



**ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU”**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

cu titlul

**„Studiul mecanismelor moleculare implicate în
modularea potențialului anti-aterogen al HDL;
abordări *in vivo* și *in vitro*”**

Susținută în data de 28.06.2018,

Aula George Emil Palade, Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”

Conducător științific

Acad. Anca Volumnia Sima

Doctorand

Cărnuță Georgiana-Mihaela

Teza de doctorat poate fi consultată la

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Motto

*„Fă primul pas cu încredere. Nu trebuie să vezi întreaga scară. Pur și simplu
pășește.”*

Martin Luther

CUPRINS

Cuvânt înainte	1
Listă abrevieri	3
Introducere și obiectivele generale ale tezei	6

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

I.1 Caracteristici structurale și metabolice ale lipoproteinelor de densitate înaltă (HDL)

Clase de lipoproteine serice	9
Compoziția și structura HDL; subpopulațiile HDL ₂ și HDL ₃	13
Biogeneza și metabolismul HDL	19

I.2 Evoluția procesului aterosclerotic - rolul lipoproteinelor și al inflamației

Morfologia peretelui arterial normal	25
Celula endotelială	26
Celula musculară netedă	30
Macrofagele - apariția și dezvoltarea leziunilor aterosclerotice	31

I.3 Stresul reticulului endoplasmic

Sinteza proteică și răspunsul la împachetarea incorectă a proteinelor	36
Căi de semnalizare implicate în răspunsul la stresul reticulului endoplasmic	38
Stresul reticulului endoplasmic în ateroscleroză	40

I.4 Rolul anti-aterogen al HDL

Funcțiile pleiotrope ale HDL	44
HDL și transportul invers de colesterol	45
Potențialul anti-oxidant al HDL	47
Potențialul anti-inflamator al HDL	49
Potențialul anti-apoptotic al HDL	51
Aspecte ale disfuncționalității HDL	52

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

STUDIUL BIOMARKERILOR PREDICTIVI AI EVOLUȚIEI BOLII LA PACIENȚI CU AFECȚIUNI CORONARIENE

II.1 Evaluarea markerilor de stres oxidativ și inflamator în sângele pacienților cu sindrom coronarian acut comparativ cu cei cu angină stabilă

Introducere și obiectivele studiului	57
Protocoale experimentale și metode de analiză	58
Rezultate	
Parametrii biochimici în sângele pacienților cu boli coronariene	65
Markeri de stres oxidativ în sângele pacienților cu boli coronariene	66
Corelarea markerilor de stres oxidativ cu parametrii asociați HDL	68
Markeri de stres inflamator în sângele pacienților cu boli coronariene	70
Discuții	71
Concluzii	73

II.2 Identificarea HDL disfuncțional la pacienții cu boală coronariană; evaluarea potențialului anti-inflamator al subfracțiilor de HDL exercitat asupra celulelor endoteliale umane

Introducere și obiectivele studiului	74
Protocoale experimentale și metode de analiză	75
Rezultate	
Compoziția biochimică a HDL izolate din plasma pacienților cu boli coronariene	83
Caracterizarea subfracțiilor de HDL ₂	84
Caracterizarea subfracțiilor de HDL ₃	86
Efectul anti-inflamator al HDL ₂ /HDL ₃ asupra celulelor endoteliale activate de TNF α	89
Discuții	93
Concluzii	96

STUDIUL MECANISMELOR MOLECULARE DE REVERSIE A STEATOZEI HEPATICE ȘI ATEROSCLEROZEI ÎN HAMSTERUL HIPERLIPIDEMIC

A. MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN MODULAREA POTENȚIALULUI ANTI-ATEROGEN AL HDL

II.3 Evidențierea mecanismelor moleculare de acțiune a dietei grase în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor hiperlipidemici

Introducere și obiectivele studiului	99
Protocoale experimentale și metode de analiză	100
Rezultate	
Efectul dietei grase asupra parametrilor biochimici serici	108
Determinarea nivelurilor de lipide în ficatul hamsterilor	112
Expresia genică și proteică a PON1 și apoAI în ficat și intestinul subțire	113
Expresia factorilor de transcriere LXR α/β și PPAR γ în ficat și intestinul subțire	115
Markeri de stres ai reticulului endoplasmic în ficat și intestinul subțire	118
Estimarea extinderii ariilor depozitelor de lipide din valvele aortice	119
Discuții	121
Concluzii	124

B. EFECTUL TERAPEUTIC AL EXTRACTULUI DE GHIMBIR ȘI AL REVERSIEI DIETEI HIPERLIPIDEMICE ASUPRA STEATOZEI HEPATICE

II.4 Evaluarea mecanismelor moleculare de acțiune a extractului de ghimbir asupra ficatului steatotic al hamsterilor hiperlipidemici

Introducere și obiectivele studiului	125
Protocoale experimentale și metode de analiză	126
Rezultate	
Determinarea efectului extractului de ghimbir asupra parametrilor plasmatici	131
Determinarea markerilor stresului oxidativ și nivelurilor de lipide în ficat	133
Expresia genică și proteică a transportorilor de colesterol în ficat	136
Expresia factorilor de transcriere LXR α/β și PPAR γ în ficat	137

Expresia proteică a markerilor de stres ai reticulului endoplasmic în ficat	138
Discuții	139
Concluzii	141
II.5 Evidențierea efectului benefic al reversiei dietei hiperlipidemice asupra steatozei hepatice și excreției de colesterol din intestinul subțire; identificarea mecanismelor moleculare implicate	
Introducere și obiectivele studiului	142
Protocoale experimentale și metode de analiză	143
Rezultate	
Efectul reversiei dietei hiperlipidemice asupra parametrilor plasmatici	147
Determinarea apolipoproteinelor, markerilor stresului oxidativ și nivelurilor de lipide în ficat și intestinul subțire	149
Expresia genică și proteică a transportorilor de colesterol în ficat și intestinul subțire	155
Expresia factorilor de transcriere și modulatorilor proteici în ficat și intestinul subțire	157
Expresia proteică a markerilor de stres ai reticulului endoplasmic în ficat și intestinul subțire	161
Discuții	163
Concluzii	168
III. CONCLUZII GENERALE	170
IV. BIBLIOGRAFIE	173
Lucrări publicate pe durata programului doctoral	198
Rezumate publicate în reviste indexate ISI	199
Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – autor principal	199
Postere prezentate la manifestări științifice internaționale- autor principal	200
Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – co-autor	201
Postere prezentate la manifestări științifice internaționale- co-autor	201
Comunicări orale și postere susținute la manifestări științifice naționale – autor principal și co-autor	203
Specializări și cursuri efectuate	203
Premii naționale obținute	204
Burse obținute pe durata programului doctoral și finanțarea cercetărilor	205

REZUMAT

Cuvinte cheie: Angină stabilă, ateroscleroză, boală coronariană, celule endoteliale, extract de ghimbir, hiperlipidemie, hiperlipidemie-hiperglicemie, lipoproteine de densitate înaltă (HDL), macrofage, tratament anti-aterogen, reversia dietei hiperlipidemice, sindrom coronarian acut, steatoză hepatică.

