

Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 7^η : Επίδραση των φλαβονοειδών στην έκφραση γονιδίων

Παραδοτέα: D7_P1

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ, ΣΤΟ ΜΥΪΚΟ ΙΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΗΠΑΡ
ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**



Σκοπός του πακέτου εργασίας ήταν η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που με βάση την βιβλιογραφία είναι πιθανοί στόχοι της δράσης των φλαβονοειδών και η σύγκριση της έκφρασης μεταξύ πειραματικών ομάδων ορνιθίων από τη δράση 3 και η διαπίστωση πιθανής επίδρασης της Εσπεριδίνης ή /και της Ναρινγίνης στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό τα γονιδια: της αδιπονεκτίνης (*adipoQ*), του υποδοχέα της αδιπονεκτίνης 2 (*adipor2*), του ενεργοποιημένου υποδοχέα γ των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (*ppar- γ*), και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (*fasn*).

Υλικά και μέθοδοι

Δειγματοληψία

Από 10 ορνίθια από κάθε μια από τις 6 πειραματικές ομάδες της δράσης 3 (*Επίδραση των φλαβονοειδών στην ποιότητα του σφάγιου ορνιθίων κρεοπαραγωγής*) ελήφθησαν δείγματα κοιλιακού λιπώδους ιστού, ήπατος και μυϊκού ιστού. Τα δείγματα των ιστών κατά την λήψη τους καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80°C έως την απομόνωση του RNA.

Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA

Απομονώθηκε ολικό RNA από τον κοιλιακό λιπώδη ιστό με τη χρήση του αντιδραστηρίου QIAzol® (Qiagen) και από το ήπαρ με τη χρήση του κιτ InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (STRATEC Biomedical, Birkenfeld, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστών και έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των πειραματικών πρωτοκόλλων.

Στη συνέχεια έγινε αντίστροφη μεταγραφή του RNA από το κοιλιακό λίπος σε cDNA με το ένζυμο SuperScriptII (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για σύνθεση cDNA με random hexamers και του RNA από το ήπαρ με το κιτ αντιδραστηρίων PrimeScript RT, Perfect Real Time (Clontech-Takara Bio, Inc.) σύμφωνα με τις οδηγίες για SYBR Green Assay και έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των πειραματικών πρωτοκόλλων.



Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση των υπό εξέταση γονιδίων

Βάσει των διαθέσιμων γονιδιακών και mRNA αλληλουχιών των παραπάνω γονιδίων σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων του cDNA των γονιδίων αυτών με real time PCR χωρίς να ενισχύεται το γενωματικό (g)DNA ή να είναι δυνατή η διάκριση των προϊόντων ενίσχυσης από το gDNA (Πίνακας 1). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του λογισμικού NCBI-Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και περαιτέρω έλεγχος της καταλληλότητας των εκκινητών in silico έγινε ελέγχοντας τις πιθανές δευτεροταγείς δομές του προϊόντος ενίσχυσης με το λογισμικό mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>). Επιπλέον σχεδιάστηκαν εκκινητές και για το γονίδιο της β-ακτίνης (*actb*) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης και τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα δείγματα cDNA από τις έξι πειραματικές ομάδες.

PCR πραγματικού χρόνου

Διενεργήθηκε μια αρχική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε 4 από τα 10 δείγματα κάθε πειραματικής ομάδας. Για το σκοπό αυτό cDNA ενισχύθηκε με το αντιδραστήριο KAPA SYBR® Fast qPCR (KAPA Biosystems) και τους εκκινητές των επί μέρους γονιδίων στο σύστημα real time PCR 7500 της Applied Biosystems® (Life Technologies), έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης του πειραματικού πρωτοκόλλου. Για την σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς από διαδοχικές αραιώσεις, 1:5, ενός αρχικού δείγματος cDNA αναφοράς το οποίο ήταν μείγμα από όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Κάθε δείγμα cDNA ενισχύθηκε σε τρεις επαναληπτικές αντιδράσεις. Η διόρθωση της έκφρασης κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα cDNA έγινε βάσει της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *actb*. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων (υπολογισμός κύκλων ουδού, threshold cycles, Ct) έγινε με το λογισμικό 7500 v2.3 (Applied Biosystems®/Life Technologies).



