μηχανισμοί και οι πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην κάθαρση της λεπτίνης δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η LEPRa, μια σύντομη ισομορφή της LEPR, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους νεφρούς και έχει εμπλακεί στην κάθαρση της λεπτίνης (220). Δεδομένου ότι η επίδραση της λεπτίνης στην ενεργειακή ομοιόσταση διαμεσολαβείται κυρίως μέσω της δράσης της λεπτίνης στον εγκέφαλο, η πρόσβαση της λεπτίνης σε νευρώνες-κλειδιά στο ΚΝΣ είναι εξαιρετικά σημαντική για τη δράση της λεπτίνης. Η λεπτίνη εισέρχεται στο ΕΝΥ με κορεσμένο τρόπο (36, 243). Τόσο οι εξαρτώμενοι όσο και οι ανεξάρτητοι από το LEPR μηχανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί για τη μεταφορά της LEP διαμέσου του BBB (15,243,261). Και πάλι, η LEPRa έχει εμπλακεί σε αυτή τη διαδικασία. Η LEPRa εκφράζεται σε αφθονία στον χοριοειδές πλέγμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB (96,220), και είναι σε θέση να μεσολαβεί στη διακύττωση της λεπτίνης διαμέσου ενός κυτταρικού μονοστρωματικού κυττάρου (240). Επιπλέον, η λεπτίνη μπορεί επίσης να έχει πρόσβαση στους νευρώνες στο μεσοβασικό υποθάλαμο (MBH) μέσω των τανυκυττάρων στο μεσαίο έμβρυο, μια διαδικασία που απαιτεί την κυτταρική ERK σηματοδότηση και τη διέλευση της λεπτίνης μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (253).

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της παχυσαρκίας είναι η μειωμένη ανταπόκριση στη λεπτίνη. Η εμφανής "αντίσταση στη λεπτίνη" μπορεί να έχει πολλές υποκείμενες αιτίες και η μειωμένη πρόσβαση της λεπτίνης σε νευρώνες-κλειδιά στο ΚΝΣ είναι μία από αυτές. Ένα ελάττωμα στη μεταφορά της λεπτίνης διαμέσου του BBB είναι ένα πρώιμο γεγονός στην πορεία ανάπτυξης της επαγόμενης από δίαιτα παχυσαρκίας σε μοντέλα ποντικών (241, 242, 243). Τα τρωκτικά που υποβάλλονται

σε θεραπεία με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά για σύντομο χρονικό διάστημα είναι ανθεκτικά στην περιφερικά χορηγούμενη λεπτίνη, αλλά διατηρούν φυσιολογική απόκριση στη χορήγηση λεπτίνης ICV (244). Οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά επηρεάζουν επίσης την πρόσβαση σε της λεπτίνης στους υποθαλαμικούς νευρώνες ανεξάρτητα από την παχυσαρκία, τα ζώα παρουσιάζουν πολύ μειωμένη απόκριση στη λεπτίνη μετά από μόνο 3 έως 5 ημέρες σίτισης με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, πριν από σημαντικές αλλαγές είτε στο σωματικό βάρος είτε στη συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα. (245, 246). Η παρατεταμένη σίτιση αρουραίων με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη, η οποία δεν αύξησε το σωματικό βάρος ή τα επίπεδα λεπτίνης στην κυκλοφορία, οδηγεί επίσης σε μειωμένη απόκριση στη λεπτίνη (247,248). Από την άλλη πλευρά, η παχυσαρκία ή/και οι καταστάσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία οδηγούν σαφώς σε μειωμένη μεταφορά λεπτίνης μέσω του BBB σε διάφορα μοντέλα παχυσαρκίας τρωκτικών (251,249,250). Στους αρουραίους Koletsky, οι οποίοι είναι ανεπαρκείς σε όλες τις γνωστές ισομορφές του LEPR, ο ρυθμός μεταφοράς λεπτίνης μέσω του BBB είναι δεν διαφέρει σημαντικά από την ομάδα ελέγχου πριν, αλλά μειώνεται σημαντικά αφού γίνουν παχύσαρκοι (251). Τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τον ρυθμό εισόδου της λεπτίνης στο ENY και τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκε ριδίων στον ορό παρεμποδίζουν τη μεταφορά της λεπτίνης διαμέσου του BBB (252).

Τέλος, η ίδια η σηματοδότηση της λεπτίνης ρυθμίζει επίσης την πρόσβαση των λεπτίνης στους νευρώνες της MBH μέσω των τενόντιων κυττάρων. Σε ποντίκια που στερούνται την ισομορφή σηματοδότησης LEPRb ή με παχυσαρκία που προκαλείται από δίαιτα, η λεπτίνη συσσωρεύεται στο διάμεσο και αποτυγχάνει να φθάσει στο MBH. Η ενεργοποίηση της ERK σηματοδότησης στα λεμφοκύτταρα με EGF αποκαθιστά τη μεταφορά λεπτίνης και σηματοδότηση στα παχύσαρκα ζώα (253).

3.6 Λεπτίνη και φυσική δραστηριότητα

Η λεπτίνη φαίνεται πως έχει μια ασθενή έως μέτρια αρνητική συσχέτιση με την φυσική δραστηριότητα. Ένα αυξημένο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας έχει βρεθεί ότι διεγείρει την ενεργειακή δαπάνη, και συνεπώς αυξάνει την απαιτούμενη

ενεργειακή πρόσληψη για τη διατήρηση σταθερής σωματικής μάζας και σωματικής σύνθεση (253). Η μείωση του σωματικού βάρους μετά απο σωματική δραστηριότητα συσχετίζεται με μειώσεις της συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα σχετικά με τις επιδράσεις της άσκησης στη συγκέντρωση της λεπτίνης στο πλάσμα, ανεξάρτητα από τη λιπώδη μάζα, είναι αντικρουόμενα (254). Η λεπτίνη συσχετίζεται επίσης αρνητικά με την φυσική κατάσταση (VO_{2peak}), αλλά δεν συσχετίστηκε με τη σωματική δραστηριότητα (255). Η φυσική δραστηριότητα και η φυσική κατάσταση συνδέονται συνήθως, αλλά η έννοια είναι διαφορετική (256). Η φυσική δραστηριότητα έχει οριστεί ως οποιαδήποτε σωματική κίνηση που παράγεται από τους σκελετικούς μύες και απαιτεί δαπάνη ενέργειας (257), ενώ η φυσική κατάσταση περιλαμβάνει την καρδιοαναπνευστική αντοχή (εκτιμώμενη είτε με τη μετρούμενη VO_{2max}), τη μυϊκή αντοχή και τη μυϊκή δύναμη, αμφότερες οι οποίες είναι ειδικές για μια μυϊκή ομάδα και πρέπει επομένως να μετρώνται ξεχωριστά (258). Σε μελέτη των Miyatake et al. διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων λεπτίνης στον ορό και σωματικής δραστηριότητας στις γυναίκες, αλλά όχι στους άνδρες (259). Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στην συγκέντρωση των επιπέδων της λεπτίνης στην κυκλοφορία και της σωματικής δραστηριότητας δεν μπόρεσε να εξηγηθεί. Σε μια μελέτη των Henson et al. η οποία αφορούσε έναν πληθυσμό με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, διαπίστωθηκε ότι ο χρόνος καθιστικής εργασίας σχετίζεται σημαντικά με τη λεπτίνη γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την οξεία φλεγμονή μεταξύ των συμμετεχόντων που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για χρόνια φλεγμονή (258).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 GLP-1

4.1 Το μόριο GLP-1 Εκφραση και έκκριση

Το GLP-1 είναι ένα πολυπεπτίδιο 31 αμινοξέων που προέρχεται από το γονίδιο της προγλυκαγόνης. Η μεταμεταφραστική επεξεργασία του εγγενούς πεπτιδίου προγλυκαγόνης 180 αμινοξέων είναι ειδική για κάθε ιστό. Διαμεσολαβείτε είτε από

την πεπτιδάση προορμονική κονβερτάση (PC)2, είτε από την PC1/3. Αυτά τα ένζυμα διασπούν την προγλυκαγόνη κατά κύριο λόγο είτε σε γλυκαγόνη (PC2) είτε σε GLP-1, GLP-2 και οξυτομοδουλίνη (PC1/3) 21. Στο έντερο, η μεταμεταφραστική επεξεργασία της προγλυκαγόνης μεσολαβεί από την PC1/3, τον παράγοντα GLP-1 και άλλες ορμόνες του εντέρου. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), υπάρχουν υψηλά επίπεδα τόσο της PC1/3 όσο και της PC2 και αμφότερες μπορεί να είναι υπεύθυνες για την επεξεργασία της προγλυκαγόνης. Ειδικότερα, το GLP-1 βρίσκεται στον υποθάλαμο και στο ουραίο στέλεχος του εγκεφάλου. Στον εγκέφαλο και το έντερο, η γλικεντίνη, η οξυτομοντουλίνη (επίσης ορμόνη του εντέρου), το παρεμβατικό πεπτίδιο-2 (IP-2), το GLP-1 και το GLP-2 παράγονται όλα από το γονίδιο της προγλυκαγόνης. Στο πάγκρεας, η επικρατούσα μορφή του ενζύμου είναι η PC2 και, ως αποτέλεσμα, το γονίδιο της προγλυκαγόνης μετατρέπεται σε μεγάλο βαθμό σε γλυκαγόνη.

Εντός του εντέρου, το GLP-1 συντίθεται κυρίως από τα κύτταρα L και εκκρίνεται από αυτά, τα οποία βρίσκονται κυρίως στον άνω ειλεό και στο παχύ έντερο. Η έκκριση του GLP-1 από το έντερο ως απάντηση στην πρόσληψη τροφής είναι διφασική: η πρώτη φάση λαμβάνει χώρα εντός 10-15 λεπτών μετά την κατάποση τροφής και αυτή ακολουθείται από μια μεγαλύτερη δεύτερη φάση που κορυφώνεται στα 30-60 λεπτά. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα και οι σχετικοί νευροδιαβιβαστές (πεπτίδιο απελευθέρωσης γαστρίνης [GRP] και ακετυλοχολίνη) είναι πιθανό να είναι οι κύριοι μεσολαβητές της έκκρισης του GLP-1 στην πρώτη φάση, αν και τα στοιχεία είναι αντικρουόμενα. Η δεύτερη φάση της έκκρισης του GLP-1 μεσολαβείται μέσω της άμεσης επαφής των θρεπτικών ουσιών με τα κύτταρα L στο απομακρυσμένο λεπτό έντερο. Μόλις απελευθερωθεί, το GLP-1 αδρανοποιείται ταχέως στην κυκλοφορία από το ένζυμο διπεπτιδυλοπεπτιδάση-4 (DPP-4), με αποτέλεσμα ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα να είναι μικρότερος από 2 λεπτά. Μόνο περίπου 10-15% του GLP-1 που εκκρίνεται από τα εντερικά L-κύτταρα φθάνει στους περιφερικούς ιστούς και στα β-και α-κύτταρα του παγκρέατος- η πλειονότητα του GLP-1 αδρανοποιείται στο έντερο, στην πυλαία φλέβα και στο ήπαρ.

Το GLP-1 ασκεί τις επιδράσεις του μέσω του υποδοχέα GLP-1, μέλους της οικογένειας υποδοχέων συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες επτά διαμεμβρανών B1. Ο υποδοχέας GLP-1 έχει βρεθεί σε διάφορους ιστούς, όπως το πάγκρεας, οι νεφροί, η καρδιά, οι πνεύμονες, τα έντερα, η υπόφυση, το ενδοθήλιο, το περιφερικό νευρικό σύστημα και το ΚΝΣ 19. Η ευρεία έκφρασή του αντανακλά τους πολυάριθμους φυσιολογικούς ρόλους του GLP-1.

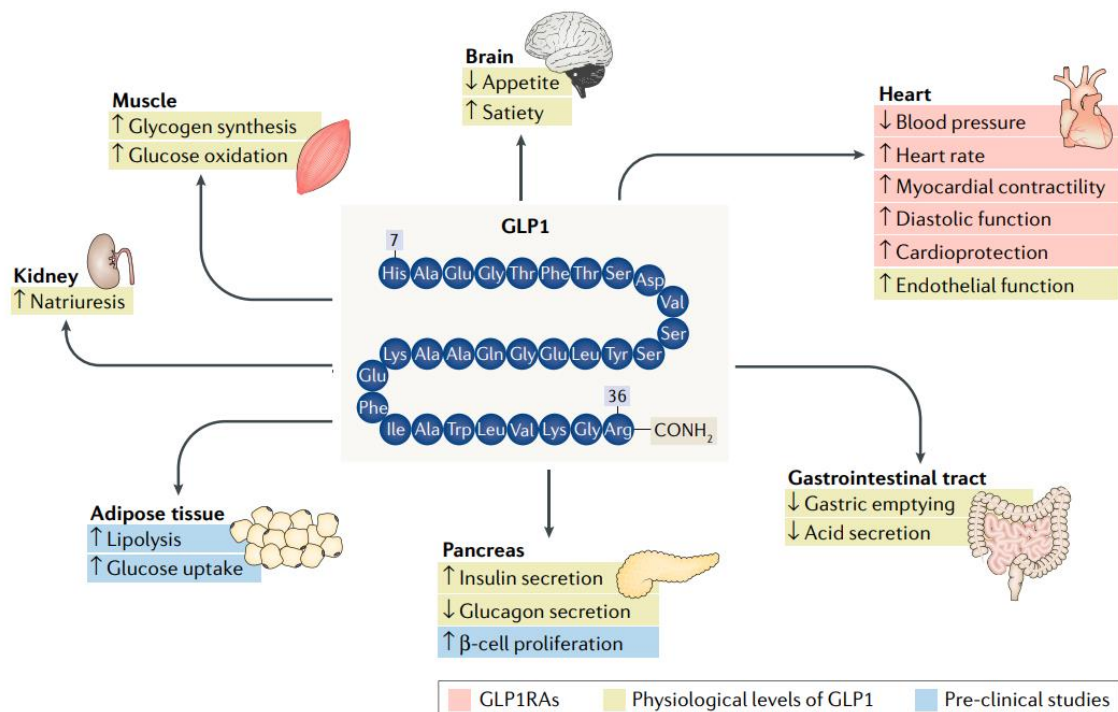
4.2 Το GLP-1 ως σήμα κορεσμού

Η GLP-1 είναι μία από τις διάφορες ορμόνες που εκκρίνονται από το έντερο και τον λιπώδη ιστό και εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και της ενεργειακής ομοιόστασης.

4.3 GLP-1 και φυσική δραστηριότητα

Ανάλογα με την ένταση, η σωματική δραστηριότητα προκαλεί μηχανική αναπήδηση, αλλάζει τη νευροενδοκρινική δραστηριότητα, και μετατοπίζει τη ροή του αίματος μακριά από το γαστρεντερικό σύστημα προς τους πνεύμονες και τους εργαζόμενους μύες (260, 259). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να επηρεάσουν τις γαστρεντερικές και τις πεπτικές λειτουργίες, όπως την κινητικότητα του εντέρου, την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και την έκκριση διάφορων ουσιών. Κατά τη διάρκεια εξαντλητικής άσκησης αντοχής (π.χ. μεγάλες αποστάσεις τρέξιμο), αυτό μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστα συμπτώματα όπως διάρροια και εντερικές κράμπες (260). Σε χαμηλή έως μέτρια έντασης άσκηση, ωστόσο, η σωματική δραστηριότητα φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του γαστρεντερικού συστήματος μειώνοντας τους κινδύνους της δυσκοιλιότητας (261, 262), η οποία σχετίζεται στενά με αδράνεια (263). Επίσης, οι επιδράσεις της άσκησης στην έκκριση των γαστρεντερικών ορμονών, όπως η GLP-1, έχουν ερευνηθεί και είναι αρκετά αμφιλεγόμενες (264). Σε ενήλικες με φυσιολογικό βάρος, η μεταγευματική GLP-1 φαίνεται να αυξάνεται μετά από οξεία άσκηση (265, 266, 267), ενώ σε μελέτες με παχύσαρκα άτομα τα επίπεδα της GLP-1 φαίνεται να αυξάνονται, σε άλλες να μειώνονται και σε μερικές ακόμα και να μένουν

ανεπηρέαστα, μετά από πρωτόκολλο οξείας άσκησης (268, 269,). Τα αντικρουόμενα ευρήματα μεταξύ των μελετών πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων (π.χ. ΔΜΣ, ηλικία και επίπεδο φυσικής κατάστασης), τα άσκηση πρωτόκολλα (π.χ. διάρκεια και ένταση) και τις τεχνικές μέτρησης GLP-1(268). Για παράδειγμα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την έκκριση του GLP-1 (269, 270) και επομένως, οι διαφορές στις αποκρίσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα στην οξεία άσκηση μπορεί να εξηγούν ορισμένες διαφορές στην επιδράσεις της άσκησης στην έκκριση του GLP-1.



