



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ- ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ
ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ PPARs»**

**ΦΩΤΕΙΝΗ Β. ΜΑΛΛΙΟΥ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ- ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ
ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ PPARs»**

**ΦΩΤΕΙΝΗ Β. ΜΑΛΛΙΟΥ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

*«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,
παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»*

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μάλλιου Φωτεινής: 8-9-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 695^α/2-11-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Κωνσταντή Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ανδρεάδου Ιωάννα, Λέκτορας Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-12-2010

«Μελέτη της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης στην ομοιοστασία των λιπιδίων: Διερεύνηση του ρόλου των πυρηνικών πρωτεϊνών PPARs»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 782^α/13-11-2015

Καλφακάκου Βασιλική	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττης Θεόφιλος	Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντή Μαρία	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος	τ. Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ανδρεάδου Ιωάννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Παππάς Περικλής	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεονταρίτης Γεώργιος	Λέκτορας Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-2-2017

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

*Στους γονείς μου,
Βασίλη και Άρτεμις*

Στο σύντροφό μου, Αχιλλέα

*Στον αδελφό μου Γιώργο
και την Αλλένα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2010-2017, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κυρίας Μαρίας Κωνσταντή. Η ολοκλήρωση αυτής της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε, χάρη στην αμέριστη βοήθεια των μελών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, του Ερευνητικού Ανοσολογικού Εργαστηρίου της Α' Παθολογικής Κλινικής, των Εργαστηρίων Βιολογίας και Βιολογικής Χημείας και φυσικά τη στήριξη της οικογένειας και των φίλων μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κυρία **Μαρία Κωνσταντή**, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και Επιβλέπουσα της Διατριβής μου, για τη συνεχή και ακούραστη παρουσία και καθοδήγησή της στο ερευνητικό κομμάτι και για την υπομονή με την οποία μου δίδαξε τις αρχές της βασικής έρευνας, με μέθοδο, υπομονή και με το επιστημονικό ήθος που τη διέπει. Θα ήθελα επιπλέον, να της εκφράσω την ευγνωμοσύνη, την αγάπη αλλά και τη βαθιά εκτίμησή μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για το γεγονός πως τα τελευταία χρόνια αποτέλεσε μια σταθερά για εμένα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά διότι μου ενέπνευσε, τη δική της αγάπη για ένα χώρο δύσκολο και απαιτητικό, όπως είναι αυτός της Έρευνας.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Φαρμακολογίας κύριο **Μάριο-Αθανάσιο Μαρσέλο**, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη Διατριβή μου στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την υποστήριξή του και τις πολύτιμες συμβουλές του σε θέματα ερευνητικά, ακαδημαϊκά και όχι μόνο.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία **Ιωάννα Ανδρεάδου**, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εποικοδομητική κριτική της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την άριστη συνεργασία μας και το γεγονός πως ήταν πάντα διαθέσιμη για κάθε απορία ή πρόβλημα προέκυπτε στα πλαίσια της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, κύριο **Περικλή Παππά** για την άριστη πολυεπίπεδη συνεργασία του, την συνεχή καθοδήγησή του σε θέματα που

άπτονταν της εξειδίκευσής του και το ευχάριστο κλίμα, που πάντα δημιουργούσε στο Εργαστήριο.

Τον Λέκτορα Φαρμακολογίας κύριο **Γεώργιο Λεονταρίτη**, μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τις χρήσιμες συμβουλές και την άριστη συνεργασία μας.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κυρία **Κατερίνα Αντωνίου**, η οποία είχε πάντα χρόνο για να απαντήσει στις απορίες ή την επίλυση προβλημάτων, που τυχόν προέκυπταν κατά τη διαδικασία των ευρύτερων ερευνητικών μου δραστηριοτήτων στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας.

Τον Δρ. **Ευάγγελο-Παναγιώτη Δασκαλόπουλο** και τον υποψήφιο Διδάκτορα κύριο **Παναγιώτη Χαρκίτη**, συνεργάτες και φίλους, οι οποίοι με καθοδήγησαν υπομονετικά στα πρώτα βήματά μου κατά την εκπόνηση αυτής της Διατριβής και εξακολουθούν να μου προσφέρουν απλόχερα τη βοήθειά τους μέχρι σήμερα, σε οτιδήποτε χρειαστεί.

Την κυρία **Αλεξάνδρα-Ελένη Κατσογριδάκη**, Πτυχιούχο του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και φίλη, της οποίας η στήριξη και επιμονή σε πειραματικό αλλά και προσωπικό επίπεδο, αποτέλεσε τεράστια βοήθεια τόσο στην αρχή όσο και κατά την ολοκλήρωση της Διατριβής μου. Η συμβολή της, είναι για εμένα ανεκτίμητης αξίας.

Την υποψήφια Διδάκτορα κυρία **Ανδριοπούλου Χριστίνα-Ειρήνη** για την άψογη συνεργασία μας, τη συνεχή βοήθειά της καθώς και τη φιλία της.

Τον κ. **Τσιάνο Βασίλειο** υποψήφιο Διδάκτορα του Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας, που προσέφερε πολύτιμη βοήθεια καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διατριβής.

Τους Διδάκτορες κυρία **Μαριάνθη Σωτηροπούλου**, κυρία **Φωτεινή Δελλή**, κυρία **Ειρήνη Μπιζιώτα**, τον κύριο **Λεωνίδα Μαυροειδή** καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κυρία **Ναυσικά Πούλια** για την άριστη συνεργασία τους σε όλες τις φάσεις της Διατριβής μου καθώς και για την φιλία τους.

Τις κυρίες **Ακυλίνα Μπαλωμένου** και **Όλγα Τσουμάνη** για τη αρωγή τους σε όλα τα θέματα, που άπτονταν των αρμοδιοτήτων τους και για τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας (μεταπτυχιακούς φοιτητές κτλ.) καθώς και των άλλων Εργαστηρίων του Ιατρικού Τμήματος, που με βοήθησαν σε τεχνικό επίπεδο, όπως επίσης και το προσωπικό της Γραμματείας του Ιατρικού Τμήματος Ιωαννίνων για την βοήθειά τους στην διεκπεραίωση των διαδικαστικών-διοικητικών θεμάτων, που άπτονταν της Διδακτορικής Διατριβής.

Τους φίλους μου, οι οποίοι, ακόμα και από απόσταση, με εμπνύχωναν και με στήριζαν σε κάθε δύσκολη στιγμή και μου έδιναν τη δύναμη να προχωρήσω και να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη μελέτη.

Τον **Αχιλλέα Λαζόπουλο**, που με την αγάπη, την υπομονή και αφοσίωσή του, με συντροφεύει και με εμπνύχώνει. Η εμπιστοσύνη και η στήριξή του αποτελούσαν πάντα κίνητρο για εμένα. Τέλος, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω και για όλες τις ευτυχισμένες στιγμές, που μου χαρίζει καθημερινά.

Την οικογένειά μου, τον αδελφό μου **Γεώργιο Μάλλιο** και τους γονείς μου, **Βασίλη** και **Άρτεμις Μάλλιου**, οι οποίοι με στηρίζουν πάντα σε κάθε μου απόφαση, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τους στόχους και τα όνειρά μου. Η αμέριστη αγάπη τους, ακόμα τις πιο δύσκολες στιγμές, ήταν εκείνη που με ωθούσε να συνεχίσω και σίγουρα τους χρωστώ πάρα πολλά από όσα έχω επιτύχει μέχρι τώρα στη ζωή μου.

Ιωάννινα, Φεβρουάριος 2017,

Φωτεινή Β. Μάλλιου

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	27
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1 ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ.....	5
1.1 Τύποι Υπερλιπιδαιμιών.....	14
1.2 Αίτια Υπερλιπιδαιμιών	14
1.3 Συμμετοχή της υπερλιπιδαιμίας στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων - Παθοφυσιολογία.....	18
1.4 Θεραπευτική Προσέγγιση Υπερλιπιδαιμιών	20
1.4.1 Τρέχουσες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις: Πλεονεκτήματα -Μειονεκτήματα	20
1.4.2 Νέες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις	28
2 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	31
3 ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ.....	33
3.1 Χημική δομή.....	35
3.2 Φαρμακολογικές Ιδιότητες	37
3.3 Τοξικότητα	38
4 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ PPARs.....	41
4.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	41
4.2 Δομή των υποδοχέων PPARs.....	43
4.3 Μοριακοί μηχανισμοί της μεταγραφικής ρύθμισης των PPARs.....	46
4.3.1 Συμβολή του ετεροδιμερούς PPAR/RXR στη μεταγραφική λειτουργία των PPARs και ρόλος των PPREs.....	46
4.3.2 Συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων	47
4.3.3 Μεταγραφική ενεργότητα των PPARs	48
4.3.4 Προσδέτες/Αγωνιστές των PPARs	49
4.4 PPARα.....	50
4.4.1 Προφίλ έκφρασης του PPARα.....	50
4.4.2 Δομή και ενεργοποίηση του PPARα	51
4.4.3 PPARα και Μεταβολισμός των Λιπιδίων.....	53
4.4.4 Ο Ρόλος του PPARα στην αθηροσκλήρυνση	57
4.5 PPARβ/δ	58
4.6 PPARγ	59
5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	61

6	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
6.1	Πειραματόζωα	65
6.2	Φάρμακα, κυτταρικές σειρές και πλασμίδια	66
6.3	Αγωγή με Ελευρωπαϊνή	67
6.3.1	<i>In vivo</i> αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαϊνής.....	67
6.3.2	<i>In vitro</i> αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαϊνής σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα.....	68
6.4	Θυσία πειραματοζώων	68
6.5	Quantitative real-time PCR	69
6.5.1	Απομόνωση RNA	69
6.5.2	Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA	71
6.5.3	Μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	71
6.5.4	Προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).....	73
6.6	Western blot analysis	77
6.6.1	Απομόνωση ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών από ήπαρ και λευκό λιπώδη ιστό	78
6.6.2	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....	79
6.6.3	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blot.....	80
6.7	Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ μυών... 86	
6.7.1	Διαδικασία απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων	86
6.7.2	Ποσοτικός προσδιορισμός κυττάρων και τοποθέτησή τους σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου.....	90
6.7.3	Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων.....	92
6.8	Κυτταροκαλλιέργεια και transient co-transfection assay	93
6.9	Βιοχημικές αναλύσεις.....	94
6.10	Molecular Docking Simulations - Μοριακή προσομοίωση πρόσδεσης..... 95	
6.10.1	Protein and Ligand Preparation – Προετοιμασία πρωτεΐνης και προσδέτη	95
6.10.2	Computational solvent mapping – Υπολογιστική Χαρτογράφηση Διαλύτη	95
6.10.3	Induced Fit Docking.....	95
6.11	Στατιστική ανάλυση.....	96
7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
7.1	Επίδραση της ελευρωπαϊνής στα επίπεδα των λιπιδίων	101
7.2	Διερεύνηση της ικανότητας της Ελευρωπαϊνής να προσδένεται στους υποδοχείς PPARα.....	104
7.3	Αξιολόγηση της ικανότητας πρόσδεσης της ελευρωπαϊνής στον PPARα με μοριακή προσομοίωση	106
7.4	Luciferase reporter gene assay	108
7.5	Επαγωγή της έκφρασης του Ppara με ελευρωπαϊνή. <i>In vivo</i> μελέτη	110

7.6	Επίδραση της ελευρωπαϊνης στην ηπατική έκφραση του Hnf4a.....	111
7.7	<i>In vivo</i> αξιολόγηση των μηχανισμών, που συμμετέχουν στην επαγόμενη από την ελευρωπαϊνη, ρύθμιση του Ppara	112
7.8	Επαγωγή του PPARα με ελευρωπαϊνη σε πρώιμα ηπατοκύτταρα.....	114
7.9	<i>In vitro</i> αξιολόγηση των μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται στην επαγωγή του PPARα, που προκαλεί η ελευρωπαϊνη.....	116
7.10	Επίδραση της ελευρωπαϊνης σε ηπατικούς παράγοντες, κρίσιμους για την ομοιοστασία των TGs.....	118
7.11	Επίδραση της ελευρωπαϊνης σε κρίσιμους για την ομοιοστασία των TGs παράγοντες, που εκφράζονται στον λευκό λιπώδη ιστό	119
7.12	<i>In vivo</i> αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαϊνης στη β-οξείδωση των λιπιδίων, την έκφραση του Ldl-r και τη σύνθεση της χοληστερόλης.....	121
7.13	Αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαϊνης στους λιπιδαιμικούς δείκτες των Ldl-r null μυών, και στην έκφραση του Ppara.	122
8	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	125
9	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	133
10	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	135
11	SUMMARY.....	139
12	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AADAC, arylacetamidideacetylase;

ACADM, acyl-CoA dehydrogenase;

ACOX, acyl-CoA oxidase; **ACOT**, acyl-CoA thioesterase

ATGL, adipose triglyceride lipase;

BAAT, bile acid CoA;

Cd36, cluster of differentiation 36;

Ces3/tgh, carboxylesterase 3;

DGAT, diacylglycerol O-acyltransferase;

EIA, Elisa;

FFA, free fatty acids;

HDL, high density lipoprotein;

HSL, hormone sensitive lipase;

IFD, Induced Fit Docking;

LPL, lipoprotein lipase;

LDL-r, low density lipoprotein receptor;

MTTP, microsomal triglyceride transfer protein;

NEFA, non-esterified fatty acids;

Nr4A, nuclear receptor 4a;

OLE, oleuropein;

PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9;

PKA, protein kinase A;

PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor- α ;

PCR, polymerase chain reaction;

RIA, radioimmunoassay;

TG, triglycerides;

VLDL, very low-density lipoprotein;

W.A.T., white adipose tissue.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ομοιοστασία των λιπιδίων είναι μια από τις πλέον βασικές βιολογικές διεργασίες στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των ζώντων οργανισμών, διότι τα λιπίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση ενέργειας, την κυτταρική σηματοδότηση, τη σύνθεση στεροειδών ορμονών και δρουν ως δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών (1). Η διαταραχή της ομοιοστασίας των λιπιδίων οδηγεί σε δυσλιπιδαιμίες, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρυνσης, καρδιαγγειακών νοσημάτων και παχυσαρκίας. Μια σχετική μελέτη μετα-ανάλυσης, που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα 29 μεμονωμένων ερευνών, στις οποίες συμμετείχαν 262.525 άτομα, συνδέει άμεσα τα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας (2). Οι τρέχουσες ιατρικές οδηγίες για την πρόληψη και αντιμετώπιση των υπετριγλυκεριδαιμιών συνιστούν τη χρήση φιβρατών (3, 4). Οι φιβράτες είναι συνθετικοί αγωνιστές του PPARα και χορηγούνται για τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με στατίνες (5, 6). Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ακόμα και με συστηματική χορήγηση στατινών ο κίνδυνος για την επανεμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, που σχετίζονται με αθηρογενείς δυσλιπιδαιμίες (χαμηλή HDL και υψηλά τριγλυκερίδια) δεν εκλείπει. Σε αυτές τι περιπτώσεις, φαίνεται ότι η συνδυασμένη χορήγηση στατινών και φιβρατών είναι πιο αποτελεσματική (7). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η συγχορήγηση των δύο υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, σχετίζεται με μικρή αλλά σημαντική θνησιμότητα λόγω ραβδομυόλυσης με κύριο ένοχο τη γεμφιβροζίλη (8). Συνεπώς, η αναζήτηση νέων μορφών είναι επιτακτική ανάγκη, για τον ασφαλή έλεγχο των δυσλιπιδαιμιών, που χαρακτηρίζονται από αυξημένα τριγλυκερίδια και/ή LDL και κατά συνέπεια και της καρδιαγγειακής νόσου.

Ο PPARα θεωρείται κυτταρικός λιποστάτης, καθώς είναι υπεύθυνος για τις προσαρμοστικές μεταβολές των επιπέδων των κυτταρικών λιπιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (9-11). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του PPARα επάγει την έκφραση γονιδίων, που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία σχετίζονται με την πρόσληψη και μεταφορά των λιπαρών οξέων καθώς και με την υπεροξυσωματική και μιτοχονδριακή β-οξείδωσή τους αλλά και με τη μικροσωματική ω-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, ο PPARα ρυθμίζει την έκφραση αρκετών γονιδίων, που κωδικοποιούν ορισμένες απολιποπρωτεΐνες (Apo), όπως η Apo AI, AII και CIII, γεγονός, που καταδεικνύει τον κεντρικό ρόλο του PPARα στην εξωκυττάρια μεταφορά των λιπαρών οξέων στο αίμα (12). Όλες οι επαγόμενες από τον PPARα δράσεις στη γονιδιακή έκφραση, τον καθιστούν ένα ιδανικό φαρμακολογικό στόχο για τη θεραπεία των υπερτριγλυκεριδαιμιών και άλλων δυσλιπιδαιμιών.

Το ελαιόλαδο και οι ελιές αποτελούν αναπόσπαστα συστατικά της μεσογειακής διατροφής και αρκετές μελέτες αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες αυτού του τύπου διατροφής στα μοναδικά χαρακτηριστικά της ελιάς (13). Η ελευρωπαΐνη (OLE) και η υδροξυτυροσώλη (προϊόν της υδρόλυσης της OLE) αποτελούν τα κύρια πολυφαινολικά συστατικά, που βρίσκονται στα φύλλα και τον ακατέργαστο καρπό της *Olea europaea* και είναι υπεύθυνα για τη σημαντική μείωση της λιπογένεσης και της υπερλιπιδαιμίας σε παχύσαρκους μύες (14, 15). Μεγάλης κλινικής σημασίας είναι το γεγονός ότι η χορήγηση καθαρής OLE σε κανονικούς και υπερχοληστερολαιμικούς επίμυες, στους οποίους είχε προκληθεί ισχαιμία/επαναιμάτωση, μείωσε σημαντικά το μέγεθος του εμφράκτου. Η OLE επέδειξε επίσης, προστατευτική δράση στο μυοκάρδιο κονίκλων έπειτα από

επαναιμάτωση ενάντια στην οξειδωτική βλάβη και επιπλέον, μείωσε τα συνολικά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στον ορό τους (16).

Με βάση τα προαναφερθέντα στοιχεία και το αυξανόμενο ενδιαφέρον προς τις ευεργετικές ιδιότητες της Μεσογειακής διατροφής, η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώνεται στο ρόλο της OLE στην ομοιοστασία των λιπιδίων. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στο ρόλο του PPAR α . Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν μύες αγρίου τύπου (Wild Type -WT) καθώς και *PPAR α null* (απουσία PPAR α από όλους τους ιστούς), οι οποίοι ακολούθησαν την τυπική διαίτα των τρωκτικών σε συνδυασμό με καθαρή OLE για διάστημα 6 εβδομάδων. Τα ευρήματα της μελέτης δείχνουν ότι η OLE μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων μέσω ενεργοποίησης του PPAR α . Φαίνεται ότι η επαγωγή των γονιδίων αρκετών ηπατικών παραγόντων, που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την πρόσληψη, τη μεταφορά και την απέκκριση των τριγλυκεριδίων, καθώς και η ενεργοποίηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης (HSL) στο λευκό λιπώδη ιστό (White Adipose tissue -WAT), συνεισφέρουν στην επαγόμενη από την ελευρωπαΐνη δράση, δηλαδή, την πτώση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της ολικής χοληστερόλης στον ορό. Τέλος, ανάλυση της δράσης της OLE σε διαγονιδιακούς μύες *Ldl-r null*, δείχνει τη συμμετοχή του ενεργού LDL υποδοχέα στη δράση της OLE στα τριγλυκερίδια του ορού.

1 ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ

Τα λιπίδια συνιστούν μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων, που περιλαμβάνουν υδρόφοβα και αμφίφυλα μόρια. Η μεγάλη βιολογική τους σημασία, έγκειται στο γεγονός ότι λειτουργούν ως ενεργειακές αποθήκες των οργανισμών, ως δομικά συστατικά των μεμβρανών των κυττάρων και φυσικά συμμετέχουν ενεργά στη διακυτταρική επικοινωνία αλλά και την ενδοκυττάρια σηματοδότηση (1, 17). Τα βιολογικής προέλευσης λιπίδια μπορούν να χωριστούν σε οκτώ κατηγορίες: τα λιπαρά οξέα, τα λιπίδια γλυκερόλης, τα γλυκεροφωσfolιπίδια, τα σφιγγολιπίδια, τα σακχαρολιπίδια και πολυκετίδια και τα λιπίδια στερόλης και πρενόλης.

Τα σημαντικότερα λιπίδια, που σχετίζονται με εμφάνιση παθογένειας, είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids, FFA), τα τριακυλογλυκερίδια ή τριγλυκερίδια (triglycerides, TGs), η χοληστερόλη (cholesterol) και τα φωσfolιπίδια (phospholipids). Τα λιπίδια συναντώνται στο αίμα είτε ως λιποπρωτεΐνες είτε ως FFA σε σύμπλοκα με αλβουμίνη. Οι λιποπρωτεΐνες είναι ετερογενή μεγαλομοριακά σύμπλοκα των λιπιδίων με ειδικές πρωτεΐνες, τις αποπρωτεΐνες ή απολιποπρωτεΐνες (apolipoproteins, Apo). Οι Apo έχουν πολύπλοκο λειτουργικό ρόλο καθώς είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία και διατήρηση της δομής των λιποπρωτεϊνών, ενώ παράλληλα συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό των λιπιδίων, μέσω πρόσδεσης σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς και ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας (Πίνακας 1). Οι λιποπρωτεΐνες συμμετέχουν στη διανομή των TGs στους ιστούς ως πηγή ενέργειας, στη διατήρηση των επιπέδων της εξωκυτταρικής χοληστερόλης και στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (επιστροφή της χοληστερόλης στο ήπαρ) (18). Οι λιποπρωτεΐνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με δύο τρόπους. Βάση της πυκνότητας τους (density, d) ταξινομούνται σε (i) υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες

(high density lipoprotein, HDL), (ii) χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low density lipoprotein, LDL), (iii) ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (intermediate density lipoprotein, IDL), (iv) πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (very low density lipoprotein, VLDL) και (v) χυλομικρά. Βάση του φορτίου τους κατηγοριοποιούνται σε (i) α-λιποπρωτεΐνες, (ii) β-λιποπρωτεΐνες, (iii) προ-β-λιποπρωτεΐνες και (iv) χυλομικρά (19). (Πίνακας 2)

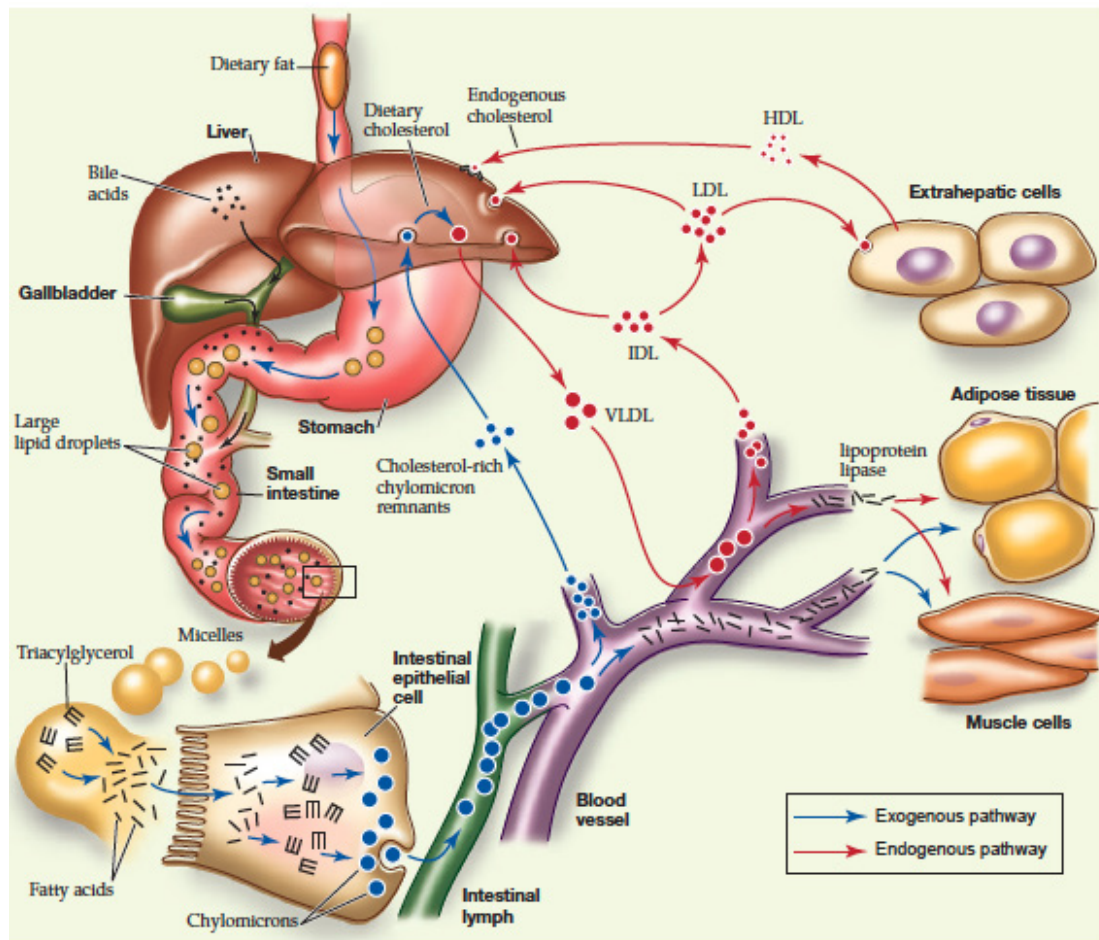
Πίνακας 1. Απολιποπρωτεΐνες

<u>Απολιποπρωτεΐνη</u>	<u>Μοριακό Βάρος</u>	<u>Λιποπρωτεΐνη</u>	<u>Μεταβολική λειτουργία</u>	<u>Σύνθεση</u>	<u>Βιβλιογραφική αναφορά</u>
ApoAI	28016	HDL, χυλομικρά	Δομικό συστατικό της HDL, ενεργοποιητής της λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλο-τρανσφεράσης (LCAT)	ήπαρ, έντερο	(20)
ApoAII	17414	HDL, χυλομικρά		ήπαρ	(21)
ApoAIV	46465	HDL, χυλομικρά	Δημιουργία και έκκριση χυλομικρών	έντερο	(22, 23)
ApoAV		HDL, VLDL, χυλομικρά	Ενεργοποιητής της ενδοαγγειακής υδρόλυσης μέσω LPL. Ρύθμιση του μεταβολισμού των TGs στο ήπαρ.	ήπαρ	(24, 25)
ApoB48	264000	-	Απαραίτητη για τη δημιουργία και έκκριση των χυλομικρών από το λεπτό έντερο	έντερο	(20)
ApoB100	540000	VLDL, IDL, LDL	Δημιουργία και έκκριση VLDL από το ήπαρ. Δομική πρωτεΐνη των VLDL, IDL και LDL. Προσδέτης του LDL υποδοχέα.	ήπαρ	(20)
ApoCI	6630	VLDL, IDL, HDL	Αναστέλλει τη σύνδεση των λιποπρωτεϊνών στους υποδοχείς τους. Πιθανός αναστολέας της πρωτεΐνης μεταφοράς χοληστερυλεστέρα	ήπαρ	(26, 27)
ApoCII	8900	VLDL, IDL, HDL	Ενεργοποιητής λιποπρωτεϊνικής λιπάσης	-	(28)
ApoCIII	8800	VLDL, IDL, HDL	Αναστολέας λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Αυξάνει την έκκριση VLDL. Ενεργοποιεί διαδικασίες, που εμπλέκονται στην αθηρογένεση και τη φλεγμονή των αγγείων.	κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στο έντερο	(27, 29-31)
ApoE	31145	χυλομικρά, VLDL, IDL, HDL	LDL υποδοχέας, προσδέτης για την LDL και για υπολείμματα χυλομικρών. Προσδέτης για την LRP. Σχετίζεται με την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης	κυρίως στο ήπαρ	(32, 33)
Apo(a)	250000-800000	Lp(a)	-	ήπαρ	(34)
ApoM	26000	HDL, VLDL, LDL	Σύνθεση της HDL	ήπαρ, νεφροί	(35)

Πίνακας 2. Ταξινόμηση λιποπρωτεϊνών (TG:τριγλυκερίδια C:χοληστερόλη, CE: εστεροποιημένη χοληστερόλη, PL: φωσφολιπίδια) (19)

	Ποκνότητα (g/ml)	Μέσο μοριακό βάρος (Da)	Διάμετρος (nm)	Λιπίδια (% κατά βάρος)				
				ολικά	TG	C	CE	PL
Χολομικρά	<0,96	5x10 ⁹	10 ² -10 ³	98-99	86-94	0,5-1	1-3	3-8
VLDL ή προ-β	0,96-1,006	7,5x10 ⁶	30-70	89- 94	55-65	6-8	12-14	12-18
LDL ή β	1,019-1,063		15-25	75-80	8-12	5-10	33-40	20-25
IDL	1,006-1,019	2,5x10 ⁶						
HDL ή α	1,063-1,210	1,9-3,9x10 ⁵	6-14	50-55	3-6	3-5	14-18	20-30

Η κατανόηση των μηχανισμών μεταβολισμού των λιπιδίων είναι πολύ σημαντική, καθώς οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης. Η μετακίνηση και ο μεταβολισμός των λιπιδίων περιλαμβάνει 3 γενικά μονοπάτια (Εικόνα 1): (i) το εξωγενές μονοπάτι, όπου τα χυλομικρά συντίθενται στο λεπτό έντερο και τα TGs και η χοληστερόλη μεταφέρονται σε διάφορους ιστούς του οργανισμού, (ii) το ενδογενές μονοπάτι, όπου η VLDL και τα TGs συντίθενται στο ήπαρ και κατόπιν, μεταφέρονται στους ιστούς και (iii) η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, όπου HDL χοληλεστέρες ανταλλάσσονται με TGs σε LDL και VLDL σωματίδια μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς χοληλεστέρα (cholesteryl ester transfer protein, CETP), μία διαδικασία ή οποία απομακρύνει χοληστερόλη από τους περιφερειακούς ιστούς και την κατευθύνει στο ήπαρ και τα στερεοειδογόνα όργανα (γονάδες).



Εικόνα 1. Γραφική αναπαράσταση των μονοπατιών μεταβολισμού των λιπιδίων

Στο εξωγενές μονοπάτι τα TGs, που έχουν προσληφθεί μέσω της διατροφής υδρολύονται στο έντερο σε μονογλυκερίδια και FFA, τα οποία σχηματίζουν μικύλλια και κατόπιν απορροφώνται από το επιθήλιο του εντέρου. Ακολούθως, τα FFA επανεστεροποιούνται, ώστε να δημιουργήσουν TGs και η χοληστερόλη εστεροποιείται από την ακετυλοτρανφεράση της λεκιθινο-χοληστερόλης (Lecithin: cholesterol acyltransferase, LCAT). Σταγονίδια TGs συνδεδεμένα με μικρή ποσότητα εστεροποιημένης χοληστερόλης και ApoB48, προσλαμβάνουν φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και ApoA. Στη συνέχεια μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο (36). Τα λιπαρά οξέα, που προέρχονται από τα TGs των χυλομικρών, μεταφέρονται στους ιστούς μέσω υδρόλυσης που καταλύεται από την λιποπρωτεϊνική

λιπάση (lipoprotein lipase, LPL), η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο ενδοθήλιο των αρτηριακών τοιχωμάτων (37). Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχει και η ApoCII, η οποία είναι απαραίτητος συνενεργοποιητής της LDL. Τα κατάλοιπα των χυλομικρών μεταφέρονται με ενδοκύττωση στο ήπαρ μέσω της ApoE (38, 39). Τόσο στο ήπαρ όσο και στο έντερο, κατά τη μετάφραση του γονιδίου της, η ApoB ταυτόχρονα μετακινείται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), όπου μικροσωμιακές πρωτεΐνες μεταφοράς (microsomal transfer protein, MTP) προσθέτουν λιπίδια, ώστε να σχηματιστούν τα πρωταρχικά ApoB σωματίδια. Η στόχευση της ApoB για αποικοδόμηση ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα των λιπιδίων. Μη λειτουργικά ApoB100 σωματίδια απομακρύνονται με μηχανισμούς, όπως η σχετιζόμενη με το ΕΔ αποικοδόμηση και η δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων. Τόσο η VLDL όσο και τα χυλομικρά απαιτούν ειδικά κυστίδια για να μεταφερθούν από το ΕΔ στα στοιχεία Golgi και κατόπιν να εκκριθούν. Ο παράγοντας ωρίμανσης της λιπάσης 1 (lipase maturation factor 1, LMF1), η προσδεδεμένη σε γλυκοζυλ-φωσφατιδυλινωσιτόλη υψηλής πυκνότητας πρωτεΐνη πρόσδεσης λιποπρωτεΐνης 1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1, GPIHBP1) και μία ομοιάζουσα της αγγειοποιητίνης πρωτεΐνη, συμμετέχουν στην διαμεσολαβούμενη από την LPL υδρόλυση των TGs, ώστε η σωστή ποσότητα λιπαρών οξέων να μεταφέρεται στο σωστό ιστό την κατάλληλη χρονική στιγμή.

Στο ενδογενές μονοπάτι, το ήπαρ εξάγει τα TGs στους περιφερικούς ιστούς με τη μορφή VLDL. Τα FFA μεταφέρονται στους ιστούς με τη βοήθεια της LPL (40). Η υδρόλυση των χυλομικρών και της VLDL από την LPL οδηγεί στην παραγωγή καταλοίπων χυλομικρών, IDL και LDL, τα οποία προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στο ήπαρ (υποδοχέας LDL-R, υποδοχέας VLDL και πρωτεΐνες, που σχετίζονται με τον υποδοχέα LDL-R) ώστε να απομακρυνθούν από το πλάσμα (41).

Ο μεταβολισμός των καταλοίπων πραγματοποιείται κυρίως από την ApoE, ενώ οι δομικές μεταβολές, που πραγματοποιούνται κατά τη δημιουργία της LDL έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε προσδέτη για τον ειδικό υποδοχέα της. Σε περίπτωση που οι υποδοχείς της LDL είναι υπερφορτωμένοι με προσδέτες, η περίσσεια LDL μπορεί να απομακρυνθεί από την κυκλοφορία μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού, που ονομάζεται «μονοπάτι καθαρισμού» (scavenger pathway) (42). Το μονοπάτι αυτό ευνοεί την πρόσληψη οξειδωμένων σωματιδίων LDL. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και τα μακροφάγα και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων φορτωμένων με λιπίδια στον έσω χιτώνα των αιμοφόρων αγγείων. Η δημιουργία των κυττάρων αυτών προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού, ενώ παράλληλα εναποτίθενται αιμοπετάλια και ινοδωγόνο, γεγονότα τα οποία οδηγούν σε περαιτέρω καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Η λιπόλυση των TGs σε σωματίδια LDL μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μικρών σε μέγεθος LDL σωματιδίων. Αυτά τα μικρά, υψηλής πυκνότητας σωματίδια διαπερνούν τον αρτηριακό χιτώνα ευκολότερα και είναι πιο επιρρεπή στην οξείδωση, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση μακροφάγων και τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων.

Η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης λαμβάνει χώρα όταν οι ApoAI και ApoE ελεύθερες λιπιδίων, προσλαμβάνουν χοληστερόλη και φωσφολιπίδια ώστε να δημιουργηθούν σωματίδια HDL. Η πρωτεΐνη μεταφοράς ATP κασέτας σύνδεσης (ATP-binding cassette (ABC), transporter protein, ABCA1), αποτελεί μόριο κλειδί για την παραγωγή νέων σωματιδίων HDL. Περαιτέρω εμπλουτισμός με χοληστερόλη των σωματιδίων αυτών πραγματοποιείται μέσω των πρωτεϊνών ABCG1 και των υποδοχέων δέσμευσης, κατηγορίας B και τύπου I (scavenger receptor class B type I, SR-BI). Στην περίπτωση του SR-BI η ροή των μορίων χοληστερόλης είναι

αμφίδρομη. Η HDL χοληστερόλη μπορεί να επιστρέψει στο ήπαρ είτε με άμεση πρόσληψη από τον SR-BI είτε μέσω ανταλλαγής χολικού εστέρα με TGs σε ApoB λιποπρωτεΐνες με τη βοήθεια της CETP, η οποία ακολουθείται από πρόσληψη των σωματιδίων, που περιέχουν ApoB στο ήπαρ. Στην κυκλοφορία του αίματος αρκετές πρωτεΐνες και ένζυμα ρυθμίζουν την HDL. Η LCAT εστεροποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη σε χολικούς εστέρες, οι οποίοι είναι υδρόφοβοι και κατ' επέκταση τοποθετούνται στο εσωτερικό των κυστιδίων. Η LCAT ενεργοποιείται κυρίως από την apoAI. Μπορεί επίσης, να ενεργοποιηθεί και από τις apoAIV, apoCI και apoE (43). Υπάρχουν ενδείξεις ότι κατά την εστεροποίηση της χοληστερόλης σε HDL η κλίση συγκέντρωσης της ελεύθερης χοληστερόλης μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και της επιφάνειας του σωματιδίου HDL διατηρείται ώστε να υπάρχει συνεχής ροή χοληστερόλης από το κύτταρο στις λιποπρωτεΐνες. Η CETP μεταφέρει χολικούς εστέρες από την HDL σε πρωτεΐνες, που περιέχουν apoB. Η πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (phospholipid transfer protein, PLTP) μεταφέρει φωσφολιπίδια μεταξύ μορίων HDL και VLDL, καθώς επίσης και μεταξύ διαφορετικών HDL μορίων (20, 44).

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι απολιποπρωτεΐνες, που εναλλάσσονται όχι μόνο διαδραματίζουν ρόλο εξωκυτταρικά στην κυκλοφορία, διαμορφώνοντας την απομάκρυνση των λιποπρωτεϊνών, αλλά επηρεάζουν και την αποτελεσματικότητα και το ρυθμό της σύνθεσης και έκκρισης των λιποπρωτεϊνών (45). Επιπλέον, στοιχεία δείχνουν ότι οι απολιποπρωτεΐνες, που εναλλάσσονται συμμετέχουν στην κινητοποίηση των λιπιδίων και στην πρόσληψή τους κατά τη σύνθεση των λιποπρωτεϊνών και στην μεταφορά τους μέσω των εκκριτικών κυστιδίων του ΕΔ και του στοιχείου Golgi. Η λειτουργία τους αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του ρόλου τους στην απομάκρυνση των λιποπρωτεϊνών (46).