Πίνακας 1: Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια: β-ακτίνη (*actb*), υποδοχέα της αδιπονεκτίνης 1 και 2 (*adipor1/2*), του ενεργοποιημένου υποδοχέα γ των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (*ppar-γ*), και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (*fasn*)

Γονίδιο	Όνομα Εκκινητή	GeneBank Accession No	Αλληλουχία	cDNA amplicon size	genomic amplicon size
<i>actb</i>	chACTB_F	mRNA: NM_205518.1	CGAGGCCCTCTTCCAGCCATCTTT	131bp	437bp
	chACTB_R	genomic DNA: NW_001486319.1	CACCAGACAGCACTGTGTTGGC		
<i>adipoq</i>	chAdipoQ_F	Maddineni et al, Chicken Adiponectin Gene Expression. Endocrinology, 2005, 146	GCCAGGTCTACAAGGTGTCA	86bp	-
	chAdipoQ_R	(10):4250–4256	CCATGTGTCCTGGAAATCCT		
<i>adipor1</i>	chAdipoR1_F	mRNA: NM_001031027.1	CCAGGAGAAGGTTGTGTTTG	149bp	1286bp
	chAdipoR1_R	genomic DNA: NC_006113.3	TGATCAGCAGTGCAATTCCT		
<i>adipor2</i>	chAdipoR2_F	mRNA: NM_001007854.1	TCATGGCTCTCCACACAGT	145bp	1200bp
	chAdipoR2_R	genomic DNA: NC_006088.3	AAGGCTGAGGGTTGCAGTAG		
<i>ppar-γ</i>	chPPARg_F	mRNA: AF470456.1	TGTTGATTTTTCAAGCATTTCTTC	143bp	1755bp
	chPPARg_R	genomic DNA: NC_006099.2	ACCACA AGGGAGGAGAAGGAGGCTCCAT		
<i>fasn</i>	chFASN_F	mRNA: NM_205155.2	GGCTTGAGTTGGCACAGTGGCTA	126bp	-
	chFASN_R	genomic DNA: J04485.1	CTTGATTCCCAGCGCCTTCCA		

Στατιστική επεξεργασία

Για τον υπολογισμό του λόγου της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου στην κάθε πειραματική ομάδα ως προς την ομάδα του μάρτυρα (R) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$R = E_{\text{target}}^{\Delta C_t \text{ target (MEAN control - MEAN sample)}} / E_{\text{ref}}^{\Delta C_t \text{ ref (MEAN control - MEAN sample)}}$$

Όπου:



E_{target} : η αποδοτικότητα της αντίδρασης για το εξεταζόμενο γονίδιο (*adipoq*, *adipor2*, *fasn* ή *ppar-γ*)

E_{ref} : η αποδοτικότητα της αντίδρασης για το γονίδιο της β-ακτίνης

ΔCt_{target} : Η διαφορά του μέσου κύκλου ουδού (threshold cycle) για το εξεταζόμενο γονίδιο για την ομάδα του μάρτυρα (control) από την πειραματική ομάδα (E1, E2, N1, N2 ή VE)

ΔCt_{ref} : Η διαφορά του μέσου κύκλου ουδού (threshold cycle) για την β-ακτίνη για την ομάδα του μάρτυρα (control) από την πειραματική ομάδα (E1, E2, N1, N2 ή VE)

Η στατιστική επεξεργασία για την σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε με το λογισμικό Relative Expression Software Tool-Multiple Condition Solver (REST-MCS©-version 2) το οποίο χρησιμοποιεί το pair wise fixed reallocation randomisation test© (Pfaffl *et al.* 2002) για τον έλεγχο σημαντικότητας. Ως επίπεδο σημαντικότητας α ορίζεται το 0,05.