Σχήμα 6: Επίδραση του GLP-1 σε διάφορους ιστούς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Ιντερλευκίνη 18

5.1 Παραγωγή IL-18

Πολλοί τύποι κυττάρων, τόσο αιμοποιητικά όσο και μη αιμοποιητικά κύτταρα, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν IL-18. Αρχικά, η παραγωγή IL-18 αναγνωρίστηκε

στα κύτταρα Kupffer, μακροφάγα που κατοικούν στο ήπαρ, ακόμη και σε κατάσταση ηρεμίας χωρίς διέγερση. Ωστόσο, στη συνέχεια, πολλοί ερευνητές ανέφεραν την παραγωγή IL-18 σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, όπως τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ακόμη και σε κατάσταση ηρεμίας. Εκτός από τη μοναδική κατανομή της και τη συστατική παραγωγή της σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων και ιστών, η IL-18 χαρακτηρίζεται από τη μοναδική διαδικασία κυτταρικής παραγωγής της. Συνήθως, κυτταροκίνες όπως η IFN- γ και η IL-4 εκκρίνονται μετά την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων, επειδή τα γονίδιά τους περιλαμβάνουν ένα πεπτιδίο σήματος που είναι απαραίτητο για την εξωκυτταρική απελευθέρωσή τους μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου προς το σύμπλεγμα Golgi. Αντίθετα, το γονίδιο της IL18, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας IL-1, στερείται πεπτιδικού σήματος. Έχει αναφερθεί πως ότι η IL-18 αποθηκεύεται στο κυτοσόλιο των κυττάρων που παράγουν την IL-18 [273,274,275]. Επιπλέον, παρόμοια με την IL-1 β αλλά σε αντίθεση με την IL-1 α ή την IL-33, η IL-18 παράγεται ως βιολογικά ανενεργή πρόδρομη ουσία [274,275,276]. Για να γίνει ενεργή και να απελευθερωθεί, η πρόδρομη IL-18 (pro-IL-18) χρειάζεται μετα-μεταφραστική επεξεργασία [277,278,279]. Ως εκ τούτου, η εξωκυτταρική απελευθέρωση της βιολογικά ενεργής IL-18 ρυθμίζεται από πολλαπλές διαδικασίες, όπως η κανονική μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση, η μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση και η μετα-μεταφραστική ρύθμιση.

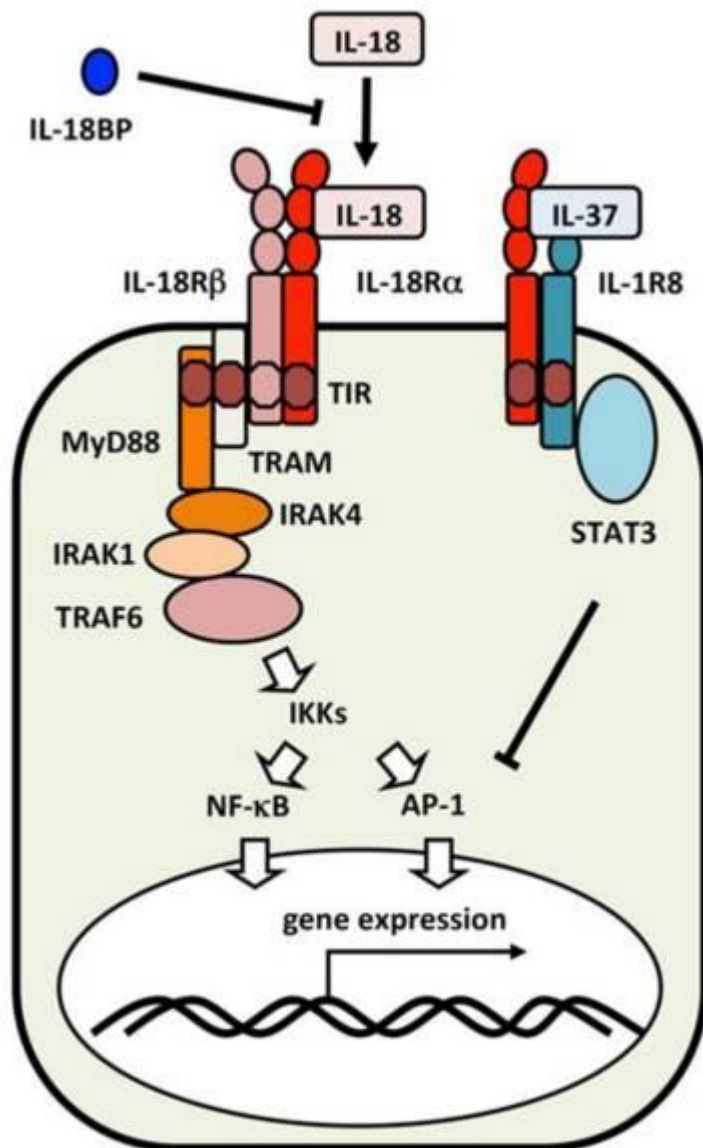
5.2 Η IL-18 στη μεταβολική ομοιόσταση

Τα διατροφικά θρεπτικά συστατικά, όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, πέπτονται και απορροφώνται μέσω του πεπτικού σωλήνα. Η γλυκόζη και τα αμινοξέα που παράγονται από υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, αντίστοιχα, απορροφώνται στο λεπτό έντερο και μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Τα απορροφημένα λιπαρά οξέα από τα λιπίδια της διατροφής συντίθενται σε τριγλυκερίδια, τα οποία μεταφέρονται στο ήπαρ. Στο ήπαρ, αυτές οι διατροφικές μονάδες καταβολίζονται και/ή αναβολίζονται κατάλληλα σε μικρότερες ουσίες, οι οποίες καταναλώνονται στα επιμέρους κύτταρα για την παραγωγή κυτταρικών συστατικών, τη συμμετοχή σε κυτταρικές δραστηριότητες και βιολογικές

λειτουργίες. Η εναπομένουσα ενέργεια σε κάθε κύτταρο συλλέγεται και αποθηκεύεται ως τριγλυκερίδια στους λιπώδεις ιστούς. Ωστόσο, η περίσσεια ενέργειας πυροδοτεί συστηματικές ασθένειες, που ονομάζονται "μεταβολικά σύνδρομα", όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η αθηροσκλήρωση και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Αρχικά, οι PRRs θεωρήθηκε ότι διακρίνονται μεταξύ μη αυτο-προϊόντων (π.χ. βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης, ιικό μονόκλωνο RNA) και αυτο-προϊόντων μορίων. Ωστόσο, αμέσως μετά την ανακάλυψή τους, οι PRRs αποδείχθηκε ότι αντιλαμβάνονται διάφορα μόρια που προέρχονται από τον ίδιο τον εαυτό τους, όπως οι κρύσταλλοι ουρικού μονονατρίου που εμπλέκονται στην ουρική αρθρίτιδα [280], οι κρύσταλλοι αφυδατωμένου πυροφωσφορικού ασβεστίου που εμπλέκονται στην ψευδοουρική αρθρίτιδα [280], το αμυλοειδές b στη νόσο του Alzheimer [281] και το αμυλοειδές πολυπεπτίδιο των νησιδίων στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [282]. Τώρα γνωρίζουμε ότι μια ευρεία ποικιλία αυτοπαραγόμενων μορίων μπορεί να ενεργοποιήσει το φλεγμονόσωμα NLRP3 (όπως περιγράφηκε παραπάνω). Επομένως, το ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί να εμπλέκεται στο μεταβολικό σύνδρομο. Επιπλέον, η διαμεσολαβούμενη από το φλεγμονόσωμα NLRP3 IL-1β έχει αναγνωριστεί ως βασική παθογόνος κυτταροκίνη που πυροδοτεί ή/και προάγει διάφορες μεταβολικές διαταραχές. Αντίθετα, η IL-18 είναι ευεργετική για τη μεταβολική ομοιόσταση. Σε αυτή την ενότητα, θα συζητήσουμε τους ευεργετικούς ρόλους της IL-18 στη μεταβολική ομοιόσταση και θα παρουσιάσουμε θέματα σχετικά με τη μοναδική παθογόνο δράση της IL-18 στην ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου.

Οι IL-1β και IL-18 ανήκουν στην υπεροικογένεια IL-1 και ενεργοποιούνται και εκκρίνονται μέσω ενός κυτταροπλασματικού, πολυμερούς συμπλόκου που ονομάζεται φλεγμονόσωμα, για να προωθήσουν τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις των κυτταροκινών. Σε αντίθεση με την IL-1β, η IL-18 αποτελεί προϋπόθεση για τη μεταβολική ομοιόσταση. Έχουν αναφερθεί διάφοροι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί για τη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης από την IL-18.



Σχήμα 7 Σήμα IL-18

5.3 Ρύθμιση της πρόσληψης τροφής από την IL-18

Ποντίκια με ανεπάρκεια IL-18 ανέπτυξαν παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη όταν τους χορηγήθηκε κανονική δίαιτα με τροφή chow [283]. Τα ποντίκια Il18^{-/-} ανέπτυξαν σακχαρώδη διαβήτη με υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναίμία, διαταραγμένες δοκιμασίες ανοχής στη γλυκόζη και στην ινσουλίνη και έκτοπη εναπόθεση λιπιδίων στο τοίχωμα της αορτής. Αυτό παρατηρήθηκε επίσης σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν συστηματικά την IL-18BP, έναν λειτουργικό υποδοχέα-δεσμώτη του ορού για την IL-18 [284]. Είναι ενδιαφέρον ότι η πρόσληψη τροφής σε ποντίκια Il18^{-/-} ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των

ποντικών ελέγχου. Η θεραπεία με ανασυνδυασμένη (r) IL-18 βελτίωσε την πρόσληψη τροφής σε ποντίκια Il18-/- . Οι Zorrilla et al. ανέφεραν ότι τα ποντίκια Il18-/- που τρέφονταν με δίαιτα χαμηλή ή υψηλή σε λιπαρά (HFD) ήταν υπερφαγικά σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου [285]. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η ενδοεγκεφαλική κοιλιακή χορήγηση rIL-18 ρυθμίζει αρνητικά την πρόσληψη τροφής με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε ποντίκια άγριου τύπου που τρέφονταν με HFD [286]. Αυτές οι αναφορές υποδηλώνουν ότι η IL-18 καταστέλλει την όρεξη και προάγει την ενεργειακή δαπάνη ακόμη και σε άτομα που καταναλώνουν HFD.

5.4 Ρύθμιση της ενεργειακής δαπάνης από την IL-18 μέσω της ενεργοποίησης των θερμογενετικών λιπώδους ιστών

Τα ποντίκια Il18-/- χαρακτηρίζονται από μειωμένη ενεργειακή δαπάνη [287,288]. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης της ενεργειακής δαπάνης από την IL-18. Τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα είναι ένα πρωτότυπο κύτταρο για την ενεργειακή δαπάνη [289]. Οι θερμογόνοι λιπώδεις ιστοί, ιδίως τα καφέ και μπεζ λιποκύτταρα που είναι κύτταρα πλούσια σε μιτοχόνδρια, είναι δευτερεύοντες τύποι κυττάρων που συμβάλλουν στην ενεργειακή δαπάνη [290,291]. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια σε αυτά τα κύτταρα δεν μπορούν να οξειδώσουν αποτελεσματικά τα λιπαρά οξέα, αλλά διαχέουν την ενέργεια ως θερμότητα, συμβάλλοντας έτσι στην ενεργειακή δαπάνη [290,291]. Τα λιποκύτταρα στον λευκό λιπώδη ιστό, όπως ο υποδόριος λιπώδης ιστός, έχουν χαμηλό αριθμό μιτοχονδρίων και δεν είναι θερμογόνα. Υπό ορισμένες συνθήκες, ωστόσο, τα λευκά λιποκύτταρα μπορούν να μεταδιαφοροποιηθούν σε θερμογόνα μπεζ κύτταρα [292]. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι τα ποντίκια Il18-/- είχαν μειωμένη ενεργοποίηση των καφέ λιποκυττάρων αλλά και μειωμένη μετατροπή των λευκών λιποκυττάρων σε μπεζ [293]. Αυτή η βλάβη μπορεί να εξηγεί τη μειωμένη ενεργειακή δαπάνη στα ποντίκια Il18-/-.

Η IL-33 είναι μια προ-ατοπική κυτταροκίνη του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και είναι μέλος της οικογένειας IL-1. Σημειωτέον, τα έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα της ομάδας 2 (ILC2s) εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-33 και η IL-33 ενεργοποιεί άμεσα τα ILC2s για να επάγει τη μελάγχρωση των λιποκυττάρων [294]

μέσω της μεθειονινικής εγκεφαλίνης, ενός μορίου που επάγει τη μελάγχρωση [295], ενεργοποιώντας άμεσα και τα ηωσινόφιλα για να επάγει τη μελάγχρωση των πρόδρομων λιποκυττάρων [296]. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ορισμένοι πληθυσμοί ILC2 εκφράζουν τον IL-18Rα αλλά όχι τον υποδοχέα IL-33 [297]. Τα ILC2 που κατοικούν στο δέρμα εκφράζουν κυρίως τον IL-18R, αν και ορισμένα ILC2 που βρίσκονται στο λίπος εκφράζουν επίσης τον IL-18R [298]. Η επαγωγή από την IL-18 της διόγκωσης των λιποκυττάρων θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ενεργοποίηση των ILC2 που εκφράζουν τον IL-18Rα.

5.5 Ενεργοποίηση της AMPK και της οξείδωσης των λιπιδίων από την IL-18 στο σκελετικό μυ

Η ενεργοποιημένη από μονοφωσφορική αδενοσίνη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) είναι ένας αισθητήρας της ενδοκυτταρικής ενεργειακής κατάστασης και διατηρεί τα αποθέματα ενέργειας μέσω καταβολικών και αναβολικών μονοπατιών [299]. Οι σκελετικοί μύες βιώνουν δραστικές ενεργειακές μεταβολές κατά τη διάρκεια της άσκησης και η AMPK συμμετέχει στον κυτταρικό έλεγχο της ενέργειας [300]. Κυτταροκίνες όπως η IL-6, αναφέρθηκε ότι ενεργοποιούν την AMPK στους σκελετικούς μύες. Οι Lindegaard et al. έδειξαν ότι η IL-18 ενεργοποίησε την AMPK σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα και λωρίδες σκελετικών μυών *in vitro* και *ex vivo* [301]. Κατά συνέπεια, αναφέρθηκε ότι τα ποντίκια Il18ra^{-/-} ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητα στην HFD, όσον αφορά την αύξηση του σωματικού βάρους και την αντίσταση στην ινσουλίνη [302]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκτοπη εναπόθεση λιπιδίων προκλήθηκε στους σκελετικούς μύες, αλλά σπάνια στο ήπαρ, σε ποντίκια που τρέφονταν με HFD με Il18ra^{-/-}, συνοδευόμενη από μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού AMPK. Επομένως, η IL-18 μπορεί να διατηρεί τη μεταβολική ομοιόσταση εν μέρει μέσω της ενεργοποίησης της οδού σήματος AMPK στους σκελετικούς μύες.

5.6 Ιντερλευκίνη 18 και φυσική δραστηριότητα

Όσον αφορά τα επίπεδα της IL-18 στο πλάσμα, έχει αποδειχθεί ότι η παρέμβαση στον τρόπο ζωής με δίαιτα (303) ή/και σε συνδυασμό με σωματική άσκηση (304), μπορεί να οδηγήσει σε μέτρια απώλεια βάρους και μείωση της IL-18 στο πλάσμα κατά 25% έως 50%. Επιπλέον, η αερόβια άσκηση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την IL-18 στο πλάσμα, ανεξάρτητα από τη μείωση του ΔΜΣ (305). Αυτό υποδηλώνει ότι η IL-18 πλάσματος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αλλαγές στον τρόπο ζωής (306,307), αλλά η έκφραση της AT IL-18 σε σχέση με την οξεία απόκριση της άσκησης ή της προπόνησης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Η μελέτη των Leick et al. έδειξε ότι 8 εβδομάδες προπόνησης υψηλής έντασης μείωσαν την έκφραση του mRNA της AT IL-18 κατά 20% τόσο σε παχύσαρκους άνδρες όσο και σε παχύσαρκες γυναίκες. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η μείωση δεν συνοδεύτηκε από βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, απώλεια βάρους ή βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ του αίματος. Πιθανών οι 8 εβδομάδες προπόνησης του πρωτοκόλλου της μελέτης αυτής να μην ήταν επαρκείς για να επιτευχθούν τέτοιες αλλαγές και τα μειωμένα επίπεδα mRNA της AT IL-18 αντικατοπτρίζουν την έναρξη μιας προσαρμοστικής προστασίας κατά της αντίστασης στην ινσουλίνη και της συστηματικής φλεγμονής λόγω της προπόνησης, η οποία μπορεί να συμβάλλει στα ευεργετικά αποτελέσματα της τακτικής σωματικής δραστηριότητας στην ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Σκοπός

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι να αποτελέσει μια προκαταρκτική έρευνα η οποία θα διερευνήσει πιθανές συσχετίσεις κυτταροκινών που συνδέονται με την όρεξη (FGF -21 , Λεπτίνη, Γκρελίνη, GLP-1, IL-18) με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας.

Για την διερεύνηση των παραπάνω διεξήχθη μια συγχρονική μελέτη στην οποία έγινε μέτρηση των επιπέδων των παραπάνω κυταροκινών σε επίπεδο νηστείας και τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας με την βοήθεια εργαστηριακών μεθόδων και ερωτηματολογίων.

Μεθοδολογία

Σχεδιασμός Μελέτης

Η μελέτη είναι μια συγχρονική μελέτη στην οποία γίνεται παρατήρηση των επιπέδων FGF-21,Λεπτίνη,Γκρελίνης,GLP-1 και Ιντερλεφκίνης 18 σε κατάσταση νηστείας με την φυσική δραστηριότητα

Ο κάθε εθελοντής εκτιμήθηκε, σωματομετρικά και ψυχομετρικά με την χρήση ερωτηματολογίων και έγινε λήψη αίματος για τον προσδιορισμό των βιοχημικών παραγόντων συσχέτισης.

Πριν την αρχή της μελέτης, κάθε εθελοντής υπέγραψε συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής ενώ η μελέτη έχει πάρει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Χαροκοπίου Πανεπιστημίου.

Προφίλ Εθελοντών

Στην μελέτη έλαβαν μέρος 52 φαινομενικά υγιείς ενήλικες άντρες και γυναίκες, ηλικίας άνω των 45 ετών, οι οποίοι δεν λαμβάνουν οποιαδήποτε συστηματική φαρμακευτική αγωγή, με ένα σχετικά μεγάλο αποδεκτό εύρος BMI (25 έως 35).