Număr total de pagini – 205

Număr de figuri în capitolul I - 16

Număr de tabele în capitolul I - 2

Număr de figuri în capitolul II - 57

Număr de tabele în capitolul II - 8

Indicații bibliografice – 406

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 6 (2 autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 5 (1 autor principal)

Lucrări în pregătire – 1

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 7 (4 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 13 (3 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 1 (co-autor)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice naționale – 1 (co-autor)

Cursuri și specializări - 6

Premii naționale – 5

Burse obținute pe durata programului doctoral – 2 (bursă doctorală de la Academia Română și bursă de tip fellowship- EAS)

Participarea la proiecte de cercetare naționale – 3

Ateroscleroza este o afecțiune cauzată de o serie de factori extrinseci, care se manifestă prin dezvoltarea localizată a leziunilor aterosclerotice în subendoteliul arterial [1, 2]. Numărul mare al factorilor de risc implicați în apariția aterosclerozei imprimă acestei afecțiuni complexitate și imposibilitate de regresie încă din stadiile timpurii ale bolii. Dislipidemia, ca important factor de risc, este asociată cu o serie de inițiatori cheie ai aterosclerozei precum: inflamația, hiperglicemia și hipertensiunea [3, 4]. Persistența acestor factori în zonele arteriale pro-aterogene determină apariția și progresia unei cascade de evenimente ce afectează inițial celulele prezente la acest nivel. Această etapă este urmată de infiltrarea accentuată a celulelor imune, migrarea și proliferarea celulelor musculare netede, cu expansiunea ateromului și în final ruperea plăcii aterosclerotice, cauza principală a mortalității asociate bolilor cardiovasculare (CVD) [5, 6].

Valorile scăzute ale concentrației de colesterol din lipoproteinele de densitate înaltă (HDL-C) în plasma umană oferă la ora actuală informații predictive despre instalarea CVD [7-9]. Foarte mult timp s-a crezut că, o creștere a nivelurilor de HDL-C ar putea proteja împotriva dezvoltării aterosclerozei datorită abilității acestor lipoproteine de a media transportul invers de colesterol (reverse cholesterol transport, RCT) de la țesuturile periferice către ficat [10]. Această idee a fost infirmată de-a lungul timpului de studii realizate pe pacienți cu CVD, cărora li s-au administrat medicamente dezvoltate să crească nivelurile de HDL-C în circulație, dintre acestea putând fi amintite niacina și inhibitorii proteinei de transfer a esterilor de colesterol (cholesteryl ester transfer protein, CETP). Aceste intervenții terapeutice s-au dovedit a fi eficiente în creșterea concentrațiilor de HDL-C, însă nu și în reducerea incidenței evenimentelor CVD [11-13]. Acest neajuns a condus la studiul funcționalității particulelor de HDL în vederea elucidării proprietăților lor de a proteja împotriva dezvoltării aterosclerozei [14, 15]. Dintre aceste proprietăți mai importante sunt: capacitatea de a asigura îndepărtarea exceselor de colesterol prin RCT [14], abilitatea de a împiedica oxidarea lipoproteinelor de densitate joasă (low density lipoproteins, LDL) [16] și capabilitatea de a oferi protecție anti-inflamatoare [17]. S-a observat că exercitarea acestor funcții este asigurată de prezența la suprafața particulelor de HDL a unor proteine cu rol anti-oxidant, paraoxonaza 1 (PON1) [16], anti-inflamator, apolipoproteinaAI (apoAI) [18], anti-apoptotic, sfingozin-1 fosfatul [19], etc.

Conceptul de HDL disfuncțional a fost introdus, pentru prima dată, în urmă cu aproximativ 20 de ani, când un grup de cercetători a raportat identificarea particulelor de HDL pro-inflamatorii rezultate ca răspuns la procesele de fază acută [20]. Studii de proteomică, realizate relativ recent, au evidențiat existența a peste 80 de proteine în structura HDL sau asociate cu aceste particule lipoproteice [21-23].

Am amintit anterior că HDL îndeplinesc o serie de funcții anti-aterogene ca rezultat al conținutului lor în proteine, precum: PON1, apoAI și sfingozin-1 fosfat; însă o creștere a proteinelor pro-oxidante și pro-inflamatorii asociate, precum: mieloperoxidaza (MPO), fosfolipaza A2 și amiloidul seric A1, conduce la scăderea funcționalității acestor particule [24].

Prin urmare, îmbunătățirea cantității și calității acestor molecule asociate HDL ar putea reprezenta o nouă abordare terapeutică, în scopul de a dezvolta noi modalități prin care să se reducă incidența deceselor cauzate de CVD și de ce nu, îmbunătățirea calității vieții acestor pacienți. Heterogenitatea compozițională și structurală a particulelor de HDL reprezintă un impediment în avansarea studiilor cu privire la proprietățile anti-aterosclerotice manifestate de aceste lipoproteine. Caracterizarea particulelor de HDL este o etapă decisivă și de viitor pentru elucidarea mecanismelor implicate în îmbunătățirea funcționalității acestor structuri moleculare complexe.

Hiperlipidemia reprezintă principalul factor de risc în inițierea și progresia aterosclerozei [4]. În condiții fiziologice, ficatul, ca principalul organ de sinteză a lipoproteinelor de densitate foarte joasă (very low density lipoproteins, VLDL) și HDL, este implicat în reglarea la nivel genic și proteic a tuturor moleculelor ce participă la metabolismul lipoproteinelor. Astfel, în condiții de hiperlipidemie, ficatul este direct răspunzător de tulburările metabolismului lipidic asociate cu procesele aterosclerotice [25]. Un alt organ implicat în reglarea metabolismului lipidic este intestinul, despre care se știe că participă atât la sinteza chilomicronilor [26] și HDL [27], precum și la efluxul trans-intestinal al colesterolului (trans-intestinal cholesterol efflux, TICE), prin intermediul căruia se asigură eliminarea acestui sterol din organism, astfel scăzând incidența bolilor CVD [28].