Αποτελέσματα

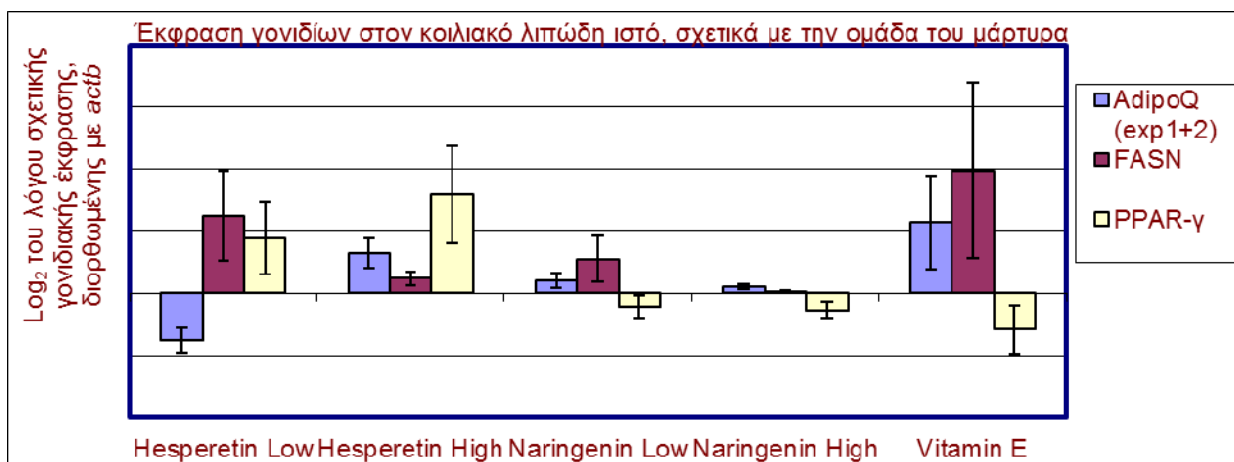
A) 1^η ομάδα αναλύσεων

Στα διαγράμματα 1 και 2 παρουσιάζονται τα επίπεδα σχετικής έκφρασης, ως προς την ομάδα του μάρτυρα, των γονιδίων *adiponectin* (*adipoQ*), *adiponectin receptor 2* (*adipor2*), *fasn* και *ppar-γ* στον λιπώδη ιστό και το ήπαρ αντιστοίχως. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τους λογαρίθμους με βάση το 2 των λόγων της μέσης διορθωμένης έκφρασης κάθε γονιδίου στο λιπώδη ιστό ή στο ήπαρ ορνιθίων από 5 διατροφικές ομάδες ως προς την μέση διορθωμένη έκφραση στην ομάδα του μάρτυρα. Δίδονται και τα στατιστικά σφάλματα. Σε κάθε βιολογικό δείγμα η έκφραση των παραπάνω γονιδίων διορθώθηκε βάσει της αντίστοιχης έκφρασης της β-ακτίνης (*actb*) η οποία που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

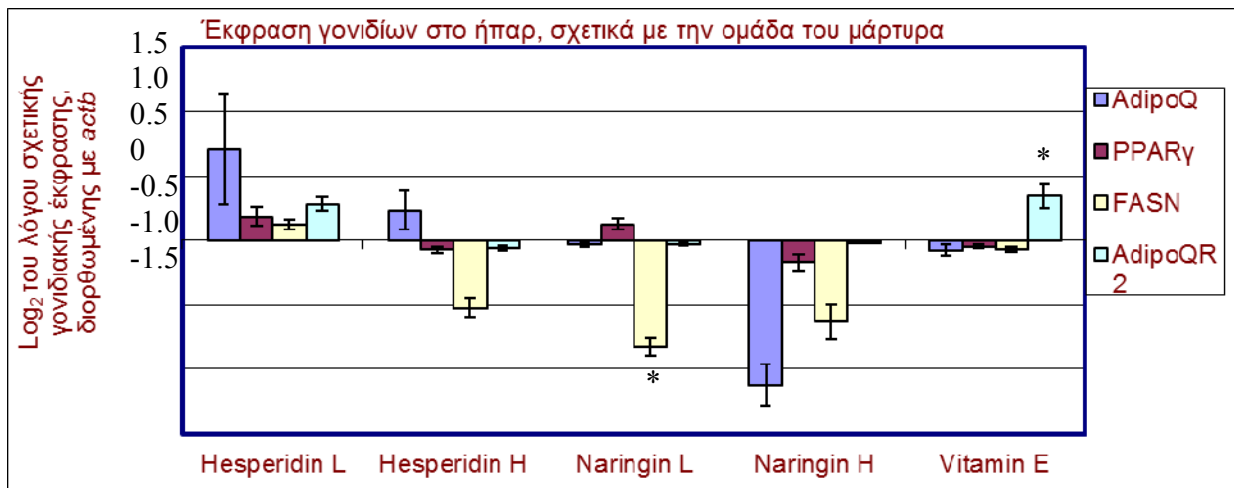


Ο αριθμός των βιολογικών επαναλήψεων ανά πειραματική ομάδα ήταν n=4 εκτός από την ομάδα του μάρτυρα και της βιταμίνης E στον κοιλιακό λιπώδη ιστό όπου n=8. Σε κάθε βιολογικό δείγμα η έκφραση των γονιδίων αναφοράς (*actb*) και ενδιαφέροντος (*adipoq*, *fasn*, *ppar-γ*, *adipor2*) μετρήθηκε εις διπλούν. Μέσοι όροι με αστερίσκο (*) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από την ομάδα του μάρτυρα.

Διάγραμμα 1: Σχετική έκφραση των γονιδίων *adipoq*, *fasn* και *ppar-γ* στις πειραματικές ομάδες ως προς την ομάδα του μάρτυρα στον λιπώδη ιστό.