Τα κριτήρια αποκλεισμού εθελοντών από την μελέτη ήταν :

- i. Χρόνιες παθήσεις όπως χρόνια φλεγμονώδης νόσος, καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιαγγειακή νόσος.
- ii. Λήψη φαρμακοθεραπείας που θα επηρέαζε τα εξεταζόμενα ευρήματα της μελέτης

Οι συμμετέχοντες βρέθηκαν μετά από ανακοίνωση σε μέσα κοινωνικής δικτύωσης και προφορικής ανακοίνωσης σε μέλη του Χαροκοπίου Πανεπιστημίου σε συνεργασία με όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας.

Ανθρωπομετρικές μετρήσεις

Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του σωματικού βάρους των εθελοντών πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και με ακρίβεια 0,1kg. Οι εθελοντές μετρήθηκαν στον ζυγό με ελαφριά ένδυση και χωρίς να φορούν υποδήματα. Όσο αφορά το ύψος, μετρήθηκαν με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημόμετρου (Seca, Αμβούργο, Γερμανία) και με ακρίβεια 0,5cm, χωρίς οι εθελοντές να φορούν τα υποδήματά τους. Επίσης υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος ως το πηλίκο του βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m) κάθε εθελοντή.

Σύσταση Σώματος

Η σύσταση του σώματος των εθελοντών, προσδιορίστηκε μετά την συμπλήρωση ερωτηματολογίων και πριν την λήψη αίματος. Για τον προσδιορισμό της χρησιμοποιήθηκε η μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτίνων Χ διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA), χρησιμοποιώντας των σαρωτή σώματος (model DPX, Lunar Corp., Madison, WI, software version 3.6), του τμήματος επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου. Η ανάλυση του σώματος έγινε σε μέτρια ταχύτητα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όσο αφορά τη διαδικασία, οι εθελοντές αφαίρεσαν τα μεταλλικά αντικείμενα που έφεραν σε όλα τα μέρη του σώματος, ώστε να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Με τη διαδικασία αυτή προσδιορίστηκε η τιμή της λιπώδους και άλιπης μάζας σώματος με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού προγράμματος που προτείνει ο κατασκευαστής. Ο συνολικός χρόνος σάρωσης του σώματος είχε διάρκεια περίπου 20 λεπτών. Τέλος, οι εθελοντές είχαν ενημερωθεί να μην καταναλώσουν φαγητό ή μεγάλη ποσότητα υγρών τις προηγούμενες τρεις ώρες για τη μέτρηση αυτή.

Ερωτηματολόγια

Εκτίμηση Φυσικής δραστηριότητας

Για την εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε το ερωτηματολόγιο IPAQ (International Physical Activity Questionnaire)(Hagstromer, Oja, & Sjostrom, 2006), στο οποίο περιλαμβάνονται ερωτήσεις σχετικά με τη συχνότητα και τη διάρκεια των διαφόρων δραστηριοτήτων καθώς και το χρόνο περπατήματος και των καθιστικών συμπεριφορών των εξεταζόμενων.

Βιοχημικές μετρήσεις

Αιμοληψίες

Όλες οι αιμοληψίες έγιναν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του Εργαστηρίου Διατροφής και Κλινικής Διαιτολογίας από έμπειρο προσωπικό. Πριν από κάθε αιμοληψία προηγήθηκε ένα 12ώρο νηστείας. Σε κάθε αιμοληψία ελήφθησαν συνολικά 6 mL αίματος από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλάσματος (vacutainers με αντιπηκτικό EDTA) .

Απομόνωση πλάσματος

- Έγινε λήψη 6 mL αίματος σε σωλήνες αιμοληψίας κενού με αντιπηκτικό.
- Φυγοκέντρωση στα 1500 g για 20 λεπτά στους 4 οC.
- Λήψη υπερκειμένου σε σωλήνες τύπου erpendorfs και αποθήκευση στους -80 οC.

Προσδιορισμός FGF-21, GLP-1, IL-18, Leptin, Ghrelin με την χρησιμοποίηση ELISA kit

Προσδιορισμός ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι αντιδιαβητική ορμόνη και παράγεται στα κύτταρα του παγκρέατος ως προΐνσουλίνη, η οποία περιέχει 109 αμινοξέα με μοριακό βάρος 11.500 περίπου. Αυτό το πεπτίδιο μετατρέπεται ταχέως σε προΐνσουλίνη 9.000 με 86 αμινοξέα και μοριακό βάρος με διάσπαση και αποθηκεύεται στα β κύτταρα. Οι μετρήσεις στα δείγματα για την ινσουλίνη έγιναν μέσω του ανοσοενζυμικού μετρητή AIA 600II. Η συγκεκριμένη ανάλυση έχει αναπτυχθεί για in vitro διαγνωστική χρήση μόνο για την ποσοτική μέτρηση ινσουλίνης σε ανθρώπινο ορό. Αυτό που συμβαίνει στην ουσία είναι το δείγμα της ινσουλίνης να συνδέεται με μια αντίδραση με μονοκλωνικό αντίσωμα που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μαγνητική στερεά φάση και σεσημασμένο. Τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται για να αφαιρεθούν τα αδέσμευτα σεσημασμένα με ένζυμο μονοκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια επώάζονται με ένα φθορογόνο υπόστρωμα, 4-methylumbelliferyl phosphate (4MUP). Η ποσότητα του επισημασμένου με ένζυμου μονοκλωνικού

αντισώματος που συνδέεται με τα σφαιρίδια είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση της ινσουλίνης στο δείγμα δοκιμής. Η διαδικασία γίνεται αυτοματοποιημένα αφού ύστερα από το δείγμα ακολουθούν κωδικοποιημένοι σωλήνες που προσδιορίζουν την μέτρηση που θα ακολουθήσει στο δείγμα.

Οι παραπάνω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρησιμοποίηση της τεχνικής Elisa(Enzyme linked immunosorbent assay). Η τεχνική αυτή βασίζεται σε πλάκες για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα σύνθετο μείγμα. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου σε μια δοκιμασία ELISA σάντουιτς επιτυγχάνεται με τη χρήση εξαιρετικά ειδικών αντισωμάτων που ακινητοποιούν την πρωτεΐνη-στόχο (αντιγόνο) στην πλάκα και ανιχνεύουν έμμεσα την παρουσία της πρωτεΐνης-στόχου. Αυτός ο τύπος δοκιμασίας σύλληψης ονομάζεται δοκιμασία σάντουιτς επειδή ο αναλυτής που μετράται δεσμεύεται μεταξύ δύο πρωτογενών αντισωμάτων, καθένα από τα οποία ανιχνεύει μια διαφορετική θέση του αντιγόνου – αντισώματος σύλληψης και το αντίσωμα ανίχνευσης.

Πιο συγκεκριμένα, για τις παραπάνω πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν τα εξής Elisa kits:

1. FGF-21 Origene
2. Human IL-18 Origene
3. Human Leptin Origene
4. Ghrelin – BMA Biomedicals
5. GLP-1 Finetest

Προσδιορισμός FGF -21

Το kit OriGene Human FGF21 Pre-Coated ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) είναι μια ανοσολογική δοκιμή στερεάς φάσης ειδικά σχεδιασμένη για τη μέτρηση του ανθρώπινου FGF21 με μια πλάκα 96-well strip plate που είναι προ-επιστρωμένη με αντίσωμα ειδικό για τον FGF21. Το αντίσωμα ανίχνευσης είναι ένα

βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ειδικό για τον FGF21. Το αντίσωμα σύλληψης είναι μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι, το αντίσωμα ανίχνευσης είναι πολυκλωνικό αντίσωμα από κατσίκια. Το κιτ περιέχει ανασυνδυασμένο ανθρώπινο FGF21 με ανοσογόνο: Σύστημα έκφρασης για το πρότυπο: E.coli- Ανοσογόνο ακολουθία: H29 - S209. Το κιτ είναι αναλυτικά επικυρωμένο με έτοιμα προς χρήση αντιδραστήρια. Για τη μέτρηση του ανθρώπινου FGF21, προσθέστε τα πρότυπα και τα δείγματα στα φρεάτια και, στη συνέχεια, προσθέστε το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης. Ξεπλύνετε τα φρεάτια με PBS ή ρυθμιστικό διάλυμα TBS και προσθέστε το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης (ABC-HRP). Ξεπλύνετε το αδέσμευτο ABC-HRP με ρυθμιστικό διάλυμα PBS ή TBS και προσθέστε TMB. Η TMB είναι υπόστρωμα της HRP και θα καταλύεται για να παραχθεί ένα προϊόν μπλε χρώματος, το οποίο μετατρέπεται σε κίτρινο μετά την προσθήκη όξινου stop διαλύματος.

Αντιδραστήρια

- ✓ Wash buffer
- ✓ Biotinylated Anti-Human FGF21 antibody
- ✓ Avidin-Biotin-Peroxidase Complex
- ✓ Human FGF21 Standard

Μέθοδος

- Προσθήκη 100 μl του προτύπου, των δειγμάτων ή του ελέγχου ανά φρεάτιο.
- Προσθήκη 100 μl του ρυθμιστικού διαλύματος αραιωτικού δείγματος στο φρεάτιο ελέγχου (μηδενικό φρεάτιο) και επώαση 90 λεπτά στους 37 °C.
- Απόρριψη του υγρού και προσθήκη 100 μl του παρασκευασμένου αντισώματος 1x Biotinylated Anti-Human FGF21 σε κάθε φρεάτιο και επώαση για 60 λεπτά στους 37 °C.
- Απόρριψη του υγρού και έκπλυση 3 φορές με 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Προσθήκη 100 μl από το παρασκευασμένο σύμπλοκο 1x Αβιδίνης-Βιοτίνης-Περοξειδάσης σε κάθε φρεάτιο και επώαση 30 λεπτά στους 37 °C.
- Απόρριψη του υγρού και έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα (5 φορές).

- Προσθήκη 90μl από το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος σε κάθε φρεάτιο και επώαση στο σκοτάδι για 25 λεπτά στους 37 °C).
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος διακοπής σε κάθε φρεάτιο και υπολογισμός της απορρόφησης Εντός 30 λεπτών από τη διακοπή της αντίδρασης με συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450nm.

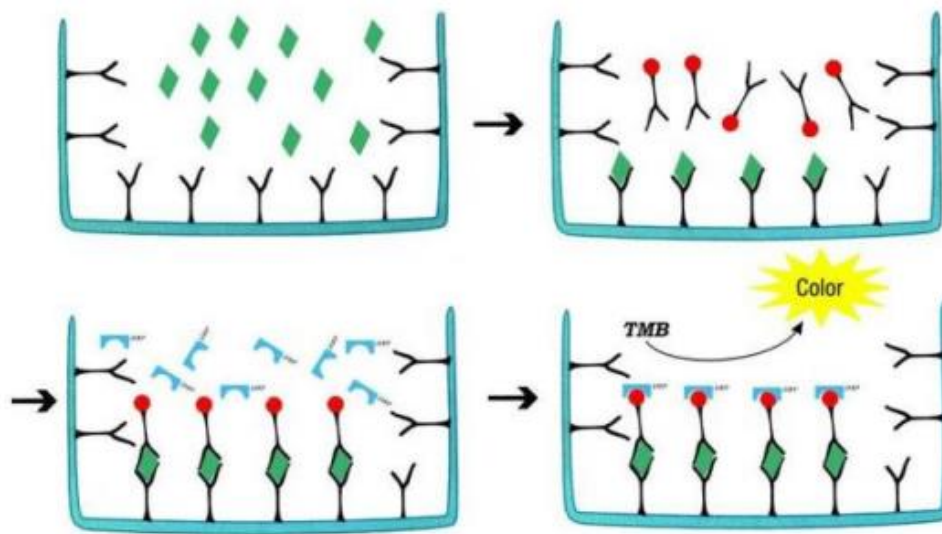
Αραίωση του ανθρώπινου προτύπου FGF21

1. Αριθμός σωληναρίων 1-8. Τελικές συγκεντρώσεις σε σωληνάριο # 1-2000pg/ml, #2-1000pg/ml, #3-500 pg/ml, #4-250 pg/ml, #5-125 pg/ml, #6- 62,5 pg/ml, #7 - 31,25 pg/ml, #8 - 0,0 (κενό).
2. Για τη δημιουργία του προτύπου #1, έγινε προσθήκη 200μl μη αραιωμένου πρότυπου αποθέματος διαλύματος 10ng/ml και 800 μl αραιωτικού δείγματος στο σωληνάριο #1 για ένα τελικό όγκο 1000μl.
3. Προσθήκη 300 μl αραιωτικού δείγματος στους σωλήνες # 2-7.
4. Για τη δημιουργία του προτύπου #2, έγινε 300 μl του προτύπου #1 από το σωληνάριο #1 στο σωληνάριο #2 για τελικό όγκο 600 μl.
5. Για το πρότυπο #3, έγινε προσθήκη 300 μl του προτύπου #2 από το σωληνάριο #2 στο σωληνάριο #3 για τελικό όγκο 600 μl.
6. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σειριακής αραίωσης για τα σωληνάρια #4-7.

Προσδιορισμός IL-18

Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-18 έχει επικαλυφθεί προηγουμένως σε μια πλάκα. Τα πρότυπα και τα δείγματα εισάγονται με σιφώνιο στα φρεάτια και η τυχόν υπάρχουσα IL-18 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά από επώαση τα μη δεσμευμένα δείγματα απομακρύνονται κατά τη διάρκεια ενός βήματος πλύσης και, στη συνέχεια, ένα αντίσωμα ανίχνευσης ειδικό για την IL-18 προστίθεται στα φρεάτια και δεσμεύεται στο συνδυασμό αντισώματος σύλληψης-IL-18 στο δείγμα. Μετά από πλύση για απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου προϊόντος προστίθεται ένζυμο στα φρεάτια. Μετά τα στάδια επώασης και πλύσης προστίθεται υπόστρωμα. Ένα έγχρωμο προϊόν σχηματίζεται ανάλογα με την

ποσότητα της IL-18 που υπάρχει στο δείγμα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη οξέος και μετράται η απορρόφηση στα 450nm.



Σχήμα6 : Εικονική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου ELISA

Αντιδραστήρια

- ✓ Standard /sample Diluent
- ✓ Concentrated Biotin-Conjugate
- ✓ Streptavidin-HRP solution
- ✓ Biotin-Conjugate antibody Diluent
- ✓ Streptavidin-HRP Diluent
- ✓ Wash Buffer Concentrate
- ✓ Substrate Solution
- ✓ Stop Solution

Μέθοδος

- Προσθήκη 100μL προτύπου, ελέγχου ή δείγματος, ανά φρεάτιο, και στη συνέχεια προσθήκη 50μL του διαλύματος εργασίας βιοτίνης σε κάθε φρεάτιο και γίνεται επώαση 2 ωρών σε συνθήκες δωματίου.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 350 μL
- Προσθήκη 100μL του διαλύματος εργασίας της στρεπταβιδίνης-HRP σε κάθε φρεάτιο και επώαση 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

- Έκπληξη και στην συνέχεια προσθήκη 100μL υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο. Επώαση για 10-20λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 100μL διαλύματος διακοπής σε κάθε φρεάτιο και άμεσος προσδιορισμός απορρόφησης στα 450 nm.

Αραίωση

1. Αριθμός σωληναρίων 1-8. Τελικές συγκεντρώσεις σε σωληνάριο # 1-5000pg/ml, #2-2500pg/ml, #3-1250 pg/ml, #4-625 pg/ml, #5-312 pg/ml, #6- 156 pg/ml, #7 - 78 pg/ml, #8 - 0,0 (κενό).
2. Για τη δημιουργία του προτύπου #1, έγινε προσθήκη λυοφιλιωμένου στανταρ διαλύματος 10ng/ml σε 0.49 ml αραιωτικού δείγματος στο σωληνάριο #1 για ένα τελικό όγκο 0,5ml.
3. Προσθήκη 250 μl αραιωτικού δείγματος στους σωλήνες # 2-7.
4. Για τη δημιουργία του προτύπου #2, έγινε 250 μl του προτύπου #1 από το σωληνάριο #1 στο σωληνάριο #2 για ένα τελικό όγκο 0,1ml.
5. Για το πρότυπο #3, έγινε προσθήκη 250 μl του προτύπου #2 από το σωληνάριο #2 στο σωληνάριο #3 για ένα τελικό όγκο 0,1ml.
6. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σειριακής αραίωσης για τα σωληνάρια #4-7.

Προσδιορισμός Λεπτίνης

Το kit OriGene Human LEP Pre-Coated ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) είναι ένα kit ανοσοδοκιμασίας στερεάς φάσης ειδικά σχεδιασμένη για τη μέτρηση της ανθρώπινης LEP με μια πλάκα που είναι προ-επιστρωμένη με αντίσωμα ειδικό για την LEP. Το αντίσωμα ανίχνευσης είναι ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ειδικό για την LEP. Το αντίσωμα σύλληψης είναι μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι και το αντίσωμα ανίχνευσης είναι πολυκλωνικό αντίσωμα από κατσίκια.

Για την μέτρηση ανθρώπινης LEP, γίνεται προσθήκη των πρότυπων και των δειγμάτων στα φρεάτια και, στη συνέχεια, προσθήκη βιοτινυλιωμένου αντισώματος ανίχνευσης. Μετά από την πλύση των πηγαδιών με ρυθμιστικό διάλυμα TBS γίνεται προσθήκη του συμπλοκου αβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης (ABC-HRP). Στην συνέχεια γίνεται έκπλυση και προσθήκη TMB. Η TMB είναι ένα υπόστρωμα HRP και θα καταλυθεί για να παραχθεί ένα προϊόν μπλε χρώματος, το οποίο μετατρέπεται

σε κίτρινο μετά από την προσθήκη του όξινου διαλύματος διακοπής. Η απορρόφηση του κίτρινου προϊόντος στα 450nm είναι γραμμικά ανάλογη με την ανθρώπινη LEP στο δείγμα.