În consecință, preocupările noastre actuale sunt îndreptate către descifrarea mecanismelor moleculare responsabile de scăderea potențialului anti-aterogen al HDL și dezvoltarea unor noi abordări terapeutice, care să țintească organele (ficat, intestin) implicate în sinteza proteinelor componente ale HDL, apoAI și PON1, a proteinelor funcționale în metabolismul și transportul colesterolului (transportorii ABC) și a factorilor de transcriere, care modulează sinteza acestor molecule.

Dat fiind impactul aterosclerozei asupra calității și duratei de viață pe întreg globul, lucrarea de față se axează pe identificarea de noi biomarkeri asociați HDL implicați în progresia și evoluția bolilor cardiovasculare, precum și pe identificarea de noi căi metabolice implicate în modularea potențialului anti-aterogen al HDL, prin care se poate încetini și, de ce nu, reduce formarea și progresia plăcii aterosclerotice.

În prima parte a lucrării de doctorat sunt descrise succint aspectele teoretice legate de metabolismul HDL, evoluția procesului aterosclerotic, stresul reticulului endoplasmic și rolul anti-aterogen al HDL. Ce-a de-a doua parte a lucrării, care include contribuțiile originale ale prezentei teze de doctorat, este împărțită în două studii majore.

Primul studiu este intitulat “**Identificarea de noi biomarkeri predictivi ai evoluției bolii la pacienții cu afecțiuni coronariene**” și urmărește două obiective generale:

(i) *Evaluarea markerilor de stres oxidativ și inflamator din sângele pacienților cu sindrom coronarian acut comparativ cu cei cu angină stabilă;*

(ii) *Identificarea HDL disfuncțional la pacienții cu boală coronariană; evaluarea potențialului anti-inflamator al subfracțiilor de HDL exercitat asupra celulelor endoteliale umane.*

Cel de-al doilea studiu se referă la “**Elucidarea mecanismelor moleculare de reversie a steatozei hepatice și aterosclerozei în hamsterul hiperlipidemic**” și este structurat în două părți:

(A) Evidențierea mecanismelor moleculare implicate în modularea potențialului anti-aterogen al HDL, care are ca obiectiv general: *Evidențierea mecanismelor moleculare de acțiune a dietei grase în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor hiperlipidemici.*

(B) Evaluarea efectului terapeutic al extractului de ghimbir și al reversiei dietei hiperlipidemice asupra steatozei hepatice, care urmărește două obiective generale:

(i) *Evaluarea mecanismelor moleculare de acțiune a extractului de ghimbir asupra ficatului steatotic al hamsterilor hiperlipidemici;*

(ii) *Evidențierea efectului benefic al reversiei dietei hiperlipidemice asupra steatozei hepatice și excreției de colesterol prin intestinul subțire; identificarea mecanismelor moleculare implicate.*

Pentru a îndeplini obiectivele propuse în prezenta lucrare am folosit o serie de tehnici de biochimie, biologie moleculară și culturi de celule, care au fost descrise amănunțit în secțiunea „Protocoale experimentale și metode de analiză” caracteristică fiecărui capitol. Pentru o mai bună reproductibilitate a rezultatelor obținute, am optimizat protocolul de dozare a activității enzimatică a PON1 în ser prin modificarea tamponului de lucru, a concentrațiilor componentelor, precum și a pH-ului acestuia. Am pus la punct metoda cea mai eficientă de determinare a activității enzimatică a PON1 și MPO pentru probe de țesut prin omogenizarea acestora în tampon RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) și am realizat teste de stabilitate a enzimei PON1 atât în ser, precum și în subfracțiile de HDL, la 4 °C, minus 80 °C și la trei cicluri de congelare-decongelare.

De asemenea, am optimizat metoda de cuantificare a proteinelor PON1 și MPO în plasmă și omogenate de țesut prin tehnica ELISA, în ceea ce privește diluțiile probelor și procesarea pieselor de țesut.

Primul studiu al capitolului de **contribuții originale** tratează aspecte legate de identificarea unor noi biomarkeri predictivi ai evoluției bolii la pacienții cu afecțiuni coronariene (coronary artery disease, CAD). În cadrul acestui studiu ne-am propus, pe de o parte, evaluarea unor markeri de stres oxidativ și inflamator din sângele pacienților CAD, care ar putea discrimina între pacienții cu sindrom coronarian acut comparativ cu cei cu angină stabilă și pe de altă parte, identificarea HDL disfuncțional la acești pacienți și evaluarea potențialului anti-inflamator al subfracțiilor de HDL exercitat asupra celulelor endoteliale umane în cultură (linia EAhy926) activate de TNF α .

În studiu au fost înrolați 93 de pacienți CAD (36 de femei și 57 de bărbați) împărțiți în două grupuri: (i) grupul de pacienți cu angină stabilă (**AS**, n = 40) și (ii) grupul de pacienți cu sindrom coronarian acut (**SCA**, n = 53). În studiu au fost incluși și 28 de subiecți clinic sănătoși, care au format grupul control (**N**) (16 femei și 12 bărbați). Toți pacienții CAD au fost înrolați, după înregistrarea consimțământului informat, de către Departamentul de Cardiologie al Spitalului Universitar de Urgență Elias, București. Probele de sânge provenite de la subiecții N au fost furnizate de către Centrul de Transfuzie a Sângelui din București.

Rezultatele raportate în literatură au evidențiat identificarea unui număr mare de markeri moleculari plasmatici de stres oxidativ și inflamator pentru predicția evenimentelor cardiovasculare. Dintre aceste molecule se pot aminti PON1 [8, 29], MPO, LDL oxidat (LDLox), proteina C reactivă (CRP), proteina chemottractantă monocitară 1 (MCP-1), etc [30]. În ciuda dezvoltării unui număr mare de medicamente destinate tratamentului CAD, un procent mare al pacienților care suferă de această boală decedează, astfel fiind necesară găsirea de noi biomarkeri predictivi pentru vulnerabilitatea CAD.