1.1 Τύποι Υπερλιπιδαιμιών

Οι διαταραχές των φυσιολογικών επιπέδων των λιποπρωτεϊνών στο αίμα χαρακτηρίζονται ως δυσλιπιδαιμίες. Συγκεκριμένα, αυξημένες τιμές τους παρατηρούνται στις υπερλιπιδαιμίες και αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (47, 48). Οι υπερλιπιδαιμίες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το λιπίδιο του οποίου τα επίπεδα είναι υψηλότερα του φυσιολογικού. Μπορεί να παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης, αυξημένη συγκέντρωση των TGs ή αυξημένη συγκέντρωση και των δύο.

Μια άλλη ταξινόμηση της υπερλιπιδαιμίας σε πρωτογενή ή δευτερογενή μπορεί να γίνει με βάση το αίτιο που την προκάλεσε. Οι πρωτογενείς υπερλιπιδαιμίες καλούνται και οικογενείς λόγω του γενετικού τους υποβάθρου και μπορεί να είναι μονογονιδιακές ή πολυγονιδιακές (49). Οι δευτερογενείς υπερλιπιδαιμίες εμφανίζονται ως αποτέλεσμα ενός άλλου νοσήματος ή κατάστασης (50).

1.2 Αίτια Υπερλιπιδαιμιών

Τα αίτια των υπερλιπιδαιμιών ποικίλλουν και μπορεί να είναι γενετικά, περιβαλλοντικά ή συνδυασμός και των δύο. Γενικά, τα κλινικά στοιχεία, που δείχνουν γενετικής προέλευσης υπερλιπιδαιμία, περιλαμβάνουν πολύ υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο αίμα ($>300\text{mg/dL}$), πολύ υψηλά επίπεδα TGs ($>500\text{mg/dL}$), ξανθώματα, οικογενειακό ιστορικό υπερλιπιδαιμίας ή πρόωμης καρδιαγγειακής νόσου, ή τέλος έλλειψη ανταπόκρισης στη μέγιστη δοσολογία θεραπευτικής αγωγής. Στον Πίνακα 3 παρατίθενται τα γενετικά αίτια των υπερλιπιδαιμιών.

Πίνακας 3. Γενετικά αίτια υπερχοληστερολαιμίας με τα κλινικά τους χαρακτηριστικά (51)

Αίτια	Κλινικά Χαρακτηριστικά
Μεμονωμένη αύξηση χοληστερόλης	
Οικογενής Υπερχοληστερολαιμία	Σχετικά συνήθης (1 στους 500 ετεροζυγώτες), η ολική χοληστερόλη ξεπερνά τα 300mg/dL. Εμφανίζεται σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό αυξημένης χοληστερόλης. Σχετίζεται με την εμφάνιση ξανθωμάτων στους τένοντες ενώ η πρόωγη (20-40 ετών) εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου είναι συνήθης. Οι ομοζυγώτες είναι σπάνιες περιπτώσεις αλλά εμφανίζουν επίπεδα ολικής χοληστερόλης >600mg/dL και εάν δεν τους χορηγηθεί θεραπεία συνήθως, πεθαίνουν από έμφραγμα του μυοκαρδίου μέχρι την ηλικία των 20 ετών.
Οικογενής έλλειψη απολιποπρωτεΐνης B100	Παρατηρείται αύξηση της LDL και παρουσιάζει φαινότυπο όμοιο με της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας.
Γενετικές μεταλλάξεις, που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα LDL	Σπάνιες και μεμονωμένες περιπτώσεις, οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία.
Αυξημένα επίπεδα Λιποπρωτεΐνης(α) στο πλάσμα	Η συσχέτιση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι ασαφής. Υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες (52, 53).
Πολυγονιδιακή Υπερχοληστερολαιμία	Χωρίς οικογενειακό ιστορικό, χωρίς φυσικές εκδηλώσεις, όπως ξανθώματα, τα ακριβή αίτια είναι άγνωστα.
Lp(X)	Σχετίζεται με αποφρακτική ηπατική νόσο. Ασαφής παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα
Σιτοστερολαιμία	Σπάνια περίπτωση, παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση φυτικών στερολών, εμφάνιση τενόντιων ξανθωμάτων κατά την παιδική ηλικία και αυξημένα επίπεδα LDL.
Εγκεφαλοτενόντια ξανθωμάτωση	Σπάνια περίπτωση, σχετίζεται με νευρολογικές διαταραχές, τενόντια ξανθώματα και καταρράκτη σε πολύ νεαρή ηλικία.
Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και TGs	
Μεικτή Οικογενής υπερλιπιδαιμία	Μπορεί να εμφανιστεί ανεξάρτητα ή με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό υπερλιπιδαιμίας. Σχετίζεται με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και το μεταβολικό σύνδρομο, γεγονός που δυσχεραίνει τη διάγνωση.
Οικογενής δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία (νόσος των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων)	Σοβαρή υπερτριγλυκερολαιμία και υπερχοληστερολαιμία (>300mg/dL), που σχετίζεται με πρόωγη διάχυτη αγγειακή νόσο. Μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στους άνδρες. Τα ξανθώματα Palmar αποτελούν παθογνωμονικό κριτήριο.
Ανεπάρκεια ηπατικής λιπάσης	Σπάνια διαταραχή με πολύ υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και TGs, φαινοτυπικά όμοια με την οικογενή δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία.
Μεμονωμένη αύξηση TGs	
Ανεπάρκεια LPL	Εμφάνιση υψηλών επιπέδων χυλομικρών, τα οποία μεταφέρουν λίπος, που προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής. Φυσιολογικά, τα χυλομικρά δεν ανιχνεύονται μετά από ολονύκτια νηστεία. Κατά συνέπεια, κρεμώδης εμφάνιση του πλάσματος μετά από νηστεία αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη διάγνωση, ειδικά εάν ο ασθενής είναι νεαρής ηλικίας. Πολύ υψηλά επίπεδα TGs δύνανται να οδηγήσουν στην εμφάνιση παγκρεατίτιδας.
Ανεπάρκεια ApoCII	Απουσία της ApoCII δημιουργεί όμοια κλινική Εικόνα με την ανεπάρκεια LPL.
Οικογενής υπερτριγλυκερολαιμία	Αυτοσωμικό επικρατές νόσημα. Προκαλεί υπερπαραγωγή VLDL και TGs από το ήπαρ.

Πέραν των γενετικών αιτίων, οι υπερλιπιδαιμίες έχουν και δευτερογενή αίτια κυρίως, περιβαλλοντικά, όπως η διατροφή, η λήψη φαρμάκων, η ταυτόχρονη παρουσία άλλων νοσημάτων, η εγκυμοσύνη (ειδικά στο 3^ο τρίμηνο) (Πίνακας 4). Ένα πολύ σημαντικό αίτιο υψηλής χοληστερόλης στο αίμα είναι ο υποθυρεοειδισμός, καθώς προκαλεί αύξηση των επιπέδων της χοληστερόλης και η μείωση των επιπέδων της θυρεοειδικής ορμόνης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μυοπάθειας σχετιζόμενης με στατίνες (51). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες στη δευτερογενή υπερλιπιδαιμία είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεφρική νόσος και ο αλκοολισμός. Το σύνδρομο Ανθρώπινης Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired immune deficiency syndrome, AIDS) επίσης, αποτελεί παράγοντα κινδύνου τόσο λόγω αυτής καθαυτής της μόλυνσης όσο και λόγω της χορήγησης αναστολέων των πρωτεασών, οι οποίοι δύνανται να οδηγήσουν σε ανωμαλίες των επιπέδων των λιπιδίων στο αίμα (54).

Η παχυσαρκία, ανάλογα με τη διάρκεια και το επιπλέον βάρος, μπορεί σταδιακά να προκαλέσει ή να επιβαρύνει ένα ευρύ φάσμα νοσημάτων όπως η δυσλιπιδαιμία, το μεταβολικό σύνδρομο και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II. Η τυπική κλινική Εικόνα της δυσλιπιδαιμίας λόγω παχυσαρκίας είναι αυξημένα επίπεδα TGs, χαμηλά επίπεδα HDL και υψηλά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης. Επιπλέον, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) παράγονται *in vivo* υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προκύψει μέσω αλληλεπιδράσεων των λιπιδίων με ROS. Η υπερλιπιδαιμία κατά την παχυσαρκία σχετίζεται επίσης, με το οξειδωτικό στρες, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωμένης LDL, η οποία περαιτέρω οδηγεί στην εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης (55).

Πίνακας 4. Δευτερογενή αίτια υπερλιπιδαιμίας (56)

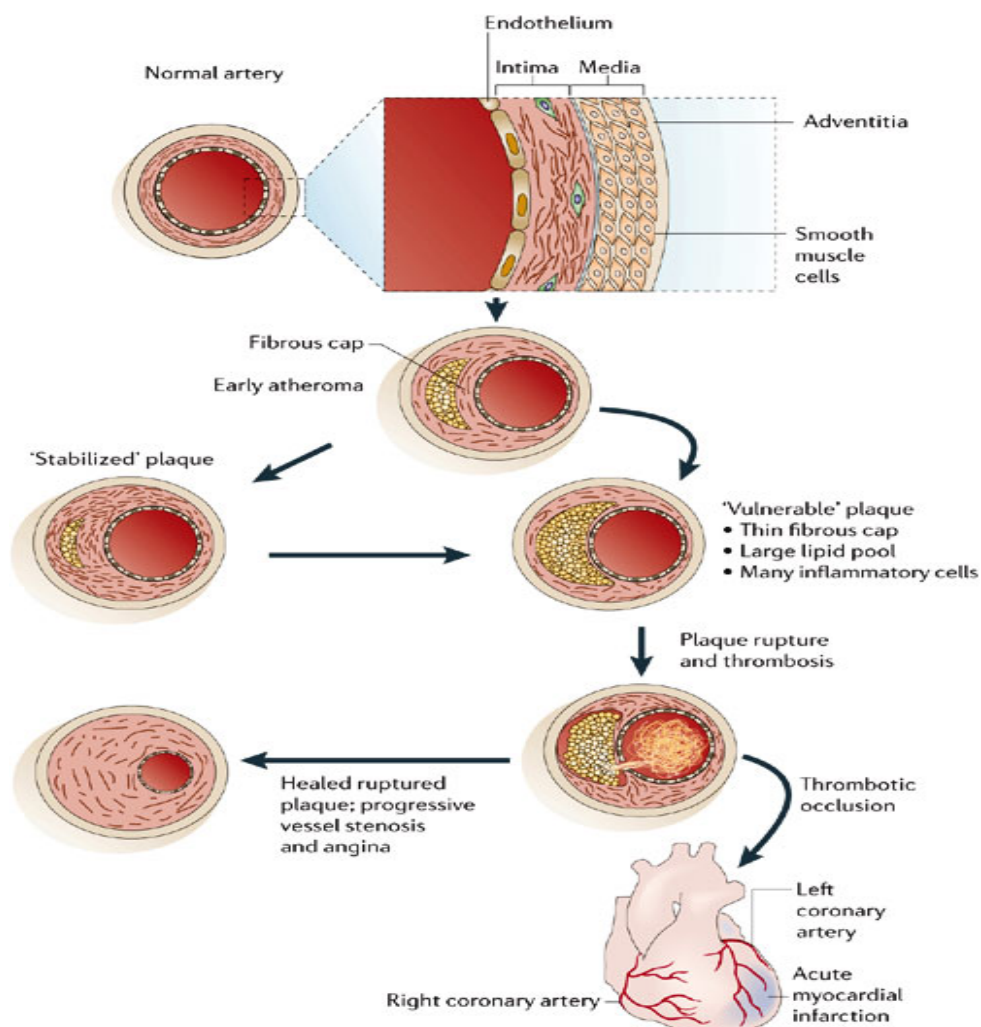
Διατροφικοί παράγοντες	Φαρμακευτικοί παράγοντες	Συνοπάρχοντα Νοσήματα και Διαταραχές μεταβολισμού
Κορεσμένα και <i>trans</i> λιπαρά	Θειαζιδικά διουρητικά	Υποθυρεοειδισμός
Περίσσεια θερμίδων	β-αναστολείς	Παχυσαρκεία
Κατανάλωση αλκοόλ	Γλυκοκορτικοειδή	Σακχαρώδης Διαβήτης (Διαβήτης τύπου II)
Κατανάλωση κόκκινου κρέατος	Ορμόνες φύλου	Μεταβολικό σύνδρομο
Κατανάλωση πλήρους γάλακτος	Παράγωγα ρετινοϊκού οξέως	Νεφρική νόσος
Κατανάλωση προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη	Αντιψυχωσικά	AIDS
	Ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες	Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
	Αντικα φάρμακα	Παραπρωτεϊναιμία
		Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

1.3 Συμμετοχή της υπερλιπιδαιμίας στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων - Παθοφυσιολογία

Ο λόγος, που η υπερλιπιδαιμία αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ατόμου είναι η πολύ καλά τεκμηριωμένη σχέση της με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η διαδικασία απόδειξης της σχέσης αιτίου-αιτιατού των επιπέδων χοληστερόλης με τα καρδιαγγειακά νοσήματα ξεκινάει τον 18^ο αιώνα με την παρατήρηση της λιπώδους φύσης της αθηρωματικής πλάκας από τον Nicolai Anitschkow το διάστημα 1912-1930. Ο Anitschkow παρατήρησε ότι ασθενείς με αθηροσκλήρυνση και στεφανιαία νόσο εμφάνιζαν συχνά υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. Η μελέτη ορόσημο, που στην ουσία απέδειξε ότι η θεραπευτική παρέμβαση για την μείωση των επιπέδων των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της νοσηρότητας/θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν η «Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial». Η μελέτη αυτή δημοσιεύτηκε σε δύο μέρη το 1984 (57, 58). Πληθώρα και άλλων μελετών, τόσο πριν όσο και μετά το 1984, υποδείκνυαν την ύπαρξη σύνδεσης της υπερλιπιδαιμίας με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Περαιτέρω επιδημιολογικές μελέτες τις επόμενες δεκαετίες επιβεβαίωσαν τα αρχικά ευρήματα (59-63) και υπέδειξαν τη διατροφή ως σημαντικό παράγοντα, που σχετίζεται με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (64). Παρόλα αυτά, η επιστημονική κοινότητα χρειάστηκε δεκαετίες για να αποδεχθεί πλήρως αυτή τη σύνδεση. Πλήρης ανάλυση αυτής της αντιπαράθεσης μπορεί να βρεθεί σε μία σειρά άρθρων ανασκόπησης που δημοσιεύτηκαν στο Journal of Lipid Research (65-69).

Όπως προαναφέρθηκε, η υπερλιπιδαιμία αποτελεί το κύριο αίτιο της αθηροσκλήρυνσης και κατ' επέκταση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ως αθηροσκλήρυνση μπορεί να οριστεί ο εκφυλισμός του έσω χιτώνα των μεσαίων και μεγάλων αρτηριών του οργανισμού. Ο εκφυλισμός αυτός περιλαμβάνει τη

συσσώρευση λιπιδίων, συμπλόκων υδατανθράκων, αίματος και παραγώγων του και κυτταρικών απορριμμάτων και συνοδεύεται από τη δημιουργία ινώδους ιστού και την εναπόθεση ασβεστίου στον έσω χιτώνα των αγγείων. Οι εναποθέσεις αυτές, ή αλλιώς αθηρωματικές πλάκες, μειώνουν προοδευτικά τη διάμετρο των αρτηριών, την ελαστικότητά τους και μπορούν να δημιουργήσουν εστίες θρόμβωσης και απόφραξης των αιμοφόρων αγγείων. Τα διαφορετικά στάδια της αθηροσκλήρυνσης, από τη φυσιολογική υγιή κατάσταση μέχρι το τελικό στάδιο της πλήρους απόφραξης παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

Εικόνα 2. Στάδια αθηροσκλήρυνσης

Αρχικά ο εσωτερικός χιτώνας των αρτηριών είναι λείος. Με την αύξηση της ηλικίας, χοληστερόλη και TGs εναποτίθενται στα τοιχώματα δημιουργώντας ένα ραβδωτό στρώμα, το οποίο όμως δεν δημιουργεί δυσλειτουργία ή συμπτώματα. Η περαιτέρω εναπόθεση στρωμάτων λίπους έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της διαμέτρου των αγγείων, ενώ η κυκλοφορία του αίματος αρχίζει να παρεμποδίζεται. Στη συνέχεια, καθώς το ινωδογόνο εναποτίθεται στην πάσχουσα περιοχή, τα στρώματα λιπιδίων γίνονται πιο σταθερά δημιουργώντας αθηρωματικές πλάκες και δυσχεραίνεται ακόμα περισσότερο η κυκλοφορία, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού. Σε κάποιες περιπτώσεις οι αθηρωματικές πλάκες μπορεί να διαρραγούν γεγονός, που προκαλεί τη δημιουργία θρόμβων. Εάν ο θρόμβος διακόψει πλήρως την παροχή αίματος σε περιοχή του μυοκαρδίου, προκαλείται οξύ ισχαιμικό επεισόδιο/έμφραγμα, σε αντίθετη περίπτωση το αγγείο μπορεί να «κλείσει» το ρήγμα που δημιουργήθηκε στην αθηρωματική πλάκα, αλλά αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω στένωση του αγγείου.

1.4 Θεραπευτική Προσέγγιση Υπερλιπιδαιμιών

1.4.1 Τρέχουσες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις: Πλεονεκτήματα -Μειονεκτήματα

Η πρόληψη και θεραπεία των υπερλιπιδαιμιών πρέπει πάντοτε να εξετάζεται στο ευρύτερο πλαίσιο της πρόληψης της καρδιαγγειακής νόσου, όπως αναφέρεται στις κατευθυντήριες γραμμές των Joint European Societies. Τα μόρια-στόχοι για τη θεραπεία της υπερλιπιδαιμίας βασίζονται κυρίως σε αποτελέσματα από κλινικές δοκιμές. Σε όλες σχεδόν τις κλινικές δοκιμές τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης αποτελούν δείκτη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Κατ' επέκταση, η LDL αποτελεί τον κύριο θεραπευτικό στόχο στις περισσότερες στρατηγικές διαχείρισης της υπερλιπιδαιμίας. Σε πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης αρκετών κλινικών

δοκιμών, με συνολικό αριθμό συμμετεχόντων 170.000 ασθενείς, επιβεβαιώθηκε η δοσοεξαρτώμενη μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων με την αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης (70).

Οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν διάφορα φαρμακευτικά μόρια: (i) στατίνες, (ii) συμπλοκοποιητές χολικού οξέος, (iii) αναστολείς απορρόφησης χοληστερόλης, (iv) νικοτινικό οξύ, (v) φιβράτες, και (vi) ω-3 λιπαρά οξέα.

Οι **στατίνες** αποτελούν ίσως τα πιο καλά μελετημένα φάρμακα για την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μειώνουν τη σύνθεση της χοληστερόλης στο ήπαρ μέσω της πλήρους αναστολής της ενεργότητας της αναγωγής του υδροξυ-μεθυλ-γλουταρυλ-συνενζύμου A (hydroxymethylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA). Η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της χοληστερόλης επάγει την έκφραση του υποδοχέα LDL-R στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης της LDL χοληστερόλης από το αίμα και τη μείωση και άλλων ApoB λιποπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πλούσιων σε TGs σωματιδίων. Μεγάλης κλίμακας κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι οι στατίνες μειώνουν σημαντικά την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα τόσο σε πρωτογενές όσο και σε δευτερογενές επίπεδο πρόληψης (70-72). Επιπλέον, φαίνεται να μειώνουν τον ρυθμό εξέλιξης της αθηροσκλήρυνσης (73-76). Οι στατίνες διαφέρουν ως προς την απορρόφηση, τη βιοδιαθεσιμότητα, την ικανότητά τους να προσδένονται σε πρωτεΐνες του πλάσματος, τον ρυθμό έκκρισης και τη διαλυτότητά τους. Αν και η θεραπεία με στατίνες έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου, υπάρχει διακύμανση τόσο στην απόκριση στη θεραπεία όσο και στη συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Παράγοντες, όπως η προχωρημένη ηλικία, το μικρό

μέγεθος σώματος, το φύλο, η νεφρική και ηπατική δυσλειτουργία, η περιεγχειρητική περίοδος, ο υποθυρεοειδισμός, η ύπαρξη πολυσυστημιακής νόσου και η κατάχρηση αλκοόλ αυξάνουν την πιθανότητα ανεπιθύμητων ενεργειών. Η πιο σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια, που σχετίζεται με τη θεραπεία με στατίνες, είναι η μυοπάθεια, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ραβδομυόλυση, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο. Η αύξηση των επιπέδων της φωσφοκινάσης της κρεατινίνης (creatinine phosphokinase, CK) αποτελεί τον κύριο δείκτη για τον κυτταρικό θάνατο μυϊκών κυττάρων. Οι στατίνες μπορεί επίσης, να επηρεάσουν την ηπατική λειτουργία. Η ενεργότητα της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) και της ασπαρτικής αμινοτρανσαμινάσης (AST) στο πλάσμα του αίματος χρησιμοποιείται συνήθως, από τους κλινικούς για την αξιολόγηση ενδεχόμενης ηπατοκυτταρικής βλάβης. Αυξημένα επίπεδα ηπατικών τρανσαμινασών εμφανίζονται στο 0,5-2,0% των ασθενών, που λαμβάνουν θεραπεία με στατίνες και είναι δοσοεξαρτώμενα. Το εάν η αύξηση των επιπέδων των τρανσαμινασών αποτελεί πραγματική ένδειξη ηπατοτοξικότητας δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ενώ η εξέλιξη σε ηπατική ανεπάρκεια είναι εξαιρετικά σπάνια. Η πρόσφατη ανακάλυψη, ότι η πιθανότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη μπορεί να αυξηθεί έπειτα από θεραπεία με στατίνες, δεν πρέπει να αποθαρρύνει τη χρήση τους. Η απόλυτη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου υπερτερεί των πιθανών αρνητικών επιπτώσεων μιας πολύ μικρής αύξησης στη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη (77). Άλλες μελέτες αναφέρουν και άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες, που σχετίζονται με τη θεραπεία με στατίνες (78, 79) όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος Alzheimer και ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος. Οι παρατηρήσεις αυτές χρειάζονται επιβεβαίωση, κατά προτίμηση με τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη, και τονίζουν την ανάγκη μακροπρόθεσμης φαρμακοεπιτήρησης.

Τα χολικά οξέα συντίθενται στο ήπαρ από τη χοληστερόλη και απελευθερώνονται στον εντερικό αυλό. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιστρέφει στο ήπαρ από την τελική μοίρα του ειλεού μέσω ενεργητικής απορρόφησης. Οι πρώτες δεσμευτικές ουσίες των χολικών οξέων, που χρησιμοποιήθηκαν, η χολεστυραμίνη (colestyramine) και η χολεστιπόλη (colestipol), είναι ανιονικές ιοντοανταλλακτικές ρητίνες, που δεσμεύουν αρνητικά φορτισμένα χολικά οξέα και χολικά άλατα από το λεπτό έντερο. Πρόσφατα, προστέθηκε και η χολησεβελάμη (colesevelam), η οποία λειτουργεί με αντίστοιχο μηχανισμό δράσης. Οι δεσμευτικές ουσίες των χολικών οξέων δεν απορροφώνται συστηματικά και δεν επιδέχονται τροποποίησης από τα πεπτικά ένζυμα. Ως εκ τούτου, τα ευεργετικά αποτελέσματα είναι έμμεσα. Με τη δέσμευση των χολικών οξέων, τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν την είσοδο των χολικών οξέων στο αίμα και έτσι απομακρύνεται ένα μεγάλο μέρος των χολικών οξέων από την εντεροηπατική κυκλοφορία. Το ήπαρ, απεμπλουτισμένο από χολή, συνθέτει παραπάνω χοληστερόλη προς αποθήκευση στο ήπαρ. Η μείωση των χολικών αλάτων του ήπατος οδηγεί στην αυξορρόθμιση ενζύμων καθοριστικών για τη σύνθεση χολικών αλάτων από χοληστερόλη και κυρίως, του κυτοχρώματος CYP7A1. Η αύξηση του ρυθμού καταβολισμού της χοληστερόλης σε χολικά οξέα έχει ως αποτέλεσμα την αντισταθμιστική αύξηση της ενεργότητας των ηπατικών LDL-R, απομακρύνοντας την LDL χοληστερόλη από την κυκλοφορία και κατ' επέκταση μειώνοντας τα επίπεδα της LDL. Επιπλέον, οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στους υπεργλυκαιμικούς ασθενείς, χωρίς όμως να έχει βρεθεί ο αντίστοιχος μηχανισμός δράσης. Λαμβάνοντας αυτές τις ουσίες στη μέγιστη δοσολογία, έχει παρατηρηθεί μείωση της LDL χοληστερόλης κατά 18-25%, καμία επίδραση στην HDL, ενώ τα TGs μπορεί να αυξηθούν σε ασθενείς με προδιάθεση. Στις κλινικές δοκιμές φαίνεται ότι οι δεσμευτικές ουσίες των χολικών οξέων

συνεισφέρουν σημαντικά στη μείωση της εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σε υπερχοληστεραιμικούς ασθενείς, με το όφελος να είναι ανάλογο της μείωσης της LDL χοληστερόλης (80). Ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό σύστημα (συνηθέστερα μετεωρισμός, δυσκοιλιότητα, δυσπεψία και ναυτία) εμφανίζονται συχνά, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις, γεγονός το οποίο περιορίζει την πρακτική τους χρήση. Οι παρενέργειες αυτές μπορεί να ελαττωθούν με την έναρξη της θεραπείας σε χαμηλές δόσεις και την ταυτόχρονη κατανάλωση άφθονων υγρών. Η δόση πρέπει να αυξάνεται σταδιακά. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μειωμένη απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών. Παράλληλα τα δεσμευτικά των χολικών οξέων φάρμακα αλληλεπιδρούν με πολλά ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα και θα πρέπει να λαμβάνονται σε διαφορετική χρονική στιγμή.

Η εξετιμίμπη (ezetimibe) είναι ο πρώτος υπολιπιδαιμικός παράγοντας, που αναστέλλει την απορρόφηση της προερχόμενης από τη διατροφή ή τη χολή χοληστερόλης από τον εντερικό αυλό χωρίς να επηρεάζει την απορρόφηση λιποδιαλυτών θρεπτικών ουσιών. Η εξετιμίμπη εμποδίζει την απορρόφηση της χοληστερόλης από τις λάχνες του βλεννογόνου του εντερικού αυλού, αλληλοεπιδρώντας με την Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) πρωτεΐνη, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της χοληστερόλης, που μεταφέρεται στο ήπαρ. Ως απόκριση στη μείωση της χοληστερόλης, το ήπαρ αυξάνει τη σύνθεση των LDL-Rs, οι οποίοι με τη σειρά τους αυξάνουν το ρυθμό μεταφοράς της χοληστερόλης από το αίμα προς το ήπαρ. Το ποσοστό μείωσης της LDL χοληστερόλης σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, που λαμβάνουν μονοθεραπεία εξετιμίμπης κυμαίνεται στο 15-22%, ενώ η συνδυαστική θεραπευτική αγωγή με στατίνες επιφέρει επιπλέον μείωση 15-20% σύμφωνα με τις κλινικές δοκιμές (81). Η εξετιμίμπη απορροφάται γρήγορα από τον οργανισμό και μεταβολίζεται στην φαρμακολογικά ενεργό μορφή της, το

γλυκουρονίδιο της εξετιμίμπης. Δεν έχουν αναφερθεί κλινικώς σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες πέραν της ήπιας αύξησης των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων και της μυαλγίας.

Το νικοτινικό οξύ έχει ευρεία ρυθμιστική δράση στα λιπίδια, καθώς φαίνεται να αυξάνει κατά 25% την HDL χοληστερόλη με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και παράλληλα να μειώνει κατά 15-18% την LDL χοληστερόλη και κατά 20-40% τα TGs. Επιπλέον, μειώνει τα επίπεδα Lp(a) κατά 30%. Ως εκ τούτου χορηγείται σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα HDL αλλά και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ή μεταβολικό σύνδρομο. Επίσης, μπορεί να χορηγηθεί σε συνδυασμό με στατίνες (82). Το νικοτινικό οξύ μειώνει την είσοδο των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και την έκκριση της VLDL από το ήπαρ. Η δράση αυτή μεσολαβείται από την επίδραση του νικοτινικού οξέως στην ορμονο-ευαίσθητη λιπάση του λιπώδους ιστού. Στο ήπαρ, το νικοτινικό οξύ αναστέλλει την ακετυλο-τρανσφεράση-2 της διακετυλογλυκερόλης (diacyl-glycerol-acyl-transferase-2, DGAT-2) με αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης των VLDL σωματιδίων από το ήπαρ και κατ' επέκταση τη μείωση των IDL και LDL σωματιδίων. Η αύξηση της HDL χοληστερόλης και της ApoA1 οφείλεται κυρίως στην αύξηση της παραγωγής ApoA1 στο ήπαρ (83). Η πιο συχνά αναφερόμενη ανεπιθύμητη ενέργεια του νικοτινικού οξέως είναι οι δερματικές αντιδράσεις (ερυθρότητα), ενώ σχετικά σπάνιες είναι η υπερουριχαιμία (αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος στα ούρα), η ηπατοτοξικότητα και η μελανίζουσα ακάνθωση. Η ύπαρξη ειδικών υποδοχέων για το νικοτινικό οξύ στα μακροφάγα του δέρματος πιθανόν, αποτελεί το λόγο για την εμφάνιση της ερυθρότητας, που συνοδεύεται από κνησμό και τσούξιμο. Επιπλέον, η χορήγηση νικοτινικού οξέως μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και θα πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη.

Οι **φιβράτες** είναι αγωνιστές του PPARα, που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών σε πολλαπλά επίπεδα. Αλληλοεπιδρώντας με τον PPARα, οι φιβράτες προσδένονται σε ορισμένους συμπαράγοντες, και ρυθμίζουν τη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες, που μειώνουν δραστικά τα επίπεδα των TGs. Παράλληλα, αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (82). Τα πλεονεκτήματα της μονοθεραπείας με φιβράτες περιγράφονται πολύ αναλυτικά σε 4 τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές: την Helsinki Heart Study (HHS), την Veterans Affairs High density lipoprotein Intervention Trial (VA-HIT), την Bezafibrate Infarction Prevention study (BIP) και τη FIELD (84-87). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, εμφανίζεται σταθερή μείωση των μη θανατηφόρων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου μετά από χορήγηση φιβρατών, με τη μείωση αυτή να είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με υψηλά επίπεδα TGs και χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης. Οι φιβράτες είναι γενικά καλά ανεκτές από τον οργανισμό, με ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες: ενοχλήσεις από το πεπτικό σύστημα εμφανίζονται στο 5% των ασθενών και δερματικά εξανθήματα στο 2% (88). Στη μελέτη FIELD, παρατηρήθηκε μικρή αλλά σημαντική αύξηση των περιστατικών παγκρεατίτιδας (0,8% έναντι 0,5%) και πνευμονικής εμβολής (1,1% έναντι 0,7%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, και μία μικρότερης στατιστικής βαρύτητας αύξηση των περιστατικών με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (1,4% έναντι 1,0%), παρατηρήσεις οι οποίες συμφωνούν και με τις υπόλοιπες μελέτες. Αύξηση της κρεατινικής κινάσης και της ALT παρατηρήθηκε συχνότερα στους ασθενείς, υπό φιβράτες αλλά το ποσοστό εμφάνισης αυτών των ανεπιθύμητων δράσεων ήταν πολύ χαμηλό και στις δύο ομάδες (φιβρατών και ελέγχου). Η πιθανότητα εμφάνισης μυοπάθειας φαίνεται να είναι 5,5 φορές υψηλότερη σε ασθενείς, που ακολουθούν μονοθεραπεία με φιβράτες σε σύγκριση με εκείνους που παίρνουν στατίνες (88) και φαίνεται να αυξάνεται επιπλέον

στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί περιστατικά αύξησης των επιπέδων κρεατινίνης και ομοκυστεΐνης στο ορό του αίματος τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα, φαινόμενο που μάλλον εξαρτάται από των τύπο των φιβρατών που χορηγούνται. Το εάν η αύξηση της κρεατινίνης του ορού αντανakλά νεφρική δυσλειτουργία ή όχι βρίσκεται υπό συζήτηση, αλλά συνιστάται η ετήσια παρακολούθηση των επιπέδων κρεατινίνης στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Η αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης θεωρείται σχετικά αθώα σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, μπορεί να μειώσει την απόδοση της θεραπείας, καθώς επηρεάζει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της ApoA1 (89). Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης συμβάλλουν επίσης, στη δημιουργία θρόμβων, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης πνευμονικής εμβολής και εν τω βάθι φλεβοθρόμβωσης που αναφέρει η μελέτη FIELD για τους ασθενείς, που ακολουθούν αγωγή με φιβράτες.

Τα ω-3 λιπαρά οξέα (το εικοσιπενταενοϊκό οξύ, eicosapentaenoic acid - EPA και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ, docosahexaenoic acid - DHA) αποτελούν συστατικά του ιχθυελαίου και σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής και χορηγούνται για τη μείωση των TGs. Σε φαρμακολογικές δόσεις (>2g/ημέρα) επηρεάζουν τα λιπίδια και τις λιποπρωτεΐνες του ορού και κυρίως, τα επίπεδα της VLDL. Ο υποκείμενος μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά πιθανόν σχετίζεται με την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τους PPARs και με τη μείωση της έκκρισης της ApoB. Το ιχθυέλαιο μειώνει τα TGs κατά ~30% με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ η επίδρασή του στις άλλες λιποπρωτεΐνες είναι αμελητέα (90). Η συνιστώμενη δοσολογία κυμαίνεται μεταξύ 2-4g/ημέρα. Η χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων φαίνεται να είναι ασφαλής και δεν αναφέρονται φαρμακολογικές αλληλεπιδράσεις με άλλα

φάρμακα. Παρόλα αυτά συνίσταται προσοχή, καθώς η αντιθρομβωτική τους δράση μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα αιμορραγίας, ειδικά όταν χορηγούνται μαζί με ασπιρίνη ή/και κλοπιδογρέλη.

Παρά το γεγονός ότι η μονοθεραπεία είναι σε γενικές γραμμές αποδοτική, ένα ποσοστό ασθενών, είτε υψηλού κινδύνου είτε με πολύ υψηλές τιμές LDL, μπορεί να απαιτεί συνδυαστική θεραπευτική αγωγή (91). Ο συνδυασμός στατινών και δεσμευτικών ουσιών των χολικών οξέων φαίνεται να μειώνει την LDL χοληστερόλη 10-20% επιπλέον (92, 93). Η χορήγηση εξετιμίμπης με στατίνες επιφέρει επιπλέον μείωση της τάξης του 15-20% (94). Σε σπάνιες περιπτώσεις πολύ σοβαρών υπερλιπιδαιμιών, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ομοζυγωτίας ή σοβαρής ετεροζυγωτίας οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας, λαμβάνεται υπόψη και αξιολογείται η ανάγκη για αφαίρεση μεγάλου ποσοστού LDL. Κατά την ακριβή αλλά αποτελεσματική αυτή τεχνική, οι LDL και Lp(a) αφαιρούνται από το πλάσμα του αίματος τους ασθενούς κάθε 1-2 εβδομάδες. Η παρεμβατική αυτή τεχνική πραγματοποιείται μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα.

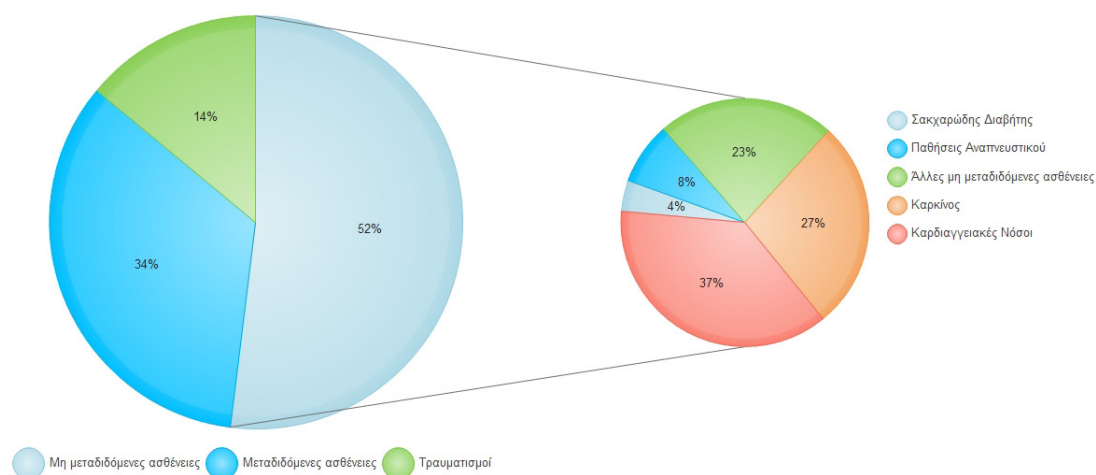
1.4.2 Νέες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Πρόσφατα, αρκετά νέα πολλά υποσχόμενα φάρμακα πέρασαν στη Φάση III των κλινικών δοκιμών και φαίνεται να μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης σε σοβαρές περιπτώσεις υπερχοληστερολαιμίας: (i) οι αναστολείς μικροσωμικών πρωτεϊνών μεταφοράς (microsomal transfer protein, MTP inhibitors) (95), ii) τα ανάλογα της θυρεοειδικής ορμόνης με ηπατική εκλεκτικότητα (96) και iii) τα ολιγονουκλεοτίδια, όπως η μιπομερσένη, που μειώνουν ειδικά τα επίπεδα της ApoB (97). Σύμφωνα με στοιχεία της επίσημης ιστοσελίδας για τις κλινικές δοκιμές του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NationalInstituteofHealth, NIH) των ΗΠΑ, αυτή τη

στιγμή διενεργούνται πάνω από 1500 κλινικές δομικές σχετικές με τις υπερλιπιδαιμίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι άνω των 600 κλινικών δοκιμών σχετίζονται με την ανάπτυξη νέων υπολιπιδαιμικών παραγόντων (98).