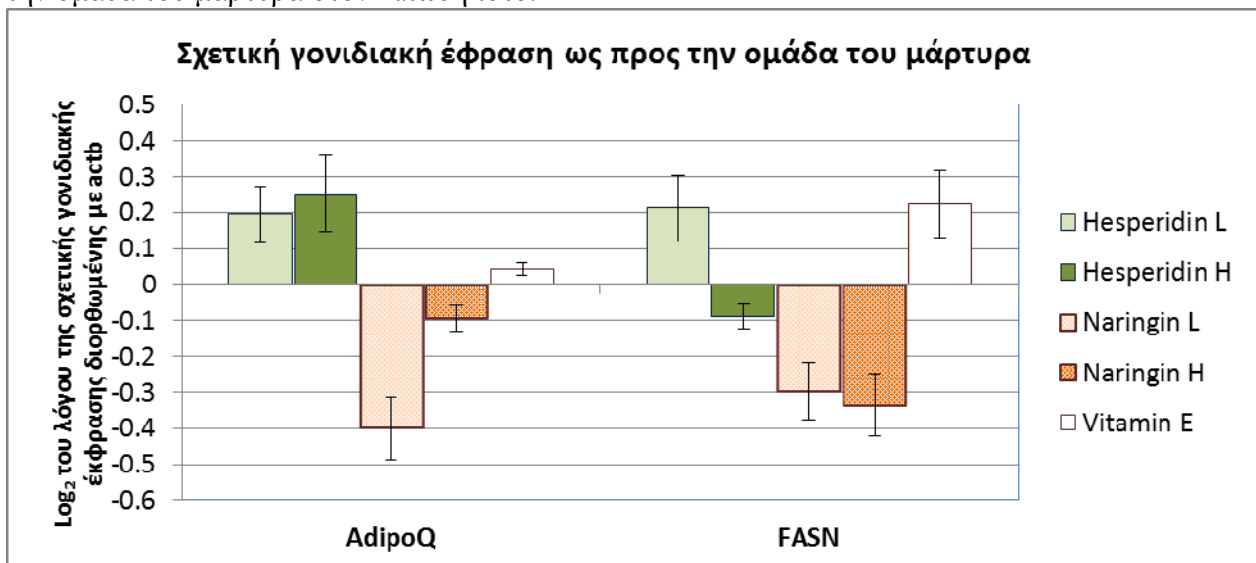
Διάγραμμα 2: Σχετική έκφραση των γονιδίων *adipoq*, *adipor2*, *fasn* και *ppar-γ* στις πειραματικές ομάδες ως προς την ομάδα του μάρτυρα στο ήπαρ.



B) Αποτελέσματα, επαναληπτικές αναλύσεις για *adipoQ* και *fasn* σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων

Έπειτα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στο λιπώδη ιστό και το ήπαρ αποφασίστηκε να επαναληφθεί η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των *adipoQ* και *fasn* σε 6 επιπλέον δείγματα ήπατος ορνιθίων κρεοπαραγωγής από κάθε μια από τις έξι διατροφικές ομάδες. Στο διαγράμμα 3 παρουσιάζονται τα επίπεδα σχετικής έκφρασης, ως προς την ομάδα του μάρτυρα, των γονιδίων *adipoQ* και *fasn* σε δείγματα ήπατος από 10 συνολικά ορνίθια ανά διατροφική ομάδα (M, E1, E2, N1, N2 και VE). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τους λογαρίθμους με βάση το 2 των λόγων της μέσης διορθωμένης έκφρασης κάθε γονιδίου στο λιπώδη ιστό ή στο ήπαρ ορνιθίων από 5 διατροφικές ομάδες ως προς την μέση διορθωμένη έκφραση στην ομάδα του μάρτυρα. Δίδονται και τα στατιστικά σφάλματα. Σε κάθε βιολογικό δείγμα η έκφραση των παραπάνω γονιδίων διορθώθηκε βάσει της αντίστοιχης έκφρασης της β-ακτίνης (*actb*) η οποία που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Διάγραμμα 3: Σχετική έκφραση των γονιδίων *adipoq* και *fasn* στις διατροφικές ομάδες ως προς την ομάδα του μάρτυρα στον λιπώδη ιστό.