Pentru a îndeplini scopul primului obiectiv al acestui studiu, ne-am propus analiza moleculelor implicate în promovarea stresului oxidativ și inflamator precum enzimele PON1, MPO și proteinele MCP-1, VCAM-1 și CRP în plasma pacienților SCA comparativ cu AS, în vederea identificării de noi biomarkeri predictivi care să discrimineze între pacienții CAD vulnerabili și cei cu AS și de a dezvolta noi ținte moleculare în vederea terapiei îndreptate către încetinirea sau chiar regresia plăcii aterosclerotice.

Rezultatele obținute au evidențiat că pacienții cu SCA prezintă cele mai mici valori serice ale concentrației și activității enzimatice a PON1, însă cele mai ridicate valori ale

nivelurilor de MPO, TBARS, 4-HNE și LDLox comparativ cu grupul AS. De asemenea, am arătat că valorile cele mai ridicate ale sVCAM-1, MCP-1 și CRP au fost înregistrate în plasma pacienților SCA comparativ cu AS. Prin urmare, am observat că nivelurile crescute de MPO, LDLox, TBARS, 4-HNE și nivelurile scăzute ale concentrației și activității enzimatice a PON1 se corelează cu stresul inflamator crescut în plasma pacienților SCA față de AS și pot discrimina între aceste grupuri de pacienți CAD.

Mai departe, ne-am propus identificarea unor modificări care apar în compoziția subfracțiilor de HDL (proteine, activități ale unor enzime și statusul oxidativ) și estimarea gradului în care aceste modificări pot discrimina între pacienții SCA și AS. Pentru a valida datele cu privire la alterarea compoziției HDL, am evaluat potențialul anti-inflamator al subfracțiilor de HDL asupra celulelor endoteliale umane din linia EAhy926 activate cu TNF α .

Este cunoscut faptul că particulele de HDL sunt complexe macromoleculare alcătuite din lipide și proteine, sunt sintetizate de către ficat și intestinul subțire, fiind implicate în transportul lipidelor (colesterol liber și esterificat, fosfolipide și trigliceride) și apolipoproteinelor (apoAI, apoAII, apoCIII, apoE) în circulația sistemică [31-33]. În plasma umană, particulele de HDL sunt reprezentate de două subfracții majore: HDL₂ și HDL₃, care prezintă dimensiuni, densități și compoziții diferite [33]. Particulele de HDL posedă proprietăți ateroprotective datorită capacității lor de a îndepărta colesterolul aflat în exces în țesuturile periferice, precum țesutul adipos, țesutul muscular și în condiții patologice subendoteliul arterial. Colesterolul este transportat de HDL la ficat prin așa numita cale de transport invers de colesterol (RCT) [34]. Recent a fost propusă o nouă ipoteză, cu privire la beneficiile HDL, bazată pe funcționalitatea acestor particule, despre care se crede că este mult mai relevantă pentru a descrie statusul pacienților CAD comparativ cu nivelurile de HDL-C [35, 36]. Funcționalitatea HDL a fost pusă în evidență în urma realizării unor teste prin care s-a urmărit potențialul acestor particule de a proteja LDL împotriva oxidării sau de a îndepărta colesterolul în exces din macrofagele încărcate cu lipide [37]. Prin urmare, este acceptat faptul că funcționalitatea HDL este strâns asociată compoziției și calității moleculelor din alcătuirea acestor lipoproteine.

Rezultatele originale ale acestui obiectiv au evidențiat că subfracțiile de HDL₂ și HDL₃ izolate de la pacienții SCA sunt mai puțin funcționale decât cele provenite de la pacienții AS, iar această diferență poate fi explicată prin apariția nivelurilor crescute ale proteinelor apoCIII, MPO, ceruloplasmină (CP) și apoAI modificată oxidativ și diminuarea concentrației proteice și activității enzimatice a PON1 la nivelul acestor particule.

Mai mult, disfuncționalitatea particulelor de HDL provenite de la pacienții SCA comparativ cu AS poate fi datorată scăderii potențialului anti-inflamator al acestor lipoproteine, explicată prin creșterea expresiei proteice a VCAM-1, sVCAM-1 mediată de ADAM17, MCP-1 și CRP în celulele endoteliale activate cu TNF α , respectiv în mediul lor de cultură.

Prin urmare, am observat că panelul de markeri evaluați (nivelurile crescute de apoCIII, MPO, apoAI oxidată, CP, și nivelurile scăzute ale proteinei PON1) se corelează cu potențialul anti-inflamator redus al subfracțiilor de HDL izolate de la pacienții SCA și AS și poate discrimina între aceste grupuri de pacienți CAD.

Aceste date originale cuprinse în primul studiu al prezentei teze de doctorat s-au concretizat în articolul cu titlul: **Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients**, autori: Cărnuță, M.G., Stancu, C.S., Toma, L., Sanda, G.M., Niculescu, L.S., Deleanu, M., Popescu, A.C., Popescu, M.R., Vlad, A., Dimulescu, D.R., Simionescu, M., Sima, A.V., publicat în revista Sci Rep 2017 4;7(1):7295. doi: 10.1038/s41598-017-07821-5. Factor de impact în 2016/2017: 4,259, Q1. Articol premiat în 2017 de către UEFISCDI.

Cel de-al doilea studiu al capitolului de **contribuții originale** are ca scop elucidarea mecanismelor moleculare de reversie a steatozei hepatice și aterosclerozei în hamsterul hiperlipidemic. Acest studiu și-a propus, pe de o parte, evidențierea mecanismelor moleculare de acțiune a dietei grase, prin care se induce apariția apoAI modificată prin oxidare și scăderea expresiei proteice și a activității enzimatică a PON1 în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor hiperlipidemici/hiperlipidemici-hiperglicemici și, pe de altă parte, dezvoltarea unor strategii terapeutice, care vizează steatoza hepatică și indirect stoparea proceselor aterosclerotice.

Studiul urmărește trei obiective generale, dintre care **primul obiectiv** este axat pe evidențierea mecanismelor moleculare de acțiune a dietei grase în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor hiperlipidemici/hiperlipidemici-hiperglicemici.

Astfel, studiul *in vivo* a inclus trei grupuri de hamsteri sirieni aurii (*Mesocricetus auratus*): (i) grupul de hamsteri control (**N**, n = 12) care a primit hrană normală (*ad libitum*); (ii) grupul de hamsteri hiperlipidemici (**HL**, n = 24) care a fost hrănit cu dietă bogată în grăsimi (hrană normală suplimentată cu 3% colesterol și 15% unt) timp de 16 săptămâni și (iii) grupul de hamsteri hiperlipidemici-hiperglicemici (**HLHG**, n=12), derivat din hamsterii HL după cele 16 săptămâni de dietă grasă.