Αντιδραστήρια

- ✓ Human LEP Standard
- ✓ Human LEP Biotinylated antibody
- ✓ Avidin-Biotin-Peroxidase Complex
- ✓ Sample Diluent
- ✓ Antibody Diluent
- ✓ Avidin-Biotin-Peroxidase Diluent
- ✓ Color Developing Reagent (TMB)
- ✓ Stop Solution
- ✓ Wash Buffer

Διαδικασία

- Προσθήκη 100 μl του προτύπου, των δειγμάτων ή του ελέγχου ανά φρεάτιο και 100 μl του ρυθμιστικού διαλύματος αραιωτικού δείγματος στο φρεάτιο ελέγχου και επώαση για 90 λεπτά στους 37 °C.
- Αφαίρεση του καλύμματος και απόρριψη του υγρού στα φρεάτια σε κατάλληλο δοχείο αποβλήτων.
- Προσθήκη 100 μl από το παρασκευασμένο 1x Biotinylated Anti-Human LEP αντίσωμα σε κάθε φρεάτιο και επώαση για 60 λεπτά στους 37°C.
- Εκπλυση της πλάκα 3 φορές με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Προσθήκη 100 μl από το παρασκευασμένο 1x Σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης σε κάθε φρεάτιο. Κάλυψη με το παρεχόμενο σφραγιστικό πλάκας και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.
- Εκπλυση της πλάκα 5 φορές με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Προσθήκη 90 μl αντιδραστηρίου ανάπτυξης χρώματος σε κάθε φρεάτιο. Κάλυψη με το παρεχόμενο σφραγιστικό πλάκας και επώαση στο σκοτάδι για 25 λεπτά στους 37°C.
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος διακοπής σε κάθε φρεάτιο και άμεση μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm.

Αραίωση του ανθρώπινου προτύπου FGF21

1. Αριθμός σωληναρίων 1-8. Τελικές συγκεντρώσεις σε σωληνάριο # 1-4000pg/ml, #2-2000pg/ml, #3-1000 pg/ml, #4-500 pg/ml, #5-250 pg/ml, #6- 125 pg/ml, #7 – 62.5 pg/ml, #8 - 0,0 (κενό).
2. Για τη δημιουργία του προτύπου #1, έγινε προσθήκη 400μl μη αραιωμένου πρότυπου αποθέματος διαλύματος 10ng/ml και 600 μl αραιωτικού δείγματος στο σωληνάριο #1 για ένα τελικό όγκο 1000μl.
3. Προσθήκη 300 μl αραιωτικού δείγματος στους σωλήνες # 2-7.
4. Για τη δημιουργία του προτύπου #2, έγινε 300 μl του προτύπου #1 από το σωληνάριο #1 στο σωληνάριο #2 για τελικό όγκο 600 μl.
5. Για το πρότυπο #3, έγινε προσθήκη 300 μl του προτύπου #2 από το σωληνάριο #2 στο σωληνάριο #3 για τελικό όγκο 600 μl.
6. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σειριακής αραίωσης για τα σωληνάρια #4-7.

Προσδιορισμός GLP-1

Αυτό το κιτ βασίστηκε στην ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία σάντουιτς. Το αντίσωμα σύλληψης επικαλύφθηκε προηγουμένως σε 96 πυγαδάκια ενώ το συζευγμένο με βιοτίνη αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ως αντισώμα ανίχνευσης. Τα πρότυπα, τα δείγματα δοκιμής και αντίσωμα ανίχνευσης συζευγμένο με βιοτίνη προστέθηκαν στη συνέχεια στα φρεάτια και ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Στην συνέχεια προστέθηκε Η HRP -Στρεπταβιδίνη ενώ προηγουμένως οι αδέσμευτοι συζεύκτες ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. για την οπτικοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης HRP χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα TMB . Η TMB καταλύθηκε από την HRP για να παράγει ένα προϊόν μπλε χρώματος που άλλαξε σε κίτρινο μετά την προσθήκη όξινου διαλύματος διακοπής . Η πυκνότητα του κίτρινου χρώματος είναι ανάλογη με την ποσότητα-στόχο του δείγματος που έχει συλληφθεί στην πλάκα και η ανάγνωση της απορρόφησης έγινε στα 450 nm.

Αντιδραστήρια

- ✓ Lyophilized Standard
- ✓ Sample Dilution Buffer
- ✓ Biotin-labeled Antibody(Concentrated)
- ✓ Antibody Dilution Buffer
- ✓ HRP-Streptavidin Conjugate(SABC)
- ✓ SABC Dilution Buffer
- ✓ TMB Substrate
- ✓ Stop Solution
- ✓ Wash Buffer

Διαδικασία

1. Ρύθμιση των πρότυπων, των δειγμάτων δοκιμής (αραιωμένα κατά το 1/2 με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δειγμάτων), τα φρεάτια ελέγχου (κενό) στο προ-επικαλυμμένο kit .
2. Προετοιμασία των πρότυπων: Απομόνωση 100ul από τον μηδενικό σωλήνα, τον 1ο σωλήνα, τον 2ο σωλήνα, τον 3ο σωλήνα, τον 4ο σωλήνα, τον 5ο σωλήνα, τον 6ο σωλήνα και την αραιώση του δείγματος ρυθμιστικό διάλυμα (τυφλό) στα φρεάτια προτύπων.
3. Προσθήκη 100ul κατάλληλα αραιωμένου δείγματος στα φρεάτια δειγμάτων δοκιμής.
4. Επώαση στους 37°C για 90 λεπτά.
5. Πλύση 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
6. Προσθέστε 100ul βιοτίνη-σημασμένο διάλυμα αντισώματος εργασίας και επώαση στους 37°C για 60 λεπτά.
7. Πλύση 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
8. Προσθήκη 100ul διαλύματος εργασίας SABC σε κάθε φρεάτιο και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
9. Πλύση 5 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
10. Προσθήκη 90ul υπόστρωμα TMB σε κάθε φρεάτιο, καλύψτε την πλάκα και επώαση στους 37°C στο σκοτάδι για 15 λεπτά.
11. Προσθήκη 50ul διαλύματος διακοπής σε κάθε φρεάτιο. Το χρώμα θα γίνει αμέσως κίτρινο
12. Μέτρηση της απορρόφησης O.D. στα 450nm .

Προσδιορισμός Γκρελίνης

Αντιδραστήρια

- ✓ ELISA buffer concentrate
- ✓ Antiserum
- ✓ Standard
- ✓ Biotinylated tracer
- ✓ Streptavidin-HRP
- ✓ TMB substrate stock solution
- ✓ TMB substrate buffer
- ✓ Stop solution 2 N HCl
- ✓ Standard diluent

Διαδικασία

- Σε κάθε φρεάτιο γίνεται προσθήκη 50l αραιωτικό, 25l ρυθμιστικό διάλυμα και 25l Bt-tracer σε κενά φρεάτια.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
- Έκπλυση 5 φορές με 300l Elisa Buffer
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Προετοιμασία του χρωμογόνου διαλύματος TMB αμέσως πριν από τη χρήση αναμειγνύοντας 20 μέρη του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος TMB με 1 μέρος TMB -H₂O₂.
- Έκπλυση 5 φορές .
- Προσθήκη 100l ανά φρεάτιο διαλύματος TMB.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (συνήθως 10 - 30 λεπτά).
- Τερματισμός της αντιδράσεως προσθέτοντας 100l HCl 2N ανά φρεάτιο.
- Διαβάστε την απορρόφηση στα 450nm εντός δεκαπέντε λεπτών.

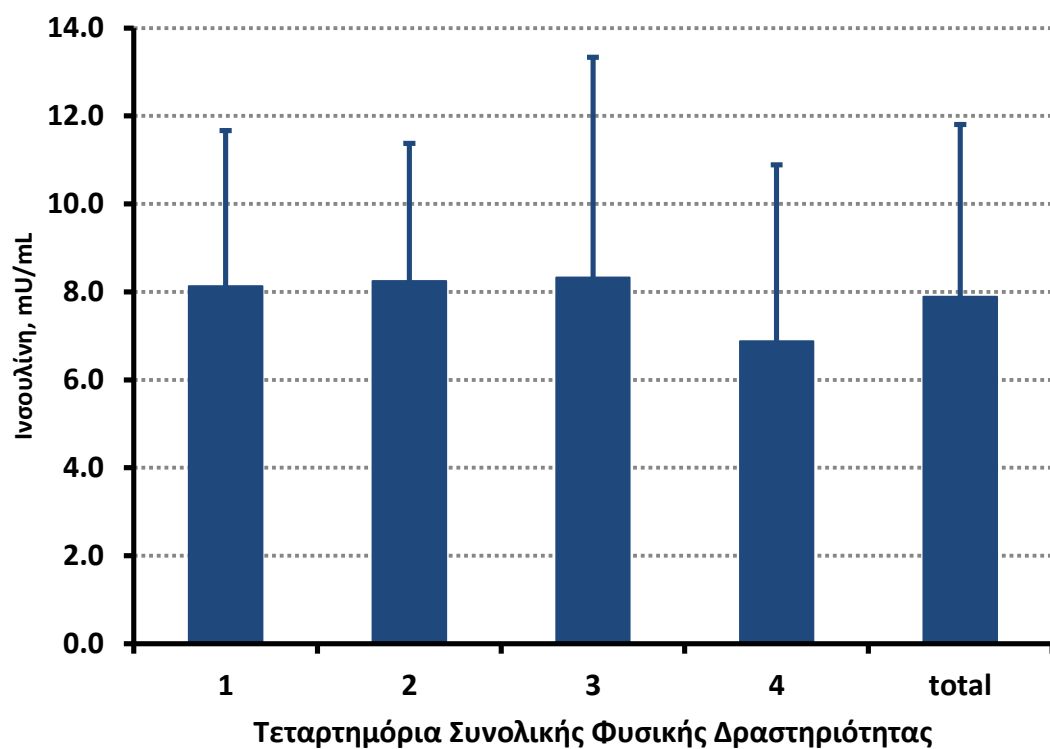
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών των εθελοντών που συμμετείχαν στην μελέτη. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, ο αριθμός των εθελοντών ήταν 52 (28 άνδρες και 24 γυναίκες), και παρατηρούμε ότι κανένα χαρακτηριστικό του πίνακα δεν διαφοροποιείται σημαντικά σε άνδρες κα γυναίκες.

Πίνακας 1: Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά

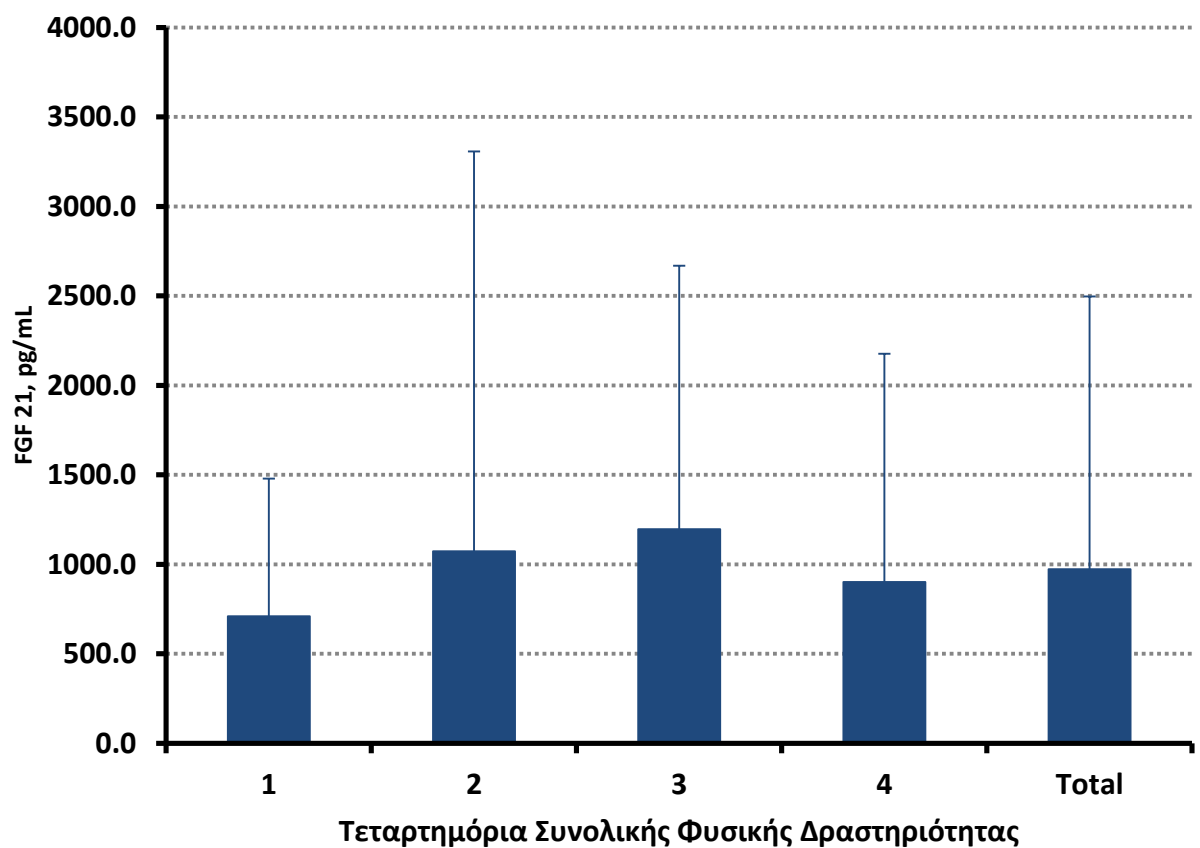
	Γυναίκες	Ανδρες	Σύνολο	P value
	N=24	N=28	N=52	
Βαρος (kg)	69.98 ± 11,3	89.05 ±12.8	80.07 ± 15,4	0.000
Υψος (cm)	161.10 ± 5,8	174.34 ± 5.1	168.23 ± 8.6	0.000
Ηλικία	54.16 +/- 12,8	53.16 +/- 4.9	53.62 ± 9.3	0.028
BMI	26.93 ± 3,9	29.25 ± 3.3	28.16 ± 3.7	0.703
Ολική μάζα λίπους (g)	28594.25 ± 9035,38	24306.89 ± 8016.51	26285.67 ± 8688.92	0.076
Ολική άλιπη μάζα (gr)	38768 ± 3665.01	60520.64 ± 6429.45	50480.96 ± 12159.05	0.000
Ποσοστό λίπους (%)	41.12 ± 6.9	27.81 ± 6.4	33.95 ± 9.4	0.000

Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται τα επίπεδα ινσουλίνης σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



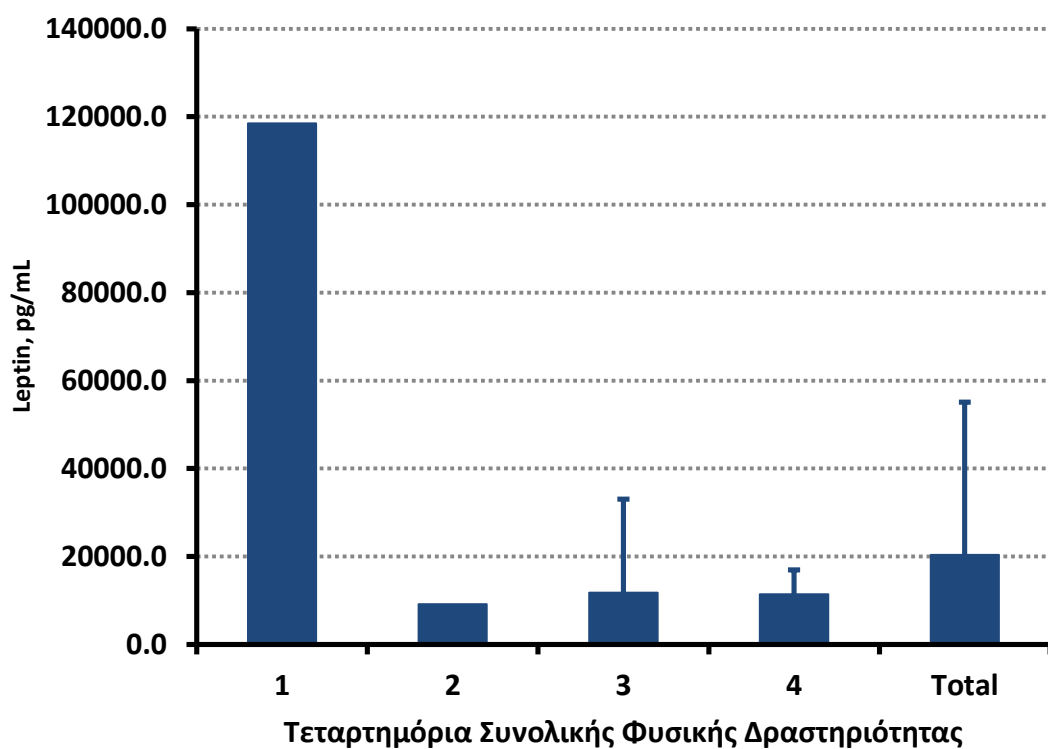
Σχήμα 1. Επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,663$)

Στο σχήμα 2 παρουσιάζονται τα επίπεδα FGF-21 σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