Συμπεράσματα

Με βάση τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της πρώτης ομάδας αναλύσεων που παρουσιάζονται εδώ φαίνεται ότι η χορήγηση Ναρινγίνης στα ορνίθια μειώνει την έκφραση του γονιδίου FASN και η χορήγηση βιταμίνης E αυξάνει την έκφραση του AdipoQR2 στο ήπαρ. Επίσης, παρατηρείται μείωση της έκφρασης της αδιπονεκτίνης στο ήπαρ στην ομάδα που έλαβε Ναρινγίνη, χωρίς όμως η μείωση αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική. Με βάση τα παραπάνω μελετήθηκε περαιτέρω η έκφραση των γονιδίων *adipoq* και *fasn* στα υπόλοιπα 6 άτομα όλων των ομάδων. Η διενέργεια περαιτέρω αναλύσεων έδειξε ότι η χορήγηση Εσπεριδίνης ή Ναρινγίνης ή Βιταμίνης E στα ορνίθια κρεοπαραγωγής δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την έκφραση των γονιδίων *adipoq* και *fasn*. Βάσει των παραπάνω και καθώς η χορήγηση Εσπεριδίνης ή Ναρινγίνης σε ορνίθια κρεοπαραγωγής δεν βρέθηκε να επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν, αποφασίστηκε να σχεδιαστεί νέα μεθοδολογία ώστε να μελετηθεί η έκφραση περισσότερων γονιδίων ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες να εντοπιστούν γονίδια των οποίων η έκφραση να τροποποιείται από την δράση των υπό μελέτη φλαβονοειδών. Ο σχεδιασμός του μοριακού αυτού εργαλείου περιγράφεται στη συνέχεια.

Ανάπτυξη νέου μοριακού εργαλείου για την περαιτέρω μελέτη υποψηφίων γονιδίων-στόχων της δράσης των φλαβονοειδών.

Σκοπός του πακέτου εργασίας 7 ήταν η μελέτη της επίδρασης της διαιτητικής χορήγησης Εσπεριδίνης ή Ναρινγίνης στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπών στο ήπαρ, στον λιπώδη ιστό και στον μυϊκό ιστό ορνιθίων και προβάτων. Για τον σκοπό αυτό είχε προ-σχεδιαστεί η μελέτη της έκφρασης τριών υποψηφίων γονιδίων-στόχων της δράσης των προαναφερθέντων φλαβονοειδών, της αδιπονεκτίνης, του PPAR-γ και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FASN).

Έπειτα από την ανάλυση των έως τώρα αποτελεσμάτων από το πακέτο εργασίας 3, και καθώς βρέθηκε ότι η χορήγηση των φλαβονοειδών στα ορνίθια επηρέασε σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορνιθίου κρέατος και το προφίλ των λιπαρών οξέων, σχεδιάστηκε νέα στρατηγική για τον εντοπισμό περισσότερων των παραπάνω τριών υποψηφίων γονιδίων



στόχων των φλαβονοειδών που χορηγήθηκαν στα ορνίθια κρεοπαραγωγής. Για το σκοπό αυτό έγινε μια λεπτομερής βιβλιογραφική έρευνα για τον εντοπισμό γονιδίων ή φυσιολογικών διεργασιών που έχει βρεθεί ότι επηρεάζονται από την χορήγηση Εσπεριδίνης ή Ναρινγίνης *in vitro* ή *in vivo* σε άλλα είδη ζώων ή και σε κυτταροκαλλιέργειες ώστε εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία των PCR μικροσυστοιχειών (PCR assays) η οποία επιτρέπει την σύγκριση επιπέδων έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων μεταξύ διαφορετικών επεμβάσεων.

Από την βιβλιογραφική έρευνα βρέθηκε ότι η χορήγηση Εσπεριδίνης ή/και Ναρινγίνης έχει διαπιστωθεί σε διάφορα ζωικά μοντέλα ή σε κυτταροκαλλιέργειες ότι μπορεί να επηρεάσει βιοδείκτες που σχετίζονται με (i) την παχυσαρκία, την αθηροσκλήρυνση και την διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Assini, et al., 2015; Chtourou, et al., 2015; Hoek-van den Hil, et al., 2015; Iio, et al., 2012; Jeon, et al., 2002; Jeon, et al., 2001; Jing, et al., 2013; Ke, et al., 2015; Lee, et al., 2001; Leray, et al., 2011; Lu and Qian, 2004; Lu, et al., 2013; Mitsuzumi, et al., 2011; Morin, et al., 2008; Nichols, et al., 2011; Ohara, et al., 2015; Pu, et al., 2012; Wang, et al., 2011; Zar Kalai, et al., 2013), (ii) τον διαβήτη τύπου 2 και την διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα (Akiyama, et al., 2009; Jung, et al., 2006; Kannappan, et al., 2010; Kapoor and Kakkar, 2014; Kapoor, et al., 2013), (iii) να προστατεύσει από την ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης (Chen, et al., 2010; Chen, et al., 2013; Elshazly and Mahmoud, 2014; Esmaili and Alilou, 2014; Hu, et al., 2014; Liu, et al., 2006; Pérez-Vargas, et al., 2014) και (iv) να μειώσει την ανάπτυξη κάποιων τύπων καρκινικών κυττάρων (Choi and Kim, 2011; Lee, et al., 2010; Yeh, et al., 2009).