2 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Σύμφωνα με την τελευταία Έκθεση Προόδου για τις μη μεταδοτικές ασθένειες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2014 (99), από τα 56 εκατομμύρια θανάτους που αναφέρθηκαν το 2012, τα 38 εκατομμύρια οφείλονταν σε μη μεταδοτικές ασθένειες (MMA) και κυρίως σε καρδιαγγειακές νόσους, τον καρκίνο καθώς και χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ποσοστό θανάτων παγκοσμίως, 2012

Παράλληλα, ο ετήσιος αριθμός θανάτων από μεταδιδόμενες ασθένειες φαίνεται να εμφανίζει πτωτικές τάσεις, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός για τις MMA αυξάνεται και εκτιμάται ότι θα αγγίξει τα 52 εκατομμύρια έως το 2030 (100, 101).

Έμφραγμα μυοκαρδίου εμφανίζεται όταν η ισχαιμία του μυοκαρδίου, δηλαδή η μειωμένη παροχή αίματος προς της καρδιά, υπερβαίνει ένα κρίσιμο όριο και ξεπερνά τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, που επιστρατεύει ο οργανισμός, προκειμένου να αντιμετωπίσει τη βλάβη. Η παρατεταμένη ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη βλάβη του μυοκαρδίου ή θάνατο. Η αθηροσκλήρυνση

είναι εν πολλοίς υπεύθυνη για την απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων, που αιματώνουν το μυοκάρδιο. Σε περίπτωση πλήρους απόφραξης κάποιου κλάδου τους η περιοχή του μυοκαρδίου, που υπό φυσιολογικές συνθήκες αιματώνεται από αυτόν τον κλάδο, παύει πλέον να δέχεται αίμα και έτσι νεκρώνεται (102). Οι βασικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης και ισχαιμίας του μυοκαρδίου είναι: (i) η υπερλιπιδαιμία, (ii) ο σακχαρώδης διαβήτης, (iii) η υπέρταση, (iv) το κάπνισμα, (v) το φύλο και (vi) το οικογενειακό ιστορικό (103).

Η υπερλιπιδαιμία και πιο συγκεκριμένα η υπερχοληστερολαιμία κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Προκαλεί βλάβες απευθείας στο μυοκάρδιο επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων, που σχετίζονται με την εύρυθμη λειτουργία του, όπως για παράδειγμα εκείνων, που επάγουν το οξειδωτικό stress στο μυοκάρδιο, την απόπτωση, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του μυοκαρδίου και την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ισχαιμίας (102). Για το λόγο αυτό, η θεραπευτική προσέγγιση σε περίπτωση ισχαιμίας του μυοκαρδίου, έχει ως κύριο άξονα τη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων, τόσο σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όσο και σε ασθενείς χαμηλού ή μέτριου κινδύνου, με βάση το μοντέλο SCORE (104).

3 ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ

Το ελαιόδεντρο ή ελιά, *Ελαία η ευρωπαϊκή (Olea europaea)*, ανήκει στο γένος *Ελαία (Olea)* της οικογένειας των *Ελαιοειδών (Oleaceae)*, το οποίο περιλαμβάνει περισσότερα από σαράντα είδη, υποείδη και ποικιλίες. Είναι καρποφόρο δέντρο, αειθαλές με φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, στην άνω επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω. Το κύριο χαρακτηριστικό του γένους *olea* είναι η μακροζωία και η διατήρηση της παραγωγικότητας. Υπάρχουν υπεραιώνόβια δένδρα στην περιοχή της Μεσογείου, τα οποία παράγουν ακόμη καρπό. Πολλά μάλιστα ξεπερνούν την χιλιετία. Στην Ελλάδα, τα παλαιότερα ευρήματα που αποδεικνύουν την παρουσία ελαιόδενδρου αφορούν απολιθωμένα φύλλα ελιάς, ηλικίας περίπου 50.000-60.000 ετών, που βρέθηκαν στην καλντέρα της Σαντορίνης, ενώ κομμάτια απανθρακωμένου ξύλου ελιάς έχουν βρεθεί στην κοιλάδα της Ιορδανίας και χρονολογούνται στο 42.980 π.Χ. (105).



Εικόνα 4: Αμφορέας, που απεικονίζει τη συγκομιδή ελιάς, 520 π.Χ.

Λόγω της διαχρονικά τεράστιας συμβολής της ελιάς στη διατροφή, την ιατρική, την οικονομία, τη θρησκεία και γενικότερα την εξέλιξη των αρχαίων πολιτισμών, πολλοί λαοί είναι εκείνοι, που μέχρι σήμερα διεκδικούν την πατρότητα της καλλιεργήσιμης ποικιλίας της. Ωστόσο, στην πλειοψηφία της η επιστημονική κοινότητα, αν και διαφωνεί για την τοποθεσία, συμφωνεί πως η καλλιέργεια του δέντρου ξεκίνησε γύρω στα 6.000 χρόνια πριν (106).

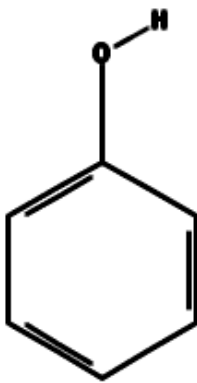
Από το 4.000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση για θεραπευτικούς σκοπούς τόσο του καρπού και των φύλλων της ελιάς, όσο και του ελαιόλαδου. Ο Αριστοτέλης μελέτησε το ελαιόδεντρο ενώ ο μαθητής του Θεόφραστος, πατέρας της Βοτανικής, ανήγαγε την καλλιέργεια του σε επιστήμη. Ο Σόλων (639-559 π.Χ.) νομοθέτησε την προστασία του, ενώ ο Ιπποκράτης θεράπευε με φύλλα ελιάς έλκη, μυϊκούς πόνους και διάφορες γυναικολογικές παθήσεις. Στα έργα του, τα οποία είναι συγκεντρωμένα στην Ιπποκρατική Συλλογή, αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές χρήσεις του ελαιόλαδου, οι οποίες περιλαμβάνουν τη θεραπεία χρόνιων πυρετών, μικρών πληγών, διηθημάτων καθώς και δερματολογικές ασθένειες, φλεγμονές, στομαχικούς πόνους (107). Ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο «προς την εν υγεία χρήσιν άριστον» και αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος και της άφθας. Αναφέρει επίσης, ότι το ελαιόλαδο από τις άγριες ελιές, το οποίο είναι πιο πικρό, είναι στυπτικό και ευεργετικό για τις κεφαλαλγίες. Άλλη μία σημαντική αναφορά στην ελιά συναντούμε στην ιστορία των αρχαίων Αιγυπτίων, όπου το εκχύλισμα από τα φύλλα της ελιάς το χρησιμοποιούσαν για την διατήρηση του σώματος των νεκρών, καθώς παρεμπόδιζε την ανάπτυξη μικροοργανισμών, που προκαλούν σήψη της σάρκας.

Οι πρώτες σύγχρονες βιβλιογραφικές αναφορές για τις ευεργετικές δράσεις της ελιάς επικεντρώνονται αποκλειστικά στη χρήση του ελαιόλαδου ως χορηγούμενο φαρμακευτικό μέσο, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με άλλες φαρμακευτικές

ουσίες και χρονολογούνται στα τέλη του 19^{ου} αιώνα κυρίως, για τη συμπτωματική αντιμετώπιση παθήσεων, όπως η χολολιθίαση (108-110). Έμφαση στη ενδεχόμενη θεραπευτική δράση βιοδραστικών μορίων, τα οποία εντοπίζονται στην ελιά και συγκεκριμένα στον καρπό και τα φύλλα του φυτού και όχι αποκλειστικά στο ελαιόλαδο, δόθηκε μετά τα μέσα του 20^{ου} αιώνα (111). Τα ελαιόδεντρα είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις με ιδιαίτερη βιολογική δράση και η πιο σημαντική εξ αυτών είναι η ελεωρωπαΐνη. Αν και ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco, η ακριβής δομή του μορίου ταυτοποιήθηκε το 1960 (112).

3.1 Χημική δομή

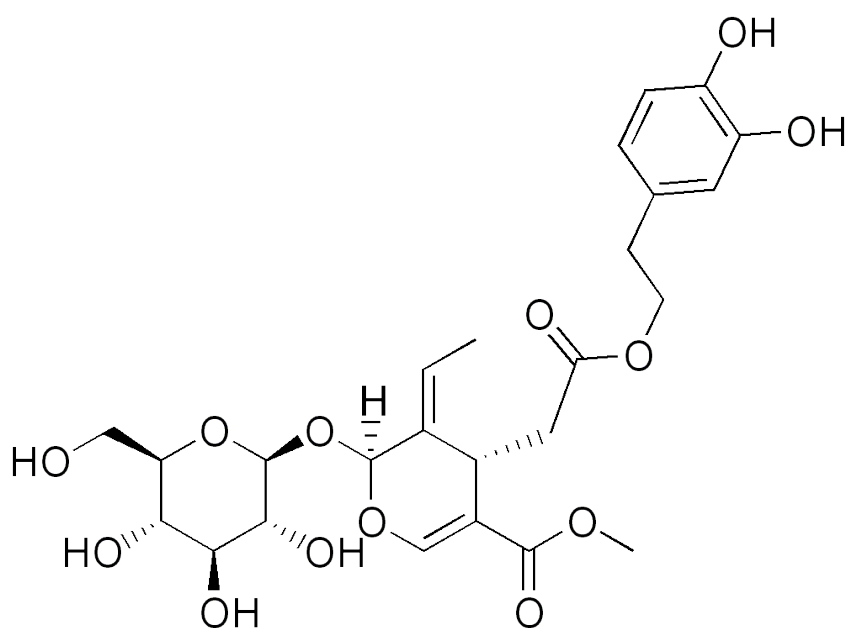
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια, απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή ετεροκυκλικούς δακτυλίους (113) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Δομή Φαινόλης (109)

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν το 40% του οργανικού άνθρακα, που κυκλοφορεί στη βιόσφαιρα, ενώ η δομή τους ποικίλει από απλή σε πολύπλοκα πολυμερή (114). Οι φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης είναι μια χημικά ετερογενής ομάδα ουσιών καθώς έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 8.000 φαινολικές δομές.

Η ελευρωπαΐνη είναι μία φαινυλαιθανοειδής ένωση, εστέρας ελενολικού οξέος και υδροξυτυροσόλης, η οποία βρίσκεται στα φύλλα του δέντρου της ελιάς, στις δρόγες της καθώς και στα παράγωγα αυτών (ελαιόλαδο) (Εικόνα 6). Η κατά IUPAC ονομασία της είναι (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl]-5-ethylidene-6-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4H-pyran-3-carboxylic acid, methyl ester και ο μοριακός της τύπος C₂₅H₃₂O₁₃ με μοριακό βάρος 540.51 g/mol.



Εικόνα 6: Συντακτικός τύπος ελευρωπαΐνης

Ποικίλες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων της ελιάς: (i) η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) (115), (ii) η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (116), (iii) η αέρια χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) (117), (iv) η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) (118), (v) ο μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός με πρότυπο

μόριο το τετραμεθυλοσιλάνιο (Tetramethylsilane NMR) (119) και (vi) η πολλαπλή φασματομετρία μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, ESI-MS/MS) (120).

3.2 Φαρμακολογικές Ιδιότητες

Η ελευρωπαΐνη εμφανίζει ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες: αντιοξειδωτική (121), αντιφλεγμονώδη (122), αντι-αθηρωματική (123-125), αντιμικροβιακή (126), αντϊική (127) και αντικαρκινική δράση (128). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο της ελευρωπαΐνης σε περιπτώσεις καρδιοτοξικότητας (129, 130) καθώς και τη λιποδιαλυτική της δράση (16, 131). Ορισμένες μελέτες συνδέουν τη δράση της ελευρωπαΐνης με την ενεργοποίηση του PPAR γ (132) καθώς και με ευόδωση της νευρικής λειτουργίας (133).

Η ελευρωπαΐνη φαίνεται να αναστέλλει δοσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από θεικό χαλκό οξείδωση της LDL χοληστερόλης (134, 135). Επιπλέον, έχει την ιδιότητα να απομακρύνει το νιτρικό οξείδιο και να αυξάνει την κυτταρική έκφραση της επαγωγίσιμης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (inducible nitric oxide synthase, iNOS) (136). Σε μία μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν κόνικλοι, που λάμβαναν ειδική διατροφή εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο και ελευρωπαΐνη, φαίνεται ότι μειώθηκαν τα επίπεδα οξειδωμένης LDL και ταυτόχρονα μειώθηκαν τα επίπεδα της ολικής, ελεύθερης και εστεροποιημένης χοληστερόλης στον ορό του αίματος (137). Επιπλέον, φαίνεται ότι σε μελέτη, που χορηγήθηκε ελευρωπαΐνη, μειώθηκε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο η απέκκριση της 8-ισο-προσταγλαδίνης F2 α (8-iso-prostaglandin F2 α , 8-iso-PGF2 α) μέσω των ούρων, γεγονός που δείχνει μείωση της *in vivo* υπεροξείδωσης των λιπιδίων στους ασθενείς (138).

Ο Visioli et al. αναφέρει ότι η ελευρωπαΐνη αυξάνει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου σε ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίτες μακροφάγα μέσω επαγωγής της ενεργού μορφής της iNOS, και κατ' επέκταση αυξάνει τη λειτουργική ενεργότητα των μακροφάγων (122). Είναι επίσης, γνωστό ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της ελευρωπαΐνης σχετίζεται με την αναστολή της δράσης της λιποξυγενάσης και με την παραγωγή λευκοτριενίου B4 (139).

Η άμεση αντι-αθηρωματική δράση της ελευρωπαΐνης φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση της προσκόλλησης μονοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο των αγγείων και με τη μείωση της έκφρασης του αγγειακού μορίου προσκόλλησης 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης (124). Σε άλλη μελέτη, η επαναιμάτωση σε καρδιές, που είχαν υποστεί ισχαιμία συνοδεύεται από άμεση απελευθέρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης, φαινόμενο που μειώνεται σημαντικά στα δείγματα που τους είχε χορηγηθεί ελευρωπαΐνη πριν την ισχαιμία. Παράλληλα με τη μείωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης, παρατηρήθηκε αναστολή της υπεροξειδωσής των μεμβρανικών λιπιδίων, γεγονός που αποτελεί κομβικό σημείο για την παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης (140).

Περαιτέρω θεραπευτικές εφαρμογές της ελευρωπαΐνης στηρίζονται στις ακόλουθες φαρμακολογικές ιδιότητές της: αγγειοδιασταλτική (141), αντιθρομβωτική (142), αντιυπερτασική (143, 144), αντιρρευματική (122), διουρητική (143) και αντιπυρετική (145).

3.3 Τοξικότητα

Μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της τοξικότητας της ελευρωπαΐνης δεν αναφέρουν παρενέργειες έπειτα από χορήγηση δόσεων έως 1000mg για διάστημα οκτώ εβδομάδων (146, 147). Οι κλινικές μελέτες, οι οποίες

αξιολογούν την πιθανή τοξική δράση της ελευρωπαϊνης στις συνιστώμενες θεραπευτικές δόσεις, που αναγράφονται στα εμπορικά σκευάσματα δεν αναφέρουν κάποια τοξική δράση της ουσίας. Ωστόσο, κρίνονται ως ανεπαρκείς και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της τοξικότητας της ελευρωπαϊνης και των σχετικών ουσιών.

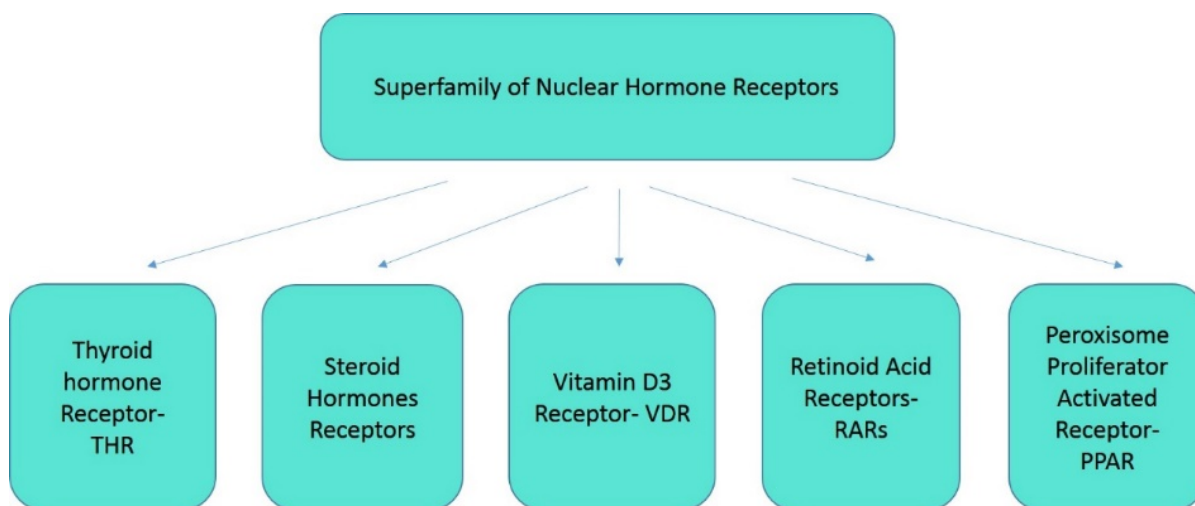
4 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ PPARs

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

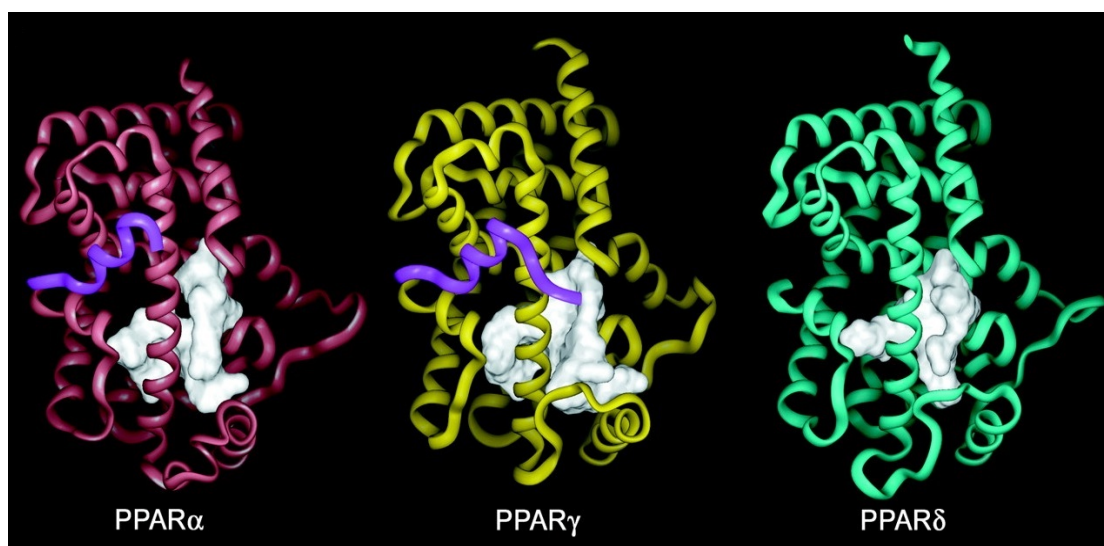
Τα υπεροξεισωμάτια (peroxisomes) είναι μικρά μεμβρανικά οργάνδια των ευκαρυωτικών κυττάρων και περιέχουν ένζυμα, που σχετίζονται με καταβολικά και αναβολικά μονοπάτια κυρίως, του μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως η διάσπαση των λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους μέσω της β-οξειδωσης και η σύνθεση λιπιδίων ή χοληστερόλης. Το 1973 παρατηρήθηκε πως η χορήγηση αναλόγων Κλοφιβράτης και παρόμοιων φαρμάκων, που δρουν ως υπολιπιδαιμικοί παράγοντες ελέγχοντας τα επίπεδα στο πλάσμα των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (peroxisome proliferation) στα ηπατοκύτταρα τρωκτικών (148, 149). Αντίστοιχα, επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ηπατικών υπεροξεισωμάτων παρατηρήθηκε και έπειτα από χορήγηση υπολιπιδαιμικών σκευασμάτων με διαφορετική δομή από εκείνη της Κλοφιβράτης (150), χωρίς ωστόσο να διαφαίνεται κάποιος μηχανισμός δράσης. Μόλις το 1990, οι Issemann και Green ανέφεραν την κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό ενός πυρηνικού υποδοχέα στα ηπατοκύτταρα των τρωκτικών, ο οποίος ενεργοποιούνταν από αρκετούς ήδη γνωστούς πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων, δίνοντάς του έτσι την ονομασία «υποδοχέας που ενεργοποιείται από τους πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων» (Peroxisome proliferator-activated receptor ή PPAR).

Οι υποδοχείς PPARs ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Εικόνα 7), η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς στεροειδικών ορμονών, του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptors RARs) και των θυρεοειδικών ορμονών (thyroid hormone receptors TRs) (151-153). Η οικογένεια των PPARs περιλαμβάνει

τρεις ισομορφές, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια με διακριτούς ρόλους και ιστοειδική έκφραση για την κάθε ισομορφή: τον PPAR α (NR1C1), τον PPAR β/δ (NR1C2) και τον PPAR γ (NR1C3) (Εικόνα 8).



Εικόνα 7: Η υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων



Εικόνα 8: Κρυσταλλογραφία δομής του PPAR α , PPAR γ και του PPAR δ

Οι PPARs ενεργοποιούνται μετά από πρόσδεσή με ενδογενή ή εξωγενή μόρια-προσδέτες (ligands). Οι ενεργοποιημένοι PPARs δρουν ως πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες (154) και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους, προσδεδεμένοι σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, που ονομάζονται αποκρινόμενα στοιχεία των PPARs (Peroxisome Proliferator Response Elements, PPRE) και τα οποία εντοπίζονται στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου (155, 156). Με τον συγκεκριμένο μηχανισμό, επάγεται ή αναστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων, που σχετίζονται με κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπιδίων, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση καθώς και διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η φλεγμονή, η καρκινογένεση και η αθηροσκλήρωση (157-159).

4.2 Δομή των υποδοχέων PPARs

Οι PPARs εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Η δομή τους χωρίζεται σε τέσσερις λειτουργικές επικράτειες (domains) (152) (Εικόνα 9).

Η επικράτεια A/B εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο του υποδοχέα (-NH₂) και έχει τη χαμηλότερη δομική ομοιότητα αλληλουχιών μεταξύ των τριών ισομορφών. Παρουσιάζει χαμηλή μεταγραφική λειτουργία, ανεξάρτητη από την παρουσία μορίου-προσδέτη και για το λόγο αυτό αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ως ligand-independent activation function (AF-1) (160). Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν πως η περιοχή AF-1 των PPARs ίσως σχετίζεται με τη διαφοροποίηση της βιολογικής λειτουργίας των τριών ισομορφών (161), ενώ πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως σε κάποιες ισομορφές η συγκεκριμένη επικράτεια διαδραματίζει ρόλο στην trans-ενεργοποίηση και πρόσληψη συμπαραγόντων για συγκεκριμένα γονίδια (162). Η

ενεργότητα της A/B επικράτειας ρυθμίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ενώ η φωσφορυλίωση του αμινο-τελικού άκρου από κινάσες, όπως οι MAPKs (mitogen-activated protein kinases), η οποία επηρεάζει σημαντικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα (163, 164).

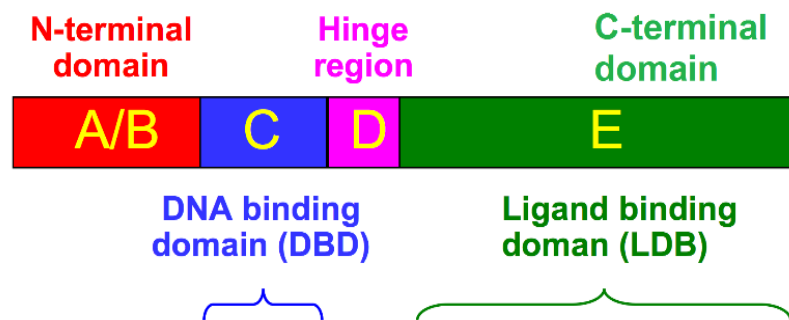
Η επικράτεια πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain- DBD) ή αλλιώς περιοχή C, είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA. Η επικράτεια DBD περιέχει ένα σύμπλεγμα δύο δακτύλων ψευδαργύρου, το οποίο προσδένει ειδικά PPREs στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων-στόχων των PPARs . Η DBD μαζί με την επικράτεια πρόσδεσης του εκάστοτε μορίου-προσδέτη (Ligand Binding Domain-LBD) ή αλλιώς περιοχή E, αποτελούν τις πιο καλοσυντηρημένες περιοχές ανάμεσα στις ισομορφές των υποδοχέων PPARs (163).

Η επικράτεια LDB καταλαμβάνει το καρβοξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα και κρυσταλλογραφικές απεικονίσεις δείχνουν ότι αποτελείται από δεκατρείς α-έλικες και τέσσερα μικρά πτυχωτά β-φύλλα. Η LDB των PPARs φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη LDB άλλων πυρηνικών υποδοχέων, γεγονός το οποίο μπορεί να προσδίδει στους PPARs την ικανότητα να αλληλεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα δομικά διαφοροποιημένων φυσικών και συνθετικών μορίων- προσδετών (155, 165). Στην καρβοξυ-τελική άκρη της LDB επικράτειας, εντοπίζεται η εξαρτώμενη από τον προσδέτη περιοχή ενεργοποίησης (ligand-dependent activation domain AF-2), η οποία συμμετέχει σημαντικά στη δημιουργία της θέσης πρόσδεσης των συνενεργοποιητών των υποδοχέων PPARs (155). Παρουσία των μορίων-προσδετών, η LDB αλλάζει στερεοδιάταξη, αναδιπλώνεται στο χώρο δημιουργώντας μια υδρόφοβη κοιλότητα στην οποία δεσμεύονται οι προσδέτες και ενεργοποιούν τον υποδοχέα. Στην LDB εντοπίζονται οι περιοχές, που λαμβάνει χώρα ο διμερισμός του

PPAR με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέως καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με τους πρωτεϊνικούς συμπαραγόντες (co-activators) (166, 167).

Η επικράτεια D, λειτουργεί ως περιοχή σύνδεσης της DBD με την LDB και αποτελεί τόπο διασύνδεσης των συμπαραγόντων, που επιστρατεύονται για την ενεργοποίηση των PPARs (163, 164).

Structural Organisation of PPARs

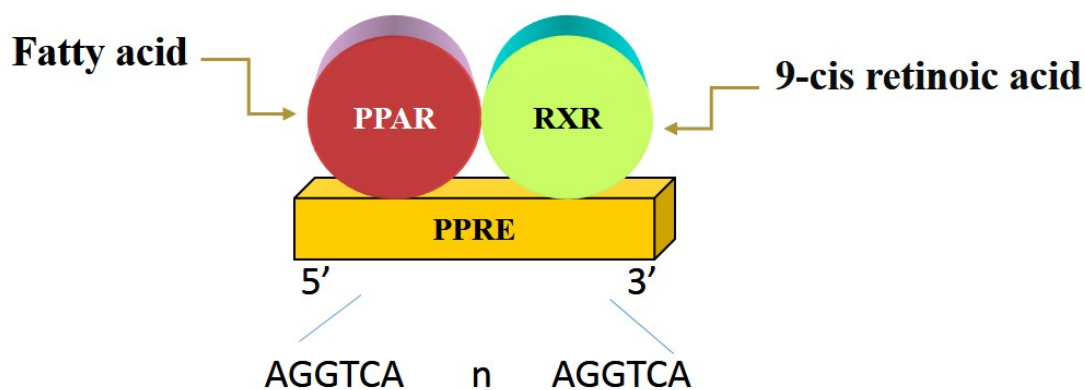


Εικόνα 9: Δομή των υποδοχέων PPARs

4.3 Μοριακοί μηχανισμοί της μεταγραφικής ρύθμισης των PPARs

4.3.1 Συμβολή του ετεροδιμερούς PPAR/RXR στη μεταγραφική λειτουργία των PPARs και ρόλος των PPREs

Σε αντίθεση με τους λοιπούς ορμονικούς υποδοχείς, που σχηματίζουν ομοδιμερή, οι υποδοχείς PPARs μετά την ενεργοποίησή τους, σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τους υποδοχείς X των ρετινοειδών (Retinoid X Receptor-RXR, NR2B) και στη συνέχεια πυροδοτούν τη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων τους (168). Το ετεροδιμερές PPAR-RXR ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω της σύνδεσής του σε ορισμένα τμήματα DNA, τα PPREs (peroxisome proliferator responsive elements), που εντοπίζονται στο άκρο 5' του υποκινητή του γονιδίου-στόχου του PPAR (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Το ετεροδιμερές PPAR/RXR συνδέεται σε αλληλουχίες DNA (PPREs) στον υποκινητή των ρυθμιζόμενων γονιδίων-στόχων

Οι αλληλουχίες PPREs αποτελούν επανάληψη της ίδιας αλληλουχίας AGGTCA, η οποία διαχωρίζεται από την επανάληψη της με ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Ο PPAR συνδέεται στο άκρο 5' του PPRE, ενώ ο RXR στο άκρο 3'. Αντίστοιχες ή παρόμοιες αλληλουχίες έχουν βρεθεί στην πλειονότητα των γονιδίων - στόχων των PPARs, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου της οξειδάσης του ακετυλο-CoA και της πρωτεΐνης δέσμευσης λιπαρού οξέως των λιποκυττάρων (153). Ορισμένα *cis* στοιχεία πλησίον του κέντρου του PPRE (ειδικά στο άκρο 5') φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκλεκτική ικανότητα δέσμευσης των PPREs (153). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως το ετεροδιμερές PPAR/RXR δεσμεύεται στο PPRE με αντίστροφη πολικότητα σε σχέση με το ετεροδιμερές του RXR με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (vitamin D receptor VDR) VDR/RXR και το ετεροδιμερές του RXR με τον υποδοχέα του θυροειδούς TR (thyroid receptor) TR/RXR (169).

4.3.2 Συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων

Ο πολλαπλασιασμός των υπεροξεισωμάτων διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς. Εξαρτάται δε, από παράγοντες όπως η φαρμακοκινητική, η σχετική περίσσεια των ισομορφών PPARs, η φύση των PPRE στις ανοδικές περιοχές (upstream) του γονιδίου στόχου, το εύρος της αλληλεπίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών (cross-talk) σε επίπεδο διαθεσιμότητας μεταγραφικών παραγόντων για τον RXR και τέλος, από το ρυθμιστικό ρόλο των συνενεργοποιητών (co-activators) και των συνκαταστολέων (co-repressors) σε σχέση με την εξαρτώμενη από τον προσδέτη μεταγραφή των PPARs (170)

Συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων ονομάζονται οι πρωτεΐνες εκείνες, που αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς υποδοχείς υπό τη μορφή προσδέτη στον υποδοχέα και ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα,

σχηματίζοντας μαζί του ένα μακρομοριακό σύμπλοκο. Στα κυριότερα χαρακτηριστικά των co-activators συμπεριλαμβάνονται: i) ο co-activator πρέπει να αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή ενεργοποίησης του υποδοχέα, παρουσία του αγωνιστή του, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας του υποδοχέα, ii) ο co-activator να μπορεί να αλληλεπιδρά και με παράγοντες του βασικού συμπλόκου μεταγραφής, iii) αν και οι co-activators διαθέτουν μια αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης δεν πρέπει να επάγουν τη βασική μεταγραφική ενεργοποίηση από μόνοι τους (171-173). Στους co-activators των πυρηνικών υποδοχέων περιλαμβάνονται τα μέλη των οικογενειών SRC-1/p160 (174) και CBP/p300 (175) με δραστικότητα ακετυλάσης των ιστονών (δραστικότητα HAT), με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης (176). Άλλοι co-activators των πυρηνικών υποδοχέων είναι οι SRC-2 [TIF-2 (177), NCoA2 (178) ή GRIP1 (172)], SRC-3 [ACTR (179), AIB1 (180), και RAC3 (181) ή p/CIP (178)] και ο PBP (182) [TRAP220 (183)], PGC-1 (184) και ARA70 (185). Οι βασικότεροι co-activators των PPARs είναι ο SRC-1 και ο PGC-1.

4.3.3 Μεταγραφική ενεργότητα των PPARs

Η ενεργοποίηση των PPARs ως μεταγραφικών παραγόντων, εξαρτάται από την παρουσία και τη σύνδεση μορίων - προσδετών (ligands) στην LBD επικράτειά τους και τη σύνδεσή τους με συνενεργοποιητές. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω φωσφορυλίωσης από ορμόνες ή άλλους αυξητικούς παράγοντες.

Οι PPARs εκτός από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων των γονιδίων-στόχων τους, μπορούν να λειτουργήσουν και ως ρυθμιστές της μεταγραφής ενός μεγάλου πλήθους γονιδίων μέσω αλλαγής της δραστικότητας άλλων

μεταγραφικών παραγόντων, που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες όπως η φλεγμονή, η διαφοροποίηση και ο μεταβολισμός. Σε αυτή την περίπτωση δεν έχουμε ετεροδιμερισμό του PPAR και πρόσδεσή του στα PPRE, αλλά φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συγκαταστολείς μέσα στον πυρήνα, ή τη μεταβολή της δραστηριότητας των κινασών όπως οι ERK1/2, JNK, Akt και GSK3β (186-189).

4.3.4 Προσδέτες/Αγωνιστές των PPARs

Λόγω της μεγάλης βιολογικής σημασίας των PPARs έχουν αναπτυχθεί αρκετές μοριακές τεχνικές για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό των μορίων-προσδετών τους. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται η μέθοδος *trans* ενεργοποίησης (transactivation assay) (190), όπου χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά σημασμένοι προσδέτες, η μέθοδος SPA (Scintillation Proximity Assay), η μέθοδος LIC (Ligand Induced Complex), η CARLA (CoActivator Dependent Receptor Ligand Assay), όπου μετράται η ικανότητα ουσιών να επάγουν την αλληλεπίδραση του υποδοχέα PPAR με τους συνενεργοποιητές της οικογένειας SRC-1 και p300/CBP (191).

Οι φυσικοί και συνθετικοί αγωνιστές των PPARs χρησιμοποιούνται στη θεραπεία γλυκαιμικών και λιπιδαιμικών διαταραχών. Οι PPARs παρουσιάζουν διάφορες δραστηριότητες μέσω ενδογενών προσδετών, οι οποίοι παράγονται στα μονοπάτια μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και για το λόγο αυτό συχνά αποκαλούνται αισθητήρες των λιπιδίων (lipid sensors). Οι αγωνιστές της κάθε ισομορφής PPAR, έχουν διαφορετικές ιδιότητες και εξειδικεύσεις, διαφορετικά προφίλ απορρόφησης/κατανομής και χαρακτηριστικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης, τα οποία οδηγούν σε διαφορετικές κλινικές εκφάνσεις (163, 192-195).

Χαρακτηριστικό της επικράτειας πρόσδεσης (LBD) των υποδοχέων PPAR αποτελεί το μεγάλο μέγεθός της σε σχέση με το μέγεθος των LBD των λοιπών πυρηνικών υποδοχέων (τρεις -τέσσερις φορές μεγαλύτερη LBD). Για το λόγο αυτό οι PPARs έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πλήθος φυσικών και συνθετικών λιπόφιλων οξέων, όπως τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (essential fatty acids EFA). Τα EFA δρουν ως φυσικοί αγωνιστές των PPAR με αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων, που συμμετέχουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων (192, 196, 197). Άλλοι φυσικοί αγωνιστές των PPARs είναι τα εικοσανοειδή. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και τα EFA και τα εικοσανοειδή πρέπει να βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>100\mu\text{M}$) για να ενεργοποιηθεί ο PPAR (197). Οι συνθετικοί αγωνιστές των PPARs χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πρακτική, συγκεκριμένα σε περιπτώσεις δυσλιπιδαιμιών (υπερτριγλυκεριδαίμια), όπου χορηγούνται φιβράτες και οι θειαζολινιδενιόνες σε περιπτώσεις σακχαρώδους διαβήτη (198-201).

4.4 PPAR α

4.4.1 Προφίλ έκφρασης του PPAR α

Όπως προαναφέρθηκε η οικογένεια των υποδοχέων PPARs αποτελείται από τρία μέλη: τον PPAR α , τον PPAR β/δ και τον PPAR γ , που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PPAR α , PPAR δ και PPAR γ , αντίστοιχα (202). Και οι τρεις εμφανίζουν χαρακτηριστικές ιστοειδικές κατανομές. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτή η ιστοειδική έκφραση της κάθε ισομορφής των PPARs, είναι πιθανό να σχετίζεται με τις διαφοροποιημένες λειτουργίες τους, και τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών, στους οποίους εκφράζονται (203). Ο PPAR α εκφράζεται σε ιστούς που σχετίζονται με την οξείδωση λιπαρών οξέων, όπως το ήπαρ, οι νεφροί, το λεπτό

έντερο, καρδιά και οι σκελετικοί μυς γεγονός που συνάδει με την κύρια λειτουργία του στη ρύθμιση του καταβολισμού των λιπιδίων. Στο ήπαρ ο PPARα είναι ο κυρίαρχος ρυθμιστής των μιτοχονδριακών, υπεροξεισωματικών και μικροσωματικών συστημάτων οξείδωσης των λιπαρών οξέων, όπου ενεργοποιείται με συνθετικούς πολλαπλασιαστές των υπεροξεισωμάτων ενώ επιπλέον ελέγχει την εισροή λιπαρών οξέων σε συνθήκες νηστείας ώστε να επάγει την έκφραση σχετικών γονιδίων (204). Ο PPARα συμμετέχει επίσης και στη σύνθεση των λιποπρωτεϊνών, στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις καθώς και στην καρκινογένεση στο ήπαρ τρωκτικών (205-209).