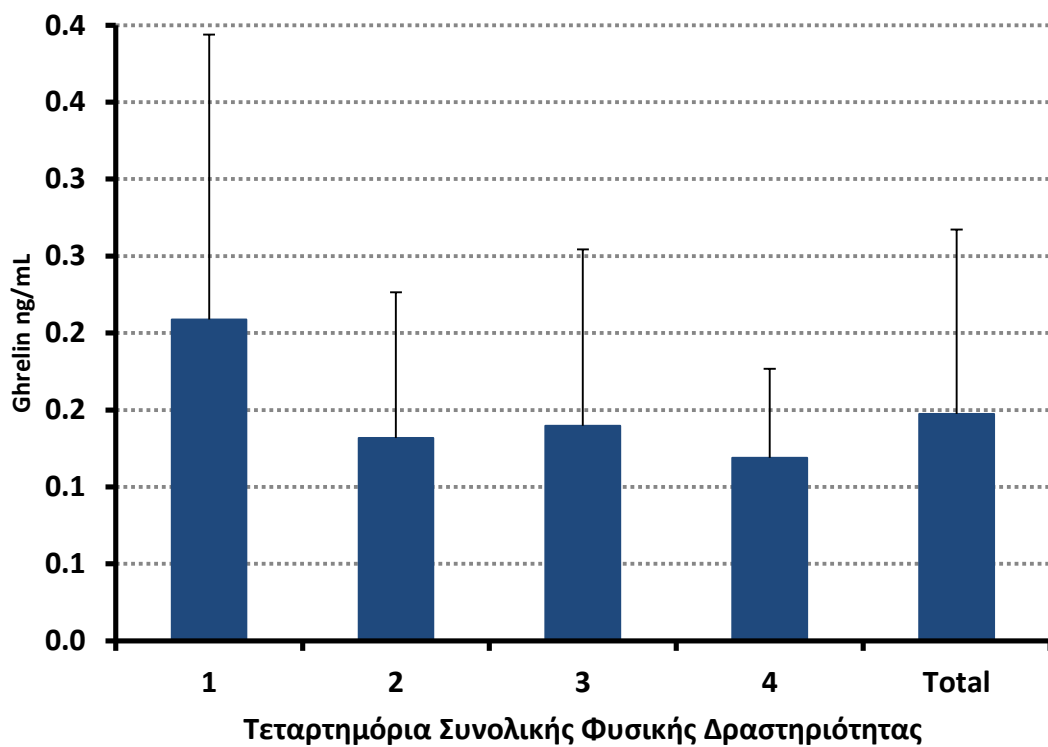
Σχήμα 2. Επίπεδα FGF-21 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,628$)

Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα επίπεδα Λεπτίνης σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



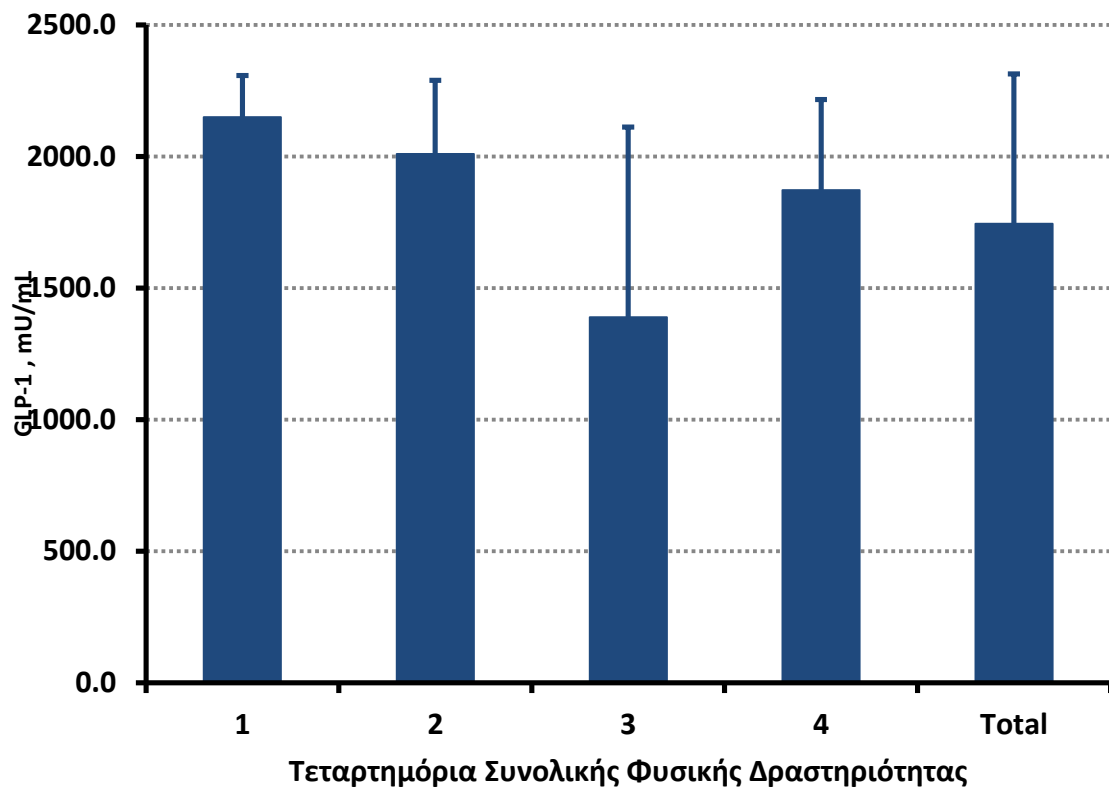
Σχήμα 3. Επιπέδα Λεπτίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,199$)

Στο σχήμα 4 παρουσιάζονται τα επίπεδα Γκρελίνης σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



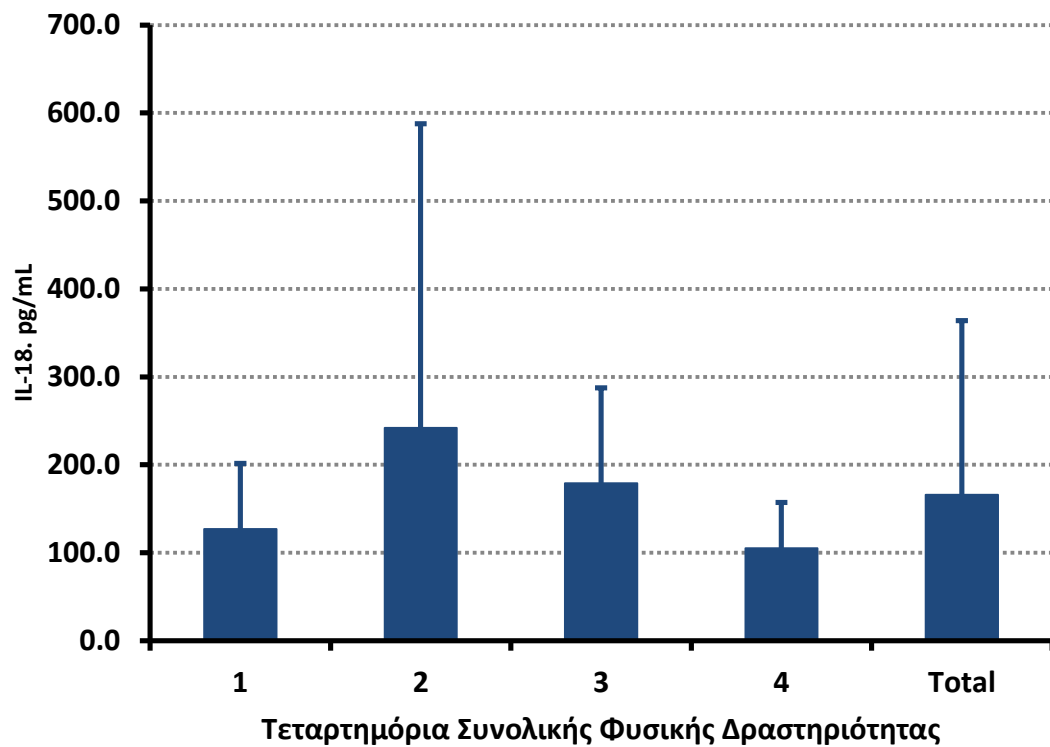
Σχήμα 4. Επίπεδα γκρελίνης στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,281$)

Στο σχήμα 5 παρουσιάζονται τα επίπεδα GLP-1 σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



σχήμα 5. Επίπεδα GLP-1 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια συνολικής φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,619$)

Στο σχήμα 6 παρουσιάζονται τα επίπεδα IL-18 σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 μεγεθών.



σχήμα 6. Επιπέδα IL-18 στο αίμα σε σχέση με τα τεταρτημόρια φυσικής δραστηριότητας. ($p = 0,495$)

Πίνακας 2 : Συσχετισίες Μεταβλητών φυσικής δραστηριότητας με τα επίπεδα ορμονών

		Insulin_uU_mL	FGF21_pg_mL	Leptin_pg_mL	IL18_pg_mL	Ghrelin_ng_mL	GLP1_ng_mL
METmin_vigorous	Pearson Correlation	,081	,104	-,413	-,008	-,119	-,122
	Sig. (2-tailed)	,571	,486	,182	,959	,409	,554
	N	51	47	12	50	50	26
METmin_moderate	Pearson Correlation	,109	-,014	-,077	-,116	-,012	,065
	Sig. (2-tailed)	,447	,923	,812	,423	,936	,752
	N	51	47	12	50	50	26
METmin_walking	Pearson Correlation	-,068	,062	-,126	-,116	-,224	-,120
	Sig. (2-tailed)	,637	,678	,696	,424	,117	,560
	N	51	47	12	50	50	26
METmin_total	Pearson Correlation	,063	,073	-,399	-,099	-,155	-,102
	Sig. (2-tailed)	,663	,628	,199	,495	,281	,619
	N	51	47	12	50	50	26
minPERday_sitting_total	Pearson Correlation	,070	-,131	-,004	-,043	-,089	,145
	Sig. (2-tailed)	,626	,382	,991	,768	,538	,478
	N	51	47	12	50	50	26

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη , προσπαθήσαμε να βρούμε κάποια πιθανή συσχέτιση ορμονών που σχετίζονται με την όρεξη με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σε άτομα με ένα αρκετά μεγάλο BMI(28.16 +/- 3.7). Κάθε ορμόνη που εξετάστηκε έχει διαφορετικές λειτουργίες και ξεχωριστό ενδιαφέρον για την μελέτη της διαιτολογίας και της διατροφής και πολλά ακόμη αναπάντητα ερωτήματα.

Όσων αφορά τον FGF21,αν και έχουν εντοπιστεί ιστοί-στόχοι, οι ακριβείς ενδοκυτταρικές οδοί της σηματοδότησης του FGF21 εντός αυτών των ιστών παραμένουν άγνωστες. Η αναγνώρισή τους είναι ζωτικής σημασίας για μελλοντικές στοχευμένες θεραπείες σχεδιασμένες για επιλεκτική δράση σε συγκεκριμένους ιστούς και για τον εντοπισμό τροποποιητών που μπορούν να ενισχύσουν τη λειτουργία του FGF21. Επιπλέον, ο μηχανισμός των αυξημένων επιπέδων FGF21 στον ορό της παχυσαρκίας και της IR παραμένει ασαφής. Αν και ορισμένες μελέτες σε ζώα υποδηλώνουν ότι υπάρχει αντίσταση στη δράση του FGF21 σε παχύσαρκες καταστάσεις, αυτό δεν επαληθεύεται στον άνθρωπο. Δεν έχει διευκρινιστεί εάν τα αυξημένα επίπεδα του FGF21 στον ορό στην παχυσαρκία οφείλονται σε αντίσταση στη δράση του ή σε αντισταθμιστική αυξημένη έκκριση. Επιπλέον, οι μελέτες σε ανθρώπους μετά από χορήγηση αναλόγων του FGF21 δεν αντικατοπτρίζουν φυσιολογικές συνθήκες. Η κύρια βιολογική δράση του FGF21, που είναι η μείωση

του ηπατικού λίπους , είτε με άμεση παρακρινική δράση είτε έμμεσα μέσω διασταύρωσης με τον λιπώδη ιστό, είναι ακόμη ανεξιχνίαστη. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο συντονισμός του ενεργειακού ισοζυγίου ολόκληρου του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των προτιμήσεων τροφής, του κirkάδιου κύκλου, της σωματικής δραστηριότητας και της ενεργειακής δαπάνης ηρεμίας είναι ένα σημαντικό αναπάντητο ερώτημα. Αν και στην μελέτη μας δεν βρήκαμε κάποια συσχέτιση με την φυσική δραστηριότητα, αυτό δεν σημαίνει πως τα επίπεδα του FGF-21 δεν επηρεάζονται από αυτήν . Σε μια μελέτη των Masahiro et al, με παρόμοιο σχεδιασμό μελέτης, έχει φανεί πως τα αυξημένα επίπεδα FGF-21 μπορούν να μειωθούν λόγω μέτριας – έντονης φυσικής δραστηριότητας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από 2 πιθανούς βιολογικούς μηχανισμούς. Πρώτον, η συνήθης εκτέλεση μετριας-έντονης φυσικής δραστηριότητας μπορεί να αποτρέψει τη χρόνια φλεγμονή η οποία οδηγεί σε αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων FGF21 μειώνοντας την έκφραση των υποδοχέων του FGF21 (αντίσταση στον FGF21) (306 Diaz). Μια άλλη πιθανή εξήγηση μπορεί να δοθεί λόγω του ότι η μέτρια-έντονη φυσική δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των κυκλοφορούντων επιπέδων FGF21 μέσω της βελτίωσης των συσσωρεύσεων λίπους στο ήπαρ, όπου εκφράζεται κυρίως ο FGF21 (38). Μια Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε ηπατικό λίπος σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων του κυκλοφορούντος FGF21 (42). Επιπλέον, σε μια μελέτη παρέμβασης σε ηλικιωμένους ενήλικες έδειξε ότι η αερόβια προπόνηση για 12 εβδομάδες μείωσε την ηπατική περιεκτικότητα σε λίπος και τα κυκλοφορούντα επίπεδα του FGF21 (57). Επιπλέον, η μείωση της ηπατικής περιεκτικότητας σε λίπος συσχετίστηκε με τη μείωση των επιπέδων του κυκλοφορούντος FGF21. Έτσι, η μετρια-έντονη φυσική δραστηριότητα μπορεί να επηρεάσει έμμεσα τον κυκλοφορούντα FGF21 μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης και της μείωσης της περιεκτικότητας σε ηπατικό λίπος. Βλέποντας τα παραπάνω, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η χρήση ερωτηματολογίου φυσικής δραστηριότητας μπορεί να επηρέασε τα αποτελέσματα μας καθώς οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποίησαν επιταχυνσιόμετρα για τον προσδιορισμό της φυσικής δραστηριότητας.

Όσον αφορά την λεπτίνη, γνωρίζουμε ότι παρουσιάζει αδύναμη αρνητική συσχέτιση στην πλειονότητα των μελετών που αφορούν την φυσική δραστηριότητα (1). Τα αυξημένα επίπεδα σωματικής δραστηριότητας έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν την ενεργειακή δαπάνη, και συνεπώς αυξάνουν την απαιτούμενη ενεργειακή πρόσληψη για τη διατήρηση σταθερής σωματικής μάζας. Η μείωση του σωματικού βάρους μετά από σωματική δραστηριότητα συσχετίζεται με μειώσεις της συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα σχετικά με τις επιδράσεις της άσκησης στη λεπτίνη του πλάσματος, ανεξάρτητα από τη λιπώδη μάζα, είναι αντικρουόμενα (38). Η λεπτίνη έχει συσχετιστεί επίσης αρνητικά με την φυσική κατάσταση (VO_{2peak}), αλλά δεν συσχετίζεται με τη σωματική δραστηριότητα (8), όπως ακριβώς φαίνεται και στην μελέτη μας. Εδώ ίσως θα πρέπει να γίνει και ένα διαχωρισμός ανάμεσα στην σωματική ικανότητα και την φυσική δραστηριότητα. Αυτές οι έννοιες ενώ συνήθως συνδέονται, στην πραγματικότητα είναι διαφορετικές (39). Η σωματική δραστηριότητα έχει οριστεί ως οποιαδήποτε σωματική κίνηση που παράγεται από σκελετικούς μύες και απαιτεί δαπάνη ενέργειας (2), ενώ η φυσική κατάσταση περιλαμβάνει την καρδιοαναπνευστική αντοχή (εκτιμώμενη είτε με τη μετρούμενη είτε με την εκτιμώμενη VO_{2max}), τη μυϊκή αντοχή και τη μυϊκή δύναμη, αμφότερες οι οποίες είναι ειδικές για μια μυϊκή ομάδα και πρέπει επομένως να μετρώνται ξεχωριστά (39).

Η γκρελίνη είναι μια ορμόνη του γαστρεντερικού συστήματος που αυξάνει την όρεξη και την πρόσληψη τροφής. Αν και δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση με την φυσική δραστηριότητα, σε μια μελέτη των Davis et al , φαίνεται πως η φυσική δραστηριότητα συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα γκρελίνης σε παχύσαρκα άτομα. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως η φυσική δραστηριότητα έχει αντισταθμιστικό ρόλο στην αυξημένη γκρελίνη, η οποία μπορεί επίσης να επιταχύνει την γαστρική κένωση για να αυξηθεί η θερμιδική πρόσληψη και να αντισταθμιστεί η αυξημένη ενεργειακή δαπάνη λόγω φυσικής δραστηριότητας. Είναι πιθανό να μην παρατηρήσαμε κάποια τέτοια συσχέτιση με τα επίπεδα γκρελίνης λόγω των χαμηλών επιπέδων φυσικής δραστηριότητας.

Το πεπτιδίο-1 της γλυκαγόνης (GLP-1) είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τα εντερικά L-κύτταρα κατά την πρόσληψη ενός γεύματος (5) και μεταξύ άλλων μειώνει την όρεξη, την πρόσληψη τροφής και καθυστερεί την γαστρική κένωση. Το GLP-1 διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης σε μια γλυκοζοεξαρτώμενη τρόπο - ως μέρος του "φαινομένου της ινκρετίνης" - και είναι υπεύθυνο για το 70% της μεταγευματικής απόκρισης στην ινσουλίνη σε υγιή άτομα ενώ οι αποκρίσεις του είναι μειωμένες σε παχύσαρκα και υπέρβαρα άτομα (112). Υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν ερευνήσει την συσχέτιση της φυσικής δραστηριότητας με τον GLP-1 με αντιφατικά αποτελέσματα (θετική, αρνητική και καμία συσχέτιση). Στην μελέτη μας, φαίνεται πως δεν παρατηρήσαμε καμία συσχέτιση. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τα διαφορετικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά μεταξύ των μελετών, τα πρωτόκολλα άσκησης και μέτρησης της σωματικής δραστηριότητας αλλά και από τις μεθόδους μέτρησης του GLP-1 καθώς πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη ορμόνη. Για παράδειγμα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στον ορό περιορίζουν την έκκριση GLP-1 και ως εκ τούτου, οι διαφορές στα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων λόγω της άσκησης μεταξύ των εθελοντών μπορεί να εξηγούν κάποιες διαφορές στις συσχετίσεις με την φυσική δραστηριότητα.