Prin urmare, la finalul celor 16 săptămâni de dietă grasă, în grupul de hamsteri HL au rămas numai 12 animale, restul de 12 dezvoltând spontan hiperglicemie și conducând la al treilea grup experimental (HLHG).

Au fost raportate o serie de date contradictorii cu privire la implicarea axei intestin-ficat în apariția aterosclerozei. Această contradicție se datorează utilizării diferitelor modele animale (șoareci și șobolani), diete și protocoale experimentale [38]. Studiile raportate de laboratorul nostru precum și de alte grupuri au evidențiat că un model animal adecvat pentru cercetarea în domeniul aterosclerozei este hamsterul auriu sirian deoarece metabolismul său lipidic este asemănător cu cel al omului, spre deosebire de modelul șoarecelui și al șobolanului [39, 40].

La sinteza particulelor de HDL participă predominant ficatul, însă într-o măsură mai mică și intestinul subțire [41]. Pentru ca aceste lipoproteine să își poată îndeplini funcțiile de bază este necesar ca nivelurile și calitatea componentelor, precum apoAI și enzima anti-oxidantă PON1, să fie funcționale [42]. Modificările oxidative care apar în structura primară a moleculelor de apoAI fac ca particulele de HDL să devină disfuncționale, prin urmare apoAI modificată prin oxidare este considerată marker al disfuncționalității HDL [43, 44]. De asemenea, scăderea activității enzimatică a PON1 a fost observată în sângele pacienților CAD, atât de grupul nostru cât și de alți cercetători și a fost asociată cu prezența HDL disfuncțional [45, 46].

Data fiind importanța enzimei PON1 în funcționalitatea HDL, este necesară cunoașterea mecanismului prin care este reglată expresia sa genică și proteică la nivelul ficatului și intestinului subțire. Datele din literatură cu privire la sinteza și secreția proteinei PON1 de către intestinul subțire sunt contradictorii, fiind la ora actuală subiect de dezbatere [47, 48]. Prin studii realizate pe celulele tumorale hepatice umane, s-a evidențiat faptul că promotorul genei PON1 este supra-reglat de factorul de transcriere LXR, care este activat prin intermediul oxisterolilor [49]. De asemenea, studiile realizate pe hepatocite umane din linia HuH7 au condus la observația prin care este acceptată implicarea factorului de transcriere PPAR γ în reglarea pozitivă a PON1, la nivel genic [50]. Mai mult, impactul negativ pe care îl exercită hiperlipidemia și hiperglicemia asupra capacității factorilor de transcriere LXR și PPAR de a regla expresia PON1 în ficat și intestinul subțire nu este pe deplin elucidat, astfel necesitând o atenție deosebită.

Reticulul endoplasmic (RE) este organitul celular central implicat în sinteza proteinelor și lipidelor. Acumularea proteinelor împachetate incorect în lumenul RE ca răspuns la diferiți

stimuli precum hiperlipidemia, hiperglicemia, stresul oxidativ și ischemia induce apariția stresului RE [51].

Contribuțiile originale ale acestui prim obiectiv au evidențiat că: (i) sinteza proteinei PON1 este realizată și de intestinul subțire, iar expresia sa genică este comparabilă cu cea întâlnită în ficatul hamsterilor; (ii) hiperlipidemia alături de hiperglicemie este asociată cu reducerea expresiei genice și proteice a moleculelor PON1 și apoAI în intestinul subțire al hamsterilor (HLHG > HL), (iii) prezența hiperlipidemiei/hiperglicemiei reduce dramatic expresia genică și nivelurile proteinei PON1 în ficatul hamsterilor hrăniți cu dietă bogată în grăsimi, dar nu și pe cele ale apoAI (HLHG > HL) și (iv) hiperlipidemia asociată hiperglicemiei amplifică stresul oxidativ și al RE în intestinul subțire și ficatul hamsterilor hrăniți cu dietă bogată în grăsimi, ceea ce conduce la diminuarea sintezei proteinelor LXR și PPAR γ , astfel reducând exprimarea la nivel proteic a PON1.

Rezultatele acestui obiectiv s-au concretizat în articolul cu titlul: **Hyperlipidemia-induced hepatic and small intestine ER stress and decreased paraoxonase 1 expression and activity is associated with HDL dysfunction in Syrian hamsters**, autori: Stancu, C.S., Cărnuță, M.G., Sanda, G.M., Toma, L., Deleanu, M., Niculescu, L.S., Sasson, S., Simionescu, M., Sima, A.V., publicat în revista Mol. Nutr. Food Res. 2015, 59, 2293–2302 DOI 10.1002/mnfr.201500422 .Factor de impact în 2016/2017: 4,323, Q1. Articol premiat în 2016 de către UEFISCDI.

Cel de-al doilea obiectiv al studiului realizat pe modelul hamsterului sirian auriu și-a propus evidențierea efectului benefic al extractului de ghimbir asupra steatozei hepatice induse de dieta bogată în grăsimi și evaluarea mecanismelor moleculare care stau la baza acestui efect.

În acest studiu am folosit trei grupuri de hamsteri: (i) un grup de hamsteri control (N, n = 7) care a primit hrană normală (*ad libitum*); (ii) un grup de hamsteri hiperlipidemici (HL, n = 7) care a primit hrană bogată în grăsimi (hrană normală suplimentată cu 3% colesterol și 15% unt) pentru 21 de săptămâni și (iii) un grup de hamsteri HL, tratat cu extract de ghimbir concomitent cu dieta grasă, în ultimele 5 săptămâni ale perioadei experimentale (HL-GIN, n = 7).