Οι φυσιολογικές διεργασίες στις οποίες φαίνεται ότι επιδρούν η Εσπεριδίνη ή/και η Ναρινγίνη ώστε να εμφανίζουν τις παραπάνω επιδράσεις μπορούν να συνοψιστούν στις εξής:

(i) σύνθεση λιπαρών οξέων, (ii) λιπογένεση, (ii) β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, (iii) μεταβολισμός των λιπών, (iv) ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων και (v) ρύθμιση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Στο μοριακό επίπεδο, η Εσπεριδίνη και η Ναρινγίνη έχει βρεθεί ότι επιδρούν μέσω τις ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τις παραπάνω διεργασίες. Από τα γονίδια



που έχει βρεθεί ότι οι ουσίες αυτές επηρεάζουν σε διάφορα είδη ζώων που έχουν μελετηθεί, και που αναφέρονται παραπάνω, επιλέχθηκαν 36 γονίδια (Πίνακας 1), καθώς εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπών και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού και επομένως θεωρήθηκαν οι πιο πιθανοί μοριακοί μεσολαβητές των επιδράσεων της Εσπεριδίνης και της Ναρινγίνης που παρατηρήθηκαν στα ορνίθια.

Πίνακας 1: Γονίδια που περιελήφθησαν στην μικροσυστοιχία PCR με την οποία θα συγκριθεί οι έκφραση των 36 γονιδίων υποψηφίων στόχων της δράσης της Εσπεριδίνης και της Ναρινγίνης μεταξύ ηπατικών δειγμάτων από ορνίθια της ομάδας του Μάρτυρα και των ομάδων που έλαβαν Εσπεριδίνη ή Ναρινγίνη ή Βιταμίνη Ε.

Σύμβολο	Ονομασία Γονιδίου	Λειτουργία
CAT	Catalase	Αντιοξειδωτική δράση
DIO1	Deiodinase, Iodothyronine deiodinase Type I	Μετατροπή της T4 σε T3
DIO2	Deiodinase, Iodothyronine deiodinase Type II	Μετατροπή της T4 σε T3
GPX1	Glutathione peroxidase 1	Αντιοξειδωτική δράση
GPX4	Glutathione peroxidase 4	Αντιοξειδωτική δράση
GSR	Glutathione Reductase	Αντιοξειδωτική δράση
SOD1	CuZn Superoxide Dismutase	Αντιοξειδωτική δράση
SOD2	Mn Superoxide Dismutase	Αντιοξειδωτική δράση
SOD3	extracellular Cu-Zn-Superoxide Dismutase	Αντιοξειδωτική δράση
TXNRD1	Thioredoxin reductase Type I	Αντιοξειδωτική δράση
TXNRD2	Thioredoxin reductase Type II	Αντιοξειδωτική δράση
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Κυτταρική Απόπτωση
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Κυτταρική Απόπτωση
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	Κυτταρική Απόπτωση
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Κυτταρική Απόπτωση
TMBIM1	Transmembrane BAX inhibitor motif containing 1	Κυτταρική Απόπτωση
ACOX1	Acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
FASN	Fatty acid synthase	De novo σύνθεση λιπαρών οξέων
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
PPARGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων



SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
LDLR	Low density lipoprotein receptor	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
LPL	Lipoprotein lipase	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
ACACA	acetyl-CoA carboxylase alpha	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
GCK	Similar to glucokinase	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων
IL10	Interleukin 10	Προφλεγμονώδης κυτταροκίνη
IL1B	Interleukin 1, beta	Προφλεγμονώδης κυτταροκίνη
IL2	Interleukin 2	Προφλεγμονώδης κυτταροκίνη
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	Προφλεγμονώδης κυτταροκίνη
LITAF	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	Προφλεγμονώδης δράση
NOS2	Inducible Nitric Oxide synthase	Προφλεγμονώδης δράση
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Προφλεγμονώδης δράση
SMAD3	SMAD family member 3	Προφλεγμονώδης δράση

Η παραπάνω μικροσυστοιχία PCR αποτελεί μια νέα μοριακή μεθοδολογία που θα χρησιμοποιηθεί ώστε να εντοπιστούν ανάμεσα στα 36 υποψήφια γονίδια-στόχους της δράσης της Εσπεριδίνης και της Ναρινγίνης αυτά τα οποία εμπλέκονται στις παρατηρούμενες δράσεις των ουσιών αυτών στα ορνίθια κρεοπαραγωγής.