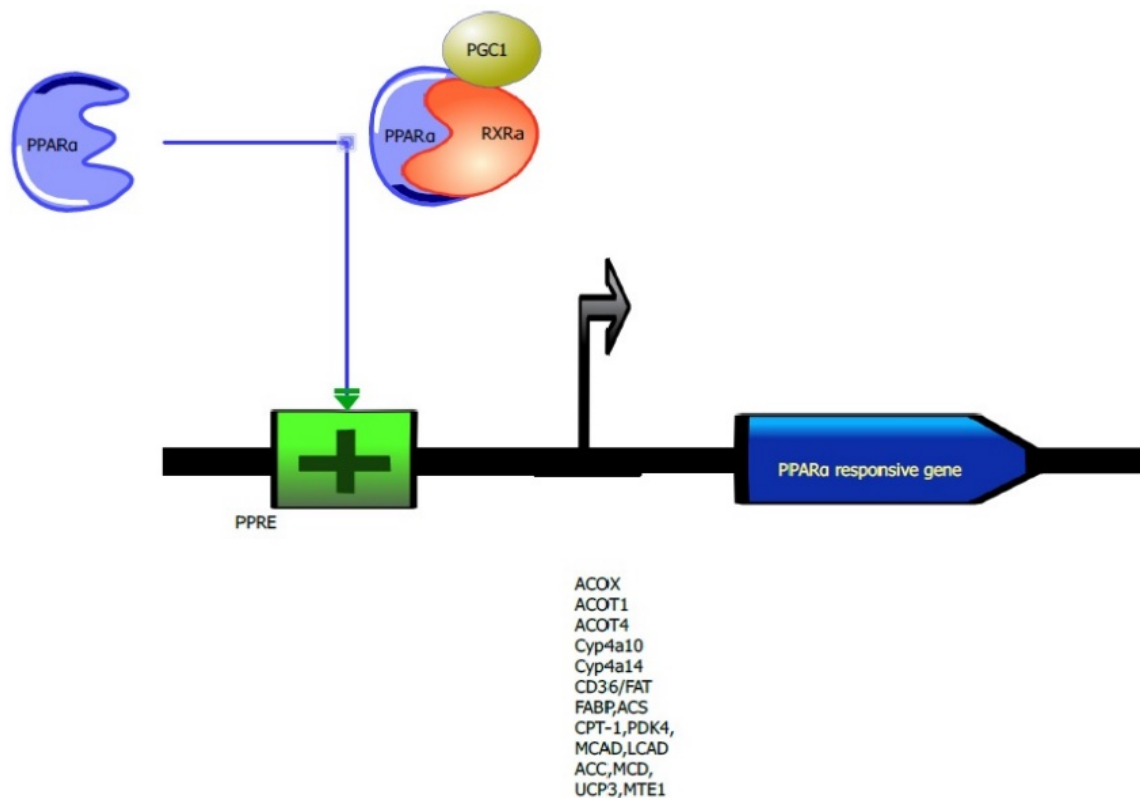
4.4.2 Δομή και ενεργοποίηση του PPARα

Ο PPARα διαθέτει πέντε δομικές περιοχές, οι οποίες εντοπίζονται μέσα στις τέσσερις λειτουργικές επικράτειες των πυρηνικών υποδοχέων: i) την περιοχή AF-1 στην επικράτεια A/B στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα. Η AF-1 αποτελεί στόχο για φωσφορυλίωση (210, 211). ii) Την περιοχή με τα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (zinc fingers) στην επικράτεια C/DBD. Τα συγκεκριμένα μοτίβα διευκολύνουν την πρόσδεση του υποδοχέα PPARα στις αλληλουχίες PPREs στον υποκινητή του γονιδίου στόχου. iii) Τη λειτουργική περιοχή στην επικράτεια D (hinge region), που αποτελεί περιοχή πρόσδεσης των co-activators του PPARα και τέλος iv) την περιοχή στην επικράτεια E/LBD στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα, που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση συγκεκριμένων αγωνιστών του PPARα (203).

Ένας μεγάλος αριθμός φυσικών και συνθετικών αγωνιστών του PPARα έχει αναγνωριστεί. Οι βασικότεροι ενδογενείς αγωνιστές του PPARα περιλαμβάνουν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFA) και τα παράγωγά τους, όπως τα εικοσανοειδή, τα 8-υδροξυ-εικοσατετρανοειδή οξέα (8-HETE/ lipoxygenases isozymes) και τη

λευκοτριένη B₄ (212). Σε άλλη ομάδα ενδογενών αγωνιστών του PPAR α περιλαμβάνονται μεταβολίτες λιπιδίων από κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι κυριότεροι συνθετικοί αγωνιστές του PPAR α είναι οι φιβράτες, που ανήκουν στην κατηγορία των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (bezafibrate, fenofibrate, gemfibrozil), ο WY14643, ορισμένοι φθαλικοί μονοεστέρες και κάποια ζιζανιοκτόνα (lactofen) (7, 213).

Μετά την πρόσδεση του αγωνιστή του, ο PPAR α σχηματίζει, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5.3.1, ένα ετεροδιμερές με τον ενεργοποιημένο RXR (ο RXR ενεργοποιείται με την πρόσδεση του 9 *cis*-retinoic acid, μορίου που λειτουργεί ως μόριο προσδέτης). Στη συνέχεια, η επικράτεια DBD του PPAR α αλλάζει τη στερεοδιάταξή της στο χώρο, με αποτέλεσμα το ετεροδιμερές PPAR α /RXR να προσδένεται στην αλληλουχία PPRE του υποκινητή του γονιδίου στόχου για να ξεκινήσει τη μεταγραφή του (214) (Εικόνα11).



Εικόνα 11: Ενεργοποίηση του PPARα

4.4.3 PPARα και Μεταβολισμός των Λιπιδίων

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο PPARα συμμετέχει σε μεταβολικές οδούς πολλών λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων. Στον ΠΙΝΑΚΑ 5 που ακολουθεί, παρουσιάζεται συνοπτικά η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων:

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Επίδραση της ενεργοποίησης του PPARα στα Γονίδια -στόχους του, που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών (203)

Γονίδια	Ενεργοποίηση PPARα	Βιβλιογραφική Αναφορά
Ομοιοστασία Χοληστερόλης		
HMGCR	Μείωση	(215)
Cyp7a1	Αύξηση	(216)
NPC1L1	Αύξηση, Μείωση	(217-219)
ABCG5,ABCG8	Αύξηση	(220)
Μεταβολισμός TGs		
LPL	Αύξηση	(221-223)
ApoA-V	Αύξηση	(215)
Angptl4	Αύξηση	(224, 225)
ApoC-III	Μείωση	(226)
Μεταβολισμός Λιπαρών οξέων		
FASN	Μείωση	(227)
ACLY	Μείωση	(228)
CPT1A	Αύξηση	(229, 230)
ACSL1,ACOX,ACAA1A	Αύξηση	(231)
Βιοσύνθεση HDL		
ApoA-I, ApoA-II	Αύξηση	(232)
ABCA1	Αύξηση	(233, 234)
LPL	Αύξηση	(235)
Μεταβολισμός LDL		
NOX4	Μείωση	(236)
SOD,GSH-Px, CAT	Αύξηση	(237-239)
Μεταβολισμός VLDL		
MTP	Αύξηση	(240)

4.4.3.1 Επίδραση του PPARα στην ομοιοστασία των Τριγλυκεριδίων

Η επαγωγή της έκφρασης του PPARα και η ενεργοποίησή του οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων τόσο στο πλάσμα ασθενών με διαβήτη τύπου II (241), όσο και στα επίπεδα τριγλυκεριδίων ενδοκυτταρικά σε HepG2 κυτταρικές σειρές (242). Αντίθετα, η καταστολή του PPARα προκαλεί υπετριγλυκεριδαίμιες σε παχύσαρκα πειραματόζωα (243). Δεν έχει ωστόσο αποσαφηνιστεί ακόμα ο ακριβής μηχανισμός δράσης του PPARα. Μία πιθανή εξήγηση για τη μείωση των τριγλυκεριδίων μέσω του PPARα, αναφέρει ότι η ενεργοποίηση του PPARα επάγει i) άμεσα ή/και έμμεσα την ενεργοποίηση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), ii) την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και iii) ρυθμίζει αρνητικά (downregulation) την έκφραση της ApoC-III. Βασική λειτουργία της LPL, είναι η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από τα χυλομικρά και την VLDL.

Πρώτον, η άμεση επαγωγή της έκφρασης της LPL από τον PPARα, βασίζεται στα εξής: Η LPL εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των ηπατικών κολποειδών/τριχοειδών, κυρίως στο λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύς. Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση φαινολών του πράσινου τσαγιού σε κοτόπουλα αύξησε σημαντικά τα επίπεδα του PPARα και εν συνεχεία την επαγωγή της έκφρασης της LPL στους σκελετικούς μύς, με τελικό αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα (223). Επιπλέον, σύμφωνα με τα ευρήματα των Schooijans et al., η έκφραση της LPL στο ήπαρ αυξάνεται και από αγωνιστές του PPARα (221), γεγονός που ενισχύει την παραπάνω θεωρία για άμεση επαγωγή της έκφρασης της LPL μέσω του PPARα. Ο ηπατικός PPARα επηρεάζει και αρκετά ηπατικά γονίδια, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί την ApoA-V και την Angptl4 (angiopoietin-like protein 4), που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, όπου μπορεί

να έχουν ρυθμιστική επίδραση στην ενεργοποίηση της LPL (έμμεση δράση του PPARα) (244).

Δεύτερον, χορήγηση αγωνιστών του PPARα μειώνει την έκφραση της ApoC-III, χωρίς ωστόσο να έχει καθοριστεί ακόμα κάποιος σαφής μηχανισμός. Η ApoC-III είναι κύριο συστατικό λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων, τα οποία είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια. Η ApoC-III εμποδίζει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και την απομάκρυνση των καταλοίπων. Έτσι η μείωση της έκφρασης της ApoC-III διευκολύνει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και κατά συνέπεια, μειώνει τα επίπεδά τους στο πλάσμα.

Τέλος, η επαγόμενη από τον PPARα β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό έχει επίσης, σαν αποτέλεσμα τη μείωση των τριγλυκεριδίων (245).

4.4.3.2 PPARα και Χοληστερόλη

Η χοληστερόλη είναι ένα βασικό δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών των θηλαστικών και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών. Ο PPARα αποτελεί κύριο ρυθμιστή της ομοιοστασίας της χοληστερόλης, καθώς επηρεάζει σε αρκετά σημεία το μεταβολισμό της, τη βιοσύνθεση, την αποικοδόμηση, την εντερική απορρόφηση και την απέκκρισή της (203, 246).

Η HMGCR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase) είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης (rate-limiting enzyme). Οι Lu J. et al αναφέρουν ότι αναστολή του PPARα, επάγει δραματικά την έκφραση του HMGCR και κατά συνέπεια, αυξάνει η σύνθεση της χοληστερόλης (215).

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι αύξηση της έκφρασης του Cyp7a1 (cholesterol 7α-υδροξυλάση) στο ήπαρ υπερλιπιδαιμικών επιμύων, μέσω ενεργοποίησης του PPARα, έπειτα από χορήγηση αλκαλοειδούς cortis, είναι υπεύθυνη, έστω και μερικώς, για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης (216).

Η NPC1L1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία μεταφέρει την ελεύθερη χοληστερόλη στα κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση της εντερικής χοληστερόλης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η NPC1L1 διαθέτει αλληλουχία PPRE στον υποκινητή του γονιδίου της, στον οποίο προσδένεται ο PPARα επάγοντας τη μεταγραφή του (219). Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το λάδι από κουρκουμά (*Curcuma longa* L. extract), αναστέλλει την έκφραση του NPC1L1 μέσω ενεργοποίησης του PPARα σε υπερλιπιδαιμικά ινδικά χοιρίδια. Άλλες μελέτες τη μείωση της εντερικής απορρόφησης της χοληστερόλης μέσω μείωσης της έκφρασης του NPC1L1 στο λεπτό έντερο άγριου τύπου μυών, έπειτα από ενεργοποίηση του PPARα με φιβράτες (217, 218). Ο λόγος πίσω από αυτές τις ασυμφωνίες στα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα.

4.4.4 Ο Ρόλος του PPARα στην αθηροσκλήρυνση

Η αθηροσκλήρυνση είναι μία πολυπαραγοντική νόσος με περίπλοκη εξέλιξη, που ενέχει ως επαγωγικούς παράγοντες την υπερλιπιδαιμία, το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τη φλεγμονή των αγγείων, τον πολλαπλασιασμό και μετατόπιση αγγειακών κυττάρων των λείων μυών (Vascular Smooth Muscle Cells-VSMC), την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας και τη θρομβογένεση (203, 247). Ο PPARα εκτός από το ρόλο, που παίζει στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, μπορεί να επηρεάσει την έκβαση πολλών σταδίων της αθηρογένεσης. Η ενεργοποίηση του PPARα:

- Αναστέλει το σχηματισμό των μακροφάγων αφρωδών κυττάρων
- Περιορίζει τη φλεγμονή των αγγείων
- Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετατόπιση των VSMCs
- Αναστέλλει το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας και τη ρήξη των αγγείων
- Αναστέλλει την αθηροθρόμβωση

4.5 PPARβ/δ

Ο PPARβ/δ εκφράζεται εκτεταμένα, με σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις να συναντώνται στον εγκέφαλο, το λιπώδη ιστό και το δέρμα (248). Η ενεργοποίηση του PPARβ/δ επάγει την έκφραση γονιδίων, που απαιτούνται για την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τη διάχυση της ενέργειας στους σκελετικούς μυς και το λιπώδη ιστό, με αποτέλεσμα τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και τη μειωμένη εναπόθεση λίπους (249). Στο ήπαρ ο PPARβ/δ μπορεί να ενεργοποιηθεί από τα εισερχόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα του πλάσματος σε συνθήκες νηστείας (250). Αρχικά, ο PPARβ/δ δεν λάμβανε αντίστοιχη προσοχή σε σχέση με του υπόλοιπους PPARς κυρίως, λόγω της ευρύτητας της έκφρασής του και της μη διαθεσιμότητας ειδικών προσδετών. Ωστόσο, γενετικές μελέτες και πρόσφατα αναπτυγμένοι συνθετικοί PPARβ/δ αγωνιστές υποδεικνύουν τον σημαντικό του ρόλο ως ρυθμιστή του καταβολισμού των λιπαρών οξέων και της ομοιοστασίας ενέργειας (251, 252). Ο PPARβ/δ αγωνιστής, GW501516, φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σε παχύσαρκα πρωτεύοντα, ενώ αυξάνει τα επίπεδα της HDL, υποκινώντας την έναρξη αρκετών κλινικών δοκιμών για την αξιολόγηση της αποδοτικότητάς του σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς (253). Μελέτες στο λιπώδη ιστό και στους μυς βοηθούν στην αποκρυπτογράφηση των μεταβολικών λειτουργιών του PPARβ/δ. Η διαγονιδιακή έκφραση μιας ενεργοποιημένης μορφής του PPARβ/δ στο λιπώδη ιστό

έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αδύνατων μυών, οι οποίοι εμφανίζουν επίσης ανθεκτικότητα στην παχυσαρκία, την υπερλιπιδαιμία και την στεάτωση των ιστών, είτε έχουν προκληθεί γενετικά είτε περιβαλλοντικά μέσω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δίαιτας (254).

4.6 PPAR γ

Ο PPAR γ , ο οποίος εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο λιπώδη ιστό, λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και προάγει την αποθήκευση ενέργειας/λίπους στα ώριμα λιποκύτταρα, αυξάνοντας την έκφραση πολλών γονιδίων αυτού του μονοπατιού (255). Αυτές οι δύο λειτουργίες του PPAR γ , η λιπογένεση και η λιπο-αποθήκευση στα λιποκύτταρα, είναι η αιτία για τη μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, που εμφανίζουν οι αντι-διαβητικές θειαζολινιδινόνες (256). Τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγα της προσταγλαδίνης J είναι οι φυσικοί προσδέτες του PPAR γ (257, 258). Πριν ακόμα ταυτοποιηθούν ως προσδέτες του PPAR γ , οι θειαζολινιδινόνες φαίνονταν να διεγείρουν τη λιπογένεση και να βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη (259, 260). Σχετικά πρόσφατα, οι θειαζολινιδινόνες αναγνωρίστηκαν ως ειδικοί προσδέτες του PPAR γ , αποσαφηνίζοντας το μηχανισμό μεταξύ του PPAR γ και της ευαισθησίας της ινσουλίνης (261, 262). Η πέραν του φυσιολογικού ενεργοποίηση του PPAR γ με θειαζολινιδινόνες διεγείρει τη λιπογένεση, αυξάνοντας τον αριθμό των νέων διαφοροποιημένων λιποκυττάρων, ειδικά στο λευκό λιπώδη ιστό. Η αύξηση της αποθηκευτικής ικανότητας του λευκού λιπώδους ιστού μειώνει την εκτοπική συσσώρευση λιπιδίων. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση των TGs στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες και η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με αρνητική επίπτωση την αύξηση της μάζας του λευκού λιπώδους ιστού.

5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι PPARs αποτελούν ιδανικό φαρμακολογικό στόχο τόσο για τη θεραπεία των υπερλιπιδαιμιών όσο και για την προστασία του μυοκαρδίου από την ισχαιμία. Κατ' επέκταση έχουν αναπτυχθεί αρκετά μόρια-αγωνιστές των PPARs εκ των οποίων κάποια έχουν ήδη αποσυρθεί λόγω τοξικότητας και ανεπιθύμητων ενεργειών. Παρά τη μεγάλη προσπάθεια για την εύρεση αποδοτικών, μη τοξικών αγωνιστών των PPARs και ενώ περίπου 50 μόρια βρίσκονται υπό διερεύνηση δεν έχει υπάρξει έγκριση από τον Food and Drug Administration (FDA) νέων φαρμάκων και πολλές από τις μελέτες αυτές τερματίστηκαν λόγω τοξικών παρενεργειών. Ως εκ τούτου η ανάγκη εύρεσης αγωνιστών των PPARs με όσο το δυνατόν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι επιτακτική και επίκαιρη.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της ελευρωπαΐνης, ως αγωνιστής των PPARs στην ομοιοστασία των λιπιδίων, με στόχο να αξιολογηθεί τόσο η αποδοτικότητά της ως αγωνιστής των PPARs όσο και οι παράπλευρες και έμμεσες δράσεις της στους μύες. Πιο αναλυτικά, διερευνήθηκε η ικανότητα της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στους PPARs, η επίδρασή της στο μεταβολισμό των λιπιδίων και ο ρόλος της στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των PPARs.

Για την ακριβέστερη προσέγγιση των ερωτημάτων προς διερεύνηση, σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν πειράματα *in silico*, *in vivo* και *in vitro* και μελετήθηκαν οι κάτωθι παράμετροι:

- i. *In vivo* & *in vitro* διερεύνηση της ικανότητας της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στους υποδοχείς PPARs
- ii. *In silico* αξιολόγηση (βασισόμενη σε μοριακή προσομοίωση) της ικανότητας της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στον PPAR α

- iii. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης στα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα
- iv. *In vivo* ενεργοποίηση του PPARα από την Ελευρωπαΐνη
- v. *In vitro* ενεργοποίηση του PPARα από την Ελευρωπαΐνη σε primary hepatocytes
- vi. Επίδρασης της Ελευρωπαΐνης σε ηπατικούς παράγοντες κρίσιμους για την ομοιοστασία των Τριγλυκεριδίων
- vii. Επίδρασης της Ελευρωπαΐνης σε παράγοντες που εκφράζονται στο λευκο λιπώδη ιστό, κρίσιμους για την ομοιοστασία των Τριγλυκεριδίων
- viii. *In vivo* αξιολόγηση της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης στη β-οξείδωση των λιπιδίων, την έκφραση του υποδοχέα Ldl και στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να αξιολογήσει τη δράση της ελευρωπαΐνης ως πιθανό υπολιπιδαιμικό παράγοντα, την αποδοτικότητά της, το μεταβολικό της προφίλ και το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Πειραματόζωα

Όλοι οι χειρισμοί (φαρμακολογικοί ή μη) των πειραματόζωων, σε όλα τα πειραματικά στάδια, επιθεωρήθηκαν και εγκρίθηκαν από την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH Publications No. 80-23, 1996) και τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρησιμοποίηση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609, No 116, 1992). Καταβλήθηκε κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να ελαχιστοποιηθεί κάθε ταλαιπωρία και επώδυνη συνθήκη για τα πειραματόζωα. Για την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί μύες στελέχους: (i) SV129 αγρίου τύπου (θα αναφέρονται ως wild type, wt), (ii) διαγονιδιακοί μύες SV129 με αποσιωπημένο το γονίδιο του PPARα (θα αναφέρονται ως *Ppara*-null) και (iii) διαγονιδιακοί μύες C57BL/6 με αποσιωπημένο το γονίδιο του υποδοχέα της LDL (θα αναφέρονται ως *Ldlr*-null) (**Εικόνα 12**). Οι μύες, σε ομάδες των 4-5 ατόμων, παρέμεναν σε ειδικούς κλωβούς (πλεξιγκλάς) διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, με στρωμή από αποστειρωμένο ροκανίδι. Η θερμοκρασία του χώρου, όπου ήταν τοποθετημένοι οι κλωβοί ήταν σταθερή ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) και υπήρχε σταθερός κύκλος φωτός - σκότους 12 ωρών (07.00 π.μ.- 19.00 μ.μ. φως, 19.00 μ.μ.- 07.00 π.μ. σκοτάδι). Οι wild type και οι *Ppara* null μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση (ad libitum) σε τυποποιημένη τροφή καθορισμένης σύστασης (diet 1324 TPF, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) ενώ οι *Ldlr*-null μύες ακολούθησαν δυτικού τύπου δίαιτα (17,3% πρωτεΐνες, 48,5% υδατάνθρακες, 21,2% λίπος, 0,2% χοληστερόλη, 4,5 Kcal/g). Όλες οι ομάδες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και ελέγχονταν

καθημερινά για ενδείξεις stress ή προβλημάτων υγείας. Τα πειραματόζωα κατά την ολοκλήρωση των πειραμάτων είχαν ηλικία οκτώ (8) εβδομάδων, ενώ το βάρος τους κυμαίνονταν ανάλογα με τον τύπο της διατροφής που ακολουθούσαν, μεταξύ 20 με 25 gr.



Εικόνα 12: Αρσενικοί μύες SV129 και C57BL/6

6.2 Φάρμακα, κυτταρικές σειρές και πλασμίδια

Ο αγωνιστής του PPAR α , WY-14643, αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich και η κυτταρική σειρά ανθρώπινων ηπατοκυττάρων από την ATCC. Το θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο, το τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), ο εμβρυϊκός βόειος ορός (fetal bovine serum, FBS), τα αντιβιοτικά, η πενικιλίνη, η στρεπτομυκίνη, η L-γλουταμίνη και τα μη-βασικά αμινοξέα προήλθαν από την Gibco BRL Life Technologies. Ο άνευ ξυλάνθρακα εμβρυϊκός βόειος ορός (charcoal stripped FBS) αγοράστηκε από την Life Technologies, το σύστημα προσδιορισμού λουσιφεράσης από την Promega και το σύστημα ανίχνευσης της β-γαλακτοσιδάσης από την Applied Biosystems.

Το πλασμίδιο p(A-OX3)-TKSL, το οποίο περιέχει 3 αντίγραφα του DR1 PPRE από το γονίδιο της mAcyl CoA οξειδάσης (ACO gene) συνδεδεμένα με λουσιφεράση κινάσης θυμιδίνης (TK luciferase) και το πλασμίδιο που εκφράζει τον

υποδοχέα PPARα (PPAR cDNA κλωνοποιημένο σε έναν pCMX φορέα) ήταν μία γενναιόδωρη προσφορά του Δρ. M. Ricote. Η αλληλουχία που περιείχε το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου RXRα σε έναν φορέα έκφρασης pMT2 ήταν μία δωρεά της Δρ. M. Χατζοπούλου-Κλαδάρα.

6.3 Αγωγή με Ελευρωπαΐνη

Η ελευρωπαΐνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε από τα φύλλα του δέντρου της ελιάς (*Olea europaea*) όπως έχει ήδη περιγραφεί (263). Το δοσολογικό σχήμα της ελευρωπαΐνης βασίστηκε σε προηγούμενα ευρήματα (16) καθώς και σε βιβλιογραφικές αναφορές (13).

6.3.1 *In vivo* αξιολόγηση της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης

Η ελευρωπαΐνη (100mg/kg) χορηγούνταν καθημερινά σε σβώλους (πελλετ) τροφής για 6 συνεχόμενες εβδομάδες. Η ελευρωπαΐνη χορηγήθηκε μέσω σβώλων τροφής, επειδή έχει αποδειχθεί ότι ακόμη και υπό κανονικές ισο-οσμωτικές συνθήκες του εντερικού αυλού απορροφάται ελάχιστα. Η απορρόφηση μπορεί να βελτιωθεί αισθητά μέσω της ροής διαλύτη από τους παρακυτταρικούς κόμβους, το οποίο καθίσταται δυνατό σε υποτονικές συνθήκες του εντερικού αυλού ((264). Η παρουσία γλυκόζης ή αμινοξέων στον εντερικό αυλό μετά το γεύμα διεγείρει τη ροή νερού μέσω της διάνοιξης των παρακυτταρικών κόμβων και πιθανόν αυτός ο μηχανισμός συμμετέχει στην απορρόφηση της ελευρωπαΐνης όμοια με τη χρήση υποτονικού διαλύματος. (265). Παρά το γεγονός ότι το φαρμακοκινητικό προφίλ της ελευρωπαΐνης δεν έχει καθοριστεί στους μύες, ο Boccio και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι μία από στόματος δόση ελευρωπαΐνης (100 mg/kg) απορροφάται στους επίμυες, φτάνοντας τα 200 ng/ml σε μέγιστο χρόνο 2 ωρών (266). Δύο ώρες μετά την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου, οι μύες θανατώθηκαν με ασφυξία και

αίμα από τον κορμό συλλέχθηκε σε BD Microtainer Serum Separator Tubes (Becton, Dickinson and Company, USA) για βιοχημική ανάλυση. Δείγματα ήπατος, καρδιάς, πνευμόμων, νεφρών, μυών, καφέ και λευκού λιπώδους ιστού συλλέχθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA και πυρηνικών, κυτταροπλασματικών και ολικών πρωτεϊνών. Όλα τα δείγματα ιστών και ορού φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι να αναλυθούν.

6.3.2 *In vitro* αξιολόγηση της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα

Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα επώαστηκαν είτε μόνο με ελευρωπαΐνη σε τελική συγκέντρωση 10μM είτε με ελευρωπαΐνη σε συνδυασμό με αναστολείς των σηματοδοτικών μονοπατιών του JNK SP600125, 10μM (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), του cAMP/PKA H89, 10μM (Sigma-Aldrich), της MAPKK (PD98056, 10μM), των αλκαλικών φωσφατασών και φωσφατασών τυροσίνης Na_3OV_4 , 1μM (Sigma Aldrich) και του PI3K/AKT (wortmannin, 1μM) για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Οι αναστολείς προστέθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο 30 λεπτά πριν την ελευρωπαΐνη. Χορηγήθηκε επίσης ένα συνθετικό ανάλογο του cAMP (8-Br-cAMP) σε συγκέντρωση 25μM και ινσουλίνη σε συγκέντρωση 1μM. Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα επώαστηκαν με τους ανωτέρω συνδυασμούς για διάφορες χρονικές περιόδους, από 2 μέχρι 12 ώρες.

6.4 Θυσία πειραματόζων

Μετά το πέρας των φαρμακολογικών χειρισμών, ακολούθησε η θυσία των πειραματόζων και όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 7.3.1 συλλέχθηκαν δείγματα ήπατος (τα οποία ζυγίζονταν σε ζυγό), καρδιάς, πνευμόμων, νεφρών, μυών, καφέ και λευκού λιπώδους ιστού για την απομόνωση ολικού RNA και πυρηνικών,

κυτταροπλασματικών και ολικών πρωτεϊνών. Έγινε συλλογή του αίματος των μυών μέσα σε κρύους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους είχαν προστεθεί 10μl EDTA 0.5% (ως αντιπηκτικός παράγοντας) και ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων αίματος για το διαχωρισμό του πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά.

6.5 Quantitative real-time PCR

6.5.1 Απομόνωση RNA

Προκειμένου να απομονωθεί το RNA από τους προς μελέτη ιστούς πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με ομογενοποιητή (Heidolph RZRO, Γερμανία) και ειδικό έμβολο από teflon. Έγινε προσαρμογή του εμβόλου στον ομογενοποιητή και ακολούθησε καθαρισμός του εμβόλου με αιθανόλη 75% και στη συνέχεια με αποστειρωμένο d.d. H₂O (συν DEPC). Η απομόνωση ολικού RNA επιτεύχθηκε με την χρήση διαλύματος TRIzol (Invitrogen, USA). Το TRIzol είναι ένα διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς. Κατά την ομογενοποίηση των δειγμάτων και τη λύση τους, ο ρόλος του TRIzol είναι η διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και του εσωτερικού των κυττάρων, ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του RNA. Ακολούθως, έγινε προσθήκη χλωροφορμίου και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε, ώστε να διαχωριστεί το διάλυμα σε δυο διαφορετικές φάσεις, την ανόργανη και την οργανική. Το RNA, το οποίο ήταν διαλυμένο στην ανόργανη φάση, συλλέχθηκε μετά από προσθήκη ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich). Το ίζημα καθαρίστηκε με 75% αιθανόλη (Panreac, Barcelona, Spain) και ακολούθησε αναδιάλυσή του σε d.d. H₂O/DEPC (Invitrogen, USA). Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- i. Προετοιμάστηκαν αποστειρωμένοι σωληνίσκοι των 5ml και σε αυτούς προστέθηκε 500μl TRIzol (Invitrogen).

- ii. Παραμονή του ιστού μέσα στο TRIzol για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- iii. Με χρήση ομογενοποιητή και εμβόλου έγινε ομογενοποίηση του ιστού μέσα στους σωληνίσκους.
- iv. Φυγοκέντρηση στα 13000g για 10 λεπτά, στους 4°C.
- v. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια αποστειρωμένα eppendorf (1.5ml) και ταυτόχρονη απόρριψη του ιζήματος.
- vi. Προσθήκη 150μl χλωροφορμίου (Sigma-Aldrich) και ανακίνηση (30-40 φορές).
- vii. Παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά, μέσα σε πάγο.
- viii. Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.
- ix. Μεταφορά του υπερκείμενου (ημιδιαφανής φάση) σε καινούριους αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf.
- x. Προσθήκη 250μl ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich), η οποία είχε διατηρηθεί για λίγα λεπτά μέσα σε πάγο. Προσεκτική ανακίνηση (30-40 φορές).
- xi. Παραμονή του διαλύματος μέσα σε πάγο για 10 λεπτά.
- xii. Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.
- xiii. Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 500μl αιθανόλης 75% (παρασκευασμένη με αποστειρωμένο d.d. H₂O/DEPC) και ανακίνηση (η ανακίνηση έγινε πολύ προσεκτικά ώστε να μη χαθεί το ίζημα).
- xiv. Φυγοκέντρηση στα 7500g για 5 λεπτά, στους 4°C.
- xv. Προσεκτική αφαίρεση όλης της ποσότητας αιθανόλης 75%.
- xvi. Προσθήκη 100μl αποστειρωμένου d.d. H₂O/DEPC (Invitrogen) και προσεκτική ανάδευση με πιπέτα με σκοπό την ήπια και ομοιόμορφη αναδιάλυση του ιζήματος RNA.

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομετρική μέθοδο (χρήση του φωτόμετρου NanoDrop).

6.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Η συγκέντρωση των διαλυμάτων RNA που προέκυψαν από την απομόνωση RNA από το ήπαρ και τον λευκό λιπώδη ιστό προσδιορίστηκε με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Ο προσδιορισμός με αυτή τη μέθοδο θεωρείται ο ιδανικότερος, διότι πρώτον απαιτούνται μόνο 2μl δείγματος RNA για κάθε μέτρηση και δεύτερον η οπτική πυκνότητα, η ακριβής συγκέντρωση του RNA και ο λόγος απορρόφησης A260/A280, ο οποίος δίνει σημαντικές πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος RNA, υπολογίζονται αυτόματα από το πρόγραμμα του H/Y, που είναι συνδεδεμένος με το φωτόμετρο NanoDrop.

6.5.3 Μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής είναι μια υψηλής ευαισθησίας μέθοδος για την μελέτη της έκφρασης του γονιδιώματος (mRNA) από ιστό ή κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ειδικές εναρκτηρίες αλληλουχίες (Oligo p(dT)15 primer) χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το ολικό mRNA του γονιδίου που έχει απομονωθεί. Για να έρθει εις πέρας αυτή η αντίδραση, απαιτείται η παρουσία του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), η οποία χρησιμοποιεί το RNA ως μήτρα για να συνθέσει τον κάθε κλώνο του DNA. Το δίκλωνο DNA, που είναι το προϊόν αυτής της αντίδρασης, στη συνέχεια ενισχύεται με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), κατά την οποία το γονιδίωμα πολλαπλασιάζεται εκατομμύρια φορές (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Απαιτούμενος εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την RT-PCR

Υλικά	
Συσσκευή CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
DEPC-treated H ₂ O	Invitrogen, USA
100mM dNTP Set	Invitrogen, USA
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, USA
Oligo p(dT)15 primer for cDNA	Roche, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen, USA
100mM DTT Solution	Invitrogen, USA
PCR Tube Strips	Bio-Rad, USA

Σε αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf παρασκευάστηκαν τα εξής:

Μείγμα Α, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 9,5μl DEPC/H₂O, 1μl μείγματος dNTP set και 1μl oligo p(dT)15 primer.

Μείγμα Β, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 4μl 5x First strand buffer και 2μl 0,1 mM DTT solution.

Μείγμα Γ, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 0.75μl DEPC/d.d. H₂O και 0.25μl SuperScriptII (το οποίο προστίθεται στο τέλος της διαδικασίας λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του ενζύμου).

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Προσθήκη 11,5μl **Μείγματος Α** σε κάθε σωληνίσκο (PCR Tube Strip) και εν συνεχεία 1,5μl δείγματος RNA (συγκέντρωσης 1μg/μl) και φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο (Centrifuge 5430, Eppendorf, USA) στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.
- Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και ψύξη (cooling) στους 4°C για 1 λεπτό.

- iii. Προσθήκη 6μl **Μείγματος Β** σε κάθε σωληνίσκο και φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.
- iv. Επώαση στους 42°C για 2 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, έγινε προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II στο Μείγμα Γ, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα απενεργοποίησής της.
- v. Προσθήκη 1μl **Μείγματος Γ** σε κάθε σωληνίσκο, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα.
- vi. Επώαση στους 42°C για 1 ώρα και 58 λεπτά,
- vii. Επώαση στους 70°C για 15 λεπτά και ψύξη (cooling) στους 4°C για 5 λεπτά.
- viii. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, προσθήκη 80μl DEPC/d.d. H₂O σε κάθε σωληνίσκο και αποθήκευση στους -80°C.

6.5.4 Προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των προϊόντων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (real time) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι ειδικά για το κάθε γονίδιο, το οποίο μελετάται. Οι αντιδράσεις PCR γίνονται σε συσκευή C1000 Thermal Cyclers (Bio-Rad), μέσα σε ειδικά Multiplate PCR πιάτα (Bio-Rad) 96 θέσεων.

Πίνακας 7: Απαιτούμενος εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την real time PCR.