Este cunoscut faptul că ficatul este organul principal implicat în realizarea unui număr mare de procese metabolice, precum lipogeneza, sinteza proteinelor și homeostazia colesterolului și glucozei [52]. Astfel, acumularea excesivă a lipidelor în ficat determină inițial apariția afecțiunii denumită boala ficatului gras non-alcoolic (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), care cuprinde o serie de alte afecțiuni, precum steatoza hepatică și

steatohepatita non-alcoolică, care netratate pot genera în final ciroza hepatică și carcinomul hepatocelular [53]. Factorii determinanți în patogeneza NAFLD sunt formarea speciilor reactive de oxigen (ROS) și generarea stresului RE ca răspuns la acumularea de acizi grași și colesterol în ficat [54, 55]. Homeostazia colesterolului este menținută în ficat prin balanța dintre preluare, sinteză și excreție. Este cunoscut faptul că transportorul ABCG5/G8 joacă un rol esențial în promovarea excreției hepatobiliare a sterolilor neutri, astfel reglând metabolismul lipidic [56]. De asemenea, enzima colesterol 7-hidroxilaza (CYP7A1) controlează efluxul sterolilor prin conversia moleculelor de colesterol în acizi biliari [56].

Sinteza proteinelor ABCG5/G8 și CYP7A1 este mediată de factorul de transcriere LXR [57]. Un alt factor de transcriere care reglează sinteza unui număr considerabil de proteine implicate în metabolismul lipidic este factorul nuclear PPAR. Un număr mare de studii au arătat că activarea PPAR α ameliorează rezistența la insulină și steatoza hepatică în șoarecii hrăniți cu dietă bogată în fructoză [58].

Rizomii de ghimbir (*Zingiber officinale*) sunt utilizați în tratamentul diferitelor afecțiuni, precum și ca supliment în băuturi și produse alimentare [59]. Au fost identificați mai mult de 400 de compuși diferiți în extractul de ghimbir, cel mai abundent fiind 6-gingerolul [60]. Date recente au demonstrat că ghimbirul poate acționa ca modulator imun, prezintă proprietăți anti-tumorogene, anti-inflamatorii, anti-apoptotice, anti-oxidante și anti-coagulante [61-63].

Datele prezentate în acest studiu au evidențiat faptul că administrarea simultană a extractului de ghimbir cu dieta bogată în grăsimi conduce la: (i) ameliorarea stresului oxidativ prin creșterea nivelurilor și activității enzimatică a PON1 și scăderea concentrației proteice și activității enzimatică a MPO în ficatul hamsterilor HL, (ii) îmbunătățirea funcției hepatice prin intensificarea sintezei proteinelor ABCG5/G8 și CYP7A1, care la rândul lor determină scăderea nivelurilor de colesterol acumulat, și (iii) restabilirea funcției RE în ficatul hamsterilor HL-GIN prin scăderea expresiei proteice a serin/treonin-protein kinazei/endonucleazei (IRE1 α), factorului de activare a transcrierii 6 (ATF6 α) și receptorilor KDEL (KDEL R), ceea ce conduce la creșterea sintezei proteice a factorilor de transcriere LXR α/β și PPAR γ , mecanism ce stă la baza intensificării sintezei ABCG5/G8, CYP7A1 și PON1.

Luate împreună, aceste rezultate ar putea contribui la dezvoltarea de noi strategii destinate diminuării acumulării de lipide și scăderii stresului oxidativ în ficatul steatotic, cu scopul de a-i îmbunătăți funcțiile specifice și de a reduce indirect progresia bolii aterosclerotice.

Rezultatele obținute în cadrul acestui obiectiv s-au concretizat în articolul cu titlul: ***Zingiber officinale* extract administration diminishes steroyl-CoA desaturase gene expression and activity in hyperlipidemic hamster liver by reducing the oxidative and endoplasmic reticulum stress.**, autori: Carnuță, M.G., Deleanu, M., Barbălată, T., Toma, L., Răileanu, M., Sima, A.V., Stancu, C.S., publicat în revista *Phytoedicine*. 2018, doi <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.059>. Factor de impact în 2016/2017: 3,526, Q1.

Ultimul studiu realizat pe modelul hamsterului sirian auriu a avut ca obiectiv evidențierea efectului benefic al reversiei dietei hiperlipidemice asupra steatozei hepatice și excreției de colesterol prin intestinul subțire și identificarea mecanismelor moleculare implicate.

Prezentul studiu a inclus un număr de 30 de hamsteri sirieni aurii distribuiți în trei grupuri de lucru: (i) grupul de hamsteri control care a primit hrană standard (**N**, n = 10), (ii) grupul de hamsteri care a primit hrană standard suplimentată cu 3% colesterol și 15% unt, timp de 21 de săptămâni (grupul hiperlipidemic, **HL**, n = 10) și (iii) grupul de hamsteri care a primit hrană standard suplimentată cu 3% colesterol și 15% unt, timp de 15 săptămâni. În ultimele 6 săptămâni (din totalul de 21 de săptămâni) animalele din acest grup au primit hrană standard în locul dietei hiperlipidemice (grupul de reversie a dietei hiperlipidemice, **HL-RD**, n = 10).

Am amintit anterior despre rolul esențial al ficatului în lipogeneză și sinteza proteinelor [52]. Menționam că acumularea excesivă a lipidelor în ficat determină apariția bolii ficatului gras non-alcoolic, NAFLD [53], însă hotărâtoare pentru patogeneza NAFLD sunt prezența ROS și amplificarea stresului RE ca rezultat al acumulării de lipide (în special colesterol și acizi grași) în ficat [54, 55].

Implicarea transportorului ABCG5/G8 în excreția colesterolului la nivelul canalelor biliari are o importanță deosebită pentru diminuarea încărcării lipidice a ficatului, reglarea metabolismului lipidic și în consecință reducerea stresului oxidativ și al RE [56]. HDL exercită un rol anti-aterogen considerabil prin numeroasele funcții pe care le posedă (potențial anti-oxidant, anti-inflamator, de transport invers de colesterol, etc) și contribuie la reglarea metabolismului lipidic. Prin urmare, supra-exprimarea proteinelor componente ale HDL (de exemplu apoAI, PON1), precum și a celor implicate în modularea încărcării lipidice a acestor particule (de exemplu ABCA1), reprezintă abordări promițătoare în vederea încetirii și/sau reversiei bolii aterosclerotice.

La nivel intracelular au loc un număr mare de procese ce intervin în reglarea homeostaziei colesterolului și acizilor grași. La aceste procese participă o serie de molecule precum: proteina de legare la acizii grași (FABP-4), care facilitează transportul acizilor grași

la diferite compartimente intracelulare [64] și hidroxiacil-CoA dehidrogenaza/3-ketoacil-CoA tiolaza/enoil-CoA hidrataza (HADHA), cunoscută și ca subunitatea alfa a complexului multienzimatic trifuncțional prezent în mitocondrie, care este implicată în β -oxidarea acizilor grași cu catenă lungă [65].