Βιβλιογραφία

- Akiyama, S., S. I. Katsumata, K. Suzuki, Y. Nakaya, Y. Ishimi, and M. Uehara. 2009. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73:2779-2782. doi 10.1271/bbb.90576
- Assini, J. M., E. E. Mulvihill, A. C. Burke, B. G. Sutherland, D. E. Telford, S. S. Chhoker, C. G. Sawyez, M. Drangova, A. C. Adams, A. Kharitononkov, C. L. Pin, and M. W. Huff. 2015. Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. *Endocrinology* 156:2087-2102. doi 10.1210/en.2014-2003
- Chen, M. C., Y. I. Y. I. Ye, J. I. Guang, and L. I. U. Jian-Wen. 2010. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3330-3335. doi 10.1021/jf904549s



- Chen, X. J., C. Wang, K. G. Shu, J. Lei, H. Nie, Y. X. Zhang, and Q. Gong. 2013. Effect of hesperidin pretreatment on the expression of apoptosis-related genes in the liver of mice with acetaminophen-induced acute liver injury. *World Chinese Journal of Digestology* 21:1278-1285. doi 10.11569/wcjd.v21.i14.1278
- Choi, E. J., and G. H. Kim. 2011. Anti-/pro-apoptotic effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced alteration in animals. *Oncology Reports* 25:545-550. doi 10.3892/or.2010.1105
- Chtourou, Y., H. Fetoui, R. Jemai, A. Ben Slima, M. Makni, and R. Gdoura. 2015. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ b pathway. *European Journal of Pharmacology* 746:96-105. doi 10.1016/j.ejphar.2014.10.027
- Elshazly, S. M., and A. A. A. Mahmoud. 2014. Antifibrotic activity of hesperidin against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387:559-567. doi 10.1007/s00210-014-0968-2
- Esmaceli, M. A., and M. Alilou. 2014. Naringenin attenuates CCl4-induced hepatic inflammation by the activation of an Nrf2-mediated pathway in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 41:416-422. doi 10.1111/1440-1681.12230
- Hoek-van den Hil, E. F., E. M. van Schothorst, I. van der Stelt, H. J. M. Swarts, M. van Vliet, T. Amolo, J. J. M. Vervoort, D. Venema, P. C. H. Hollman, I. M. C. M. Rietjens, and J. Keijer. 2015. Direct comparison of metabolic health effects of the flavonoids quercetin, hesperetin, epicatechin, apigenin and anthocyanins in high-fat-diet-fed mice. *Genes and Nutrition* 10. doi 10.1007/s12263-015-0469-z
- Hu, L., L. Li, D. Xu, X. Xia, R. Pi, W. Wang, H. Du, E. Song, and Y. Song. 2014. Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in vivo and in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 213:51-59. doi 10.1016/j.cbi.2014.02.003
- Iio, A., K. Ohguchi, M. Iinuma, Y. Nozawa, and M. Ito. 2012. Hesperetin upregulates ABCA1 expression and promotes cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *Journal of Natural Products* 75:563-566. doi 10.1021/np200696r
- Jeon, S. M., S. H. Bok, M. K. Jang, Y. H. Kim, K. T. Nam, T. S. Jeong, Y. B. Park, and M. S. Choi. 2002. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta* 317:181-190. doi 10.1016/S0009-8981(01)00778-1
- Jeon, S. M., S. H. Bok, M. K. Jang, M. K. Lee, K. T. Nam, Y. B. Park, S. J. Rhee, and M. S. Choi. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sciences* 69:2855-2866. doi 10.1016/S0024-3205(01)01363-7
- Jing, L., Y. Zhang, S. Fan, M. Gu, Y. Guan, X. Lu, C. Huang, and Z. Zhou. 2013. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. *European Journal of Pharmacology* 715:46-55. doi 10.1016/j.ejphar.2013.06.022
- Jung, U. J., M. K. Lee, Y. B. Park, M. A. Kang, and M. S. Choi. 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38:1134-1145. doi 10.1016/j.biocel.2005.12.002
- Kannappan, S., N. Palanisamy, and C. V. Anuradha. 2010. Suppression of hepatic oxidative events and regulation of eNOS expression in the liver by naringenin in fructose-administered rats. *European Journal of Pharmacology* 645:177-184. doi 10.1016/j.ejphar.2010.07.015
- Kapoor, R., and P. Kakkar. 2014. Naringenin accords hepatoprotection from streptozotocin induced diabetes in vivo by modulating mitochondrial dysfunction and apoptotic signaling cascade. *Toxicology Reports* 1:569-581. doi 10.1016/j.toxrep.2014.08.002