Υλικά	
Συσκευή CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
DEPC-treated H ₂ O	Invitrogen, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA
Εκκινητές (forward και reverse primers) για τα γονίδια προς εξέταση	VBC-Genomics, Austria
Microseal 'B' Adhesive Seals, Optical	Bio-Rad, USA
Multiplate 96-Well PCR Plates	Bio-Rad, USA

Για τη μελέτη cDNA προερχόμενου από RNA που είχε απομονωθεί από ιππόκαμπο ή προμετωπιαίο φλοιό, σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου PCR, έγινε προσθήκη των εξής:

- i. 1μl εκκινητή forward συγκεκριμένου γονιδίου
- ii. 1μl εκκινητή reverse συγκεκριμένου γονιδίου
- iii. 5μl SYBR Green PCR Master Mix
- iv. 1,5μl DEPC-treated water
- v. 1,5μl δείγματος cDNA

Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν. Ακολούθως, το πιάτο PCR καλύφθηκε με ειδική αυτοκόλλητη μεμβράνη (Microseal 'B' Adhesive Seal, Biorad), έγινε φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 3 λεπτά και το πιάτο τοποθετήθηκε στην ειδική βάση της συσκευής PCR. Ο έλεγχος της διαδικασίας της PCR έγινε μέσω του προγράμματος (Bio-Rad CFX Manager) του H/Y, στον οποίο ήταν συνδεδεμένη η συσκευή C1000 Thermal Cycler. Οι θερμικές συνθήκες ήταν οι εξής:

Πίνακας 8: Παρουσίαση θερμικών συνθηκών για την real time PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική διάρκεια
1	95	10mins
2	95	15secs
3	69	1min
4	Επανάληψη σταδίων 2 και 3, 39 φορές	
5	95	15secs
6	60	15secs
7	95	15secs

Η συνολική διάρκεια της διαδικασίας ήταν 1 ώρα και 37 λεπτά. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της PCR, το πρόγραμμα του H/Y εμφάνισε τις C(t) του κάθε δείγματος, καθώς και την καμπύλη της αντίδρασης PCR που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, έγινε μέτρηση PCR με εκκινητή το house-keeping γονίδιο της β-ακτίνης (Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay, Qiagen, USA). Οι τιμές των C(t) του κάθε γονιδίου προς μελέτη αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές C(t) της β-ακτίνης και η τιμή που προέκυψε ήταν η σχετική τιμή που αντιστοιχούσε στην έκφραση του mRNA του αντίστοιχου γονιδίου. Οι διάφοροι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών (primers) των γονιδίων

Εκκινητές	Αλληλουχία
PPARα	F: CAGTGGGGAGAGAGGACAGA R: AGTTCGGGAACAAGACGTTG
PPARγ	F: CACAAGAGCTGACCCAATGGT R: AATAATAAGGTGGAGATGCAGGTTCT
PPARβ/δ	F: AGATGAAGACAAACCCACGG R: CTGTGGCTGTTCCATGACTG
HNF4α	F: CGGAGCCCCTGCAAAGT R: ACTATCCAGTCTCACAGCCCATTCT
Acox	F: GGGAGTGCTACGGGTTACATG R: CCG ATA TCC CCA ACA GTG ATG
Acot1	F: ATG GCA GCA GCT CCA GAC TT R: CCC AAC CTC CAA ACC ATC AT
Acot4	F: AACATCGATGATGCCTGGA R: GTCACTTCATGGCTCCCG
eNOS	F: GCAGAAGAGTCCAGCGAACA R: GGCAGCCAAACACCAAAGTC
iNOS	F: GTG TTC CAC CAG GAG ATGTTG R: CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC
PXR	F: AAG AAG CAG ACT CTG CCT TGG A R: GTG GTA GCC ATT GGC CTT GT
RXR	F: CTC CAT GAG GAA GGT GTC AAT G R: AAG TGT CTG GAG CAC CTG TTC TT
CAR	F: CCT CTT CTC CCC TGG TTT CTG R: TCA TTG CCA CTC CCA AGC TC
Cyp4a10	F: CCAGGAACTGCATTGGGAAA R: GACCCTGGTAGGATCTGGCA
Cyp4a14	F: GGTGAGGCTGATTGAGTCTTGAG R: CTCCAGATTGATCCAGGATGGA
Dgat1	F: GACGGCTACTGGGATCTGA R: TCACCACACACCAATTCAGG
Dgat2	F: CGCAGCGAAAACAAGAATAA R: GAAGATGTCTTGAGGGGCTG
Lipin1	F: TCCTTCACCGTCACAAACAC R: TTTTTCATACAAAGGCAGC
Lipin2	F: GCCCACATAATTCATGGTTTG R: GGTTCAGGAAAGCTCGTTGA
Acadm	F: AGCTCTAGACGAAGCCACGA R: GCGAGCAGAAATGAAACTCC
LDL-r	F: GGGAACATTTTCGGGGTCTGT R: AGTCTTCTGCTGCAACTCCG
PCSK9	F: GGCTGCCAGGAACCTACATT R: CTGGGCGAAGACAAAGGAGT
MTTP	F: CGTGGTGAAAGGGCTTATTC R: TCGCGATACCACAGAATGAA
Lpl	F: TTTGGCTCCAGAGTTTGACC R: TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG

ATGL/PNPLA2	F: CCACTCACATCTACGGAGCC R: TAATGTTGGCACCTGCTTCA
HSL	F: CCTCCAAGCAGGGCAAAGA R: GCGTAAATCCATGCTGTGTGA
NR4A	F: ATTGAGCTTGAATACAGGGCA R: GCTAGAAGGACTGCGGAGC
CES3/TGH	F: TGGTATTTGGTGTCCCATCA R: GCTTGGGCGATACTCAAACCT
CD36	F: GCGACATGATTAATGGCACA R: CCTGCAAATGTCAGAGGAAA
Plin3	F: ACAGGTTCCCTCCATAGCAGC R: CTTGGTAGGGGAGGTTTCCT
Plin5	F: ACGCACAAAGTAGCCCTGTT R: CCG ATA TCC CCA ACA GTG ATG
AADAC	F: ACCGCTTCCAGATGCTATTG R: TGATTCCCAAAAAGTTCACCA
Cyp7a1	F: AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA R: GTCCGGATATTCAAGGATGCA
Cyp8b1	F: ACGCTTCCTCTATCGCCTGAA R: GTG CCTCAGACGCAGAGGAT
BAAT	F: ACAGGCCTGGCCCCCTTTCA R: CCCATGGGGTGGACCCCAT
PGC1a	F: TGT AGC GAC CAA TCG GAA AT R: TGA GGA CCG CTA GCA AGT TT
β-actin	F: TATTGGCAACGAGCGGTTCC R: GGCATAGAGGTCTTTACGGATGTC

6.6 Western blot analysis

Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της πρωτεϊνικής έκφρασης του PPAR α και του hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α), όπως και των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής της mitogen-activated protein kinase 38 (p-p38-MAPK) διενεργήθηκε σε πυρηνικό εκχύλισμα δειγμάτων ήπατος. Για την απομόνωση του πυρηνικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε το NE-PER nuclear extraction kit (Pierce, Rockford, IL). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της forkhead box protein O1 (FOXO1) ελέγχθηκαν τόσο σε πυρηνικά όσο και σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα δειγμάτων ήπατος. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70S6 κινάσης (Thr389) ελέγχθηκαν σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα δειγμάτων

ήπατος. Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης HSL, της ολικής ATGL, της περιλιπίνης 5 (PLIN5) και της ολικής perilipin (PLIN) αξιολογήθηκαν στο ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών του λευκού λιπώδους ιστού.

6.6.1 Απομόνωση ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών από ήπαρ και λευκό λιπώδη ιστό

Σε αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf τοποθετούμε τον απομονωμένο ιστό και κατόπιν προσθέτουμε τα εξής:

- | |
|--|
| • 500μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (με 0,5μl Protease Inhibitor Cocktail, Pierce) |
| • 5μl διαλύματος PMSF (αρχικής συγκέντρωσης 100mM, Sigma-Aldrich) |
| • 5μl διαλύματος β-glycerophosphate (αρχικής συγκέντρωσης 500mM, Sigma-Aldrich) |
| • 5μl διαλύματος NaF (αρχικής συγκέντρωσης 500mM, Sigma-Aldrich) |
| • 0,5μl διαλύματος NaVO ₃ (αρχικής συγκέντρωσης 400mM, Sigma-Aldrich) |

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ομογενοποίηση για 2-3 λεπτά με μικρά πλαστικά έμβολα ειδικά ώστε να εφαρμόζουν στους σωληνίσκους eppendorf και στη συνέχεια το ομογενοποίημα αφήνεται μέσα σε πάγο για 15 λεπτά. Το προϊόν της ομογενοποίησης φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C (σε φυγόκεντρο eppendorf centrifuge 5417R). Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελούνταν από τις ολικές πρωτεΐνες, χωρίστηκε σε υποπολλαπλάσιες ποσότητες (aliquots) των 100μl και μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέους αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf που αποθηκεύτηκαν χωρίς καμία καθυστέρηση στους -80°C.

6.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε με το BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την αντίδραση αναγωγής του Cu^{+2} σε Cu^{+1} από την πρωτεΐνη μέσα σε αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του Cu^{+1} , χρησιμοποιώντας το δικιχονινικό οξύ (bicinchoninic acid). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης απαιτήθηκε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης (standard curve), με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης από βόειο ορό (BSA). Το πρωτόκολλο του BCA Protein Assay Kit, ακολουθήθηκε με μικρές προσαρμογές και συνοψίζεται στα εξής:

- i. Προετοιμασία των διαλυμάτων της πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές αραιώσεις ενός αρχικού διαλύματος BSA (Pierce, USA), συγκέντρωσης 2mg/ml. Προετοιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.025mg/ml και ένα "τυφλό" δείγμα (blank) με 0mg/ml BSA.
- ii. Προετοιμασία του BCA Working Reagent, με αναλογία 50 μέρη BCA Reagent A με 1 μέρος BCA Reagent B. Μετά την ανάμιξη, το μείγμα απέκτησε χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα.
- iii. Σε σωληνίσκους eppendorf μεταφέρουμε 2μl αρχικού δείγματος πρωτεΐνης και προσθέτουμε 38μl d.d H_2O ώστε να επιτευχθεί αραιώση 1:20.
- iv. Μεταφορά 5μl από κάθε αραιωμένο δείγμα πρωτεΐνης και κάθε δείγματος standard BSA, σε σωληνίσκους eppendorf.
- v. Προσθήκη 100μl μείγματος BCA Working Reagent σε κάθε σωληνίσκο eppendorf και ανακίνηση για 30 δευτερόλεπτα.
- vi. Επώαση των μειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά.

- vii. Ακολουθεί επώαση 5' σε πάγο
- viii. Τα μείγματα αφήνονται να φθάσουν την θερμοκρασία δωματίου.
- ix. Γίνεται ανίχνευση στα 595 nm με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος σε πρωτεΐνες γίνεται με το υπολογιστικό πρόγραμμα του NanoDrop 2000.

6.6.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blot

Προετοιμασία δειγμάτων πρωτεΐνης

Για την επιλογή της βέλτιστης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης, που έπρεπε να φορτωθεί, έγινε πιλοτική ανάλυση διαφόρων ποσοτήτων πρωτεΐνης (linearization). Έτσι, 80μg-100μg ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης (ήπαρ) ή 40μg-80 μg (WAT) αναλύθηκαν πιλοτικά και η ποσότητα πρωτεΐνης, που έδωσε το καλύτερο σήμα επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Για την αραίωση των δειγμάτων ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (**sample buffer**), το οποίο έχει την εξής σύνθεση:

- 4 ml d.d. H₂O
- 1 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
- 800 μl Glycerol (Sigma-Aldrich)
- 1.6 ml SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)
- 400 μl 2-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)
- 200 μl bromophenol blue 0.5 % (Sigma-Aldrich)

Ανάλογα με τα αποτελέσματα του linearization υπολογίστηκε ο όγκος του αρχικού δείγματος ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών που φορτώθηκε στα πηγαδάκια της γέλης. Η πρωτεΐνη και το διάλυμα φόρτωσης αναμείχθηκαν και οι πρωτεΐνες αποδιατάχθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά σε heat block (Stuart block heater SBH130DC, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 1 λεπτό και στην συνέχεια αφέθηκαν εκτός πάγου, έως ότου η θερμοκρασία προσεγγίσει εκείνη του περιβάλλοντος και στην συνέχεια φορτώθηκαν στη γέλη για ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση

Τα δείγματα φορτώθηκαν και διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης (SDS-PAGE) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 7 %. Το πήκτωμα αποτελούνταν από δύο μέρη:

α) **πήκτωμα διαχωρισμού** (κάτω μέρος), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (επαρκείς ποσότητες για δύο πηκτώματα):

5.345 ml d.d. H₂O
2.5 ml Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)
100 µl SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)
2.5 ml Acrylamide 30% (BioRad)
50 µl APS 10% (Sigma-Aldrich)
5 µl TEMED (Sigma-Aldrich)

β) **πήκτωμα επιστοιβάξης** (πάνω μέρος), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (επαρκείς ποσότητες για δύο πηκτώματα):

3.8 ml d.d. H₂O
1.5 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
60 µl SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)
800 µl Acrylamide 30% (BioRad)
30 µl 10% APS (Sigma-Aldrich)
6 µl TEMED (Sigma-Aldrich)

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, California, USA) στα 100 Volt για περίπου 90 λεπτά, μέσα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer: 25 mM Tris-base, 250 mM Glycine, 0.1 % SDS). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από την γέλη σε μεμβράνες Hybond-P PVDF (Amersham, USA, πριν την χρήση απαιτείται η ενεργοποίησή τους με μεθανόλη 100% για 1 λεπτό και πλύση με d.d. H₂O για 5 λεπτά και επώαση σε transfer buffer για >5 λεπτά) με την ίδια συσκευή BioRad, στα 30 Volt για 12-14 ώρες (overnight), στους 4°C μέσα σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 20% methanol) υπό ανακίνηση.

Ανίχνευση πρωτεϊνών

Πριν την έναρξη της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western, προετοιμάστηκαν τα εξής διαλύματα:

α) Διάλυμα TBS: 10mM Tris-HCl και 0.154M NaCl, pH 7.5

β) Διάλυμα TTBS: διάλυμα TBS, 0.25% Tween 20 (Sigma, USA)

Οι μεμβράνες επώαστηκαν αρχικά για 1 ώρα στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα

(blocking solution), αποτελούμενο από διάλυμα TTBS και 3% άπαχο γάλα σε σκόνη, προκειμένου να δεσμευτούν οι μη-ειδικές (κενές) θέσεις δέσμευσης του αντισώματος. Στη συνέχεια οι μεμβράνες πλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα TTBS επί 5 λεπτά έκαστη. Ακολούθως, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 12-14 ώρες (overnight) στους 4°C υπό συνεχή ανακίνηση, με τα πολυκλωνικά πρωτογενή αντισώματα (PPAR α , hn-RNP A2, b-actin, phospho-Creb ser133), σε διάλυμα TTBS που περιείχε είτε 3% ή 5% άπαχο γάλα είτε 5% Bovine Serum Albumin (φωσφορυλιωμένο αντίσωμα). Λεπτομέρειες για τον χρόνο επώασης, τις αραιώσεις, το είδος του διαλύματος παρεμπόδισης (blocking solution) και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται αναλυτικά στον **Πίνακα 10**.

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά των πρωτογενών & δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Πρωτογενές Αντίσωμα (primary antibody)	Είδος/ Οργανισμός προέλευσης	Χρόνος Επώασης	Αραίωση πρωτογενούς αντισώματος	Διάλυμα παρεμπόδισης (blocking solution)	Δευτερογενές Αντίσωμα (secondary antibody)	Αραίωση δευτερογενούς αντισώματος
Actin (Cell Signaling)	polyclonal goat	12-14hrs 4°C	1:750	3% άπαχο γάλα	Anti-goat IgG HRP-linked	1:2000
Histone H3 (Santa Cruz)	polyclonal goat	12-14hrs 4°C	1:500	3% άπαχο γάλα	Anti-goat IgG HRP-linked	1:2000
PPARα (Santa Cruz)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:500	3% άπαχο γάλα	Anti-rabbit IgG HRP- linked	1:2000
HNF4a	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:300	3% άπαχο γάλα	Anti-rabbit IgG HRP- linked	1:2000
Phospho- p70S6K (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:500	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP- linked	1:2000
Phospho- p38(Santa Cruz)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:500	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP- linked	1:2000
FKHR(Santa Cruz)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	3% άπαχο γάλα	Anti-rabbit IgG HRP- linked	1:2000

Phospho-FKHR(Santa Cruz)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000
STA5β(Santa Cruz)	Polyclonal mouse	12-14hrs 4°C	1:750	3% άπαχο γάλα	Anti-mouse IgG HRP-linked	1:2000
ATGL (Santa Cruz)	polyclonal goat	12-14hrs 4°C	1:500	3% άπαχο γάλα	Anti-goat IgG HRP-linked	1:2000
LSDP5(PLIN5 Santa Cruz)	polyclonal goat	12-14hrs 4°C	1:500	3% άπαχο γάλα	Anti-goat IgG HRP-linked	1:2000
Perilipin (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	3% άπαχο γάλα	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000
HSL (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	3% άπαχο γάλα	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000
Phospho-HSL(Ser563) (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000
Phospho-HSL(Ser565) (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000
Phospho-HSL(Ser660) (Cell Signaling)	polyclonal rabbit	12-14hrs 4°C	1:1000	5% BSA	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000

Εν συνεχεία, οι μεμβράνες πλύθηκαν 5 φορές με TTBS, επί 5 λεπτά και ακολούθησε επώαση - υπό ανακίνηση - με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked, anti-goat IgG, Horseradish Peroxidase-linked και anti-biotin IgG, Horseradish Peroxidase-linked) στους 4°C για 1 ώρα (διάλυμα 3% άπαχο γάλα ή 5% BSA σε TTBS). Οι μεμβράνες πλύθηκαν 5 φορές με διάλυμα TTBS (5 λεπτά ανά πλύση) και εν συνεχεία - μέσα σε σκοτεινό θάλαμο - οι μεμβράνες επώαστηκαν σε μείγμα 1:1 των reagents A και B του συστήματος χημειοφωταύγειας ECL (Amersham, GE Healthcare, UK). Έγινε ανάμειξη 1ml reagent A και 1ml reagent B, και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετήθηκε στην επιφάνεια της μεμβράνης για 5 λεπτά. Κατόπιν οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε ειδική επιφάνεια της συσκευής απεικόνισης ChemiDoc™ XRS+ system (Biorad, USA) και έπειτα από κατάλληλες ρυθμίσεις για τον χρόνο έκθεσης και την συχνότητα αποθήκευσης των εικόνων της μεμβράνης λήφθηκαν οι κατάλληλες ψηφιακές φωτογραφίες.

6.7 Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ μυών

6.7.1 Διαδικασία απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων

Η απομόνωση διενεργήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ μυών και επίμυων του εργαστηρίου του NIH, το οποίο στηρίζεται στη μέθοδο του Klaunig et al. (267, 268), με ορισμένες μετατροπές.

Συγκεκριμένα, για την απομόνωση των πρωτογενών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα, το "διάλυμα έγχυσης" (perfusion buffer - 1mM Na₂EDTA σε 250ml HBSS) (*in situ* έγχυση διαλύματος κολλαγενάσης στο ήπαρ των μυών για την απομόνωση των παρεγχυματικών ηπατοκυττάρων) και το "διάλυμα κολλαγενάσης" (collagenase buffer - CaCl₂ 0.56g/L, Collagenase I 50mg/100ml σε

250ml HBSS), τα οποία αμέσως μετά την προετοιμασία τους διατηρήθηκαν στους 37°C καθ'όλη την διάρκεια της απομόνωσης των ηπατοκυττάρων. Επίσης, για τη διενέργεια της απομόνωσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε περισταλτική αντλία (Gilson, Minipuls evolution, Middleton, WI, USA) ώστε να κατασταθεί ικανή η μεταφορά των δύο διαλυμάτων στο ήπαρ του πειραματόζωου. Πριν την έναρξη της διαδικασίας, καθώς και καθ' όλη τη διάρκειά της, το πειραματόζωο βρίσκονταν υπό αναισθησία με αιθέρα (Panreac, Barcelona, Spain). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

α) Αναισθητοποίηση του πειραματόζωου με αιθέρα, μέσα σε ειδικό γυάλινο θάλαμο.

β) Μετά την επιβεβαίωση ότι το πειραματόζωο ήταν πλήρως αναισθητοποιημένο, έγινε η μεταφορά του σε ειδική μεταλλική βάση και ακινητοποίησή του πάνω σε αυτή.

γ) Καθαρισμός του τριχώματος της κοιλιακής χώρας με αιθανόλη 75% και οριζόντια τομή της κοιλιακής χώρας με αποστειρωμένα εργαλεία.

δ) Απομάκρυνση του στομάχου και των σπλάχνων προς τα δεξιά (έξω από την κοιλιακή κοιλότητα). Αναγνώριση της πυλαίας φλέβας και τοποθέτηση κλωστής κάτω από αυτήν, ώστε να δημιουργηθεί βρόγχος.

ε) Εισαγωγή βελόνας και καθετήρα (Surflo I/V catheter, 24G Terumo) στην πυλαία φλέβα, κλείσιμο του βρόγχου.

στ) Επιβεβαίωση της σωστής τοποθέτησης του καθετήρα (έξοδος φλεβικού αίματος από την πίσω μεριά του καθετήρα σημαίνει επιτυχή καθετηριασμό) και αφαίρεση της βελόνας (ώστε μόνον ο καθετήρας να βρίσκεται μέσα στην πυλαία φλέβα).

ζ) Προσαρμογή στον καθετήρα του σωλήνα, μέσω του οποίου μεταφέρθηκε από την αντλία το διάλυμα με την κολλαγενάση. Ενεργοποίηση της αντλίας.

η) Εκκίνηση της έγχυσης του **διαλύματος έγχυσης** (perfusion buffer) με ροή 15 ml/λεπτό. Συχνός έλεγχος για την σωστή θέση του καθετήρα μέσα στην πυλαία φλέβα (βλ. **Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Χαρακτηριστικός αποχρωματισμός του ήπατος από καφέ σε υποκίτρινο

θ) Μετά την αλλαγή χρώματος του ήπατος (από καφέ σε υποκίτρινο), έγινε τομή της μηριαίας αρτηρίας και φλέβας, με αποτέλεσμα την κατάληξη του πειραματόζωου εντός δευτερολέπτων λόγω αιμορραγίας.

ι) Ολοκλήρωση της έγχυσης των 250ml διαλύματος έγχυσης, και εκκίνηση της έγχυσης του **διαλύματος κολλαγενάσης** (collagenase buffer), όγκου επίσης 250ml. Η ροή αρχικά ήταν 15-20 ml/λεπτό και σταδιακά αυξήθηκε στα 30 ml/λεπτό. Το διάλυμα κολλαγενάσης, το οποίο ανέβλυζε από τα αγγεία του πειραματόζωου, συλλέχθηκε και επεστράφη στο αρχικό διάλυμα κολλαγενάσης (37°C), ώστε να επανεγχυθεί. Κατά τη διάρκεια της έγχυσης του δεύτερου διαλύματος, ήταν καλή πρακτική η μάλαξη του ήπατος, ώστε να επιταχύνεται η πλήρωση των λοβών του με το διάλυμα.

ια) Αλλαγή του χρώματος του ήπατος σε κίτρινο, ολοκλήρωση της έγχυσης του διαλύματος κολλαγενάσης και αφαίρεση του καθετήρα από την πυλαία φλέβα.

ιβ) Αφαίρεση των λοβών του ήπατος (με αποστειρωμένα εργαλεία) και τοποθέτησή τους σε δύο τριβλία petri (ισόποσα).

ιγ) Κατάτμηση των λοβών σε πολύ μικρά κομμάτια και μεταφορά του περιεχομένου του κάθε τριβλίου petri σε αποστειρωμένο σωληνίσκο falcon 50ml.

ιδ) Έκπλυση των κομματιών του ήπατος με 35ml διαλύματος DPBS (Gibco).

ιε) Φιλτράρισμα του περιεχομένου κάθε falcon μέσα από φίλτρο των 70μm (BD Falcon nylon filters, BD).

ιστ) Συλλογή του διαλύματος που προέκυψε από το φιλτράρισμα, σε νέο αποστειρωμένο σωληνίσκο falcon 50ml.

ιζ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.

ιη) Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 15ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon. Ανάδευση με την πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος (οι διαδικασίες από αυτό το σημείο και μετά γίνονταν μέσα σε hood για την αποφυγή επιμόλυνσης).

ιθ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.

κ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος.

κα) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.

κβ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος. Με την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης προστίθεται 1ml HBSS (Gibco) και 9ml Percoll (Sigma-Aldrich). Έγινε καλή ανάμιξη.

κγ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.

κδ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος.

κε) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.

κστ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml culture medium στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος. Το culture medium αποτελούνταν από William's Medium E (Gibco), 1% L-Glutamine (PAA, USA) και 1% Penicillin/Streptomycin (PAA).

κζ) Ποσοτικός προσδιορισμός των ηπατοκυττάρων σε chamber μέτρησης κυττάρων (βλ. **Εικόνες 14, 15**).

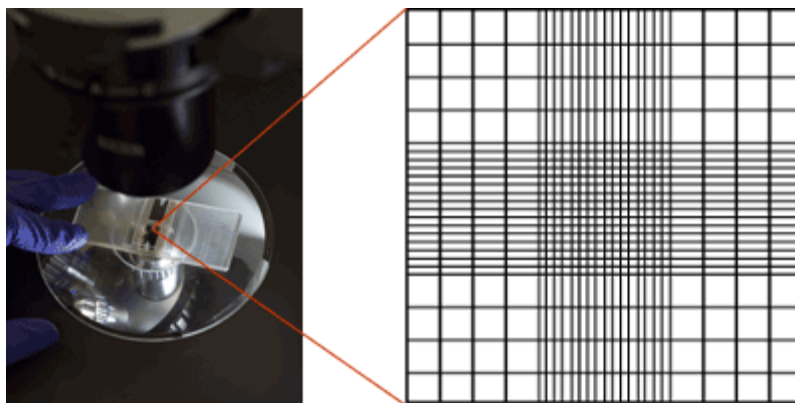
6.7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός κυττάρων και τοποθέτησή τους σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου

Σε ειδικό chamber μέτρησης κυττάρων (τύπου Neubauer, Marienfeld, Germany - βλ. **Εικόνα 14**) προστέθηκαν 10μl του διαλύματος πρωτογενών ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν. Με τη βοήθεια μικροσκοπίου έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, που βρίσκονταν εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων του chamber (βλ. **Εικόνα 15**) και έγινε υπολογισμός του μέσου όρου. Ο αριθμός που προέκυψε, πολλαπλασιάστηκε με το 10^4 και το τελικό αποτέλεσμα ήταν η συγκέντρωση των ηπατοκυττάρων σε 1ml.



Εικόνα 14: Chamber μέτρησης κυττάρων (τύπου Neubauer)

Η απαιτούμενη συγκέντρωση για την τελική τοποθέτηση των κυττάρων σε πιάτα (plating των κυττάρων) με 12 πηγαδάκια, ήταν 10^5 κύτταρα / 500μl. Επομένως, σύμφωνα με την μέτρηση, υπολογίστηκε ο τελικός όγκος, στον οποίο έπρεπε να αραιωθεί το 1ml κυττάρων.



Εικόνα15: Υπολογισμός αριθμού κυττάρων σε chamber Neubauer

Τα απομονωμένα ηπατοκύτταρα αναδιαλύθηκαν σε William's Medium Ε ενισχυμένο με L-γλουταμίνη, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και επιστρώθηκαν σε τριβλία 12 θέσεων διαμέτρου 60 mm επιστρωμένα με κολλαγόνο τύπου Ι (BIOCOAT, Cell Environment, Becton Dickinson Labware, UK) (Εικόνα 16). Τα ηπατοκύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C για 24 ώρες, σε συνθήκες υγραποιημένης ατμόσφαιρας με 5% CO₂ ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τριβλίου. Η δοκιμασία χρόνου απόκρισης ξεκίνησε έπειτα από 24 ώρες.



Εικόνα 16: Πιάτο με 12 πηγαδάκια προ-επικαλυμμένα με κολλαγόνο

6.7.3 Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων

Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων υπολογίζεται τοποθετώντας 10 μ l τρυψινοποιημένου κυτταρικού εναιωρήματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer και με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

- Συγκέντρωση (αριθμός κυττάρων/ml) = $\frac{\text{Αριθμός ζώντων κυττάρων}}{\text{Αριθμός τετραγώνων}} \times 10^4$

Η χρήση της βαφής trypan blue βασίζεται στο γεγονός ότι μπορεί να γίνει χρώση του κυτταροπλάσματος, μόνον εάν η κυτταρική μεμβράνη δεν είναι άθικτη. Επομένως κύτταρα, τα οποία βάφονται με την trypan blue είναι νεκρά, ενώ τα κύτταρα, τα οποία δεν φέρουν τη βαφή είναι ζώντα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

α) Χρησιμοποίηση του ειδικού chamber μέτρησης κυττάρων τύπου Neubauer για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων.

β) Προσθήκη 10 μ l trypan blue (διάλυμα 0.4%, Invitrogen) σε 100 μ l διαλύματος κυττάρων και ανάμιξη (η παρατεταμένη επαφή των κυττάρων με την βαφή trypan blue - για πάνω από 30 λεπτά - αποφεύχθηκε, λόγω της τοξικότητας της).

γ) Μεταφορά στο ειδικό chamber μέτρησης κυττάρων και μέτρηση (με τη βοήθεια μικροσκοπίου) των ολικών κυττάρων και έπειτα των κυττάρων που έφεραν την βαφή.

δ) Υπολογισμός του ποσοστού των ζώντων κυττάρων σύμφωνα με τον εξής μαθηματικό τύπο:

Το ποσοστό των ζώντων κυττάρων έπρεπε να είναι τουλάχιστον 85% για μια επιτυχημένη κυτταροκαλλιέργεια.

6.8 Κυτταροκαλλιέργεια και transient co-transfection assay

Η *in vitro* αξιολόγηση της πρόσδεσης της ελευρωπαϊνης στον PPAR α έγινε με το reporter gene assay από την κυρία Αντιγόνη Λάζου, Καθηγήτρια του τομέα Ζωολογίας, του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και από την κυρία Ιωάννα Βαλλιανού Διδάκτορα του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Κύτταρα HepG2 καλλιεγήθηκαν σε DMEM ενισχυμένο με 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), πενικιλίνη (100 units/ml), στρεπτομυκίνη (0.25 μ g/ml), L-γλουταμίνη (2 mM) και μη-βασικά αμινοξέα (0.1 mM), σε θερμοκρασία 37°C σε υγραποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Οι κυτταροκαλλιέργειες καθώς αυξάνονταν εκθετικά ανακαλλιεργούνταν συστηματικά. Την ημέρα 0, 5x10⁵ κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (διαμέτρου 60mm) με καλλιεργητικό μέσο DMEM που περιείχε 10% FBS. Την ημέρα 2, χρησιμοποιήθηκε ως καλλιεργητικό μέσο DMEM με 5% charcoal stripped FBS, ώστε να απαλειφθούν οι PPAR συνδέτες και οι τροφικοί παράγοντες του ορού. Την ημέρα 3, πραγματοποιήθηκε παροδική/μεταβατική επιμόλυνση με τη μέθοδο της συν-καθίζησης DNA με φωσφορικό ασβέστιο, σε φρέσκο DMEM με 5% charcoal

stripped FBS. Εν συντομία, τα κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (construct) λουσιφεράσης πυγολαμπίδας με PPRE (p(A-OX3)-TKSL, 1.5 μ g), μαζί με ανασυνδυασμένα πλασμίδια PPAR α (1.5 μ g) και RXR α (1.5 μ g) και 0.5 μ g πλασμιδίου β-γαλακτοσιδάσης. 16 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και προστέθηκε νέο DMEM με 5% charcoal stripped FBS. Η ελευρωπαΐνη και ο αγωνιστής του PPAR α , WY-14643, προστέθηκαν 24 ώρες μετά την επιμόλυνση των κυττάρων σε νέο DMEM με 5% charcoal stripped FBS αφού είχαν διαλυθεί σε DMSO σε κατάλληλη συγκέντρωση ανάλογα με το καλλιεργητικό μέσο, ώστε να μην υπερβαίνει το 0.5% (v/v) του συνολικού όγκου. Στα κύτταρα μάρτυρες προστέθηκε DMSO χωρίς τις υπό μελέτη ουσίες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά την επιμόλυνση και μετά τη λύση τους, αναλύθηκαν οι ενεργότητες της λουσιφεράσης και της γαλακτοσιδάσης με τα κιτ ανάλυσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή τους. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης με την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (internal control).

6.9 Βιοχημικές αναλύσεις

Η συγκέντρωση της συνολικής χοληστερόλης του ορού μετρήθηκε με το Cholesterol EIA kit (Wako Diagnostics, Richmond, VA). Τα επίπεδα των μη εστεροποιημένων ή ελεύθερων λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν με τη χρήση του NEFA C, EIA kit (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) και η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων του ορού με το ThermoTrace kit (Melbourne, Australia).

6.10 Molecular Docking Simulations - Μοριακή προσομοίωση πρόσδεσης

Η διερεύνηση της πρόσδεσης της Ελευρωπαϊνης στον υποδοχέα PPAR α , έγινε με την τεχνική Μοριακής Προσομοίωσης από τους κκ. Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και από τον κκ Γεώργιο Λαμπρινίδη, ΕΔΙΠ του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

6.10.1 Protein and Ligand Preparation – Προετοιμασία πρωτεΐνης και προσδέτη

Η κρυσταλλική δομή του PPAR α σε σύμπλοκο είτε με τον Indeglitazar, έναν παν-αγωνιστή των PPARs είτε με την ελευρωπαϊνή προήλθε από την εγγραφή 3ET1 της Protein Data Bank (PDB, <http://www.wwpdb.org/>) (269). Η πρωτεΐνη προετοιμάστηκε για τους υπολογισμούς σύνδεσης με τη χρήση του λογισμικού Protein Preparation Workflow (Schrödinger Suite 2011, Protein Preparation Wizard). Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη μελέτη (270).

6.10.2 Computational solvent mapping – Υπολογιστική Χαρτογράφηση Διαλύτη

Οι πιθανές θέσεις ενυδάτωσης του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου SZMAP [SZMAP 1.2.0.7: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>. (2013)] όπως έχει περιγραφεί (271).

6.10.3 Induced Fit Docking

Η μοριακή σύνδεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Induced Fit Docking (IFD) πρωτοκόλλου (Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol), το οποίο αποσκοπεί στην παράκαμψη της άκαμπτης θέσης πρόσδεσης και στοχεύει σε

κινήσεις των πλευρικών ομάδων ή του βασικού σκελετού του μορίου ή και των δύο κατά τη σύνδεση του προσδέτη (upon ligand binding). Κατά την πρώτη φάση του IFD πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί σύνδεσης με τη χρήση του λογισμικού Glide 5.7 (Glide, version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) και επελέγησαν 20 απεικονίσεις ανά προσδέτη. Στη δεύτερη φάση, για κάθε μορφή σύνδεσης του προσδέτη, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της πρωτεΐνης με τη χρήση του λογισμικού Prime 1.6 (Prime, version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) σε όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα σε απόσταση 8Å από τη θέση του προσδέτη. Η βελτιστοποίηση ξεκινά με διερεύνηση της διαμόρφωσης και ελαχιστοποίηση των πλευρικών αλυσίδων των επιλεγμένων αμινοξικών καταλοίπων. Τα ληφθέντα σύμπλοκα αξιολογήθηκαν με βάση την υπολογιζόμενη ενέργεια (μοριακή μηχανική και διαλυτοποίηση) ενώ στην τελευταία φάση της διαδικασίας πέρασαν τα σύμπλοκα με ελάχιστη ενέργεια δομής μέχρι 25kcal/mol. Τέλος, οι πιθανοί προσανατολισμοί του προσδέτη που χρησιμοποιήθηκαν στο πρώτο βήμα της πρόσδεσης, επανασυνδέθηκαν σε κάθε μία από τις δομές υποδοχής που προέκυψαν από το στάδιο της βελτιστοποίησης. Η τελική αξιολόγηση προέκυψε ως σύνθετο αποτέλεσμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης υποδοχέα προσδέτη (GlideScore), του είδους του υποδοχέα και της ενέργειας διάσπασης του συμπλόκου (Prime energy).

6.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS-14 για Microsoft Windows. Για την ανάλυση των μετρήσεων στις μελέτες πρόκλησης στρες περιορισμού (Restraint Stress) ή στρες μητρικής αποστέρησης (MDS), χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA) με παράγοντα την επίδραση του RS (σύγκριση ομάδων "μαρτύρων" και

ομάδων "στρες περιορισμού"). Η στατιστική επεξεργασία της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας και των μεταβλητών κινητικότητας στη μελέτη MDS, έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA), με παράγοντα την επίδραση του MDS.

Για την στατιστική ανάλυση των μετρήσεων από τους φαρμακολογικούς χειρισμούς *in vivo* και *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one-way ANOVA) ή κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA), ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων που είχαν συμπεριληφθεί σε κάθε μελέτη.

Η τιμή του $p < 0.05$ καθορίστηκε ως όριο για την αποδοχή της στατιστικής σημαντικότητας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Επίδραση της ελευρωπαϊνης στα επίπεδα των λιπιδίων

Μακροχρόνια αγωγή των WT ποντικών με ελευρωπαϊνη οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των TGs στον ορό τους (Πίνακας 11), ενώ η ελευρωπαϊνη δεν επηρέασε την συγκέντρωση των TGs στον ορό των ποντικών *Ppara*-null (Πίνακας 11), δείχνοντας έτσι την εμπλοκή του PPARα στην μείωση των TGs που προκάλεσε η ελευρωπαϊνη. Η συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης του ορού επίσης, μειώθηκε από την ελευρωπαϊνη στους WT ποντικούς (Πίνακας 11), μία επίδραση που όμως δεν φάνηκε στους διαγονιδιακούς ποντικούς *Ppara*-null (Πίνακας 11). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ελευρωπαϊνη δεν επηρέασε το σχετικό βάρος του ήπατος (βάρος ήπατος/βάρος σώματος, Μάρτυρες vs Ελευρωπαϊνη, $0.0483\text{g}\pm 0.0017\text{g}$ vs $0.044\text{g}\pm 0.0025\text{g}$).

Πίνακας 11. Μεταβολές στους λιπιδαιμικούς δείκτες στον ορό μετά από χορήγηση ελευρωπαϊνης

	Wild type μύες		<i>Ppara</i> null μύες		<i>Ldl-r</i> null μύες	
	Φυσιολογική διατροφή		Φυσιολογική διατροφή		Δίαιτα δυτικού τύπου	
	Μάρτυρες	OLE	Μάρτυρες	OLE	Μάρτυρες	OLE
TG	79.7±7.9	39.6±2.9*	182.3±6.7	192.7±9.0	350.0±71.0	316.0±26.0
FFA	0.3±0.1	0.5±0.1	0.7±0.04	0.9±0.04	3.5±0.9	3.4±0.4
Χοληστερόλη	139.0±8.3	93.0±6.1*	119.6±8.2	123.2±7.0	823.0±40.0	839.4±11.0

Πίνακας 11: TGs : Τριγλυκερίδια σε (mg/dl); FFA: Ελεύθερα λιπαρά οξέα σε (mEq/l); Ολική Χοληστερόλη σε (mg/dl); n:5-7 ενήλικοι αρσενικοί μύες ανά ομάδα ελέγχου; * $P < 0.001$.