Όσον αφορά την συσχέτιση της IL-18 και της άσκησης, οι Leick et al. ανέφεραν ότι η προπόνηση με άσκηση μείωσε την περιεκτικότητα mRNA IL-18 του λιπώδους ιστού κατά 20% και στα δύο φύλα μετά από 8 εβδομάδες προπόνησης σε παχύσαρκα άτομα [28]. Οι Stensvold D et al έδειξαν επίσης ότι τα επίπεδα της IL-18 στον ορό μειώθηκαν κατά 43% μετά από αερόβια διαλειμματική προπόνηση σε 11 αδρανείς άνδρες και γυναίκες με μεταβολικό σύνδρομο [29]. Η άσκηση ήταν ικανή να μειώσει την IL-18 με ένα πρόγραμμα αερόβιας άσκησης διάρκειας 6 μηνών (τέσσερις φορές/εβδομάδα, 40-60 λεπτά/συνεδρία) [30]. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της IL-18 και της φυσικής δραστηριότητας. Αυτό πιθανώς έχει να κάνει με τον σχεδιασμό της μελέτης αλλά και με το γεγονός ότι οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποίησαν διαφορετικό τρόπο για την μέτρηση της φυσικής δραστηριότητας.

Συμπέρασματα

Η μελέτη μας είχε ως στόχο να διερευνήσει αν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων φυσικής δραστηριότητας και τα επίπεδα ορισμένων ορμονών που σχετίζονται με την όρεξη. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στο σχεδιασμό της μελέτης και το δείγμα των εθελοντών. Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη, αν και αρκετοί σε αριθμό, δεν είχαν κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας τα οποία ήταν και αρκετά χαμηλά. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει δεν έχουν βρει κάποια συσχέτιση των παραπάνω ορμονών με χαμηλά επίπεδα φυσικής δραστηριότητας, αλλά κυρίως με μέτριας-υψηλής έντασης φυσικής δραστηριότητας. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της φυσικής δραστηριότητας στην μελέτη μας έγινε με την χρησιμοποίηση ερωτηματολογίου IPAQ ενώ οι μελέτες που βρήκαν κάποιες συσχετίσεις έκαναν χρήση επιταχυσίόμετρων, γεγονός που προσδίδει μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις, αλλά είναι και πιο κοντά στην έννοια της φυσικής δραστηριότητας, καθώς βασίζονται σε απτά δεδομένα. Λόγω του ότι η μελέτη μας είναι μια συγχρονική μελέτη παρατήρησης, δεν μπορούν να αποδοθούν αιτιολογικά αίτια για οποιαδήποτε συσχέτιση η μη-συσχέτιση, αλλά μπορεί να αποτελέσει μια βάση για την εκτέλεση μελλοντικών μελετών. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει μια μελέτη με τον ίδιο σχεδιασμό χρησιμοποιώντας αξελερόμετρα για την έκτιμηση της φυσικής δραστηριότητας καθώς η χρησιμότητα τους έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες. Τέλος, μελέτες όπως η συγκεκριμένη, μπορεί να δώσουν εξαιρετικά στοιχεία για την χρησιμότητα της άσκησης και τα οφέλη της φυσικής δραστηριότητας στον οργανισμό, καθώς είναι από τις λιγότερο παρεμβατικές αλλαγές που μπορεί να κάνει ένας άνθρωπος για την βελτίωση της υγείας του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.003
2. Alipoor, S. D., Mortaz, E., Garssen, J., Movassaghi, M., Mirsaeidi, M., and Adcock, I. M. (2016). Exosomes and exosomal miRNA in respiratory diseases. *Med. Inflamm.* 2016:5628404. doi: 10.1155/2016/5628404
3. Hoffmann, C., and Weigert, C. (2017). Skeletal muscle as an endocrine organ: the role of myokines in exercise adaptations. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7:a029793. doi: 10.1101/cshperspect.a029793
4. Delezie, J., and Handschin, C. (2018). Endocrine crosstalk between skeletal muscle and the brain. *Front. Neurol.* 9:698. doi: 10.3389/fneur.2018.00698
5. Safdar, A., and Tarnopolsky, M. A. (2018). Exosomes as mediators of the systemic adaptations to endurance exercise. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8:a029827. doi: 10.1101/cshperspect.a029827
6. Rai, M., and Demontis, F. (2016). Systemic nutrient and stress signaling via myokines and myometabolites. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 85–107. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105305
7. Whitham, M., and Febbraio, M. A. (2016). The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 719–729. doi: 10.1038/nrd.2016.153
8. Fisher, F. M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105339
9. Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabe de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men. *Endocr. Rev.* 38, 468–488. doi: 10.1210/er.2017-00016
10. Fisher, F. M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105339
11. Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabe de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men. *Endocr. Rev.* 38, 468–488. doi: 10.1210/er.2017-00016
12. Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., et al. (2017). Age-associated loss of opa1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and epithelial senescence. *Cell Metab.* 25, 1374.e6–1389.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.021
13. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 582, 3805–3810. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021
14. Keipert, S., Ost, M., Johann, K., Imber, F., Jastroch, M., van Schothorst, E. M., et al. (2013). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine crosstalk through the induction of FGF21 as a myokine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E469–E482. doi: 10.1152/ajpendo.00330.2013
15. Pereira, R. O., Tadinada, S. M., Zasadny, F. M., Oliveira, K. J., Pires, K. M. P., Olvera, A., et al. (2017). OPA1 deficiency promotes secretion of FGF21 from muscle that

- prevents obesity and insulin resistance. *EMBO J.* 36, 2126–2145. doi: 10.15252/embj.201696179
16. Rodríguez-Nuevo, A., Díaz-Ramos, A., Noguera, E., Díaz-Sáez, F., Duran, X., Muñoz, J. P., et al. (2018). Mitochondrial DNA and TLR9 drive muscle inflammation upon opa1 deficiency. *EMBO J.* 37:e96553. doi: 10.15252/embj. 201796553
 17. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206.
 18. Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635. doi: 10.1172/JCI23606
 19. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.003
 20. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 582, 3805–3810. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021
 21. Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., et al. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018–6027. doi: 10.1210/en.2008-0816
 22. Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., et al. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1105–E1114. doi: 10.1152/ajpendo.00348.2009
 23. Fazeli, P. K., Lun, M., Kim, S. M., Bredella, M. A., Wright, S., Zhang, Y., et al. (2015). FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *J. Clin. Invest.* 125, 4601–4611. doi: 10.1172/JCI83349
 24. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206.
 25. Zhang, X., Yeung, D. C. Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.-G., Liu, F., et al. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 57, 1246–1253. doi: 10.2337/db07-1476
 26. Johnson, C. L., Weston, J. Y., Chadi, S. A., Fazio, E. N., Huff, M. W., Kharitonov, A., et al. (2009). Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 137, 1795–1804. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.064
 27. Hsueh, H., Pan, W., and Kastin, A. J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* 28, 2382–2386. doi: 10.1016/j.peptides.2007.10.007
 28. Patel, R., Bookout, A. L., Magomedova, L., Owen, B. M., Consiglio, G. P., Shimizu, M., et al. (2015). Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* 29, 213–223. doi: 10.1210/me. 2014-1259

29. Fazeli, P. K., Lun, M., Kim, S. M., Bredella, M. A., Wright, S., Zhang, Y., et al. (2015). FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *J. Clin. Invest.* 125, 4601–4611. doi: 10.1172/JCI83349
30. Antonellis, P. J., Hayes, M. P., and Adams, A. C. (2016). fibroblast growth factor 21-null mice do not exhibit an impaired response to fasting. *Front. Endocrinol.* 7:77. doi: 10.3389/fendo.2016.00077
31. Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.002
32. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.003
33. Schaap, F. G., Kremer, A. E., Lamers, W. H., Jansen, P. L. M., and Gaemers, I. C. (2013). Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie* 95, 692–699. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.019
34. Kim, K. H., Jeong, Y. T., Oh, H., Kim, S. H., Cho, J. M., Kim, Y.-N., et al. (2013). Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* 19, 83–92. doi: 10.1038/nm.3014
35. Adams, A. C., Astapova, I., Fisher, M., Badman, M. K., Kurgansky, K. E., Flier, J. S., et al. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR α -dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 14078–14082. doi: 10.1074/jbc.C110.107375
36. Wang, Y., Solt, L. A., and Burris, T. P. (2010). Regulation of FGF21 expression and secretion by retinoic acid receptor-related orphan receptor α . *J. Biol. Chem.* 285, 15668–15673. doi: 10.1074/jbc.M110.102160
37. Berry, D. C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C. M., and Noy, N. (2012). Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 61, 1112–1121. doi: 10.2337/db11-1620
38. Tsuchiya, H., Ikeda, Y., Ebata, Y., Kojima, C., Katsuma, R., Tsuruyama, T., et al. (2012). Retinoids ameliorate insulin resistance in a leptin-dependent manner in mice. *Hepatology* 56, 1319–1330. doi: 10.1002/hep.25798
39. Li, Y., Wong, K., Walsh, K., Gao, B., and Zang, M. (2013). Retinoic acid receptor β stimulates hepatic induction of fibroblast growth factor 21 to promote fatty acid oxidation and control whole-body energy homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 10490–10504. doi: 10.1074/jbc.M112.429852
40. Hirai, T., Nomura, K., Ikai, R., Nakashima, K.-I., and Inoue, M. (2019). Baicalein stimulates fibroblast growth factor 21 expression by up-regulating retinoic acid receptor-related orphan receptor α in C2C12 myotubes. *Biomed. Pharmacother.* 109, 503–510. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.154
41. Patel, R., Bookout, A. L., Magomedova, L., Owen, B. M., Consiglio, G. P., Shimizu, M., et al. (2015). Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* 29, 213–223. doi: 10.1210/me.2014-1259

42. Lee, C. H., Woo, Y. C., Chow, W. S., Cheung, C. Y. Y., Fong, C. H. Y., Yuen, M. M. A., et al. (2017). Role of circulating fibroblast growth factor 21 measurement in primary prevention of coronary heart disease among chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Heart Assoc.* 6:e005344. doi: 10.1161/JAHA.116.005344
43. Iizuka, K., Takeda, J., and Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 583, 2882–2886. doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.053
44. Moyers, J. S., Shiyanova, T. L., Mehrbod, F., Dunbar, J. D., Noblitt, T. W., Otto, K. A., et al. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J. Cell. Physiol.* 210, 1–6. doi: 10.1002/jcp.20847
45. Wang, H., Qiang, L., and Farmer, S. R. (2008). Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 188–200. doi: 10.1128/MCB.00992-07
46. Cyphert, H. A., Ge, X., Kohan, A. B., Salati, L. M., Zhang, Y., and Hillgartner, F. B. (2012). Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J. Biol. Chem.* 287, 25123–25138. doi: 10.1074/jbc.M112.375907
47. Archer, A., Venteclef, N., Mode, A., Pedrelli, M., Gabbi, C., Clément, K., et al. (2012). Fasting-induced FGF21 is repressed by LXR activation via recruitment of an HDAC3 corepressor complex in mice. *Mol. Endocrinol.* 26, 1980–1990. doi: 10.1210/me.2012-1151
48. Uebanso, T., Taketani, Y., Yamamoto, H., Amo, K., Tanaka, S., Arai, H., et al. (2012). Liver X receptor negatively regulates fibroblast growth factor 21 in the fatty liver induced by cholesterol-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* 23, 785–790. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.03.023
49. Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Yu, R. T., Mangelsdorf, D. J., et al. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPARγ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 148, 556–567. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.062
50. Hondares, E., Iglesias, R., Giral, A., Gonzalez, F. J., Giral, M., Mampel, T., et al. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990. doi: 10.1074/jbc.M110.215889
51. Kim, K. H., Jeong, Y. T., Oh, H., Kim, S. H., Cho, J. M., Kim, Y.-N., et al. (2013). Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* 19, 83–92. doi: 10.1038/nm.3014
52. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 582, 3805–3810. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021
53. Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARα and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.002

54. Fisher, F. M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Kharitononkov, A., Flier, J. S., et al. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 59, 2781–2789. doi: 10.2337/db10-0193
55. Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Yu, R. T., Mangelsdorf, D. J., et al. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 148, 556–567. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.062
56. Murata, Y., Nishio, K., Mochiyama, T., Konishi, M., Shimada, M., Ohta, H., et al. (2013). Fgf21 impairs adipocyte insulin sensitivity in mice fed a lowcarbohydrate, high-fat ketogenic diet. *PLoS One* 8:e69330. doi: 10.1371/journal.pone.0069330
57. Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., et al. (2017). Age-associated loss of opa1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and epithelial senescence. *Cell Metab.* 25, 1374.e6–1389.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.021
58. Jimenez, V., Jambrina, C., Casana, E., Sacristan, V., Muñoz, S., Darriba, S., et al. (2018). FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO Mol. Med.* 10:e8791. doi: 10.15252/emmm.201708791
59. Kharitononkov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y.-F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., et al. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148, 774–781. doi: 10.1210/en.2006-1168
60. Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., et al. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1105–E1114. doi: 10.1152/ajpendo.00348.2009
61. Hecht, R., Li, Y.-S., Sun, J., Belouski, E., Hall, M., Hager, T., et al. (2012). Rationalebased engineering of a potent long-acting FGF21 analog for the treatment of type 2 diabetes. *PLoS One* 7:e49345. doi: 10.1371/journal.pone.0049345
62. Zhen, E. Y., Jin, Z., Ackermann, B. L., Thomas, M. K., and Gutierrez, J. A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochem. J.* 473, 605–614. doi: 10.1042/BJ20151085
63. Parmar, B., Lewis, J. E., Samms, R. J., Ebling, F. J. P., Cheng, C. C., Adams, A. C., et al. (2018). Eccentric exercise increases circulating fibroblast activation protein α but not bioactive fibroblast growth factor 21 in healthy humans. *Exp. Physiol.* 103, 876–883. doi: 10.1113/EP086669
64. Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., et al. (2010). Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064. doi: 10.1210/me.2010-0142
65. Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giral, M., et al. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* 106, 19–31. doi: 10.1093/cvr/cvu263
66. Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., et al. (2015). FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 124–130. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.081

67. Rupérez, C., Lerin, C., Ferrer-Curriu, G., Cairo, M., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., et al. (2018). Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 260, 163–170. doi: 10.1016/j.ijcard. 2018.02.109
68. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 582, 3805–3810. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021
69. Hojman, P., Pedersen, M., Nielsen, A. R., Krogh-Madsen, R., Yfanti, C., Åkerström, T., et al. (2009). Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 58, 2797–2801. doi: 10.2337/db09-0713
70. Pereira, R. O., Tadinada, S. M., Zasadny, F. M., Oliveira, K. J., Pires, K. M. P., Olvera, A., et al. (2017). OPA1 deficiency promotes secretion of FGF21 from muscle that prevents obesity and insulin resistance. *EMBO J.* 36, 2126–2145. doi: 10.15252/embj.201696179
71. Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., et al. (2017). Age-associated loss of opa1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and epithelial senescence. *Cell Metab.* 25, 1374.e6–1389.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.021
72. Rodríguez-Nuevo, A., Díaz-Ramos, A., Noguera, E., Díaz-Sáez, F., Duran, X., Muñoz, J. P., et al. (2018). Mitochondrial DNA and TLR9 drive muscle inflammation upon opa1 deficiency. *EMBO J.* 37:e96553. doi: 10.15252/embj. 201796553
73. Guridi, M., Tintignac, L. A., Lin, S., Kupr, B., Castets, P., and Rüegg, M. A. (2015). Activation of mTORC1 in skeletal muscle regulates whole-body metabolism through FGF21. *Sci. Signal.* 8:ra113. doi: 10.1126/scisignal.aab3715
74. Tsai, S., Sitzmann, J. M., Dastidar, S. G., Rodriguez, A. A., Vu, S. L., McDonald, C. E., et al. (2015). Muscle-specific 4E-BP1 signaling activation improves metabolic parameters during aging and obesity. *J. Clin. Invest.* 125, 2952–2964. doi: 10.1172/JCI77361
75. Keipert, S., Ost, M., Johann, K., Imber, F., Jastroch, M., van Schothorst, E. M., et al. (2013). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine crosstalk through the induction of FGF21 as a myokine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E469–E482. doi: 10.1152/ajpendo.00330.2013
76. Morovat, A., Weerasinghe, G., Nesbitt, V., Hofer, M., Agnew, T., Quaghebeur, G., et al. (2017). Use of FGF-21 as a biomarker of mitochondrial disease in clinical practice. *J. Clin. Med.* 6:E80. doi: 10.3390/jcm6080080
77. Conte, M., Ostan, R., Fabbri, C., Santoro, A., Guidarelli, G., Vitale, G., et al. (2018). Human aging and longevity are characterized by high levels of mitokines. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* doi: 10.1093/gerona/gly153 [Epub ahead of print]
78. Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., 2017. Regulation of longevity by FGF21: interaction between energy metabolism and stress responses. *Ageing Res. Rev.* 37,79–93.
79. Geng, L., Liao, B., Jin, L., Huang, Z., Triggie, C.R., Ding, H., Zhang, J., Huang, Y., Lin, Z., Xu, A., 2019. Exercise alleviates obesity-induced metabolic dysfunction via enhancing FGF21 sensitivity in adipose tissues. *Cell Rep.* 26 2738–2752.e2734.