- Kapoor, R., F. Rizvi, and P. Kakkar. 2013. Naringenin prevents high glucose-induced mitochondria-mediated apoptosis involving AIF, Endo-G and caspases. *Apoptosis* 18:9-27. doi 10.1007/s10495-012-0781-7
- Ke, J. Y., K. L. Kliever, E. M. Hamad, R. M. Cole, K. A. Powell, R. R. Andridge, S. R. Straka, L. D. Yee, and M. A. Belury. 2015. The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutrition and Metabolism* 12. doi 10.1186/1743-7075-12-1
- Lee, C. H., T. S. Jeong, Y. K. Choi, B. H. Hyun, G. T. Oh, E. H. Kim, J. R. Kim, J. I. Han, and S. H. Bok. 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284:681-688. doi 10.1006/bbrc.2001.5001
- Lee, K. H., M. H. Yeh, S. T. Kao, C. M. Hung, C. J. Liu, Y. Y. Huang, and C. C. Yeh. 2010. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters* 194:42-49. doi 10.1016/j.toxlet.2010.01.021
- Leray, V., B. Freuchet, J. Le Bloc'h, I. Jeusette, C. Torre, and P. Nguyen. 2011. Effect of citrus polyphenol- and curcumin-supplemented diet on inflammatory state in obese cats. *The British journal of nutrition* 106 Suppl 1:S198-201.
- Liu, X., W. Wang, H. Hu, N. Tang, C. Zhang, W. Liang, and M. Wang. 2006. Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF- β 1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical Research* 23:82-89. doi 10.1007/s11095-005-9043-5
- Lu, H. L., and M. Z. Qian. 2004. Influences of hesperidin on the regulation of serum lipids levels by simvastatin and CYP4503A mRNA expression. *Chinese Pharmacological Bulletin* 20:330-334.
- Lu, Y., W. Xi, X. Ding, S. Fan, Y. Zhang, D. Jiang, Y. Li, C. Huang, and Z. Zhou. 2013. Citrange fruit extracts alleviate obesity-associated metabolic disorder in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mouse. *International Journal of Molecular Sciences* 14:23736-23750. doi 10.3390/ijms141223736
- Mitsuzumi, H., A. Yasuda, N. Arai, T. Sadakiyo, and M. Kubota. 2011. Glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in the rats fed a high-fat diet through the reduction of hepatic triglyceride and cholesteryl ester. *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 39:727-740.
- Morin, B., L. A. Nichols, K. M. Zalasky, J. W. Davis, J. A. Manthey, and L. J. Holland. 2008. The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells. *Journal of Nutrition* 138:1274-1281.
- Nichols, L. A., D. E. Jackson, J. A. Manthey, S. D. Shukla, and L. J. Holland. 2011. Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids in Health and Disease* 10. doi 10.1186/1476-511X-10-36
- Ohara, T., K. Muroyama, Y. Yamamoto, and S. Murosaki. 2015. A combination of glucosyl hesperidin and caffeine exhibits an anti-obesity effect by inhibition of hepatic lipogenesis in mice. *Phytotherapy Research* 29:310-316. doi 10.1002/ptr.5258
- Pfaffl M.W., G.W. Horgan & L. Dempfle. 2002. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30(9): E36
- Pu, P., D. M. Gao, S. Mohamed, J. Chen, J. Zhang, X. Y. Zhou, N. J. Zhou, J. Xie, and H. Jiang. 2012. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 518:61-70. doi 10.1016/j.abb.2011.11.026



- Pérez-Vargas, J. E., N. Zarco, M. Shibayama, J. Segovia, V. Tsutsumi, and P. Muriel. 2014. Hesperidin prevents liver fibrosis in rats by decreasing the expression of nuclear factor- κ B, transforming growth factor- β and connective tissue growth factor. *Pharmacology* 94:80-89. doi 10.1159/000366206
- Wang, X., J. Hasegawa, Y. Kitamura, Z. Wang, A. Matsuda, W. Shinoda, N. Miura, and K. Kimura. 2011. Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 117:129-138. doi 10.1254/jphs.11097FP
- Yeh, M. H., S. T. Kao, C. M. Hung, C. J. Liu, K. H. Lee, and C. C. Yeh. 2009. Hesperidin inhibited acetaldehyde-induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters* 184:204-210. doi 10.1016/j.toxlet.2008.11.018
- Zar Kalai, F., J. Han, R. Ksouri, A. El Omri, C. Abdelly, and H. Isoda. 2013. Antiobesity effects of an edible halophyte *Nitraria retusa* Forssk in 3T3-L1 preadipocyte differentiation and in C57B6J/L mice fed a high fat diet-induced obesity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013. doi 10.1155/2013/368658

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής
Λέκτορας

Μ. Χαρισμάδου
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής