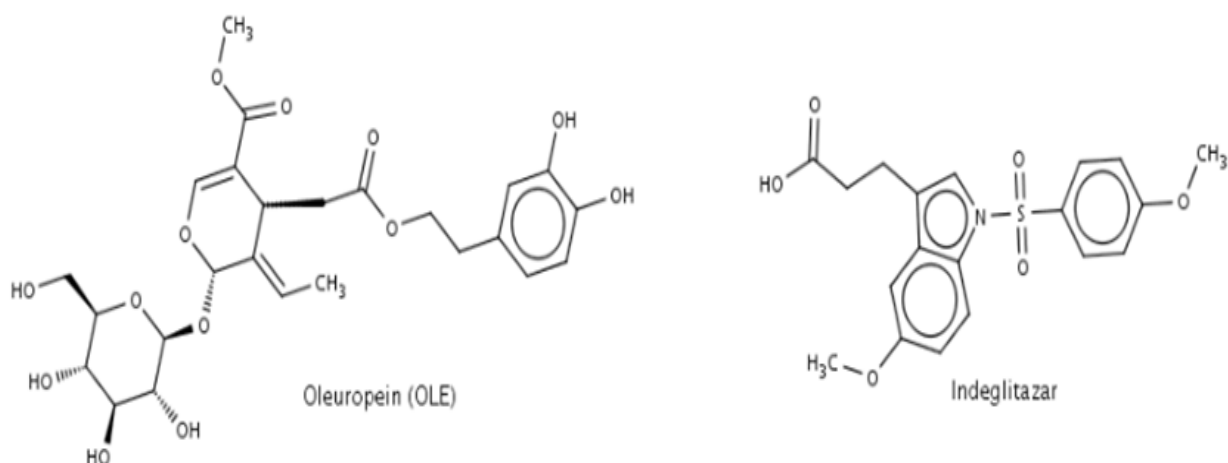
Πίνακας 12. Μεταβολές στο βάρος σώματος των ποντικών μετά από χορήγηση ελευρωπαΐνης

	<i>SV129 (regular diet)</i>		<i>Ppara-null (regular diet)</i>		<i>SV129 (high fat diet)</i>		<i>Ldl-r null (high fat diet)</i>	
	C	OLE	C	OLE	C	OLE	C	OLE
1 st day	19.2±0.6	16.0±0.9	19.8±0.9	19.6±0.9	22.4±0.7	18.0±0.5	28.0±0.0	27.5±0.5
42 ^d day	21.2±0.5	18.8±0.7	23.3±0.6	23.0±0.6	27.9±0.4	25.2±0.8	29.0±1.5	29.5±0.5

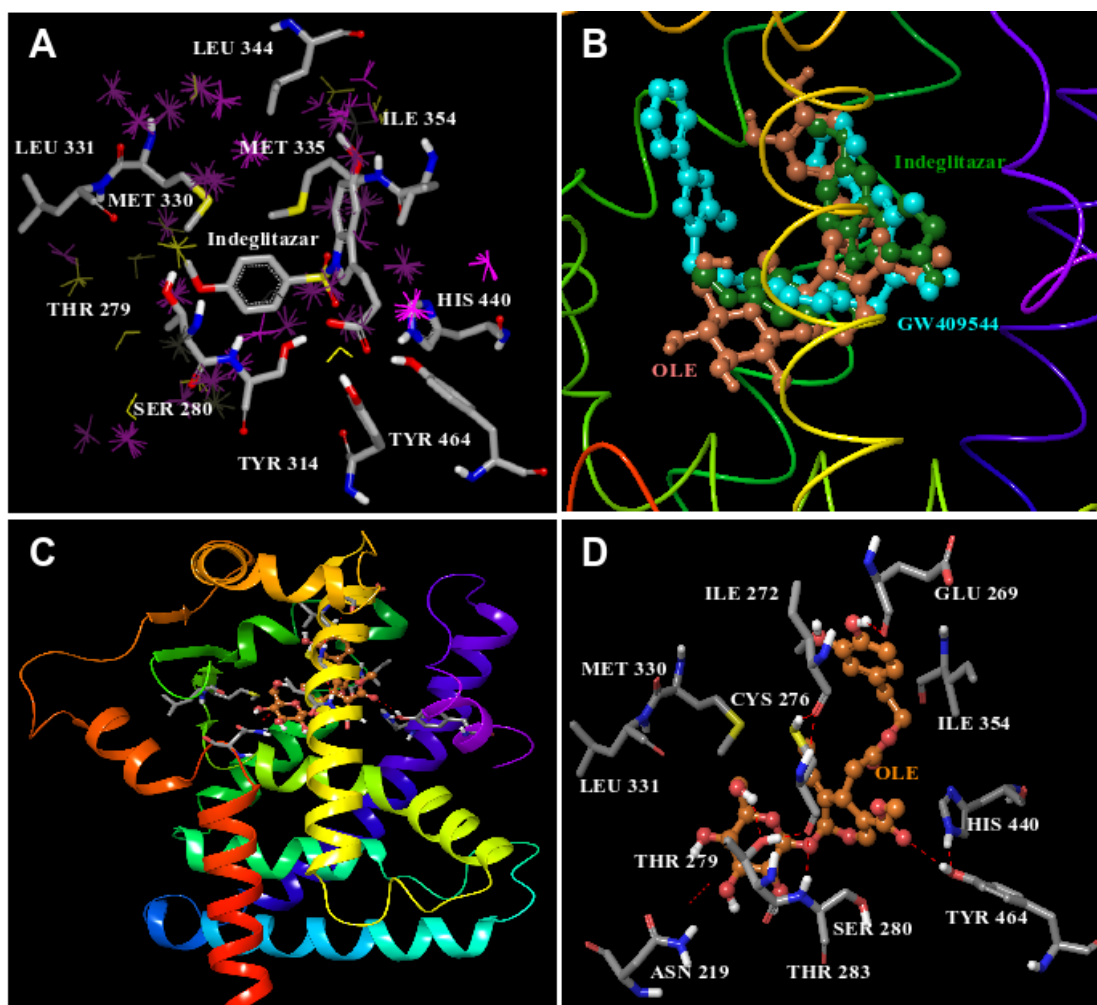
Πίνακας 12:. Βάρος σώματος σε g, C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη

7.2 Διερεύνηση της ικανότητας της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στους υποδοχείς PPARα

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η OLE μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (14, 15). Ο βασικός ρόλος του PPARα στην ομοιοστασία των τριγλυκεριδίων έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (9-11). Συγκεκριμένα, οι αγωνιστές του PPARα μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των TGs στον ορό. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ικανότητας πρόσδεσης της ελευρωπαΐνης στον PPARα 1) με Μοριακή προσομοίωση και 2) με το Luciferase reporter gene assay.



Εικόνα 17. Οι χημικές δομές της ελευρωπαΐνης (OLE) και του αγωνιστή του PPARα, Indeglitazar.



Εικόνα 18: Όπως φαίνεται στο A τα πιο θερμοδυναμικά σταθερά μόρια νερού (κίτρινο χρώμα) βρίσκονται ανάμεσα στα αμινοξικά κατάλοιπα Tyr314 και Tyr464 και είναι υποκατεστημένα από υδρόφιλες καρβοξυλομάδες των προσδετών του PPARα, Indeglitazar. Στο B παρατηρούμε την διάταξη της κρυσταλλικής δομής του Indeglitazar (πράσινο χρώμα) στο εσωτερικό του PPARα παρουσία ελευρωπαΐνης. Στο C παρατηρούμε τις αλληλεπιδράσεις του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (OLE-1) μέσα στη θέση πρόσδεσης του PPARα. Στο D φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (OLE-1) μέσα στη θέση πρόσδεσης του PPARα.

7.3 Αξιολόγηση της ικανότητας πρόσδεσης της Ελευρωπαϊνης στον PPARα με μοριακή προσομοίωση

Η μοριακή προσομοίωση της πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε ώστε να μελετηθεί καλύτερα η αλληλεπίδραση μεταξύ OLE και PPARα. Η κρυσταλλική δομή των συμπλόκων, που σχηματίζει ο PPARα με ένα πλήθος μορίων-προσδετών, όπως είναι οι φιβράτες και ο παναγωνιστής των PPARs, Indeglitazar, είναι καταχωρημένη στην Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Όλοι οι προσδέτες του PPARα διαθέτουν μια όξινη ομάδα, που σταθεροποιεί την C-τελική έλικα (H12) της πρωτεΐνης σε μια διαμόρφωση γνωστή για τους πυρηνικούς υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση του Indeglitazar με την περιοχή πρόσδεσης στο PPARα μεσολαβείται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλομάδων και των Ser280, Tyr314, Tyr464 και His440 (Εικόνα 18). Για να επιτύχουμε αυτή τη δομική συνθήκη και να έχουμε τη μέγιστη χημική ομοιότητα με τους προαναφερθέντες δεσμούς, επιλέχθηκε για τη μελέτη το άγλυκο της ελευρωπαϊνης (OLE-1), μιας και ο γλυκοσιδικός δεσμός υδρολύεται μέσα στα κύτταρα σε λίγα δευτερόλεπτα (Εικόνα 18) και απομένει το άγλυκο μόριο της ελευρωπαϊνης.

Αρχικά μελετήσαμε την περιοχή πρόσδεσης στο PPARα, ξεκινώντας από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου με το Indeglitazar (272) (PDB καταχώρηση 3ET1). Χρησιμοποιώντας την εφαρμογή SZMAP (OpenEyeInc) διερευνήθηκαν πιθανές, επιφάνειες, προσβάσιμες από νερό, στο εσωτερικό της θέσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Κάποια μόρια νερού εντοπίζονται κοντά στην είσοδο της εσοχής πρόσδεσης, ανάμεσα στις έλικες H4, H6 και το β-πτυχωτό φύλλο ανάμεσα στις H4 και H7. Οι υπολογισμοί SZMAP, παρέχουν θερμοδυναμικές πληροφορίες σχετικά με την υποκατάσταση των μορίων νερού. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 18Α το πλέον θερμοδυναμικά σταθερό μόριο νερού (κίτρινο χρώμα), εντοπίζεται ανάμεσα

στις Tyr314 και Tyr464 και έχει προφανώς αντικατασταθεί από τις υδρόφιλες καρβοξυλομάδες του προσδέτη του PPAR α , Indeglitazar. Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν αρκετά μόρια νερού κοντά στο καρβονυλικό οξυγόνο της Leu331 (κίτρινο χρώμα) Εικόνα 18Α, τα οποία μπορούν να αντικατασταθούν από υδρόφιλες, λειτουργικές ομάδες, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. Αντίθετα, υπάρχουν αρκετά μόρια νερού κοντά στις υδρόφοβες περιοχές της περιοχής πρόσδεσης.

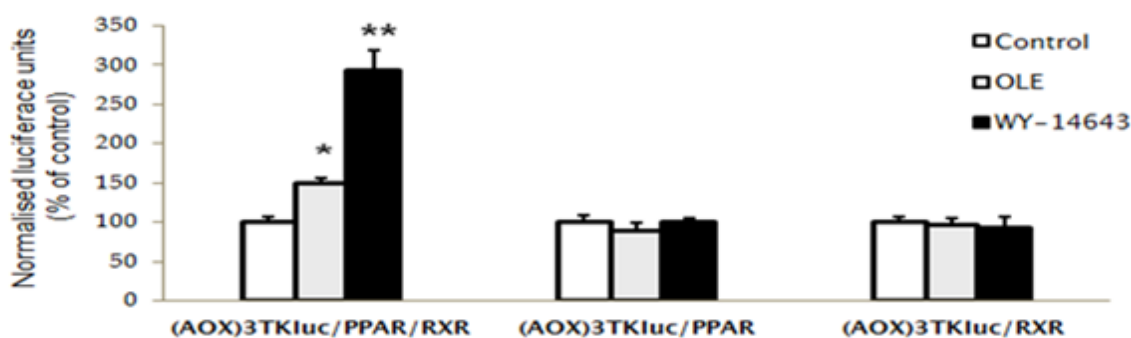
Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας την ίδια κρυσταλλική δομή της OLE-1, πραγματοποιήθηκαν IFD προσομοιώσεις (InducedFitDocking). Είναι αξιοσημείωτο ότι η θεωρητική τιμή pKa, που υπολογίσαμε για τις κατεχολικές υδροξυλομάδες είναι 9,2 (3OH) και 11,7 (4OH) υποδηλώνοντας ότι σε φυσιολογικό pH η απο-πρωτονιωμένη μορφή μπορεί να έχει σημαντική συγκέντρωση ανάλογα με το μικρο-περιβάλλον της πρωτεΐνης. Οι δύο τελικές δομές χαμηλής ενέργειας, παρουσιάζονται στην Εικόνα 18B. Η διαμόρφωση (Εικόνα 18C) έχει Glidescore 1 Kcal/mole υψηλότερο, σε σχέση με το indeglitazar, ενώ η δεύτερη ελάχιστη διαμόρφωση (Εικόνα 18D) έχει Glidescore 1,5 Kcal/mole υψηλότερο. Στην ελάχιστη διαμόρφωση, η απο-πρωτονιωμένη υδροξυλομάδα έχει τοποθετηθεί κοντά στη θέση της καρβοξυλομάδας του indeglitazar αλληλεπιδρώντας με Ser280, Tyr314, Tyr464, και His440 (Εικόνα 18C). Επιπλέον, η πλευρική αλυσίδα της ελάχιστης διαμόρφωσης (Εικόνα 18B, πορτοκαλί), έχει τον ίδιο προσανατολισμό σε σχέση με το indeglitazar (Εικόνα 18B, πράσινο). Η δεύτερη ελάχιστη διαμόρφωση (Εικόνα 6B, γαλάζιο) έχει έναν εκτενή προσανατολισμό προς την ινδολική δομή του indeglitazar.

Περαιτέρω εξέταση της ενεργειακής ελάχιστης δομής αποκαλύπτει ότι η θέση της αλειφατικής υδροξυλομάδας της OLE-1 στην ενεργή περιοχή, θα μπορούσε να υποκαταστήσει τα μόρια νερού, ενώ σύμφωνα με την προηγούμενη SZMAP ανάλυσή

μας αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της χημικής συγγένειας με την πρωτεΐνη PPARα, μέσω αλληλεπίδρασης με την καρβονυλομάδα της Leu331 (Εικόνα 18Α και 18C).

7.4 Luciferase reporter gene assay

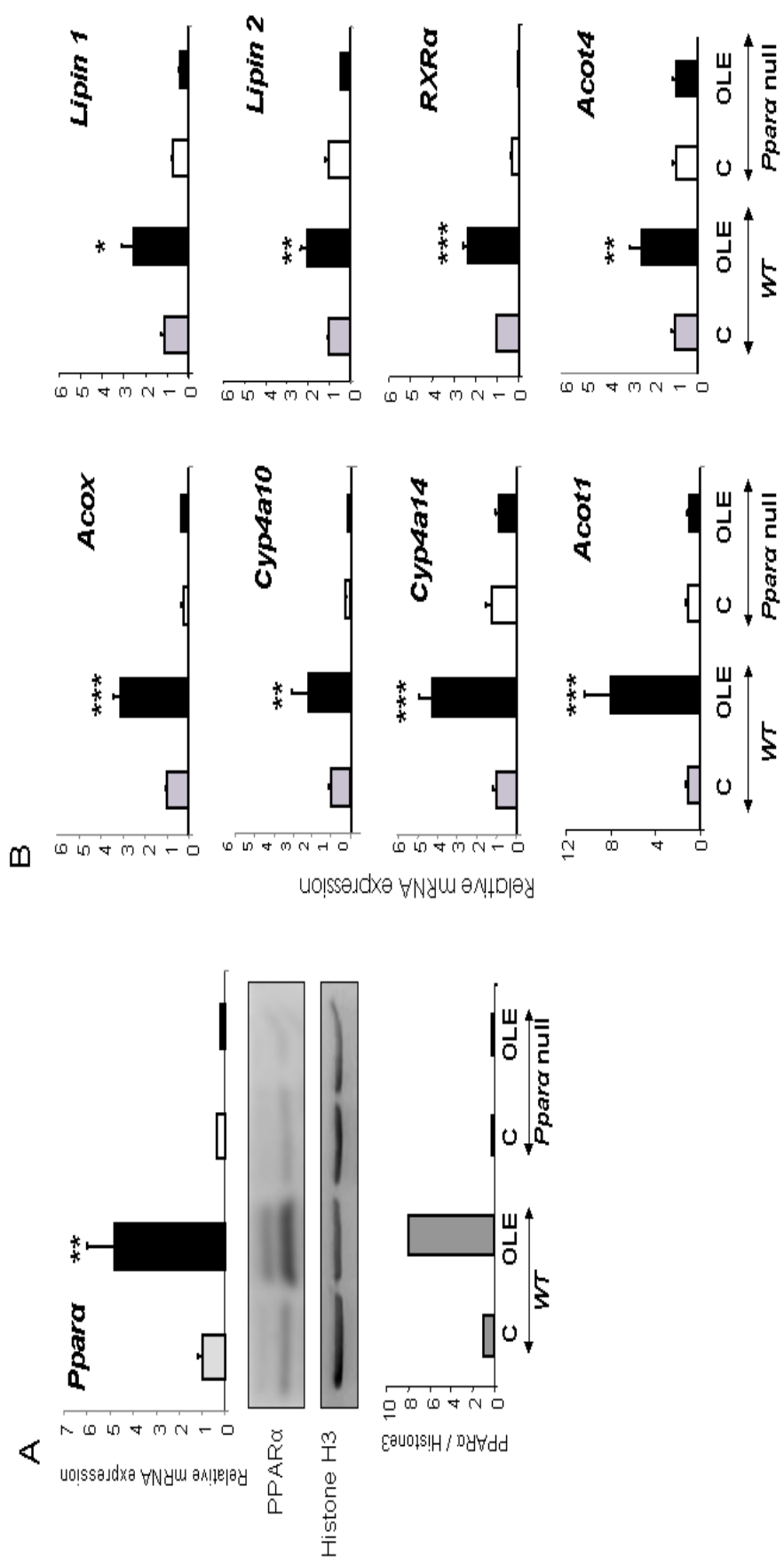
Για να διερευνηθεί αν η OLE λειτουργεί ως προσδέτης (ligand) του PPARα, χρησιμοποιήθηκε ένα reporter gene assay με το πλασμίδιο PPRE-luc.



Εικόνα 19: Αξιολόγηση της πρόσδεσης της OLE (ελευρωπαΐνης) στον εκκινητή του PPARα με το luciferase reporter gene assay. *P<0.05, **P<0.01

Η αγωγή με OLE είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στην ενεργοποίηση του πλασμιδίου PPRE-luc κατά 55%, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς PPARα/RXRα (Εικόνα 19).

Περαιτέρω διερεύνηση, έδειξε ότι αγωγή με OLE παρουσία μόνο του PPARα ή μόνο του RXRα, δεν οδήγησε σε ενεργοποίηση του πλασμιδίου PPRE-luc (Εικόνα 19), ενώ χορήγηση του προσδέτη WY-14643 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενεργοποίησης μόνο παρουσία του πλασμιδίου PPARα. Από τα ανωτέρω αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι η OLE λειτουργεί ως προσδέτης του PPARα, αν και είναι πιο ασθενής σε σχέση με τον WY-14643..



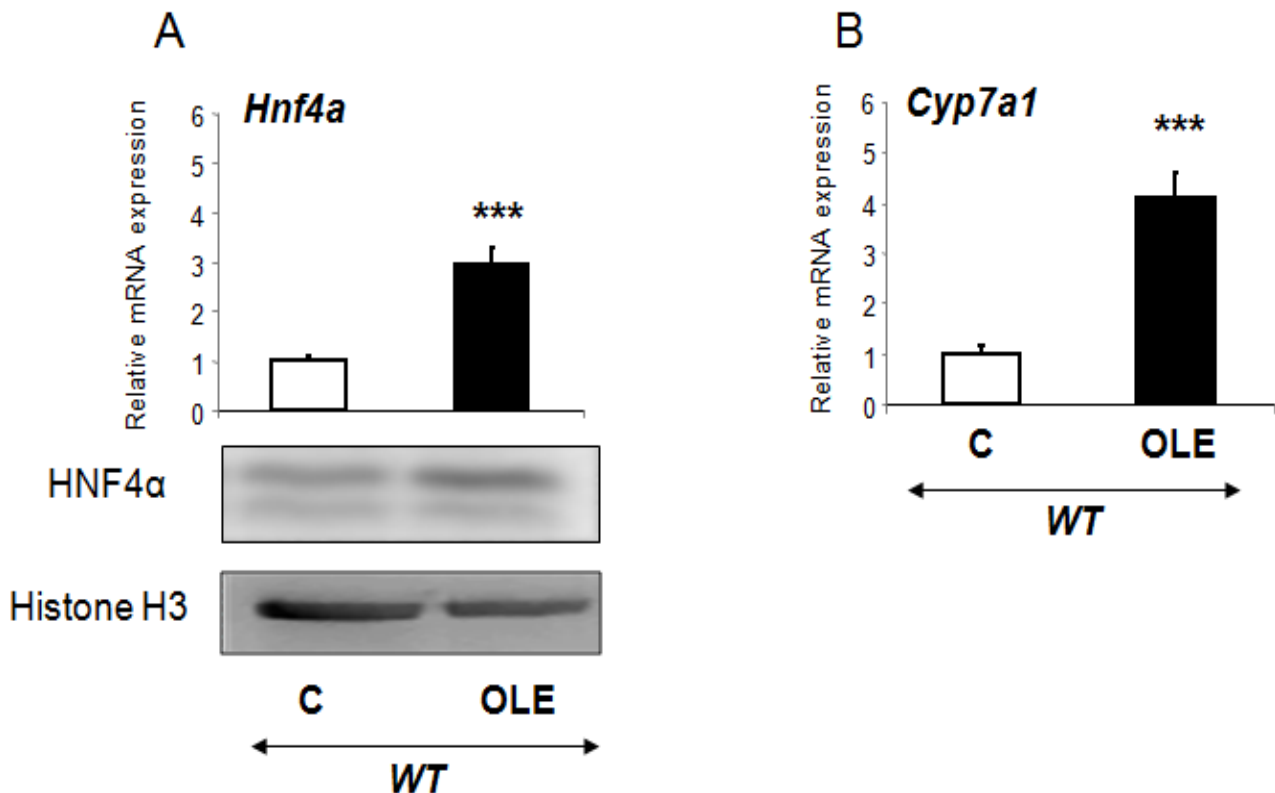
Εικόνα 20: Επίδραση της ελευρωπαίνης στην έκφραση του *Ppara* και των γονιδίων-στόχων του. C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαίνη, WT: μύες αγρίου τύπου SV129, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

7.5 Επαγωγή της έκφρασης του *Ppara* με ελευρωπαϊνή. In vivo μελέτη

Η χορήγηση ελευρωπαϊνης για 6 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του *Ppara* σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο PPARα αποπρωτεΐνης στο ήπαρ των ποντικών WT (Εικόνα 20Α). Η αυξορρύθμιση του *Ppara*, που προκάλεσε η ελευρωπαϊνή ακολουθήθηκε από την αυξορρύθμιση αρκετών γονιδίων-στόχων του, συμπεριλαμβανόμενων των *Acox*, *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Acot1*, *Acot4*, *Lipin 1* και *Lipin2* (Εικόνα 20Β). Η έκφραση του *Rxra* σε επίπεδο mRNA επίσης, αυξήθηκε από την ελευρωπαϊνή (Εικόνα 20Β).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αύξηση στην ενεργοποίηση του PPARα, που προκάλεσε η ελευρωπαϊνή δεν συνδέεται με κάποια μεταβολή στην διατροφική συμπεριφορά των πειραματοζώων, καθώς δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ημερήσια πρόσληψη τροφής (υπερβολική λήψη τροφής ή νηστεία). Επίσης, τα βάρη σώματος των πειραματοζώων, που έλαβαν ελευρωπαϊνή κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά πλαίσια στην αρχή και το τέλος του πειράματος και ήταν συγκρίσιμα με εκείνα των μαρτύρων (Πίνακας 12).

7.6 Επίδραση της ελευρωπαΐνης στην ηπατική έκφραση του Hnf4a

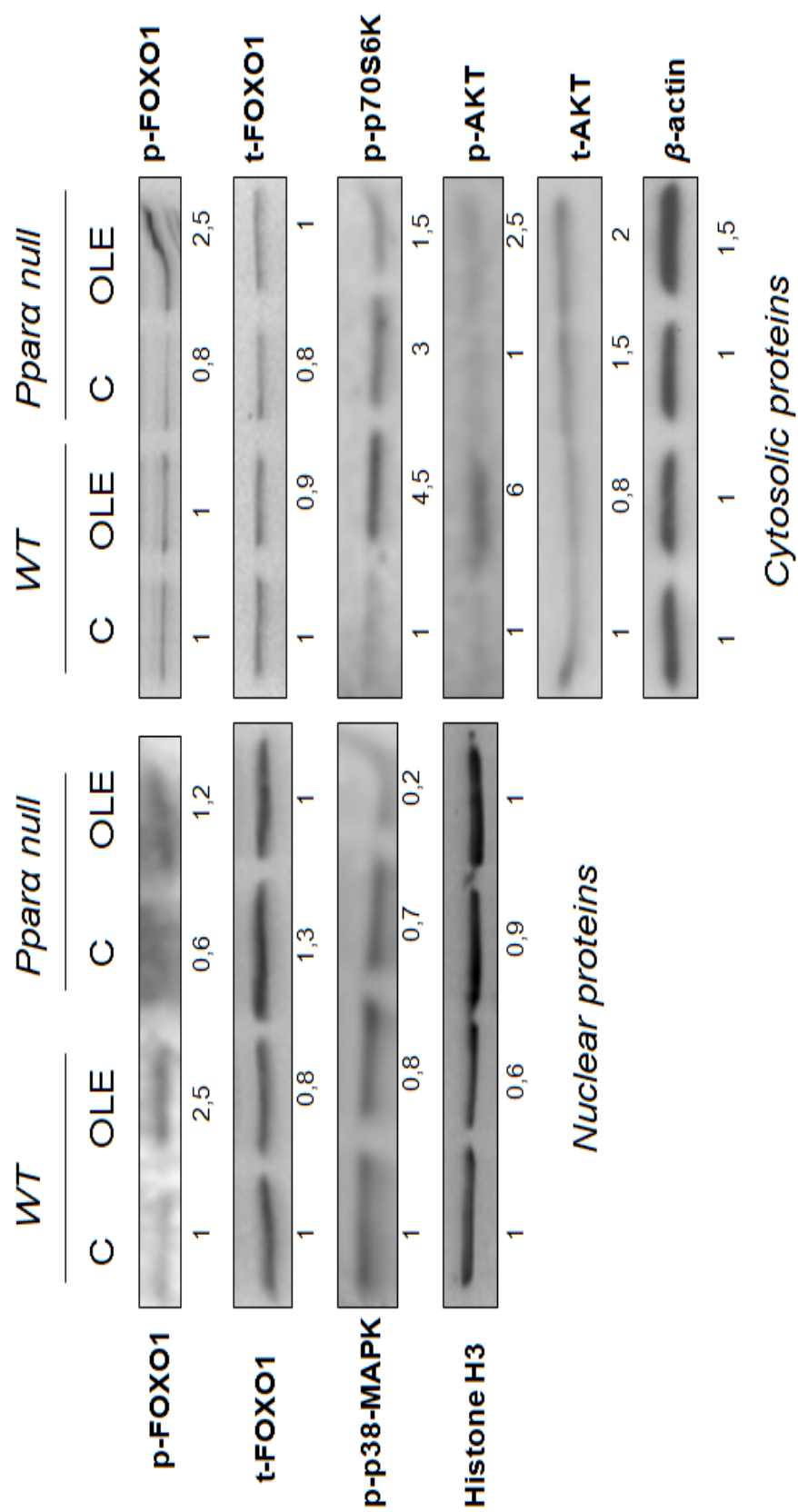


Εικόνα 21: Επίδραση της ελευρωπαΐνης (OLE) στην έκφραση του Hnf4a και Cyp7a1 στο ήπαρ μυών αγρίου τύπου (WT). C: μάρτυρες, *** $p < 0.001$

Η ελευρωπαΐνη επάγει την ηπατική έκφραση του HNF4α τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και αποπρωτεΐνης (Εικόνα 21Α). Επάγεται επίσης, και η έκφραση mRNA του γονιδίου *Cyp7a1*, στόχου του *Hnf4a* (Εικόνα 21Β).

7.7 In vivo αξιολόγηση των μηχανισμών, που συμμετέχουν στην επαγόμενη από την ελευρωπαΐνη, ρύθμιση του Ppara

Είναι καλά μελετημένο ότι το μονοπάτι insulin/PI3K/AKT παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση αρκετών γονιδίων, που κωδικοποιούν κρίσιμους παράγοντες στη σύνθεση και το μεταβολισμό των TGs (273, 274). Φαίνεται πως η OLE ενεργοποιεί το μονοπάτι insulin/PI3K/AKT καθώς αύξησε την φωσφορυλίωση της AKT, γεγονός που ακολουθήθηκε από ενεργοποίηση των FOXO1 και p70S6K στο ήπαρ μυών υπό αγωγή με ελευρωπαΐνη, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 22). Οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO1 και p70S6K βρίσκονται καθοδικά σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι, ωστόσο μόνο η ενεργοποίηση του p70S6K ακολουθείται από αυξημένη μεταγραφή γονιδίων (275), ενώ η ενεργοποίηση του FOXO1 στον πυρήνα οδηγεί στη μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα και τερματισμό της μεταγραφής (275, 276). Επομένως, η επαγωγή του PPARα από την OLE, πιθανώς μεσολαβείται, τουλάχιστον μερικώς, από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/p70S6K.

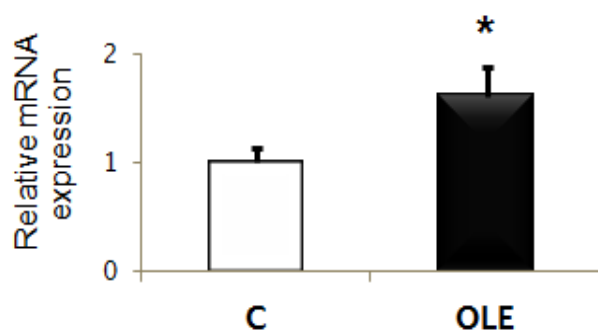


Εικόνα 22: Επίδραση της ελευρωπαΐνης σε σηματοδοτικά μονοπάτια. WT: μύες αγρίου τύπου SV129, C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη. Οι αριθμοί κάτω από τις μπάντες δείχνουν το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με εκείνη που παρατηρείται στους μάρτυρες, η οποία έχει καθοριστεί ως 1

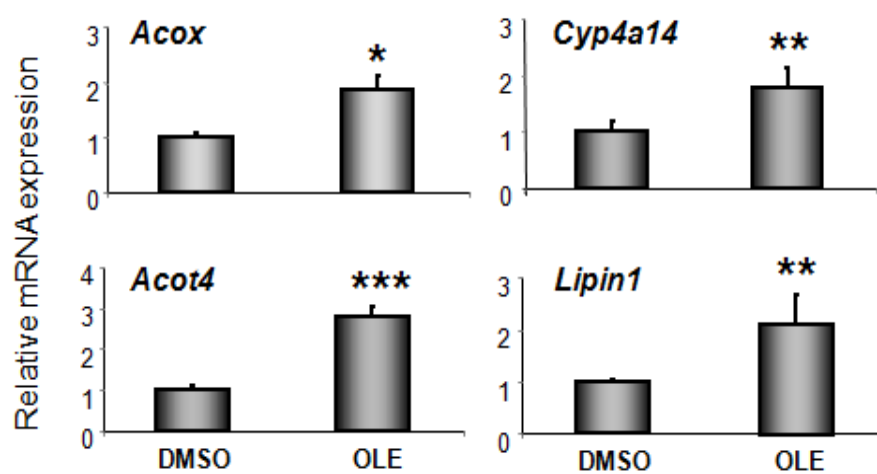
7.8 Επαγωγή του PPARα με ελευρωπαϊνή σε πρώιμα ηπατοκύτταρα

Η επώαση πρωτογενών ηπατοκυττάρων με ελευρωπαϊνή αύξησε σημαντικά την έκφραση του *Ppara* σε επίπεδο mRNA (Εικόνα 23Α). Η αυξορρύθμιση, που προκάλεσε η OLE στην ηπατική έκφραση του *Ppara* (mRNA) συνοδεύτηκε από την αυξορρύθμιση αρκετών γονιδίων-στόχων του *Ppara*, όπως των *Acox*, *Cyp4a14*, *Lipin 1* και *Acot4* (Εικόνα 23Β).

A *Ppara*



B

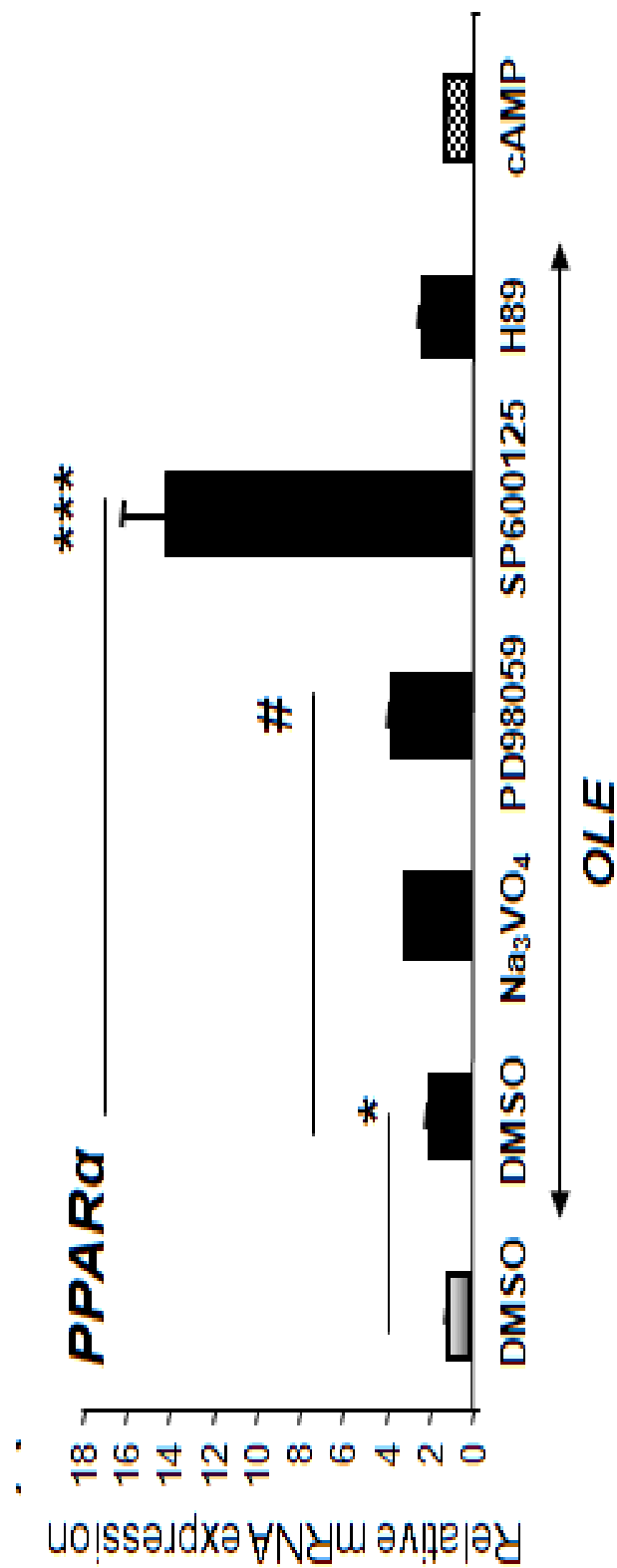


In vitro experiment

Εικόνα 23: Αξιολόγηση της άμεσης επίδρασης της ελευρωπαΐνης στην έκφραση του *Ppara* σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα. C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

7.9 In vitro αξιολόγηση των μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται στην επαγωγή του PPARα, που προκαλεί η ελευρωπαΐνη

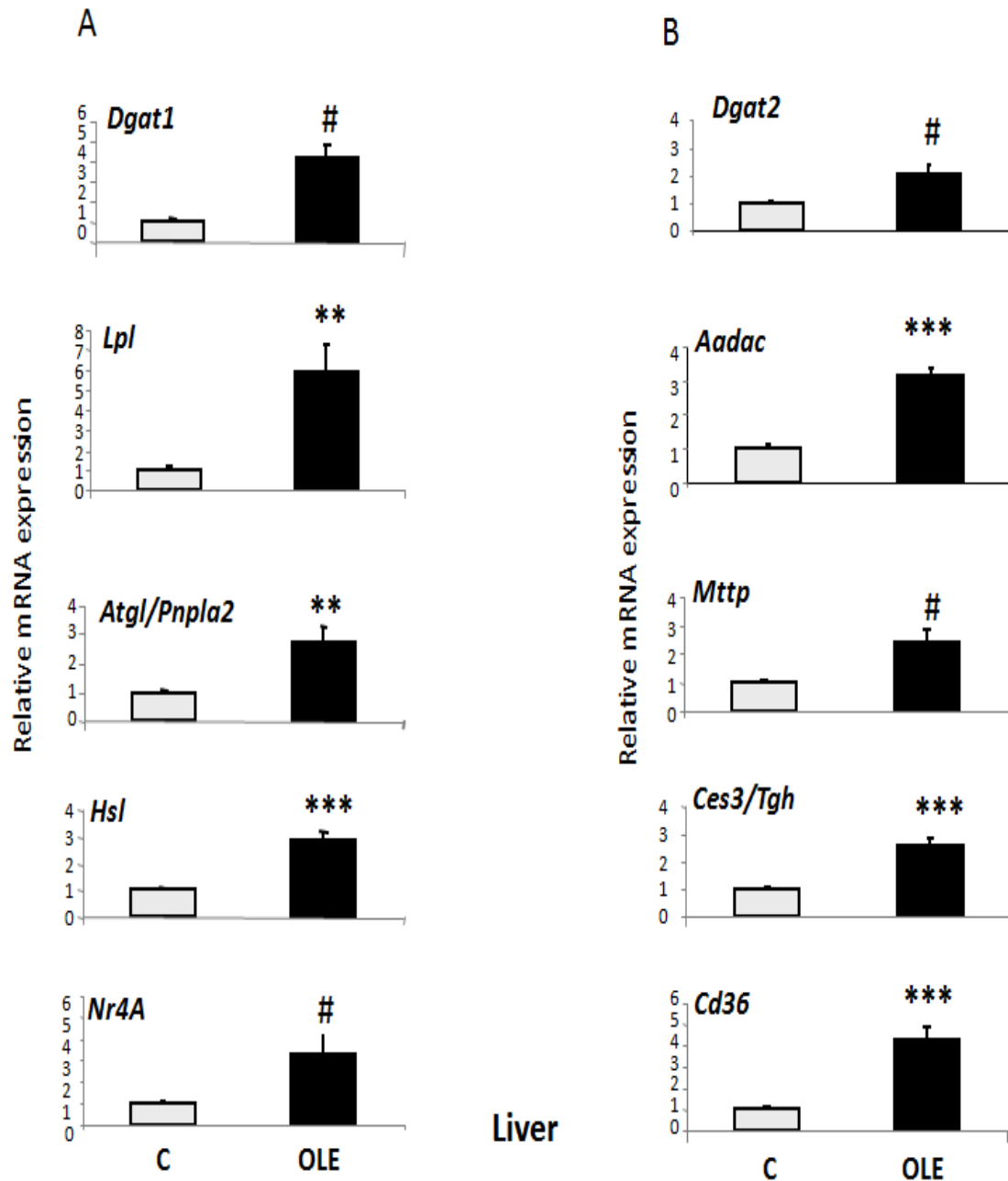
Η επώαση πρωτογενών ηπατοκυττάρων με OLE αύξησε το *Ppara* mRNA ($P < 0.05$, Εικόνα 24), μία επίδραση που δεν μεσολαβήθηκε από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται οι φωσφατάσες ή οι MAPK, καθώς δέσμευση των αντίστοιχων σηματοδοτικών μονοπατιών με είτε sodium orthovanadate ή PD98059, αντίστοιχα, δεν επηρέασε την αυξορρυθμιστική δράση της OLE στον PPARα (Εικόνα 24). Η επίδραση της OLE δεν έγινε επίσης, μέσω του μονοπατιού cAMP/PKA καθώς αναστολή του με H89 δεν εμπόδισε την επαγωγή του PPARα με OLE (Εικόνα 24). Ομοίως, χορήγηση του συνθετικού c-AMP, 8-Br-cAMP, δεν επηρέασε την βασική έκφραση του *Ppara* (mRNA) (Εικόνα 24). Επιβεβαιώνεται για μια ακόμη φορά ότι το μονοπάτι, που σχετίζεται με τον JNK, ασκεί αρνητική επίδραση στη ρύθμιση του PPARα. Έτσι και στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι χορήγηση του αναστολέα του JNK, SP600125, σε πρωτογενή ηπατοκυττάρια πριν την OLE, ενίσχυσε σημαντικά την επαγωγική δράση της OLE στον *Ppara* (mRNA) ($P < 0.001$, Εικόνα 24). Η επαγωγή του PPARα, που προκάλεσε η OLE στα πρωτογενή ηπατοκύτταρα συνοδεύτηκε από επαγωγή της έκφρασης και αρκετών γονιδίων-στόχων του *Ppara*, συμπεριλαμβανόμενων των *Acox*, *Cyp4a14*, *Lipin 1* και *Acot4* ($P < 0.01$, Εικόνα 23B).