Reglarea la nivel genic este esențială pentru a modula sinteza proteinelor responsabile de funcționalitatea HDL și excreția excesului de colesterol, precum: apoAI, PON1, ABCA1, ABCG5 și ABCG8. Factorii de transcriere LXR și PPAR sunt cunoscuți a fi implicați în reglarea transcrierii genelor care codifică proteinele implicate în metabolismul lipidic [58, 66]. Importante în reglarea metabolismului lipidic sunt și moleculele care modulează proteinele implicate în transcrierea genică. Dintre acești modulatori pot fi amintiți: deacetilaza sirtuin-1 dependentă de NAD (Sirtuin 1, SIRT1), implicată în reglarea metabolismului lipidic prin modularea pozitivă a factorilor de transcriere precum LXR, PPAR γ , SREBP-1c [67, 68] și proteina 39B cu domenii repetitive tetratricopeptidice (tetratricopeptide repeat protein 39B, TTC39B), despre care se consideră că este implicată în metabolismul lipidic prin legarea la proteine reglatoare ale HDL pe care le direcționează astfel către proteosom pentru degradare, însă mecanismele implicate în acest proces nu sunt pe deplin elucidate [69]. Pe lângă ficat, intestinul subțire participă activ la biosinteza HDL, iar acest aspect îl face un candidat excelent în vederea reglării metabolismului lipidic [48].

Scopul ultimului obiectiv a constat în investigarea efectului reversiei dietei HL asupra steatozei hepatice, evaluarea cantităților de lipide acumulate în ficatul hamsterilor HL, în paralel cu măsurarea expresiei genice și proteice a transportorilor ABCG5, ABCG8 și ABCA1, în ficat și intestinul subțire. De asemenea, am urmărit efectul reversiei dietei HL asupra factorilor de transcriere LXR și PPAR, a modulatorilor proteici SIRT1 și TTC39B și asupra stresului oxidativ și al RE în ficat și intestinul subțire.

Datele raportate în acest studiu au evidențiat faptul că reversia dietei HL a indus: (i) diminuarea stresului oxidativ prin creșterea nivelurilor și activității enzimatice a PON1 și scăderea concentrației și activității enzimatice a MPO în ficat și intestinul subțire al hamsterilor, (ii) îmbunătățirea statusului oxidativ prin diminuarea nivelurilor proteinei FABP-4 și intensificarea sintezei hepatice a HADHA, (iii) reversia bolii steatotice prin stimularea sintezei proteice a ABCG5/G8, apoAI și scăderea expresiei proteice a apoE în ficat și intestinul subțire, care la rândul lor determină diminuarea nivelurilor de colesterol și (iv) îmbunătățirea funcției RE în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor HL-RD, ceea ce conduce la creșterea expresiei genice și proteice a factorilor LXR α și PPAR γ ca rezultat al

creșterii expresiei genice și nivelurilor proteinelor SIRT1 și TTC39B, mecanism care stă la baza intensificării sintezei ABCG5/G8, apoAI și PON1.

Prin urmare, putem aprecia că reversia dietei HL, chiar și pe o perioadă scurtă de timp (6 săptămâni), a condus la stimularea la nivel genic și proteic a transportorului ABCG5/G8, a proteinei majoritare apoAI și a enzimei anti-oxidante PON1 prin creșterea moderată a nivelurilor factorilor de transcriere LXR și PPAR și a modulatorilor lor SIRT1 și TTC39B, contribuind în acest fel la diminuarea excesului de colesterol acumulat în ficat și la îmbunătățirea funcției hepatice cu posibilitatea reducerii incidenței de apariție a CAD.

Datele prezentate mai sus reprezintă obiectivul unui articol în pregătire.

Rezultatele obținute în cele două studii principale, primul realizat *in vivo* pe pacienți cu boală coronariană și *in vitro* pe celule endoteliale umane în cultură și cel de-al doilea realizat *in vivo* utilizând modelul hamsterului hiperlipidemic, au condus la o serie de **concluzii generale** care sunt enunțate mai jos.

Biomarkeri predictivi ai evoluției bolii la pacienții cu angină stabilă (AS) și sindrom coronarian acut (SCA)

- ✚ Sângele pacienților SCA prezintă un status pro-oxidant crescut comparativ cu pacienții AS ca urmare a scăderii expresiei proteice și activității enzimactice a PON1 și creșterii nivelurilor de MPO, TBARS, 4-HNE și LDLox.
- ✚ Sângele pacienților SCA prezintă subfracții de HDL₂ și HDL₃ disfuncționale (mult mai accentuat la HDL₃) comparativ cu AS, iar această disfuncționalitate poate fi explicată prin apariția nivelurilor crescute ale proteinelor apoCIII, MPO, CP și apoAI modificată oxidativ.
- ✚ Pacienții SCA prezintă subfracții de HDL₂ și HDL₃ cu efect anti-inflamator diminuat comparativ cu AS, acest efect fiind evidențiat pe celule endoteliale activate cu TNF α și exprimat prin creșterea nivelurilor de MCP-1, CRP, VCAM-1 și sVCAM-1, creștere mediată de proteaza celulară ADAM17

Mecanisme moleculare implicate în modularea potențialului anti-aterogen al HDL pe hamsterul hiperlipidemic (HL) și hiperlipidemic-hiperglicemic (HLHG)

- ✚ Intestinul subțire al hamsterului sirian auriu are capacitatea de a sintetiza PON1, expresia sa fiind comparabilă cu cea din ficatul acestor animale.

- ✚ Condiția de hiperlipidemie-hiperglicemie conduce la alterarea capacității de sinteză a HDL de către intestinul subțire al hamsterilor HL prin scăderea sintezei PON1 și apoAI (HLHG > HL).
- ✚ Condiția de hiperlipidemie-hiperglicemie conduce la alterarea potențialului anti-oxidant al HDL prin diminuarea sintezei proteice a PON1 în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor hrăniți cu dietă bogată în grăsimi (HLHG > HL).
- ✚ **Mecanismul propus pentru acțiunea dietei grase** implică inducerea stresului oxidativ și al reticulului endoplasmic în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor (HLHG > HL), care conduce la diminuarea nivelurilor factorilor de transcriere LXR și PPAR γ , ducând astfel la reducerea expresiei proteice a PON1.