80. Charansonney, O.L., 2011. Physical activity and aging: a life-long story. *Discov. Med.* 12, 177–185.
81. Kasapis, C., Thompson, P.D., 2005. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1563–1569.
82. Vicencio, F., Jiménez, P., Huerta, F., Cofré-Bolados, C., Gutiérrez Zamorano, S., GarciaDiaz, D.F., Rodrigo, R., Poblete-Aro, C., 2019. Effects of physical exercise on oxidative stress biomarkers in hypertensive animals and non-diabetic subjects with prehypertension/hypertension: a review. *Sport Sciences for Health* 15, 481–495.
83. Masahiro Matsui, Keisei Kosaki, Koichiro Tanahashi, Nobuhiko Akazawa, Yosuke Osuka, Kiyoji Tanaka, Makoto Kuro-o, Seiji Maeda, “Relationship between physical activity and circulating fibroblast growth factor 21 in middle-aged and older adults”, *Experimental Gerontology*, Volume 141, 2020, 111081, ISSN 0531-5565.
84. H.H. Kojima M, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402 (1999) 656e660.
85. A.D. Howard, D.F. Cully, J.P. Arena, P.A. Liberator, C.I. Rosenblum, M. Hamelin, D.L. Hreniuk, O.C. Palyha, J. Anderson, P.S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K.K. Liu, K.K. McKee, S.S. Pong, L.Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevicz, R. Heavens, M. Rigby, D.J. Sirinathsinghji, D.C. Dean, D.G. Melillo, A.A. Patchett, R. Nargund, P.R. Griffin, J.A. DeMartino, S.K. Gupta, J.M. Schaeffer, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, *Science* 273 (1996) 974e977.
86. R.G. Solcia E, R. Buffa, R. Fiocca, C. Capella, Gastric endocrine cells: types, function and growth, *Regul. Pept.* 93 (2000) 31e35.
87. G.Z. Saranac L, The ghrelin system; beyond the role in energy homeostasis, *Med. Biol.* 18 (2017) 33e38.
88. H.H.M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, *Trends Endocrinol. Metabolism* (2001) 118e122.
89. G.A.P. Korbonits M, M. Gueorguiev, A.B. Grossman, Ghrelin hormone with multiple functions, *Front. Neuroendocrinol.* 25 (1) (2004) 27e68. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25 (2004) 27e68.
90. K.K. McKee, O.C. Palyha, S.D. Feighner, D.L. Hreniuk, C.P. Tan, M.S. Phillips, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard, Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors, *Mol. Endocrinol.* 11 (1997) 415e423.
91. S.R. Palus S, Y.J. Akashi, B. Bockmeyer, R. Datta, H. Halem, J. Dong, M.D. Culler, V. Adams, S.D. Anker, J. Springer, Ghrelin and its analogs, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFBX in a rat heart failure model, *PLoS One* 6 (2011) 1e7.
92. I.J. Granata R, G. Alloatti, E. Ghigo, Cardiovascular actions of the Ghrelin gene derived peptides and growth hormone-releasing hormone, *Exp. Biol. Med.* 236 (2011) 505e514.
93. B.A. Barazzoni R, M. Stebel, M.R. Cattin, E. Roder, L. Visintin, L. Cattin, G. Biolo, M. Zanetti, G. Guarnieri, Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene

- expression and tissue fat distribution favoring triglyceride deposition in liver but not skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 288 (2005) 228e235.
94. C.E. Benso A, E. Gramaglia, I. Olivetti, M. Tomelini, E. Ghigo, F. Broglio, Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin, *Ghrelin Syst.* 25(2013) 59e68.
 95. N.M. Date Y, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M.S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada, S. Matsukura, Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion, *Diabetes* 51 (2002) 124e129.
 96. S.A. Elham Z, S. Omid, Possible intermediary role of ghrelin in seborrhea, *Med. Hypotheses* 85 (2015) 1019e1020.
 97. M. Damian, M. Louet, A.A.S. Gomes, C. M'Kadmi, S. Denoyelle, S. Cantel, S. Mary, P.M. Bisch, J.-A. Fehrentz, L.J. Catoire, N. Floquet, J.-L. Banerjee, Allosteric modulation of ghrelin receptor signaling by lipids, *Nat. Commun.* 12 (2021) 3938.
 98. G.M. Du, Z.H. Hu, J.G. Wu, W.M. Yan, Z.Q. Han, Y.H. Zhang, M.J. Liu, The effect of ghrelin O-acyltransferase inhibitor on gastric H⁺-K⁺-ATPase activity and GOAT/ghrelin system in gastric mucosal cells in vitro, *Gen. Comp. Endocrinol.* 267 (2018) 167e171.
 99. Z.X. Barazzoni R, M. Deboer, R. Datta, M.D. Culler, M. Zanetti, G. Guarnieri, D.L. Marks, Combined effects of ghrelin and higher food intake enhance skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and AKT phosphorylation in rats with chronic kidney disease, *Kidney Int.* 77 (2010) 23e28.
 100. G.J.F. Sominsky L, Z.B. Andrews, S.J. Spencer, Acylated ghrelin supports the ovarian transcriptome and follicles in the mouse: implications for fertility, *Front. Endocrinol.* 9 (2019) 815.
 101. K.K. Kojima M, Ghrelin: structure and function, *Physiol. Rev* 85 (2005) 495e522.
 102. J.A. Gutierrez, D.R. Perkins, J.A. Willency, M.D. Knierman, Z. Jin, D.R. Witcher, S. Luo, J.E. Onyia, J.E. Hale, Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 6320e6325.
 103. J.L. H, Ghrelin octanoylation by ghrelin O-acyltransferase: unique protein biochemistry underlying metabolic signaling, *Biochem. Soc. Trans* 47 (2019) 169e178.
 104. N.A. Nass R, J. Liu, S.S. Pezzoli, L.S. Farhy, J. Patrie, B.D. Gaylinn, M. Heiman, M.O. Thorner, The level of circulating octanoate does not predict ghrelin O-acyltransferase (GOAT)-mediated acylation of ghrelin during fasting, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 110e113.
 105. M.M. Malagon, E. Ruiz-Guerrero, F. Rodríguez-Pacheco, S. García-Navarro, F.F. Casanueva, F. Gracia-Navarro, J.P. Castaño, Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes, *Endocrinology* 144 (2003) 5372e5380.

106. G.E.C. Savino F, M.F. Fissore, C. Guidi, S.A. Liguori, L. Silvestro, R. Oggero, R. Miniero, Ghrelin, motilin, insulin concentration in healthy infants in the first months of life: relation to fasting time and anthropometry, *Clin.Endocrinol.* 65 (2006) 158e162.
107. G.C. Muccioli G, M.C. Ghigo, M. Papotti, E. Arvat, M.F. Boghen, M.H. Nilsson, R. Deghenghi, H. Ong, E. Ghigo, Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland, *J. Endocrinol* 157 (1998) 99e106.
108. L.M. Pantel J, S. Cabrol, L. Hilal, Y. Hajaji, S. Morisset, S. Nivot, M.P. Vie-Luton, D. Grouselle, M. de Kerdanet, A. Kadiri, J. Epelbaum, Y. Le Bouc, S. Amselem, Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature, *J. Clin. Invest* 116 (2006) 760e768.
109. H.J. Wang, A. Dempfle, N. Sch€auble, S. Friedel, P. Lichtner, F. Fontenla-Horro, S. Wudy, S. Hagemann, L. Gortner, K. Huse, H. Remschmidt, T. Bettecken, T. Meitinger, H. Sch€afer, J. Hebebrand, A. Hinney, Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal weight and underweight students, and children with short normal stature, *J. Clin. Endocrinol.* 89 (2004) 157e162.
110. C.B. Lawrence, F.M. Baudoin, S.M. Luckman, Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers, *Endocrinology* 143 (2002) 155e162.
111. A.M. Wren, M.A. Cohen, A.E. Brynes, G.S. Frost, K.G. Murphy, W.S. Dhillo, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86 (2001) 5992.
112. D.L. Williams, D.E. Cummings, J.M. Kaplan, Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin, *Endocrinology* 144 (2003) 5184e5187.
113. A.K. Hewson, Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats, *J. Neuroendocrinol* 12 (2000) 1047e1049.
114. L.M. Al Massadi O, M. Tsch€op, C. Di-
e
guez, R. Nogueiras, Current understanding of the hypothalamic ghrelin pathways inducing appetite and adiposity, *Trends Neurosci.* 40 (3) (2017) 167e180. *Trends in Neurosciences*, 40 (2017) 167-180.
115. L.F. Faulconbridge, J.M. Kaplan, H.J. Grill, Search : hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration, *Diabetes* 52 (2010) 2260e2265.
116. D.F.P.N. Uriarte M, G. Fernandez, A. Cabral, D. Castrogiovanni, T. Lalonde, G. LuytL, S. Trejo, M. Perello, Evidence supporting a role for the bloodcerebrospinal fluid barrier transporting circulating ghrelin into the brain, *Mol. Neurobiol.* 56 (2018) 4120e4134.
117. W.G. Liang Y, T. Lv, Z. Li, Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism, *Biosci. Rep.* 38 (2018) 1e13.
118. H.Y. Chen, A.S. Chen, D.T. Weingarh, J.R. Adams, E.G. Frazier, Z. Shen, D.J. Marsh, S.D. Feighner, X.M. Guan, Z. Ye, R.P. Nargund, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard, D.J. MacNeil, S. Qian, Orexigenic action of peripheral ghrelin is

- mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein, *Endocrinology* 145 (2004) 2607e2612.
119. O.Y. Shintani M, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao, Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway, *Diabetes* 50 (2001) 227e232.
 120. D.Y. Toshinai K, N. Murakami, M. Shimada, M.S. Mondal, T. Shimbara, J.L. Guan, Q.P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, S. Shioda, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato, Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway, *Endocrinology* 144 (2003) 1506e1512.
 121. D.E. Cummings, R.S. Frayo, P.A. Breen, M.K. Ma, E.P. Dellinger, J.Q. Purnell, Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery, *N. Engl. J. Med* 346 (2002) 1623e1630.
 122. H.J. Leidy, B.R. Frye, M.L. Snook, M.K. Schuchert, E.L. Richard, N.I. Williams, Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normal-weight young women, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89 (2004) 2659e2664.
 123. A.F. Leite-Moreira, Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin, *Drug Discov. Today* 12 (2007) 276e288.
 124. N.M. Thompson, R. Davies, N. Loveridge, P.A. Houston, I.C. Robinson, T. Wells, Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor, *Endocrinology* 145 (2004) 234e242.
 125. M.T. Yasuda T, T. Kakuma, H. Yoshimatsu, Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats, *Neurosci. Lett* 349 (2003) 75e78.
 126. P.N. Muccioli G, C. Gh_____e, F. Catapano, R. Granata, E. Ghigo, Ghrelin and desacyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor, *Eur. J. Pharmacol* 498 (2004) 27e35.
 127. M.S. Kim, P.G. Jang, Y.J. Park, C.S. Shin, H.S. Park, J.W. Ryu, Y.K. Pak, J.Y. Park, K.U. Lee, S.Y. Kim, H.K. Lee, Y.B. Kim, K.S. Park, The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes, *Mol. Endocrinol* 18 (2004) 2291e2301.
 128. M.T. Tsubone T, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma, H. Yoshimatsu, Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice, *Regul. Pept* 130 (2005) 97e103.
 129. S.E.M. Dixit V D, R.S. Pyle, G.D. Collins, S.K. Sakthivel, R. Palaniappan, J.W. Lillard Jr., D.D. Taub, Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 57e66.
 130. V.N. Tang-Christensen M, S. Ortmann, M. Bidlingmaier, T.L. Horvath, M. Tschöpp, Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132)

- increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats, *Endocrinology* 145 (2004) 4645e4652.
131. D.M.G. Otukonyong E.E, R. Torto, P.S. Kalra, S.P. Kalra, High-fat diet induced ultradian leptin and insulin hypersecretion are absent in obesity resistant rats, *Obes. Res.* 13 (2005) 991e999.
 132. G.H.J. Williams D.L, D.E. Cummings, J.M. Kaplan, Overfeeding induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats, *J. Endocrinol. Invest.* 29 (2006) 863e868.
 133. D.Y. Takachi K, O. Ishikawa, I. Miyashiro, Y. Sasaki, H. Ohigashi, K. Murata, H. Nakajima, H. Hosoda, K. Kangawa, F. Sasakuma, S. Imaoka, Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy, *J. Surg. Res.* 130 (2006) 1e7.
 134. K.K. Kojima M, Ghrelin discovery: a decade after, *Ghrelin Syst.* 25 (2013) 1e4.
 135. D.d.I.C.C. Salehi A, R. Håkanson, I. Lundquist, Effects of ghrelin on insulin and glucagons secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice, *Regul. Pept.* 118 (2004) 143e150.
 136. R.-G.J. Egido E.M, R.A. Silvestre, J. Marco, Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002) 241e244.
 137. G.C. Broglio F, A. Benso, F. Prodam, S. Destefanis, C. Gauna, M. Maccario, R. Deghenghi, A.J. van der Lely, E. Ghigo, Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 4268e4272.
 138. Deighton K., Batterham R.L., Stensel D.J. (2014) Appetite and gut peptide responses to exercise and calorie restriction. The effect of modest energy deficits. *Appetite*, 81: 52-59
 139. Douglas J.A., King J.A., McFarlane E., Baker L., Bradley C., Crouch N., Hill D., Stensel D.J. (2015) Appetite hormone and energy intake responses to two consecutive days of aerobic exercise in healthy young men. *Appetite*, 92: 57-65.
 140. King J.A., Garnham J.O., Jackson A.P., Kelly B.M., Xenophontos S., Nimmo M.A. (2015) Appetite-regulatory hormone responses on the day following a prolonged bout of moderate-intensity exercise. *Physiol. Behav.*, 141: 23-31.
 141. Bilski J., Mańko G., Brzozowski T., Pokorski J., Nitecki J., Nitecka E., Wilk-Frańczuk M., Ziółkowski A., Jaszczur-Nowicki J., Kruczkowski D., Pawlik W.W. (2013) Effects of exercise of different intensity on gut peptides., energy intake and appetite in young males. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 20(4): 787-793.
 142. Crabtree D.R., Chambers E.S., Hardwick R.M., Blannin A.K. (2014) The effects of high-intensity exercise on neural responses to images of food. *Am. J. Clin. Nutr.*, 99(2): 258-267.
 143. Martins C., Stensvold D., Finlayson G., Holst J., Wisloff U., Kulseng B., Morgan L., King N.A. (2015) Effect of moderate – and high-intensity acute exercise on appetite in obese individuals. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 47(1): 40-48
 144. Stokes K.A., Sykes D., Gilbert K.L., Chen J.W., Frystyk J. (2010) Brief, high intensity exercise alters serum ghrelin and growth hormone concentrations but not

IGF-I, IGFII or IGF-I bioactivity. *Growth. Horm. IGF Res.*, 20(4): 289-294.

145. Stokes K.A., Sykes D., Gilbert K.L., Frystyk J. (2005) Growth hormone and ghrelin responses to very intense exercise in humans. *Endocrine Abstracts*, 10: 62
146. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549, 1995.
147. Kowalski TJ, Liu SM, Leibel RL, Chua SC, Jr. Transgenic complementation of leptin-receptor deficiency. I. Rescue of the obesity/diabetes phenotype of LEPR-null mice expressing a LEPR-B transgene. *Diabetes* 50: 425-435, 2001.
148. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311-1314, 1995.
149. Hegele RA. Familial partial lipodystrophy: A monogenic form of the insulin resistance syndrome. *Mol Genet Metab* 71: 539-544, 2000.
150. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipodystrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab* 11: 410-416, 2000.
151. Reue K, Peterfy M. Mouse models of lipodystrophy. *Curr Atheroscler Rep* 2: 390-396, 2000.
152. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A. Leptin replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346: 570-578, 2002.
153. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76, 1999
154. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.
155. Cinti S, Matteis RD, Pico C, Ceresi E, Obrador A, Maffei C, Oliver J, Palou A. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 789-793, 2000
156. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141: 333-339, 2000
157. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161, 1995
158. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3424- 3427, 1996.
159. Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* 28: 690-693, 1996.

160. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47: 913-917, 1998.
161. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46: 2035-2039, 1997.
162. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46: 2035-2039, 1997.
163. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, Satoh N, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, Jingami H, Kawada T, Nakao K. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 96: 1647-1652, 1995.
164. Zheng D, Jones JP, Usala SJ, Dohm GL. Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 434-437, 1996.
165. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47: 913-917, 1998.
166. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brolin RE, Fried SK. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: Depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol* 275: E507-E515, 1998.
167. Arner P. Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 10-13, 1999.
168. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529, 1995.
169. Zheng D, Jones JP, Usala SJ, Dohm GL. Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 434-437, 1996.
170. Zhang Y, Hufnagel C, Eiden S, Guo KY, Diaz PA, Leibel R, Schmidt I. Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics* 4: 189-199, 2001.
171. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46: 2035-2039, 1997.
172. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3424-3427, 1996.
173. Zhang Y, Zitsman JL, Hou J, Fennoy I, Guo K, Feinberg J, Leibel RL. Fat cell size and adipokine expression in relation to gender, depot, and metabolic risk factors in morbidly obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 22(3): 691-697, 2014.
174. Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, Levine LS, Fedun B, Wang J, Pierson RN, Jr., Leibel RL. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2509-2518, 2000.