In vitro experiment

Εικόνα 24: Na₃OV₄ (Sodium Orthovanadate): kinase-phosphatase inhibitor, PD98059: MAPK-ERK inhibitor, SP600125: JNK inhibitor, OLE: ελεβοπατίνη, *p<0.05, **p<0.01, #p<0.005, ***p<0.001

7.10 Επίδραση της ελευρωπαΐνης σε ηπατικούς παράγοντες, κρίσιμους για την ομοιοστασία των TGs

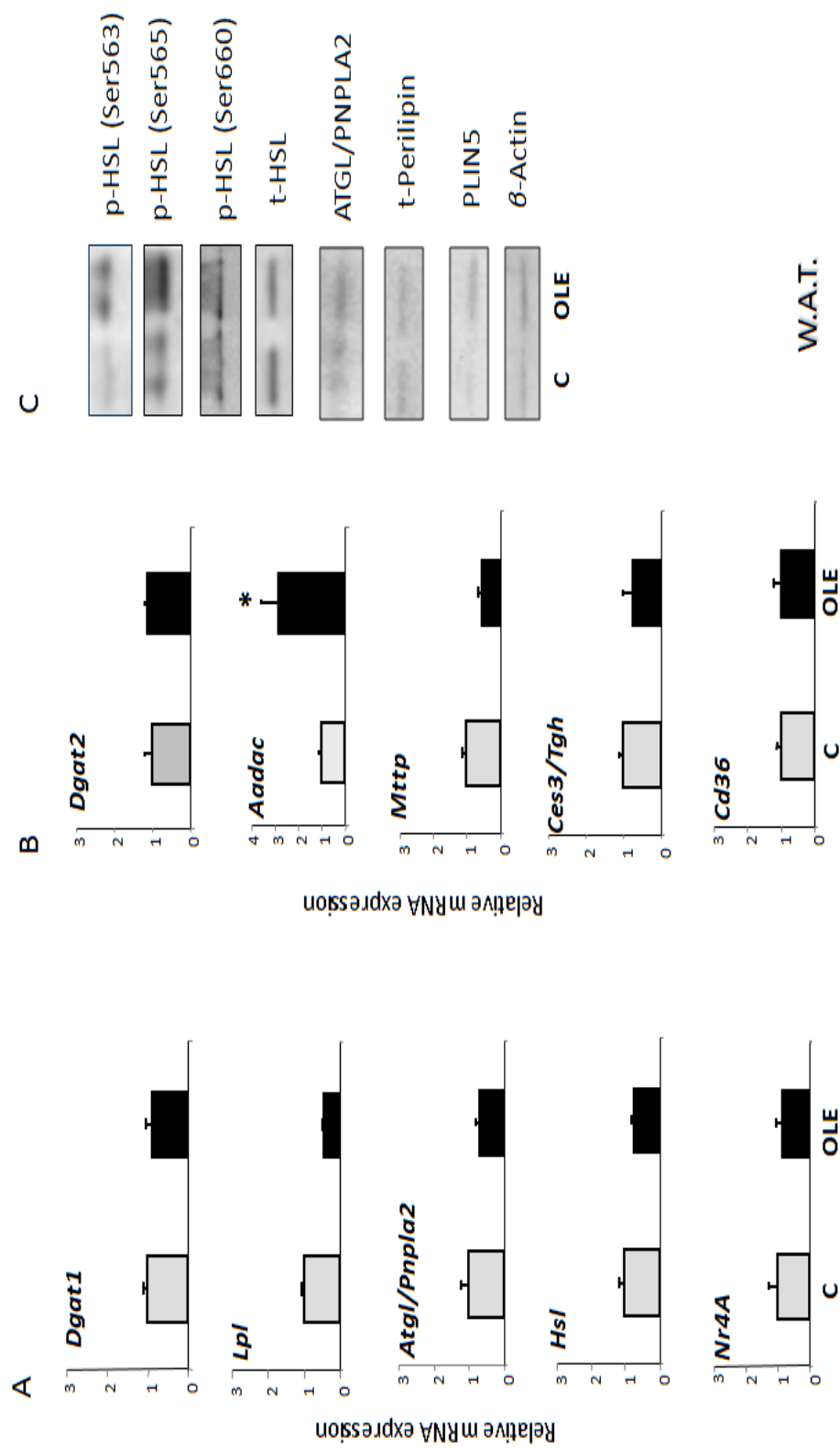


Εικόνα 25: Επίδραση της ελευρωπαΐνης σε παράγοντες, που ρυθμίζουν την σύνθεση, τη μεταφορά, τον μεταβολισμό και την κάθαρση των λιπιδίων στο ήπαρ. C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη, **P<0.01, #P<0.005, ***P<0.001.

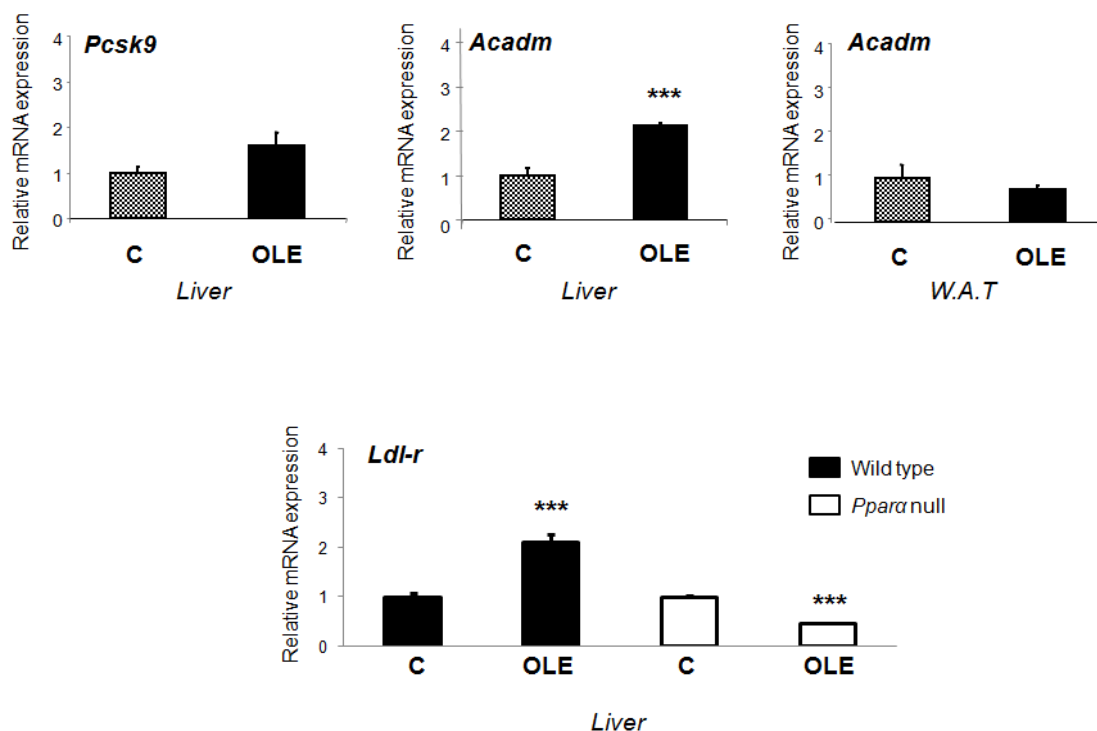
Αγωγή με OLE σε WT μύες οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης του mRNA πολλών γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση, την μεταφορά, τον μεταβολισμό και την κάθαρση των TGs στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, η OLE αύξησε τα επίπεδα του mRNA των *Dgat1*, *Lpl*, *Atgl/Pnlpa2*, *Hsl* και *Nr4A* στο ήπαρ των υπό αγωγή με OLE μυών σε σχέση με τους μάρτυρες (Εικόνα 25A). Επίσης, αυξήθηκαν και τα επίπεδα του mRNA των *Dgat2*, *Aadac*, *Mttp*, *Ces/Tgh* και *Cd36* έπειτα από αγωγή με OLE (Εικόνα 25B).

7.11 Επίδραση της ελευρωπαΐνης σε κρίσιμους για την ομοιοστασία των TGs παράγοντες, που εκφράζονται στον λευκό λιπώδη ιστό

Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στο λευκό λιπώδη ιστό στα γονίδια, που κωδικοποιούν παράγοντες με βασικούς ρόλους στη σύνθεση, τη μεταφορά, τον μεταβολισμό και την κάθαρση των TGs, συμπεριλαμβανομένων και των *Dgat1*, *Dgat2*, *Atgl*, *Nr4A*, *Mttp*, *Ces/Tgh* και *Cd36* (Εικόνα 26A και 26B), με μοναδική εξαίρεση το γονίδιο *Aadac*, το οποίο αυξορρυθμίστηκε από την OLE (Εικόνα 26B). Η επαγόμενη από την OLE μείωση των επιπέδων των TGs στον ορό, θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει, στην ενεργοποίηση της HSL στο λευκό λιπώδη ιστό, καθώς η OLE αύξησε την φωσφορυλίωση της HSL στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser563 και Ser565 (Εικόνα 26C).



Εικόνα 26: Επίδραση της ελεωρωπαΐνης σε παράγοντες, που ρυθμίζουν την σύνθεση, την μεταφορά, τον μεταβολισμό και την κάθαρση των λιπιδίων στον λευκό λιπώδη ιστό (W.A.T.). C: μάρτυρες, OLE: ελεωρωπαΐνη, *P<0.05.



Εικόνα 27: Επίδραση της ελευρωπαΐνης στην έκφραση mRNA των *Acadm*: acyl-CoA dehydrogenase, *Ldl-r*: low density lipoprotein receptor, *Pcsk9*: protein convertase subtilisin/kexin type 9 στο ήπαρ και τον λευκό λιπώδη ιστό (W.A.T.) μυών αγρίου τύπου, που ακολούθησαν την φυσιολογική διαίτα. C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη, ***P<0.001.

7.12 In vivo αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαΐνης στη β-οξείδωση των λιπιδίων, την έκφραση του *Ldl-r* και τη σύνθεση της χοληστερόλης

Η OLE αυξορρύθμισε την έκφραση του mRNA της αφυδρογονάσης του ακυλο-συνενζύμου A (*Acadm*) στο ήπαρ μυών (Εικόνα 27), χωρίς ωστόσο να επηρεάσει την έκφρασή της στον λευκό λιπώδη ιστό. Η OLE επίσης, αύξησε σημαντικά την έκφραση του mRNA του υποδοχέα της *Ldl* (*Ldl-r*) στο ήπαρ (Εικόνα 27). Αντίθετα, η ηπατική έκφραση του *Pcsk9* δεν επηρεάστηκε από την OLE (Εικόνα 27).

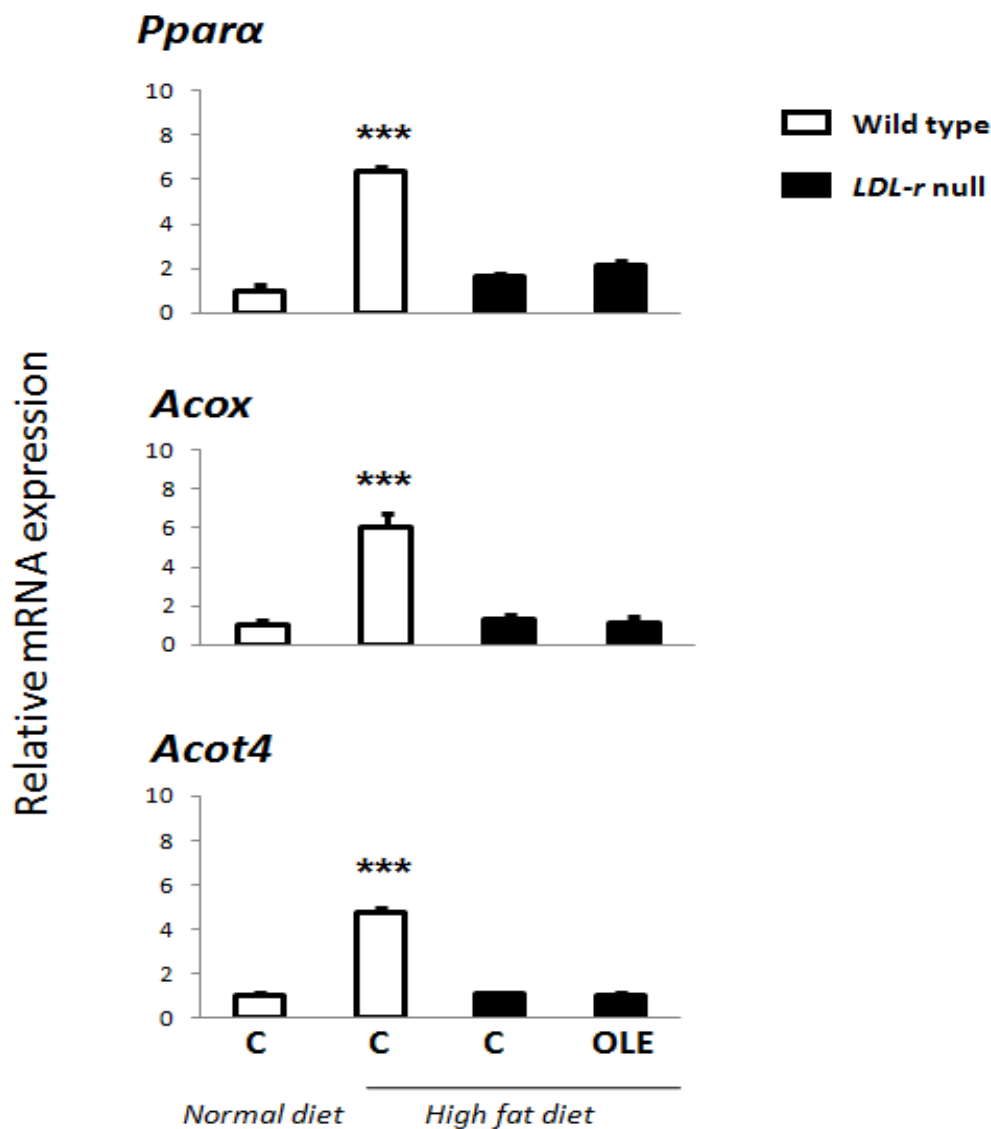
7.13 Αξιολόγηση της επίδρασης της ελευρωπαΐνης στους λιπιδαιμικούς δείκτες των *Ldl-r* null μυών, και στην έκφραση του *Ppara*.

Πίνακας 13. Μεταβολές λιπιδαιμικών δεικτών μετά χορήγηση ελευρωπαΐνης σε μύες *Ldl-r* null

<i>Ldl-r</i> null μύες		
Δίαιτα δυτικού τύπου		
	Μάρτυρες	Ελευρωπαΐνη
TG	350.0±71.0	316.0±26.0
FFA	3.5±0.9	3.4±0.4
Χοληστερόλη	823.0±40.0	839.4±11.0

Πίνακας 13: TGs : Τριγλυκερίδια σε (mg/dl); FFA: Ελεύθερα λιπαρά οξέα σε (mEq/l); Ολική Χοληστερόλη σε (mg/dl); n:5-7 ενήλικοι αρσενικοί μύες ανά ομάδα ελέγχου.

Δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα TGs και ολικής χοληστερόλης του ορού των *Ldl-r* null μυών υπό δίαιτα δυτικού τύπου, μετά από χορήγηση ελευρωπαΐνης σε σχέση με τους μάρτυρες *Ldl-r* null (Πίνακας 13).



Εικόνα 28: Επίδραση της ελευρωπαΐνης στην έκφραση του *Ppara* σε *Ldl-r* null μύες. C: μάρτυρες, OLE: ελευρωπαΐνη, *** $P < 0.001$.

Η επαγωγή, που παρατηρείται στην έκφραση του *Ppara* mRNA και των γονιδίων-στόχων του μετά από χορήγηση OLE σε μύες WT, που λάμβαναν την κανονική διατροφή των τρωκτικών ($P < 0.001$), δεν παρατηρήθηκε στους διαγονιδιακούς μύες *Ldl-r*null, που ακολούθησαν λιπαρή διατροφή δυτικού τύπου (Εικόνα 28). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να δικαιολογήσουν εν μέρει, την μη εμφάνιση μείωσης στα TGs και την ολική χοληστερόλη του ορού των *Ldl-r* null μυνών μετά από μακροχρόνια χορήγηση ελευρωπαΐνης.

8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε σε ζωικά μοντέλα την επίδραση της ελευρωπαΐνης, σημαντικότερου δραστικού συστατικού της ελιάς, στην ομοιοστασία των λιπιδίων, δίνοντας έμφαση στο ρόλο του PPARα. Για τον σκοπό αυτό έγιναν πολλά και χρονοβόρα *in vivo* πειράματα, που διερευνούσαν διαφορετικά δοσολογικά σχήματα χορήγησης της ελευρωπαΐνης στους μύες. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές δόσεις ελευρωπαΐνης, συχνότητα και οδοί χορήγησης (i.p., διαλυμένη στο πόσιμο νερό, gavage, αναμεμιγμένη στην τροφή) και χρόνοι χορήγησης της ουσίας, με στόχο να βρεθεί το άριστο δοσολογικό σχήμα χορήγησής της για το βέλτιστο αποτέλεσμα, δηλαδή την μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στους μύες. Όλα τα πειράματα, οξείας, υποξείας και χρόνιας χορήγησης της ελευρωπαΐνης από όλες τις οδούς χορήγησης (εκτός της διαλυμένης στο πόσιμο νερό) έδειξαν την υπολιπιδαιμική δράση της ελευρωπαΐνης, αλλά επελέγη η χρόνια χορήγησή της, αφού αντιστοιχεί στις συνθήκες αγωγής, που συνήθως ακολουθείται στην υπολιπιδαιμική αγωγή. Ακολούθησαν αρκετά επαναληπτικά πειράματα για να διαπιστωθεί η ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και εδώ παρουσιάζονται εκείνα, που αντιστοιχούν στην τελευταία *in vivo* μελέτη, όπου η ελευρωπαΐνη χορηγήθηκε μακροχρόνια αναμεμιγμένη στην τροφή. Ο ρόλος του PPARα στην δράση της ελευρωπαΐνης διερευνήθηκε *in vivo* με *Ppara* null διαγονιδιακούς μύες, καθώς επίσης, με *in silico* και *in vitro* μοντέλα. Τα αποτελέσματα από την *in silico*, *in vitro* και *in vivo* μελέτη, δείχνουν ότι η ελευρωπαΐνη δρα ως προσδέτης του PPARα, αυξορυθμίζοντας ένα ευρύ φάσμα παραγόντων του ήπατος και του λευκού λιπώδους ιστού, που διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην πρόσληψη, τη μεταφορά, τον μεταβολισμό και την απομάκρυνση

από την κυκλοφορία των λιπιδίων, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των TGs στο αίμα.

Οι επιπτώσεις της μεσογειακής διατροφής και ειδικότερα, της κατανάλωσης παραγώγων της ελιάς έχει διερευνηθεί διεξοδικά από ποικίλες κλινικές μελέτες, οι οποίες δείχνουν σημαντική μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας σε πληθυσμούς, που καταναλώνουν τα προϊόντα αυτά (277). Έχει επίσης, συσχετιστεί με την πρόληψη του μεταβολικού συνδρόμου, ενός συμπλέγματος παραγόντων κινδύνου (υπερχοληστερολαιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία, αθηροσκλήρυνση, υπέρταση, παχυσαρκία, λιπώδες ήπαρ, αντίσταση στην ινσουλίνη), οι οποίοι σχετίζονται στενά με τη στεφανιαία νόσο (278). Η κλινική δοκιμή ACCORD συγκρίνει τη μονοθεραπεία με στατίνες με τη θεραπεία, που συνδυάζει στατίνες και φιβράτες, σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, αποδεικνύοντας ότι οι φαινοφιβράτες συνδυασμένες με στατίνες προσφέρουν επιπλέον προστατευτική επίδραση από ότι οι στατίνες μόνες τους.

Ανάλυση υποομάδων έδειξε ότι ασθενείς με επίπεδα TGs ≥ 204 mg/dl και επίπεδα HDL χοληστερόλης ≤ 34 mg/dl έχουν ωφεληθεί από τη θεραπεία με φαινοφιβράτες. Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφία, όταν ένας ασθενής φθάσει στο μέγιστο όφελος από τη θεραπεία με στατίνες, μπορεί να ωφεληθεί περαιτέρω, όταν στο θεραπευτικό σχήμα προστεθούν οι φιβράτες, υπό την προϋπόθεση ότι τα επίπεδα TGs στο αίμα είναι > 200 mg/dl και τα επίπεδα HDL χοληστερόλης < 35 mg/dl. Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια, τρία από τα κύρια φαινολικά συστατικά του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, η ελευρωπαΐνη και οι δυο κύριοι μεταβολίτες της, η υδροξυ-τυροσόλη και η τυροσόλη, έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της μείωσης των λιπιδίων, που προκαλούν σε διάφορα υπερλιπιδαιμικά μοντέλα πειραματόζωων (16, 279). Έχει αναφερθεί ότι η ελευρωπαΐνη, όταν χορηγήθηκε σε μοντέλα

πειραματόζων με μεταβολικό σύνδρομο, βελτίωσε την ανοχή τους στη γλυκόζη και επανάφερε σε φυσιολογικά επίπεδα την κοιλιακή εναπόθεση λίπους καθώς και τα επίπεδα των TGs και της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα (15, 280-282).

Αρκετές *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν την υπολιπιδαιμική επίδραση της ελευρωπαϊνης. Η χορήγηση ελευρωπαϊνης σε κυτταρικές σειρές HepG2 και FL83B φαίνεται να μειώνει την επαγόμενη από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα συσσώρευση των λιπιδίων, το μέγεθος των σταγονιδίων των λιπιδίων και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των TGs (283), φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και σε καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων (284). Παρά την εντατική έρευνα, οι βιοχημικοί μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η υπολιπιδαιμική επίδραση της ελευρωπαϊνης παραμένουν ασαφείς, έχοντας κυρίως αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της (280).

Η κεντρική υπόθεση της παρούσας μελέτης είναι ότι η ελευρωπαϊνή μειώνει τα επίπεδα TGs και χοληστερόλης στο αίμα μέσω της ενεργοποίησης του PPAR α . Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, διεξήχθη αρχικά *in silico* μελέτη χρησιμοποιώντας ένα μοριακό μοντέλο προσομοίωσης σύνδεσης για να αξιολογηθεί εάν η ελευρωπαϊνή προσδένεται στον PPAR α . Η *in silico* προσέγγιση βασίστηκε στο γεγονός ότι όλοι οι γνωστοί αγωνιστές του PPAR α εμπεριέχουν μια όξινη ομάδα δίπλα στα κατάλοιπα Tyr464 και His440 για τη σταθεροποίηση της AF2 δομής στη διαμόρφωση των αγωνιστών. Το θεωρητικό μοντέλο, που προέκυψε από αυτή την εργασία δείχνει ότι ο μεθυλεστέρας της ελευρωπαϊνης βρίσκεται στην ίδια θέση, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλική ομάδα της Tyr464.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία εστερασών ή/και αλκαλικού περιβάλλοντος μπορεί να απομεθυλιώσει την ελευρωπαϊνή (285), δημιουργώντας ένα

μεταβολίτη, ο οποίος θα μπορούσε να αυξήσει τη συγγένεια πρόσδεσης. Τα ευρήματα της *in silico* μελέτης δείχνουν ξεκάθαρα ότι η ελευρωπαΐνη είναι προσδέτης του PPARα, γεγονός που επιβεβαιώνεται περαιτέρω με reporter gene assays, που δείχνουν ότι η ελευρωπαΐνη αυξάνει την ενεργότητα του PPRE-luc, μέσω της ενεργοποίησης του ετεροδιμερούς PPARα-RXRα.

Τα *in vivo* αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν τη συσχέτιση της έκφρασης και ενεργοποίησης του PPARα με την επαγόμενη από την ελευρωπαΐνη μείωση των επιπέδων των TGs και της χοληστερόλης, αφού η ελευρωπαΐνη μειώνει τα επίπεδα μόνο στους αγρίου τύπου μύες και όχι στους μύες με αποσιωπημένο το γονίδιο του PPARα. Τα αποτελέσματα από τη γονιδιωματική μελέτη δείχνουν ότι η χορήγηση ελευρωπαΐνης στους μύες επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων-στόχων του PPARα, συμπεριλαμβανομένων των *Acox*, *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Lipin2*, *Acot1* και *Acot4*. Ως εκ τούτου συμπεραίνεται ότι η ελευρωπαΐνη μειώνει τα επίπεδα των TGs και της χοληστερόλης κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του PPARα.

Στο επίπεδο της μεταγωγής σήματος, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αρνητική ρύθμιση του PPARα μέσω του JNK σηματοδοτικού μονοπατιού (286). Η προ-χορήγηση του JNK αναστολέα, SP600125, σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων μυός, έδειξε μεγάλη αύξηση της επαγόμενης από την ελευρωπαΐνη έκφρασης του γονιδίου του *Ppara*. Σύμφωνα με τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τα σηματοδοτικά μονοπάτια MEK1- και cAMP/PKA δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση του γονιδίου του *Ppara* από την ελευρωπαΐνη, καθώς η προ-χορήγηση του αναστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού MEK1 (PD98059) και του PKA (H89), δεν ανέστειλαν την επίδραση της ελευρωπαΐνης στο γονίδιο του *Ppara*. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα HNF4α, πιθανόν συμμετέχει στην επαγόμενη από την ελευρωπαΐνη αυξορρύθμιση του *Ppara*. Η υπόθεση αυτή

βασίζεται στο γεγονός ότι ο HNF4α διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, και αντίστοιχα με το *Ppara*, η ελευρωπαΐνη αυξάνει τα επίπεδα mRNA του HNF4α και του γονιδίου-στόχου του, του *Cyp7a1*, στο ήπαρ μυών που έχουν λάβει αγωγή με ελευρωπαΐνη. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η ελευρωπαΐνη πιθανόν, ενεργοποιεί το ρυθμιστικό μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης, στον οποίο συμμετέχουν ο PPARα και ο HNF4α (287).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στους αγρίου τύπου μύες, η ελευρωπαΐνη επάγει την ηπατική έκφραση του LDL-R, του κύριου υποδοχέα ηπατικής επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης από την κυκλοφορία της LDL και των πλούσιων σε χοληστερόλη και φτωχών σε TGs λιποπρωτεϊνών. Η ελευρωπαΐνη επίσης, επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων του ήπατος στους αγρίου τύπου μύες, τα οποία διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη σύνθεση, την επαναπρόσληψη, τη μεταφορά, το μεταβολισμό και την εξάλειψη των TGs. Συγκεκριμένα, αυξάνει την ηπατική έκφραση των *Dgat1* και *Dgat2*, τα οποία εμπλέκονται στο σχηματισμό των TGs από τις διακυλογλυκερόλες και το ακετυλο-συνένζυμο (288). Το γονίδιο *Atgl*, το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο, που καταλύει το περιοριστικό στάδιο της υδρόλυσης των TGs στην διαδρομή λιπόλυσης των τριακυλογλυκερολών (289). Επίσης, το *Atgl* αυξορρυθμίζεται από την ελευρωπαΐνη στο ήπαρ μυών αγρίου τύπου. Η ηπατική έκφραση του *Aadac* επίσης, αυξάνεται από την ελευρωπαΐνη. Ο παράγοντας αυτός εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και εμφανίζει ενδοκυτταρικά δράση όμοια με τις λιπάσες των TGs, αυξάνοντας έτσι την ενδοκυττάρια συγκέντρωση λιπαρών οξέων, τα οποία προέρχονται από την υδρόλυση των νεοσχηματιζόμενων δομών αποθήκευσης τριγλυκεριδίων (newly formed TG stores). Επίσης, συμμετέχει στη σύνθεση των VLDL (290). Η ελευρωπαΐνη επάγει την έκφραση του γονιδίου *Mttp*, το οποίο

κωδικοποιεί τη μικροσωματική πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων, η οποία απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου (291). Οι LPL επίσης επάγονται από την ελευρωπαΐνη. Δρουν ως υδρολάσες των TGs και ως ligand/bridging παράγοντες της διαμεσολαβούμενης από τον LDL-R επαναπρόσληψης των λιποπρωτεϊνών, (292, 293). Επιπρόσθετα, το γονίδιο *Ces3/Tgh*, που κωδικοποιεί το ένζυμο, το οποίο καταλύει την υδρόλυση των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, των εστέρων και θειοεστέρων (294) και το γονίδιο *Cd36*, που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα εκκαθαριστή των λιποπρωτεϊνών, των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (295-299), αυξορρυθμίζονται από την ελευρωπαΐνη. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ο πυρηνικός υποδοχέας Nr4A (Nur77) ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα μέσω της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου *SREBP-1c*, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση των TGs (300). Η χορήγηση ελευρωπαΐνης σε μύες οδήγησε στην αυξημένη έκφραση αυτών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων στο ήπαρ. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Acadm* από την ελευρωπαΐνη στο ήπαρ, το οποίο συμμετέχει στην αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας. Η επαγόμενη από την ελευρωπαΐνη αυξορρύθμιση των προαναφερθέντων γονιδίων στο ήπαρ ενδεχομένως, μεσολαβείται από την ενεργοποίηση του PPARα, αφού τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια αποτελούν γονίδια-στόχους του PPARα (244). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν παρόμοιες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αυτών στο λευκό λιπώδη ιστό, με εξαίρεση το *Aadac*, το οποίο κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική λιπάση των TGs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ελευρωπαΐνη ενεργοποιεί το ένζυμο HSL, το οποίο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα για την αποικοδόμηση των TGs στο λευκό λιπώδη ιστό (301). Παρά το γεγονός ότι η ελευρωπαΐνη επάγει την έκφραση

της περιλιπίνης 5 (Plin5) στο λευκό λιπώδη ιστό, προφανώς αυτή η επίδραση δεν είναι ικανή ώστε να αποτρέψει τη δράση των λιπασών και των υδρολασών πάνω στα TGs.

9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα ανωτέρω *in silico*, *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα, φαίνεται ότι η ελευρωπαΐνη δρα ως αγωνιστής του PPAR α , μειώνοντας τα επίπεδα της χοληστερόλης και των TGs στο αίμα. Η ευεργετική επίδραση της ελευρωπαΐνης στην ομοιοστασία των λιπιδίων θα μπορούσε επίσης, να αποδοθεί στη ρύθμιση, μέσω της ενεργοποίησης του PPAR α , αρκετών παραγόντων στο ήπαρ και στο λευκό λιπώδη ιστό, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη πρόσληψη, τη μεταφορά, το μεταβολισμό και την αποικοδόμηση των λιπιδίων. Είναι πιθανόν, μηχανισμοί που δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμα, πέραν της ενεργοποίησης του PPAR α , της αυξορρύθμισης του *Ldl-r* και την ενεργοποίηση της HSL, να εμπλέκονται στην υπολιπιδαιμική δράση της ελευρωπαΐνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η ελευρωπαΐνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία κατά της υπερτριγλυκεριδαιμίας και άλλων δυσλιπιδαιμιών, και ίσως τη βάση για το σχεδιασμό νέων μορίων με βελτιωμένη υπολιπιδαιμική δράση και μειωμένες παρενέργειες σε σύγκριση με τις στατίνες και τις φιβράτες.

10 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ελευρωπαΐνη, το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς, παρουσιάζει αντιοξειδωτικές και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνη για τη μείωση του εμφράκτου σε κονίκλους, που ακολουθούν τυπική ή υπερχοληστερολαιμική διαίτα. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας επαγωγής του πολλαπλασιασμού των υπεροξεισωμάτων τύπου α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α, PPARα), διαδραματίζει καίριο ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού των λιπιδίων και στην ενεργειακή ομοιοστασία του κυττάρου. Η συγκεκριμένη έρευνα εστιάζει στους μηχανισμούς της υπολιπιδαιμικής δράσης της Ελευρωπαΐνης. Έμφαση δίνεται στον ρόλο της Ελευρωπαΐνης στην ενεργοποίηση του PPARα.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε κατ'αρχήν αξιολόγηση *in silico* της ικανότητας της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στον PPARα. Θεωρητικά μοντέλα πρόσδεσης στην κρυσταλλική δομή του PPARα με τη χρήση Μοριακής Προσομοίωσης Πρόσδεσης (Molecular Docking Simulations), επιβεβαιώνουν την υπόθεσή μας ότι η Ελευρωπαΐνη είναι αγωνιστής του PPARα. Επιπλέον, διερευνήθηκε *in vitro* με το Luciferase reporter gene assay η ικανότητα της Ελευρωπαΐνης να προσδένεται στον υποδοχέα PPARα και να τον ενεργοποιεί. Τα αποτελέσματα από την *in silico* και την *in vitro* μελέτη δείχνουν σαφώς ότι η ελευρωπαΐνη ενεργοποιεί τον PPARα. Στη συνέχεια έγινε *in vivo* διερεύνηση της ενεργοποίησης του PPARα από την Ελευρωπαΐνη και αξιολόγηση της επίδρασής της στο λιπιδαιμικό προφίλ των πειραματόζων. Αγωγή αρσενικών μυών άγριου τύπου (SV129 Wild Type- WT) με Ελευρωπαΐνη σε δοσολογία 100mg/kg, p.o, τα οποία ακολούθησαν τυπική διαίτα για τρωκτικά, για διάστημα 6 εβδομάδων, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του Ppara και των γονιδίων-στόχων του στο ήπαρ, πιθανώς μέσω ενεργοποίησης του PI3K/AKT/p70S6K σηματοδοτικού μονοπατιού. Αυτή η επίδραση της Ελευρωπαΐνης

φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με σημαντική μείωση των επιπέδων των TGs του ορού και της ολικής χοληστερόλης, γιατί η Ελευρωπαΐνη δεν είχε καμία επίδραση σε αυτούς τους λιπιδαιμικούς δείκτες σε διαγονιδιακούς *Ppara null* μύες με αποσιωπημένο τον *Ppara*, αποδεικνύοντας έτσι την άμεση συμμετοχή του PPARα στην επαγόμενη από την Ελευρωπαΐνη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στον ορό. Στην κατεύθυνση της διερεύνησης της επίδρασης της Ελευρωπαΐνης σε ηπατικούς παράγοντες και σε παράγοντες, που εκφράζονται στο λευκό λιπώδη, κρίσιμους για την ομοιοστασία των Τριγλυκεριδίων, διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: 1) Ενεργοποίηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης (Hormone Sensitive Lipase - HSL) στο λευκό λιπώδη ιστό (White Adipose Tissue –W.A.T.) των άγριου τύπου μυών, 2) επαγωγή ποικίλων ηπατικών παραγόντων, που συμμετέχουν στη σύνθεση, τη μεταφορά, τον μεταβολισμό και την απέκκριση των τριγλυκεριδίων. Αυτή η ενεργοποίηση της HSL στον W.A.T. και των ηπατικών παραγόντων, που συμμετέχουν στην ομοιοστασία των λιπιδίων, είναι πιθανόν να ενισχύει την επαγόμενη από την Ελευρωπαΐνη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στον ορό.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι η Ελευρωπαΐνη μειώνει τα τριγλυκερίδια και την ολική χοληστερόλη του ορού σε μύες μέσω ενεργοποίησης του PPARα. Τα δεδομένα αυτής της μελέτης δείχνουν επίσης, ότι στην υπολιπιδαιμική δράση της Ελευρωπαΐνης συμμετέχει και η ενεργοποίηση της HSL στο λευκό λιπώδη ιστό καθώς και η επαγωγή ηπατικών γονιδίων, που διαδραματίζουν βασικό ρόλο την ομοιοστασία των τριγλυκεριδίων, δηλαδή τη σύνθεση, την μεταφορά, τον μεταβολισμό και την κάθαρσή τους. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε τις υπολιπιδαιμικές δυνατότητες της Ελευρωπαΐνης σε μύες και αποσαφήνισε σε σημαντικό βαθμό τους μηχανισμούς της υπολιπιδαιμικής δράσης της, φωτίζοντας

κυρίως τον ρόλο του PPARα. Επειδή η διατήρηση της ομοιοστασίας των λιπιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, που ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες, πιστεύουμε ότι πιθανώς εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί στην δράση της Ελευρωπαΐνης, η διερεύνηση των οποίων είναι αντικείμενο μελλοντικών μελετών.