175. Ravussin E, Pratley RE, Maffei M, Wang H, Friedman JM, Bennett PH, Bogardus C. Relatively low plasma leptin concentrations precede weight gain in Pima Indians. *Nat Med* 3: 238-240, 1997
176. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3419-3423, 1996.
177. Pratley RE, Nicolson M, Bogardus C, Ravussin E. Plasma leptin responses to fasting in Pima Indians. *Am J Physiol* 273: E644-E649, 1997.
178. Devaskar SU, Ollesch C, Rajakumar RA, Rajakumar PA. Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 44-47, 1997.
179. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4162-4165, 1996.
180. Nisoli E, Carruba MO, Tonello C, Macor C, Federspil G, Vettor R. Induction of fatty acid translocase/CD36, peroxisome proliferator-activated receptor gamma2, leptin, uncoupling proteins 2 and 3, and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous fat by lipid infusion. *Diabetes* 49: 319-324, 2000.
181. Etherton TD, Allen CE. Metabolic responsiveness of different size adipocytes to fasting and refeeding in the pig. *J Nutr* 110: 1169-1175, 1980.
182. Hood RL, Trankina ML, Beitz DC, Best DJ. Insulin responsiveness in non-fa/fa and fa/fa Zucker rats: Effects of adipocyte size. *Int J Obes* 8: 31-40, 1984.
183. Wrann CD, Eguchi J, Bozec A, Xu Z, Mikkelsen T, Gimble J, Nave H, Wagner EF, Ong SE, Rosen ED. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. *J Clin Invest* 122: 1010-1021, 2012.
184. Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, Sharma A, Michael R, Jinagouda SD, Boyadjian R, Steil GM. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: Effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 453-459, 1998.
185. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, Gold PW. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3: 575-579, 1997.
186. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: Clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4140-4147, 1998.
187. Bradley RL, Cheatham B. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 48: 272-278, 1999.
188. Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28: 685-689, 1996.
189. Kosaki A, Yamada K, Kuzuya H. Reduced expression of the leptin gene (ob) by catecholamine through a G(S) protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 45: 1744-1749, 1996
190. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138: 4463-4472, 1997.

191. Kolaczynski JW, Nycze MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45: 699-701, 1996.
192. Moreno-Aliaga MJ, Stanhope KL, Havel PJ. Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3- L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 544-548, 2001.
193. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139: 551-558, 1998.
194. Asada N, Takahashi Y, Honjo M. Effects of 22K or 20K human growth hormone on lipolysis, leptin production in adipocytes in the presence and absence of human growth hormone binding protein. *Horm Res* 54: 203-207, 2000.
195. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ. Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 605-610, 1996.
196. Fain JN, Leffler CW, Bahouth SW. Eicosanoids as endogenous regulators of leptin release and lipolysis by mouse adipose tissue in primary culture. *J Lipid Res* 41: 1689-1694, 2000
197. Fain JN, Leffler CW, Bahouth SW, Rice AM, Rivkees SA. Regulation of leptin release and lipolysis by PGE2 in rat adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62: 343-350, 2000.
198. Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, Kowalski TJ, Schmidt I, Leibel RL. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 492-495, 1997.
199. Zhang Y, Hufnagel C, Eiden S, Guo KY, Diaz PA, Leibel R, Schmidt I. Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics* 4: 189-199, 2001.
200. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688, 1998
201. Wang J, Liu R, Liu L, Chowdhury R, Barzilai N, Tan J, Rossetti L. The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nat Med* 5: 895-899, 1999.
202. Considine RV, Cooksey RC, Williams LB, Fawcett RL, Zhang P, Ambrosius WT, Whitfield RM, Jones R, Inman M, Huse J, McClain DA. Hexosamines regulate leptin production in human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3551-3556, 2000.
203. McClain DA, Alexander T, Cooksey RC, Considine RV. Hexosamines stimulate leptin production in transgenic mice. *Endocrinology* 141: 1999-2002, 1999.
204. Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* 45: 190-198, 1996.

205. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379-2381, 2000.
206. McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonylCoA. *J Biol Chem* 253: 4128-4136, 1978.
207. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonylCoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60: 265-270, 1977.
208. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 98: 1004-1009, 1996.
209. Rentsch J, Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 379: 55-59, 1996.
210. Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K. Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: Effects of triacsin C, palmitate, and 2- bromopalmitate. *Metabolism* 49: 326-330, 2000
211. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC, Jr., Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 5: 5-12, 1995.
212. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.
213. de la Brousse FC, Shan B, Chen JL. Identification of the promoter of the mouse obese gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4096-4101, 1996.
214. He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancerbinding protein alpha. *J Biol Chem* 270: 28887-28891, 1995.
215. Hwang CS, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 873-877, 1996
216. Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs MR, Auwerx J. The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5507-5511, 1996
217. De Vos P, Lefebvre AM, Shrivu I, Fruchart JC, Auwerx J. Glucocorticoids induce the expression of the leptin gene through a non-classical mechanism of transcriptional activation. *Eur J Biochem* 253: 619-626, 1998
218. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brolin RE, Fried SK. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: Depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol* 275: E507-E515, 1998.
219. Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB. Functional antagonism between

- CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem* 272: 5283-5290, 1997.
220. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 98: 1004-1009, 1996.
 221. Zhang B, Graziano MP, Doebber TW, Leibowitz MD, WhiteCarrington S, Szalkowski DM, Hey PJ, Wu M, Cullinan CA, Bailey P, Lollmann B, Frederick R, Flier JS, Strader CD, Smith RG. Downregulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice. *J Biol Chem* 271: 9455-9459, 1996.
 222. He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancerbinding protein alpha. *J Biol Chem* 270: 28887-28891, 1995.
 223. Wrann CD, Eguchi J, Bozec A, Xu Z, Mikkelsen T, Gimble J, Nave H, Wagner EF, Ong SE, Rosen ED. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. *J Clin Invest* 122: 1010-1021, 2012.
 224. Gerrits PM, Olson AL, Pessin JE. Regulation of the GLUT4/muscle-fat glucose transporter mRNA in adipose tissue of insulin-deficient diabetic rats. *J Biol Chem* 268: 640-644, 1993.
 225. Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol* 101: 169-171, 1979.
 226. Mandrup S, Loftus TM, MacDougald OA, Kuhajda FP, Lane MD. Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4300-4305, 1997.
 227. Lee MJ, Yang RZ, Gong DW, Fried SK. Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem* 282: 72-80, 2007.
 228. Lee MJ, Wang Y, Ricci MR, Sullivan S, Russell CD, Fried SK. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E858-E864, 2007.
 229. Roh C, Han J, Tzatsos A, Kandror KV. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E322-E330. Epub 2002 Oct 2001, 2003.
 230. Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: Observational and interventional studies in humans. *Diabetes* 51: 2105-2112, 2002.
 231. Guo K, McMinn JE, Ludwig T, Yu YH, Yang G, Chen L, Loh D, Li C, Chua S, Jr., Zhang Y. Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities. *Endocrinology* 148: 3987-3997, 2007.
 232. Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: Modulation with obesity. *Diabetes* 45: 1638-1643, 1996.

233. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 276: 6343-6349, 2001.
234. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282, 1996.
235. Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, Kelley DE, FriedmanEinat M, Skibinski GA, McCrory MA, Szalai AJ, Zhao AZ. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* 12: 425-432. Epub 2006 Apr 2002, 2006
236. Yang G, Ge H, Boucher A, Yu X, Li C. Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor. *Mol Endocrinol* 18: 1354-1362, 2004
237. Tu H, Kastin AJ, Hsueh H, Pan W. Soluble receptor inhibits leptin transport. *J Cell Physiol* 214: 301-305, 2008.
238. Cumin F, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 1120-1126, 1996.
239. Garibotto G, Russo R, Franceschini R, Robaudo C, Saffioti S, Sofia A, Rolandi E, Deferrari G, Barreca T. Inter-organ leptin exchange in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 504-509, 1998.
240. Cumin F, Baum HP, Levens N. Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol* 155: 577-585, 1997.
241. Van Heek M, Mullins DE, Wirth MA, Graziano MP, Fawzi AB, Compton DS, France CF, Hoos LM, Casale RL, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR, Jr. The relationship of tissue localization, distribution and turnover to feeding after intraperitoneal 125I-leptin administration to ob/ob and db/db mice. *Horm Metab Res* 28: 653-658, 1996.
242. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45: 984-987, 1996
243. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271, 1995.
244. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161, 1996.
245. Wu-Peng XS, Chua SC, Jr., Okada N, Liu SM, Nicolson M, Leibel RL. Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): Evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat. *Diabetes* 46: 513-518, 1997.
246. Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141: 1434-1441, 2000.

247. Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143: 775-783, 2002.
248. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271, 1995.
249. Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prevot V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* 19: 293-301, 2014.
250. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161, 1996.
251. Edison E, Whyte M, van Vlymen J, Jones S, Gatenby P, de Lusignan S, Shawe J. Bariatric surgery in obese women of reproductive age improves conditions that underlie fertility and pregnancy outcomes: Retrospective cohort study of UK National Bariatric Surgery Registry (NBSR). *Obes Surg* 26(12): 2837-2842, 2016.
252. Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143: 775-783, 2002.
253. Lin L, Martin R, Schaffhauser AO, York DA. Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R504-R509, 2001.
254. Wang H, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1352-E1359, 2002.
255. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1370-R1375, 2008.
256. Vasselli JR. Fructose-induced leptin resistance: Discovery of an unsuspected form of the phenomenon and its significance. Focus on "Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding," by Shapiro et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1365-R1369, 2008.
257. Banks WA, Niehoff ML, Martin D, Farrell CL. Leptin transport across the blood-brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. *Brain Res* 950: 130-136, 2002.
258. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53: 1253-1260, 2004.

259. Dirlewanger M, Vetta V Di, Giusti V, et al. Effect of moderate physical activity on plasma leptin concentration in humans. *Eur J Appl Physiol.* 1999;79:331–335. <http://dx.doi.org/10.1007/s004210050516>
260. Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, et al. Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:240–245.
261. St-Pierre DH, Faraj M, Karelis AD, et al. Lifestyle behaviours and components of energy balance as independent predictors of ghrelin and adiponectin in young non-obese women. *Diabetes Metab.* 2006;32:131–139. [http://dx.doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70259-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70259-8)
262. Warren JM, Ekelund U, Besson H, et al. Assessment of physical activity - a review of methodologies with reference to epidemiological research: a report of the exercise physiology section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2010;17:127–139. <http://dx.doi.org/10.1097/HJR.0b013e32832ed875>
263. Pate RR, Pratt M, Blair SN, et al. Public health and prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA* 1995;273:402–407. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1995.03520290054029>
264. Miyatake N, Murakami H, Kawakami R, et al. Circulating leptin levels are associated with physical activity or physical fitness in Japanese. *Environ Health Prev Med.* 2014;19:362–366. <http://dx.doi.org/10.1007/s12199-014-0398-2>
265. Henson J, Yates T, Edwardson CL, et al. Sedentary time and markers of chronic low-grade inflammation in a high risk population. *PLoS One.* 2013;8:e78350. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078350>
266. Brouns F & Beckers E. Is the gut an athletic organ? Digestion, absorption and exercise. *Sports Medicine* 1993 15 242–257. (<https://doi.org/10.2165/00007256-199315040-00003>)
267. Simren M. Physical activity and the gastrointestinal tract. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002 14 1053–1056. (<https://doi.org/10.1097/00042737-200210000-00003>)
268. Peters HPF, De Vries WR, Vanberge-Henegouwen GP & Akkermans LMA. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. *Gut* 2001 48 435–439. (<https://doi.org/10.1136/gut.48.3.435>)
269. Oettle GJ. Effect of moderate exercise on bowel habit. *Gut* 1991 32 941–944. <https://doi.org/10.1136/gut.32.8.941>
270. Kinnunen O. Study of constipation in a geriatric hospital, day hospital, old people's home and at home. *Aging* 1991 3 161–170.
271. Schubert MM, Sabapathy S, Leveritt M & Desbrow B. Acute exercise and hormones related to appetite regulation: a meta-analysis. *Sports Medicine* 2014 44 387–403. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0120-3>
272. Martins C, Morgan LM, Bloom SR & Robertson MD. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *Journal of Endocrinology* 2007 193 251–258. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0030>
273. Howe SM, Hand TM, Larson-Meyer DE, Austin KJ, Alexander BM & Manore MM. No effect of exercise intensity on appetite in highlytrained endurance women. *Nutrients* 2016 8 223. <https://doi.org/10.3390/nu8040223>

274. Holliday A & Blannin A. Appetite, food intake and gut hormone responses to intense aerobic exercise of different duration. *Journal of Endocrinology* 2017 235 193–205. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0570>
275. Ueda SY, Yoshikawa T, Katsura Y, Usui T & Fujimoto S. Comparable effects of moderate intensity exercise on changes in anorectic gut hormone levels and energy intake to high intensity exercise. *Journal of Endocrinology* 2009 203 357–364. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0190>
276. Unick JL, Otto AD, Goodpaster BH, Helsel DL, Pellegrini CA & Jakicic JM. Acute effect of walking on energy intake in overweight/ obese women. *Appetite* 2010 55 413–419. (<https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.07.012>)
277. Bak MJ, Wewer Albrechtsen NJ, Pedersen J, Knop FK, Vilsboll T, Jorgensen NB, Hartmann B, Deacon CF, Dragsted LO & Holst JJ. Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon-like peptide-1 (GLP-1): implications for GLP-1 measurements in clinical studies. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2014 16 1155–1164. (<https://doi.org/10.1111/dom.12352>)
278. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R & Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut* 1996 38 916–919. (<https://doi.org/10.1136/gut.38.6.916>)
279. Vestergaard ET, Hjelholt AJ, Kuhre RE, Møller N, Larraufie P, Gribble FM, Reimann F, Jessen N, Holst JJ & Jørgensen JOL. Acipimox acutely increases GLP-1 concentrations in overweight subjects and hypopituitary patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 104 2581–2592. (<https://doi.org/10.1210/jc.2018-02503>)
280. Okamura H., Tsutsui H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*. 1995;378:88–91. doi: 10.1038/378088a0
281. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:423–474. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.423.
282. Bazan J.F., Timans J.C., Kastelein R.A. A newly defined interleukin-1? *Nature*. 1996;379:591. doi: 10.1038/379591a0.
283. Gu Y., Kuida K., Tsutsui H., Ku G., Hsiao K., Fleming M.A., Hayashi N., Higashino K., Okamura H., Nakanishi K., et al. Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science*. 1997;275:206–209.
284. Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A., Quintal L., Sekut L., Talanian R., Paskind M., et al. Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. *Nature*. 1997;386:619–623. doi: 10.1038/386619a0.
285. Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440:237–241. doi: 10.1038/nature04516.
286. Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.T. The Nalp3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β *Nat. Immunol.* 2008;9:857–865. doi: 10.1038/ni.1636.

287. Masters S.L., Dunne A., Subramanian S.L., Hull R.L., Tannahill G.M., Sharp F.A., Becker C., Franchi L., Yoshihara E., Chen Z., et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1b in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 2010;11:897. doi: 10.1038/ni.1935.
288. Netea M.G., Joosten L.A.B., Lewis E., Jensen D.R., Voshol P.J., Jan Kullberg B., Tack C.J., van Krieken H., Kim S.-H., Stalenhoef A.F., et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 2006;12:650–656. doi: 10.1038/nm1415.
289. Zorrilla E.P., Sanchez-Alavez M., Sugama S., Brennan M., Fernandez R., Bartfai T., Conti B. Interleukin-18 controls energy homeostasis by suppressing appetite and feed efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:11097–11102. doi: 10.1073/pnas.0611523104.
290. Zorrilla E.P., Conti B. Interleukin-18 null mutation increases weight and food intake and reduces energy expenditure and lipid substrate utilization in high-fat diet fed mice. *Brain Behav. Immun.* 2014;37:45–53. doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.001.
291. Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012;8:457–465. doi: 10.1038/nrendo.2012.49.
292. Wang W., Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015;17:691–702. doi: 10.1038/nrm.2016.96.
293. Virtue S., Vidal-Puig A. Assessment of brown adipose tissue function. *Front. Physiol.* 2013;4:Article128.
294. Pazos P., Lima L., Tovar S., Gonzalez-Touceda D., Dieguez C., Garcia M.C. Divergent responses to thermogenic stimuli in BAT and subcutaneous adipose tissue from interleukin 18 and interleukin 18 receptor 1-deficient mice. *Sci. Rep.* 2015;5:17977. doi: 10.1038/srep17977.
295. Klose C.S.N., Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* 2016;17:765–774. doi: 10.1038/ni.3489.
296. Brestoff J.R., Kim B.S., Saenz S.A., Stine R.R., Monticelli L.A., Sonnenberg G.F., Thome J.J., Farber D.L., Lutfy K., Seale P., et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature.* 2015;519:242–246. doi: 10.1038/nature14115.
297. Lee M.-W., Odegaard J.I., Mukundan L., Qin Y., Molofsky A.B., Nussbaum J.C., Yun K., Locksley R.M., Chawla A. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell.* 2015;160:74–87. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.011.
298. Ricardo-Gonzalez R.R., Van Dyken S.J., Schneider C., Lee J., Nussbaum J.C., Liang H.-E., Vaka D., Eckalbar W.L., Molofsky A.B., Erle D.J., et al. Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. *Nat. Immunol.* 2018;19:1093–1099. doi: 10.1038/s41590-018-0201-4.
299. Kjøbsted R., Hingst J.R., Fentz J., Foretz M., Sanz M.-N., Pehmøller C., Shum M., Marette A., Mounier R., Treebak J.T., et al. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J.* 2018;32:1741–1777. doi: 10.1096/fj.201700442R.
300. Lindegaard B., Matthews V.B., Brandt C., Hojman P., Allen T.L., Estevez E., Watt M.J., Bruce C.R., Mortensen O.H., Syberg S., et al. Interleukin-18 activates

- skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2013;62:3064–3074. doi: 10.2337/db12-1095.
301. Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, et al. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3864 – 6
 302. Esposito K, Pontillo A, Di PC, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*. 2003;289:1799 – 804.
 303. Leick, L., Lindegaard, B., Stensvold, D., Plomgaard, P., Saltin, B. and Pilegaard, H., 2007. Adipose Tissue Interleukin-18 mRNA and Plasma Interleukin-18: Effect of Obesity and Exercise*. *Obesity*, 15(2), pp.356-363.
 304. Kohut ML, McCann DA, Russell DW, et al. Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun*. 2006;20:201–9
 305. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98:1154 – 62.
 306. Julieta Díaz-Delfín, Elayne Hondares, Roser Iglesias, Marta Giralt, Carme Caelles, Francesc Villarroya, TNF- α Represses β -Klotho Expression and Impairs FGF21 Action in Adipose Cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 Pathway, *Endocrinology*, Volume 153, Issue 9, 1 September 2012, Pages 4238–4245, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1193>
- Y. C. Woo, Aimin Xu, Yu Wang, Karen S. L. Lam, “Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives”, Volume 78, Issue 4 April 2013 Pages 489-496