11 SUMMARY

Oleuropein (OLE), the main polyphenolic constituent of the olive tree, has demonstrated antioxidant and hypolipidemic properties. In addition, it has been reported to display a cardio-protective effect, by reducing the infarct size in chow- and cholesterol-fed rabbits. It is well established that upon activation, Peroxisome proliferator activated receptor type α (PPAR α), plays a key role in the regulation of lipid metabolism, as well as the energy homeostasis of the cell. This study focuses on the mechanisms underlying the Oleuropein's hypolipidemic properties and specifically, on its role on PPAR α activation.

For this purpose, we initially evaluated using *in silico* approaches, the Oleuropein's binding capacity to PPAR α . These *in silico* studies, employing theoretic binding models at the PPAR α 's crystal structure along with Molecular Docking simulation, confirmed our hypothesis that OLE is a PPAR α agonist. Furthermore, we investigated *in vitro*, using the Luciferase reporter gene assay, Oleuropein's ability to bind to the LBD of PPAR α . Both, *in silico* and *in vitro* studies, clearly showed that OLE is a ligand of PPAR α . *In vivo* studies also confirmed that OLE is a PPAR α agonist that induces PPAR α activation. Specifically, treatment of male wild-type mice with OLE (100mg/kg, p.o.) followed the regular rodent diet for 6 weeks, resulted in the up-regulation of both, PPAR α and several target genes in the liver, potentially via activation of the PI3K/AKT/p70S6K signaling pathway. This effect was correlated with a significant reduction of serum triglycerides (TGs) and total cholesterol levels. In contrast, OLE had no effect in these lipid markers in *Ppara*-null mice indicating a direct involvement of PPAR α in the OLE-mediated suppression of serum TG and total cholesterol levels.

The assessment of the effect of OLE on hepatic and W.A.T regulatory factors playing determinant roles in TG homeostasis indicated the following: 1) the activation of HSL (Hormone Sensitive Lipase) in the W.A.T of wild type mice, 2) the upregulation of several hepatic factors involved in TG uptake, transport, metabolism and clearance. It is very likely that both, HSL activation in the W.A.T. and activation of several hepatic factors may also contribute in the OLE- mediated reduction of TGs and total cholesterol levels.

In summary, it appears that OLE reduces serum TGs and total cholesterol levels in mice via PPAR α activation. The data of this study, also indicated that HSL activation in the W.A.T. and upregulation of various hepatic genes (most of them are PPAR α target genes) may contribute in the mechanism mediating the Oleuropein's hypolipidemic effects. In conclusion, this study has demonstrated in mice the Oleuropein's hypolipidemic effects and has clarified to a certain point the underlying mechanisms indicating mainly, the catalytic role of PPAR α activation. Given that lipid homeostasis is regulated by complex cellular mechanisms, involving a plethora of factors, we consider that potentially other mechanisms also mediate the Oleuropein's hypolipidemic effects, and that their thorough investigation is a subject of future studies.

“STUDY OF THE EFFECT OF THE OLIVE CONSTITUENT OLEUROPEIN IN LIPID HOMEOSTASIS-INVESTIGATION OF THE ROLE OF THE NUCLEAR RECEPTORS PPARS”, FOTEINI MALLIOU

12 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Subramaniam S, Fahy E, Gupta S, Sud M, Byrnes RW, Cotter D, et al. Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chem Rev*. 2011;111(10):6452-90.
2. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115(4):450-8.
3. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.
4. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(1):8-13.
5. Balint BL, Nagy L. Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *EndocrMetab ImmuneDisordDrug Targets*. 2006;6(1):33-43.
6. Watts GF, Dimmitt SB. Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *CurrOpinLipidol*. 1999;10(6):561-74.
7. Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:125.
8. Barter PJ, Rye KA. Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(1):39-46.
9. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *PharmacolRev*. 2006;58(4):726-41.
10. Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagate A, He J, Perdomo G, et al. PPAR{alpha} mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *AmJPhysiol EndocrinolMetab*. 2007;292(2):E421-E34.
11. Rampler H, Weinhofer I, Netik A, Forss-Petter S, Brown PJ, Oplinger JA, et al. Evaluation of the therapeutic potential of PPARalpha agonists for X-linked adrenoleukodystrophy. *MolGenetMetab*. 2003;80(4):398-407.
12. Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *JBiolChem*. 1996;271(3):1764-9.
13. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, et al. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(10):1413-26.
14. Briante R, La Cara F, Tonziello MP, Febbraio F, Nucci R. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by

- hyperthermophilic beta-glycosidase. *J Agric Food Chem*. 2001;49(7):3198-203.
15. Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, et al. Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2008;54(5):363-70.
 16. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, et al. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr*. 2006;136(8):2213-9.
 17. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(Suppl):S9-S14.
 18. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2011;48(6):498-515.
 19. Brewer HB, Jr., Gregg RE, Hoeg JM, Fojo SS. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. *Clinical chemistry*. 1988;34(8b):B4-8.
 20. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2014;52(12).
 21. Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. *Clinical chemistry*. 2011;57(3):392-410.
 22. Kalogeris TJ, Fukagawa K, Tso P. Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride. *J Lipid Res*. 1994;35(7):1141-51.
 23. Lu S. Overexpression of Apolipoprotein A-IV Enhances Lipid Transport in Newborn Swine Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(35):31929-37.
 24. Blade AM, Fabritius MA, Hou L, Weinberg RB, Shelness GS. Biogenesis of apolipoprotein A-V and its impact on VLDL triglyceride secretion. *The Journal of Lipid Research*. 2010;52(2):237-44.
 25. Merkel M. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2694-6.
 26. de Barros JPP, Boualam A, Gautier T, Dumont L, Verges B, Masson D, et al. Apolipoprotein CI is a physiological regulator of cholesteryl ester transfer protein activity in human plasma but not in rabbit plasma. *The Journal of Lipid Research*. 2009;50(9):1842-51.
 27. Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. 2001;12(3):297-304.
 28. Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, et al. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;78(5):1287-95.
 29. Chen J, Li Q, Wang J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(36):14813-8.

30. Sacks FM, Zheng C, Cohn JS. Complexities of plasma apolipoprotein C-III metabolism. *The Journal of Lipid Research*. 2011;52(6):1067-70.
31. Sundaram M, Zhong S, Khalil MB, Zhou H, Jiang ZG, Zhao Y, et al. Functional analysis of the missense APOC3 mutation Ala23Thr associated with human hypotriglyceridemia. *The Journal of Lipid Research*. 2010;51(6):1524-34.
32. Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(8):4266-72.
33. Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Holvoet P, Lund-Katz S, Phillips MC. Domain Structure and Lipid Interaction in Human Apolipoproteins A-I and E, a General Model. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(26):23227-32.
34. Lippi G, Franchini M, Targher G. Screening and therapeutic management of lipoprotein(a) excess: Review of the epidemiological evidence, guidelines and recommendations. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(11-12):797-801.
35. Ren K, Tang Z-L, Jiang Y, Tan Y-M, Yi G-H. Apolipoprotein M. *Clinica Chimica Acta*. 2015;446:21-9.
36. Hegele RA. Lipoprotein and Lipid Metabolism. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*: Elsevier BV; 2013. p. 1-33.
37. Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5(2):117-25.
38. Mahley RW, Hussain MM. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Current Opinion in Lipidology*. 1991;2(3):170-6.
39. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res*. 1999;40(1):1-16.
40. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(2):151-7.
41. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science (New York, NY)*. 1986;232(4746):34-47.
42. Platt N, Gordon S. Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chemistry & biology*. 1998;5(8):R193-203.
43. Steinmetz A, Kaffarnik H, Utermann G. Activation of phosphatidylcholine-sterol acyltransferase by human apolipoprotein E isoforms. *European journal of biochemistry*. 1985;152(3):747-51.
44. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32(5):1079-86.
45. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992;33(2):141-66.
46. Sundaram M, Yao Z. Intrahepatic role of exchangeable apolipoproteins in lipoprotein assembly and secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1073-8.
47. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 1998;81(4A):18B-25B.
48. Krauss RM. Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management. *Am J Med*. 1998;105(1A):58S-62S.
49. Tripathi KD. *Essentials of Medical Pharmacology*. Jaypee Brothers Medical Publishing; 2008.

50. Book Review: Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 8th Edition Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 8th Edition Edited by DiPiro Joseph T PharmD FCCP, Talbert Robert L PharmD FCCP BCPS CLS, Yee Gary C PharmD FCCP BCOP, Matzke Gary R PharmD FCP FCCP FASN, Wells Barbara G PharmD FCCP BCPP, and Posey L Michael B Pharm. Published by McGraw-Hill Companies Inc., New York, NY, 2011. ISBN 978-0-07-170354-3. Clothbound, xxxii + 2668 pp. (28.5 × 22.5 cm), \$195; 21 additional chapters available online. www.mcgrawhillmedical.com. *Annals of Pharmacotherapy*. 2011;45(12):1594-5.
51. Semenkovich CF, Goldberg AC, Goldberg IJ. Disorders of Lipid Metabolism. *Williams Textbook of Endocrinology*: Elsevier BV; 2011. p. 1633-74.
52. Gregson J, Stirnadel-Farrant HA, Doobaree IU, Koro C. Variation of lipoprotein associated phospholipase A2 across demographic characteristics and cardiovascular risk factors: A systematic review of the literature. *Atherosclerosis*. 2012;225(1):11-21.
53. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *European Heart Journal*. 2010;31(23):2844-53.
54. Aberg JA. Lipid management in patients who have HIV and are receiving HIV therapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2009;38(1):207-22.
55. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*. 1983;24(8):1070-6.
56. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Primary care*. 2013;40(1):195-211.
57. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1984;251(3):351-64.
58. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1984;251(3):365-74.
59. Gordon T. Lipoproteins, Cardiovascular Disease, and Death. *Archives of Internal Medicine*. 1981;141(9):1128.
60. Robertson TL, Kato H, Rhoads GG, Kagan A, Marmot M, Leonard Syme S, et al. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. *The American Journal of Cardiology*. 1977;39(2):239-43.
61. Verschuren WMM. Serum Total Cholesterol and Long-term Coronary Heart Disease Mortality in Different Cultures. *JAMA*. 1995;274(2):131.
62. Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2015;108(1):32-7.
63. Stamler J. George Lyman Duff Memorial Lecture. Lifestyles, major risk factors, proof and public policy. *Circulation*. 1978;58(1):3-19.
64. Capewell S, O'Flaherty M. Can dietary changes rapidly decrease cardiovascular mortality rates? *Eur Heart J*. 2011;32(10):1187-9.
65. Steinberg D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *The Journal of Lipid Research*. 2004;45(9):1583-93.

66. Steinberg D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *The Journal of Lipid Research*. 2004;46(2):179-90.
67. Steinberg D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia. *The Journal of Lipid Research*. 2005;46(10):2037-51.
68. Steinberg D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: The 1984 Coronary Primary Prevention Trial ends it--almost. *The Journal of Lipid Research*. 2005;47(1):1-14.
69. Steinberg D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy. *The Journal of Lipid Research*. 2006;47(7):1339-51.
70. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2010;376(9753):1670-81.
71. Brugts JJ, Yetgin T, Hoeks SE, Gotto AM, Shepherd J, Westendorp RGJ, et al. The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2009;338(jun30 1):b2376-b.
72. Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ, Arora P, Perri D. Primary Prevention of Cardiovascular Mortality and Events With Statin Treatments. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(22):1769-81.
73. Fellström BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, et al. Rosuvastatin and Cardiovascular Events in Patients Undergoing Hemodialysis. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(14):1395-407.
74. investigators G-H. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2008;372(9645):1231-9.
75. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(21):2195-207.
76. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(13):1343-56.
77. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJM, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *The Lancet*. 2010;375(9716):735-42.
78. García-Rodríguez LA, Massó-González EL, Wallander M-A, Johansson S. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100 000 statin users in UK primary care. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 2008;17(10):943-52.
79. Hippisley-Cox J, Coupland C. Unintended effects of statins in men and women in England and Wales: population based cohort study using the QResearch database. *BMJ*. 2010;340(may19 4):c2197-c.

80. Tyroler HA. Cholesterol and cardiovascular disease. An overview of Lipid Research Clinics (LRC) epidemiologic studies as background for the LRC Coronary Primary Prevention Trial. *Am J Cardiol.* 1984;54(5):14c-9c.
81. Group SC. Study of Heart and Renal Protection (SHARP): Randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease. *American Heart Journal.* 2010;160(5):785-94.e10.
82. Chapman MJ, Redfern JS, McGovern ME, Giral P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: Pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacology & Therapeutics.* 2010;126(3):314-45.
83. Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of Action of Niacin. *The American Journal of Cardiology.* 2008;101(8):S20-S6.
84. Secondary Prevention by Raising HDL Cholesterol and Reducing Triglycerides in Patients With Coronary Artery Disease : The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *Circulation.* 2000;102(1):21-7.
85. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *The Lancet.* 2005;366(9500):1849-61.
86. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, et al. Helsinki Heart Study: Primary-Prevention Trial with Gemfibrozil in Middle-Aged Men with Dyslipidemia. *New England Journal of Medicine.* 1987;317(20):1237-45.
87. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, et al. Gemfibrozil for the Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Men with Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *New England Journal of Medicine.* 1999;341(6):410-8.
88. Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA. Safety Considerations with Fibrate Therapy. *The American Journal of Cardiology.* 2007;99(6):S3-S18.
89. Taskinen MR, Sullivan DR, Ehnholm C, Whiting M, Zannino D, Simes RJ, et al. Relationships of HDL Cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II With Homocysteine and Creatinine in Patients With Type 2 Diabetes Treated With Fenofibrate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2009;29(6):950-5.
90. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):19-30.
91. Reiner Ae. Combined therapy in the treatment of dyslipidemia. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2010;24(1):19-28.
92. Zhao X-Q, Krasuski RA, Baer J, Whitney EJ, Neradilek B, Chait A, et al. Effects of Combination Lipid Therapy on Coronary Stenosis Progression and Clinical Cardiovascular Events in Coronary Disease Patients With Metabolic Syndrome: A Combined Analysis of the Familial Atherosclerosis Treatment Study (FATS), the HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS), and the Armed Forces Regression Study (AFREGS). *The American Journal of Cardiology.* 2009;104(11):1457-64.
93. Huijgen R, Abbink EJ, Bruckert E, Stalenhoef AFH, Imholz BPM, Durrington PN, et al. Colesevelam added to combination therapy with a statin and ezetimibe in patients with familial hypercholesterolemia: A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Therapeutics.* 2010;32(4):615-25.

94. Ballantyne CM, Weiss R, Moccetti T, Vogt A, Eber B, Sosef F, et al. Efficacy and Safety of Rosuvastatin 40 mg Alone or in Combination With Ezetimibe in Patients at High Risk of Cardiovascular Disease (Results from the EXPLORER Study). *The American Journal of Cardiology*. 2007;99(5):673-80.
95. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, et al. Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):148-56.
96. Ladenson PW, Kristensen JD, Ridgway EC, Olsson AG, Carlsson B, Klein I, et al. Use of the Thyroid Hormone Analogue Eprotirome in Statin-Treated Dyslipidemia. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(10):906-16.
97. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng M-J, Cromwell WC, et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2010;375(9719):998-1006.
98. Health NIo. ClinicalTrials.gov 2017 [cited 2017 1/2/2017]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Hyperlipidemia&intr=%22Hypolipidemic+Agents%22>.
99. WHO. Global status report on noncommunicable diseases2014. 298 p.
100. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*. 2006;3(11):e442.
101. Organization WH. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/, http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/.
102. Andreadou I, Iliodromitis EK, Lazou A, Gorbe A, Giricz Z, Schulz R, et al. Effect of hypercholesterolemia on myocardial function, ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British journal of pharmacology*. 2017.
103. Cohen MB. Robbins' pathologic basis of disease,5th Edition Authors: Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar, and Stanley L. Robbins W.B. Saunders, Philadelphia, 1994. *Diagnostic Cytopathology*. 1995;12(4):377-.
104. Elisaf M PC, Liberopoulos Ev, Tziomalos K, Athyros V. Updated guidelines of the Hellenic Society of Atherosclerosis for the diagnosis and treatment of dyslipidemia-2014. *Hellenic Journal of Atherosclerosis* 2014;5(3):151–63.
105. International Olive Oil C. World olive encyclopedia. Madrid, Spain: World Olive Council; 1996.
106. Zohary D, Spiegel-Roy P. Beginnings of fruit growing in the old world. *Science (New York, NY)*. 1975;187(4174):319-27.
107. Jones WHS. Hippocrates and the corpus Hippocraticum.
108. Goodhart JF. Remarks on Gall Stones and on their Treatment by the Administration of Large Doses of Olive Oil. *Br Med J*. 1892;1(1622):219-22.
109. Gubb AS. A Case of Hepatic Colic Cured by the Ingestion of Olive Oil. *Br Med J*. 1895;1(1790):865.
110. Stephenson WH. Treatment of Gall Stones by Large Doses of Olive Oil. *Br Med J*. 1895;1(1795):1144.
111. Mainoli S. [Hypotensive effect of extracts from olive leaves: first clinical results]. *Minerva medica*. 1951;42(24):751-54.

112. Pannizzi L SM, Oriente G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz Chim Ital.* 1960;90:1449–85.
113. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
114. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*: Wiley; 2015.
115. Capasso R, Evidente A, Scognamiglio F. A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochemical Analysis.* 1992;3(6):270-5.
116. Ficarra P, Ficarra R, de Pasquale A, Monforte MT, Calabro ML. HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989).* 1991;46(6):803-15.
117. Campeol E, Flamini G, Chericoni S, Catalano S, Cremonini R. Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5409-11.
118. Bonoli M, Bendini A, Cerretani L, Lercker G, Toschi TG. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J Agric Food Chem.* 2004;52(23):7026-32.
119. Baracco A, Bertin G, Gnocco E, Legorat M, Sedocco S, Catinella S, et al. A comparison of the combination of fast-atom bombardment with tandem mass spectrometry and of gas chromatography with mass spectrometry in the analysis of a mixture of kaempferol, kaempferide, luteolin and oleuropein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 1995;9(5):427-36.
120. Di Donna L, Mazzotti F, Salerno R, Tagarelli A, Taverna D, Sindona G. Characterization of new phenolic compounds from leaves of *Olea europaea* L. by high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2007;21(22):3653-7.
121. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews.* 2002;22(1):65-75.
122. Visioli F, Bellosta S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life sciences.* 1998;62(6):541-6.
123. Charoenprasert S, Mitchell A. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012;60(29):7081-95.
124. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):622-9.
125. Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Current atherosclerosis reports.* 2001;3(1):64-7.
126. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews.* 2005;18(1):98-112.
127. Micol V, Caturla N, Perez-Fons L, Mas V, Perez L, Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral research.* 2005;66(2-3):129-36.

128. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B, et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*. 2000;1:107-12.
129. Andreadou I, Papaefthimiou M, Zira A, Constantinou M, Sigala F, Skaltsounis A-L, et al. Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein. *NMR in Biomedicine*. 2009;22(6):585-92.
130. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;42(3):549-58.
131. Andreadou I, Bibli SI, Konstantinou M, Vasileiou S, Gikas E, Lemonakis N, et al. The olive constituent oleuropein triggers a postconditioning-like effect in anesthetized rabbits through GSK3 β inhibition and JAK/STAT activation. *European Heart Journal*. 2013;34(suppl 1):3698-.
132. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis International*. 2010;22(2):675-84.
133. de la Puerta Ro, Domínguez MEMn, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JRS. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life sciences*. 2001;69(10):1213-22.
134. Visioli F, Galli C, Galli G, Caruso D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *European journal of lipid science and technology*. 2002;104(9-10):677-84.
135. Visioli F, Bogani P, Galli C. Healthful properties of olive oil minor components. *Olive oil: Chemistry and technology*. 2006:173-90.
136. de la Puerta R, Martinez Dominguez ME, Ruiz-Gutierrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life sciences*. 2001;69(10):1213-22.
137. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, et al. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*. 2000;35(1):45-54.
138. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(3):797-9.
139. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(4):445-9.
140. Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2004;15(8):461-6.
141. Petkov V, Manolov P. Pharmacological studies on substances of plant origin with coronary dilatating and antiarrhythmic action. *Comparative medicine East and West*. 1978;6(2):123-30.
142. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis research*. 1995;78(2):151-60.

143. De A. Ribeiro R, De Melo MMRF, De Barros F, Gomes C, Trolin G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. *Journal of Ethnopharmacology*. 1986;15(3):261-9.
144. Khayyal M, El-Ghazaly M, Abdallah D, Nassar N, Okpanyi S, Kreuter M-H. Blood Pressure Lowering Effect of an Olive Leaf Extract {*Olea europaea*) in L-NAME Induced Hypertension in Rats. *Arzneimittelforschung*. 2011;52(11):797-802.
145. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 1995;117(1):25-32.
146. Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Mocetti T, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2011;18(4):251-8.
147. de Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PloS one*. 2013;8(3):e57622.
148. Reddy J, Svoboda D, Azarnoff D. Microbody proliferation in liver induced by nafenopin, a new hypolipidemic drug: comparison with CPIB. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973;52(2):537-43.
149. Reddy JK. Hepatic microbody proliferation and catalase synthesis induced by methyl clofenapate, a hypolipidemic analog of CPIB. *Am J Pathol*. 1974;75(1):103-18.
150. Reddy JK, Krishnakantha TP. Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science (New York, NY)*. 1975;190(4216):787-9.
151. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY)*. 1988;240(4854):889-95.
152. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*. 1992;11(3):1003-13.
153. Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chemistry & biology*. 1995;2(5):261-6.
154. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
155. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
156. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20(5):649-88.
157. Ondrey F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway targeting in carcinogenesis: implications for chemoprevention. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):2-8.
158. Giaginis C, Tsourouflis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: novel pharmacological agents in the treatment of ischemia reperfusion injury. *Curr Mol Med*. 2008;8(6):562-79.

159. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A, Theocharis S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Ligands: Potential Pharmacological Agents for Targeting the Angiogenesis Signaling Cascade in Cancer. *PPAR Res.* 2008;2008:431763.
160. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(32):20230-5.
161. Hummasti S, Tontonoz P. The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2006;20(6):1261-75.
162. Bugge A, Grontved L, Aagaard MM, Borup R, Mandrup S. The PPARgamma2 A/B-domain plays a gene-specific role in transactivation and cofactor recruitment. *Mol Endocrinol.* 2009;23(6):794-808.
163. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine.* 2002;53:409-35.
164. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7355-9.
165. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell.* 1999;3(3):397-403.
166. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(30):18779-89.
167. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(4):1440-4.
168. Miyata KS, McCaw SE, Marcus SL, Rachubinski RA, Capone JP. The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene.* 1994;148(2):327-30.
169. A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(32):20108-17.
170. Qi C, Zhu Y, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell biochemistry and biophysics.* 2000;32 Spring:187-204.
171. Boukouvala E, Antonopoulou E, Favre-Krey L, Diez A, Bautista JM, Leaver MJ, et al. Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids.* 2004;39(11):1085-92.
172. Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(10):4948-52.

173. Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J.* 1998;17(1):232-43.
174. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY).* 1995;270(5240):1354-7.
175. Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 1996;85(3):403-14.
176. Roeder RG. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* 2005;579(4):909-15.
177. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 1996;15(14):3667-75.
178. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature.* 1997;387(6634):677-84.
179. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 1997;90(3):569-80.
180. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science (New York, NY).* 1997;277(5328):965-8.
181. Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8479-84.
182. Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(41):25500-6.
183. Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):7939-44.
184. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92(6):829-39.
185. Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(11):5517-21.
186. Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3beta inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. *Shock.* 2008;30(3):299-307.
187. Liang YJ, Chen CY, Juang SJ, Lai LP, Shyu KG, Wang BW, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta agonists attenuated the C-reactive protein-induced pro-inflammation in cardiomyocytes and H9c2 cardiomyoblasts. *European journal of pharmacology.* 2010;643(1):84-92.
188. Rodriguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sanchez RM, Merlos M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by

- lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes*. 2008;57(8):2149-57.
189. Kapoor A, Collino M, Castiglia S, Fantozzi R, Thiemermann C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. *Shock*. 2010;34(2):117-24.
 190. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(22):12953-6.
 191. Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(10):6718-25.
 192. Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 1997;11(6):779-91.
 193. Lehrke M, Pascual G, Glass CK, Lazar MA. Gaining weight: the Keystone Symposium on PPAR and LXR. *Genes & development*. 2005;19(15):1737-42.
 194. Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2003;6(3):165-9.
 195. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*. 2000;43(4):527-50.
 196. Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, et al. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes*. 2007;56(4):1034-41.
 197. Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology and atherosclerosis: emerging insights for evolving paradigms. *Current atherosclerosis reports*. 2000;2(4):327-35.
 198. Fruchart JC, Staels B, Duriez P. The role of fibric acids in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2001;3(1):83-92.
 199. Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Hayashi K, Ebihara I, Koide H. Comparative effects of pioglitazone, glibenclamide, and voglibose on urinary endothelin-1 and albumin excretion in diabetes patients. *Journal of diabetes and its complications*. 2000;14(5):250-4.
 200. Taniguchi A, Fukushima M, Sakai M, Tokuyama K, Nagata I, Fukunaga A, et al. Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001;50(4):477-80.
 201. Vrablik M, Dobiasova M, Stulc T, Kasalova Z, Dolezalova R, Prazny M, et al. Fenofibrate and rosiglitazone improve quality of lipoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus. *Neuro endocrinology letters*. 2008;29(1):146-50.
 202. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68(5):879-87.

203. Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Advances in clinical chemistry*. 2015;71:171-203.
204. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(37):28918-28.
205. Crisafulli C, Cuzzocrea S. The role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) in the regulation of inflammation in macrophages. *Shock*. 2009;32(1):62-73.
206. Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*. 1995;15(6):3012-22.
207. Mei CL, He P, Cheng B, Liu W, Wang YF, Wan JJ. Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation via PPAR alpha and PPAR gamma-dependent pathways. *Cell biology international*. 2009;33(3):301-8.
208. Mukherjee R, Locke KT, Miao B, Meyers D, Monshizadegan H, Zhang R, et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists lower low-density lipoprotein and triglycerides, raise high-density lipoprotein, and synergistically increase cholesterol excretion with a liver X receptor agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;327(3):716-26.
209. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling*. 2010;8:e002.
210. Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World journal of cardiology*. 2014;6(8):744-54.
211. Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther*. 2006;111(1):145-73.
212. Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Molecules and cells*. 2012;33(3):217-22.
213. Freitag CM, Miller RJ. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate neuropathic pain: a link to chemokines? *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:238.
214. Giby VG, Ajith TA. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology*. 2014;6(8):570-9.
215. Lu J, Huang G, Hu S, Wang Z, Guan S. 1,3-Dichloro-2-propanol induced hyperlipidemia in C57BL/6J mice via AMPK signaling pathway. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014;64:403-9.
216. Cao Y, Bei W, Hu Y, Cao L, Huang L, Wang L, et al. Hypocholesterolemia of Rhizoma Coptidis alkaloids is related to the bile acid by up-regulated CYP7A1 in hyperlipidemic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(8-9):686-92.
217. Valasek MA, Clarke SL, Repa JJ. Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPARAlpha-dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2725-35.

218. Singh V, Jain M, Misra A, Khanna V, Rana M, Prakash P, et al. Curcuma oil ameliorates hyperlipidaemia and associated deleterious effects in golden Syrian hamsters. *The British journal of nutrition*. 2013;110(3):437-46.
219. Iwayanagi Y, Takada T, Tomura F, Yamanashi Y, Terada T, Inui K, et al. Human NPC1L1 expression is positively regulated by PPARalpha. *Pharmaceutical research*. 2011;28(2):405-12.
220. Byun HW, Hong EM, Park SH, Koh DH, Choi MH, Jang HJ, et al. Pravastatin activates the expression of farnesoid X receptor and liver X receptor alpha in Hep3B cells. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2014;13(1):65-73.
221. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPARE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996;15(19):5336-48.
222. Huang J, Zhang Y, Zhou Y, Zhang Z, Xie Z, Zhang J, et al. Green tea polyphenols alleviate obesity in broiler chickens through the regulation of lipid-metabolism-related genes and transcription factor expression. *J Agric Food Chem*. 2013;61(36):8565-72.
223. Camps L, Reina M, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Vilaro S. Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J Lipid Res*. 1991;32(12):1877-88.
224. Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, et al. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(33):34411-20.
225. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(37):28488-93.
226. Schuster H, Fagerberg B, Edwards S, Halmos T, Lopatynski J, Stender S, et al. Tesaglitazar, a dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist, improves apolipoprotein levels in non-diabetic subjects with insulin resistance. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):355-62.
227. Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, Saito M, Takeda J. Feedback looping between ChREBP and PPARalpha in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. *Endocrine journal*. 2013;60(10):1145-53.
228. Yi X, Pashaj A, Xia M, Moreau R. Reversal of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)-alpha-lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;439(3):390-5.
229. Shi L, Shi L, Zhang H, Hu Z, Wang C, Zhang D, et al. Oxymatrine ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in rats through peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation. *Molecular medicine reports*. 2013;8(2):439-45.
230. Gamboa-Gomez C, Salgado LM, Gonzalez-Gallardo A, Ramos-Gomez M, Loarca-Pina G, Reynoso-Camacho R. Consumption of *Ocimum sanctum* L. and *Citrus paradisi* infusions modulates lipid metabolism and insulin resistance in obese rats. *Food & function*. 2014;5(5):927-35.
231. Kim MJ, Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Lee MK. Dietary umbelliferone attenuates alcohol-induced fatty liver via regulation of PPARalpha and SREBP-1c in rats. *Alcohol*. 2014;48(7):707-15.

232. Zhang LH, Kamanna VS, Ganji SH, Xiong XM, Kashyap ML. Pioglitazone increases apolipoprotein A-I production by directly enhancing PPRE-dependent transcription in HepG2 cells. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2211-22.
233. Babaev VR, Ishiguro H, Ding L, Yancey PG, Dove DE, Kovacs WJ, et al. Macrophage expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2007;116(12):1404-12.
234. Kammerer I, Ringseis R, Biemann R, Wen G, Eder K. 13-hydroxy linoleic acid increases expression of the cholesterol transporters ABCA1, ABCG1 and SR-BI and stimulates apoA-I-dependent cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. *Lipids in health and disease.* 2011;10:222.
235. Schafer HL, Linz W, Falk E, Glien M, Glombik H, Korn M, et al. AVE8134, a novel potent PPAR α agonist, improves lipid profile and glucose metabolism in dyslipidemic mice and type 2 diabetic rats. *Acta pharmacologica Sinica.* 2012;33(1):82-90.
236. Zarzuelo MJ, Lopez-Sepulveda R, Sanchez M, Romero M, Gomez-Guzman M, Ungvary Z, et al. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. *Biochemical pharmacology.* 2013;85(9):1288-96.
237. Ibarra-Lara L, Hong E, Soria-Castro E, Torres-Narvaez JC, Perez-Severiano F, Del Valle-Mondragon L, et al. Clofibrate PPAR α activation reduces oxidative stress and improves ultrastructure and ventricular hemodynamics in no-flow myocardial ischemia. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2012;60(4):323-34.
238. Liu X, Jang SS, An Z, Song H, Kim WD, Yu JR, et al. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells. *Radiation oncology journal.* 2012;30(2):88-95.
239. Zhu J, Wu Y, Tang Q, Leng Y, Cai W. The effects of choline on hepatic lipid metabolism, mitochondrial function and antioxidative status in human hepatic C3A cells exposed to excessive energy substrates. *Nutrients.* 2014;6(7):2552-71.
240. Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(2):1224-9.
241. Rubin CJ, De Pril V, Fiedorek FT. Coadministration of muraglitazar plus glyburide: improvement of glycaemic and lipid profiles in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & vascular disease research.* 2009;6(2):120-32.
242. Wu C, Jia Y, Lee JH, Jun HJ, Lee HS, Hwang KY, et al. trans-Caryophyllene is a natural agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2014;24(14):3168-74.
243. Lu Y, Liu X, Jiao Y, Xiong X, Wang E, Wang X, et al. Periostin promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia through downregulation of PPAR α . *The Journal of clinical investigation.* 2014;124(8):3501-13.
244. Rakhshandehroo M, Knoch B, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *PPAR Res.* 2010;2010.
245. Jeong S, Yoon M. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPAR α in high fat diet-induced obese mice. *Experimental & molecular medicine.* 2009;41(6):397-405.

246. Shi QY, Lin YG, Zhou X, Lin YQ, Yan S. [Expression of FXR mRNA, PPAR alpha mRNA and bile acid metabolism related genes in intrahepatic cholestasis of pregnant rats]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology*. 2010;18(12):927-30.
247. Mani S, Untereiner A, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(5):805-17.
248. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5119-28.
249. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-70.
250. Sanderson LM, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Muller M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol*. 2009;29(23):6257-67.
251. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;99(1):303-8.
252. Peters JM, Lee SST, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, et al. Growth, Adipose, Brain, and Skin Alterations Resulting from Targeted Disruption of the Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta (delta). *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(14):5119-28.
253. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(9):5306-11.
254. Wang Y-X, Lee C-H, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-70.
255. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(41):37731-4.
256. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):41245-54.
257. Desvergne B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*. 1999;20(5):649-88.
258. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, et al. Adipose Tissue Is a Major Source of Interleukin-1 Receptor Antagonist: Upregulation in Obesity and Inflammation. *Diabetes*. 2003;52(5):1104-10.
259. Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, Sohda T, Kawamatsu Y, Iwatsuka H, et al. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*. 1983;32(9):804-10.

260. Hiragun A, Sato M, Mitsui H. Preadipocyte differentiation in vitro: Identification of a highly active adipogenic agent. *Journal of Cellular Physiology*. 1988;134(1):124-30.
261. Lazar Mitchell A. PPAR γ , 10 years later. *Biochimie*. 2005;87(1):9-13.
262. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(22):12953-6.
263. Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;69:4-16.
264. Edgecombe SC, Stretch GL, Hayball PJ. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr*. 2000;130(12):2996-3002.
265. Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *The Journal of membrane biology*. 1987;100(2):123-36.
266. Del Boccio P, Di Deo A, De Curtis A, Celli N, Iacoviello L, Rotilio D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003;785(1):47-56.
267. Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Chacko J, Trump BF. Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro*. 1981;17(10):913-25.
268. Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Trump BF. Mouse liver cell culture. II. Primary culture. *In Vitro*. 1981;17(10):926-34.
269. <http://www.rcsb.org>. Available from: Protein Data Bank.
270. Kosti V, Lambrinidis G, Myrianthopoulos V, Dhallinas G, Mikros E. Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. *PloS one*. 2012;7(7):e41939.
271. Kryptou E, Lambrinidis G, Evangelidis T, Mikros E, Dhallinas G. Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol*. 2014;93(1):129-45.
272. Artis DR, Lin JJ, Zhang C, Wang W, Mehra U, Perreault M, et al. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(1):262-7.
273. Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M, et al. Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(10):1493-503.
274. Cheng Z, White MF. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(4):649-61.
275. Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther*. 2007;113(1):88-120.

276. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol.* 2004;24(18):7931-40.
277. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England journal of medicine.* 2003;348(26):2599-608.
278. Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8):769-77.
279. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, et al. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2008;56(8):2630-6.
280. Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr.* 2010;140(5):946-53.
281. Eidi A, Eidi M, Darzi R. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytother Res.* 2009;23(3):347-50.
282. Park S, Choi Y, Um SJ, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *J Hepatol.* 2011;54(5):984-93.
283. Hur W, Kim SW, Lee YK, Choi JE, Hong SW, Song MJ, et al. Oleuropein reduces free fatty acid-induced lipogenesis via lowered extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes. *Nutr Res.* 2012;32(10):778-86.
284. Priore P, Siculella L, Gnoni GV. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2014;25(7):683-91.
285. Obied HK, Prenzler PD, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposto S, et al. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural product reports.* 2008;25(6):1167-79.
286. Konstandi M, Shah YM, Matsubara T, Gonzalez FJ. Role of PPARalpha and HNF4alpha in stress-mediated alterations in lipid homeostasis. *PloS one.* 2013;8(8):e70675.
287. Martinez-Jimenez CP, Kymrizi I, Cardot P, Gonzalez FJ, Talianidis I. Hepatocyte nuclear factor 4alpha coordinates a transcription factor network regulating hepatic fatty acid metabolism. *Mol Cell Biol.* 2010;30(3):565-77.
288. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):13018-23.
289. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, NY).* 2004;306(5700):1383-6.
290. Nourbakhsh M, Douglas DN, Pu CH, Lewis JT, Kawahara T, Lisboa LF, et al. Arylacetamide deacetylase: a novel host factor with important roles in the lipolysis of cellular triacylglycerol stores, VLDL assembly and HCV production. *J Hepatol.* 2013;59(2):336-43.
291. Brozovic S, Nagaishi T, Yoshida M, Betz S, Salas A, Chen D, et al. CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nat Med.* 2004;10(5):535-9.

292. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2547-59.
293. Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology.* 2008;149(3):942-9.
294. Mori M, Hosokawa M, Ogasawara Y, Tsukada E, Chiba K. cDNA cloning, characterization and stable expression of novel human brain carboxylesterase. *FEBS Lett.* 1999;458(1):17-22.
295. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *The Journal of membrane biology.* 1996;153(1):75-81.
296. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res.* 1998;39(4):777-88.
297. Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(2):269-75.
298. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, et al. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(41):38503-16.
299. Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *The Journal of clinical investigation.* 2002;109(10):1381-9.
300. Pols TW, Ottenhoff R, Vos M, Levels JH, Quax PH, Meijers JC, et al. Nur77 modulates hepatic lipid metabolism through suppression of SREBP1c activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366(4):910-6.
301. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(52):40236-41.