Efectul terapeutic al extractului de ghimbir și al reversiei dietei hiperlipidemice asupra steatozei hepatice în hamsterul HL

- ✚ **Administrarea extractului de ghimbir concomitent cu dieta HL a condus la:**
 - ameliorarea statusului oxidativ și îmbunătățirea funcționalității reticulului endoplasmic, ca rezultat al creșterii nivelurilor și activității enzimatice a PON1 și al diminuării concentrației și activității enzimatice a MPO în ficatul hamsterilor (HL-GIN > HL);
 - îmbunătățirea funcției hepatice prin intensificarea sintezei ABCG5/G8 și CYP7A1, care la rândul lor determină scăderea nivelurilor de colesterol acumulat în ficat.
- ✚ **Mecanismul de acțiune al extractului de ghimbir** propus implică reducerea stresului reticulului endoplasmic în ficatul hamsterilor HL, care induce creșterea expresiei proteice a factorilor LXR α/β și PPAR γ și stimularea sintezei ABCG5/G8 și CYP7A1.
- ✚ **Reversia dietei HL determină:**
 - ameliorarea stresului oxidativ prin creșterea nivelurilor și activității enzimatice a PON1 și scăderea concentrației și activității enzimatice a MPO în ficat și intestinul subțire al hamsterilor HL (HL-RD > HL);
 - îmbunătățirea funcției de sinteză a reticulului endoplasmic, ca rezultat al diminuării stresului oxidativ în ficat, asociat cu scăderea sintezei FABP-4 și creșterea sintezei HADHA (HL-RD > HL);
 - reglarea funcției hepatice prin ameliorarea bolii steatotice, ca rezultat al stimulării sintezei proteice a transportorului ABCG5/G8, apoAI și blocarea sintezei apoE în

ficatul și intestinul subțire al hamsterilor, determinând în acest fel scăderea nivelurilor de colesterol (HL-RD > HL).

✚ **Mecanismul propus, prin care întreruperea dietei HL exercită efecte benefice** constă în reducerea stresului reticulului endoplasmic, care conduce la creșterea expresiei genice și proteice a factorilor LXR α și PPAR γ și a modulatorilor proteici SIRT1 și TTC39B în ficatul și intestinul subțire al hamsterilor și la stimularea sintezei apoAI, PON1 și ABCG5/G8.

Luată împreună, aceste rezultate ar putea contribui la identificarea de noi biomarkeri implicați în progresia și evoluția bolilor cardiovasculare, precum și la stabilirea de noi căi metabolice implicate în modularea potențialului anti-aterogen al HDL, prin care se poate încetini și/sau reduce formarea și progresia plăcii aterosclerotice

Perspective

Boala cardiovasculară reprezintă principala afecțiune a cărei progresie este greu de controlat, chiar și în stadiile incipiente ale dezvoltării. Numeroasele încercări de încetinire și regresie a ateromului prin utilizarea diferitelor medicamente (statine, fibrați, niacina) au reușit parțial să controleze această afecțiune, însă efectele benefice au fost de multe ori depășite de cele secundare. Din acest motiv, îmi propun:

- Continuarea studiului privind descifrarea căilor de semnalizare implicate în modularea potențialului anti-aterogen al HDL.
- Studiarea mecanismelor prin care diferiți agenți (activatori sau represori genici / proteici) exercită efecte benefice prin creșterea potențialului anti-aterogen al HDL și testarea lor ca potențiali compuși cu efect terapeutic, cu scopul de a reduce boala aterosclerotică.

❖ **Lucrări publicate în reviste indexate ISI – 2 autor principal**

1. **Cărnută MG**, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Scientific Reports.*, 7(1):7295, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07821-5. (IF în 2016 = 5.2; Q1).
2. **Cărnută MG**, Deleanu M, Barbalata T, Toma L, Raileanu M, Sima AV, Stancu CS. Zingiber officinale extract administration diminishes steroyl-CoA desaturase gene expression and activity in hyperlipidemic hamster liver by reducing the oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Phytomedicine.*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.059> (IF în 2017 = 3.52; Q1).

❖ **Lucrări publicate în reviste indexate ISI – 4 co-autor**

1. Niculescu LS, Simionescu N, Fuior EV, Stancu CS, **Cărnută MG**, Dulceanu M, Răileanu M, Drăgan E, Sima AV. Inhibition of miR-486 and miR-92a decreases liver and plasma cholesterol levels by modulating lipid-related genes in hyperlipidemic hamsters. *Molecular Biology Reports.*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11033-018-4186-8>. (IF în 2016 = 1.83; Q1).
2. Stancu CS, **Cărnută MG**, Sanda GM, Toma L, Deleanu M, Niculescu LS, Sasson S, Simionescu M, Sima AV. Hyperlipidemia-induced hepatic and small intestine ER stress and decreased paraoxonase 1 expression and activity is associated with HDL dysfunction in Syrian hamsters. *Molecular Nutrition & Food Research.*, 59(11): 2293-302, 2015. DOI: 10.1002/mnfr.201500422. (IF în 2017 = 4.32; Q1).
3. Simionescu N, Niculescu LS, **Cărnută MG**, Sanda GM, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Hyperglycemia determines increased specific microRNAs levels in sera and HDL of acute coronary syndrome patients and stimulates microRNAs production in human macrophages. *PLoS ONE*, 11(8): e0161201, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0161201 (IF în 2016 = 2.80; Q1).
4. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, **Cărnută MG**, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. *PloS ONE.*, 10(10): e0140958, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140958 (IF în 2016 = 2.80; Q1).

REZUMATE PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI

1. **Cărnută MG**, Camelia S. Stancu CS, Sanda GM, Toma L, Niculescu LS, Deleanu M, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional HDL characterized by decreased paraoxonase 1 and increased apolipoproteins AII, CIII and myeloperoxidase levels discriminate between acute coronary syndrome and stable CAD patients. *Atherosclerosis.*, **263**: e219, **2017**. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.713.
2. Simionescu N, **Cărnută MG**, Fuior E, Stancu CS, Răileanu M, Dulceanu MD, Drăgan E, Sima AV, Niculescu LS. Targeting lipid metabolism-related genes by *in vivo* inhibition of miR-486 and miR-92a lowers plasma cholesterol levels in hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis.*, **263**: e34-35, **2017**. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.132.
3. Stancu CS, **Cărnută MG.**, Sanda GM, Toma L, Deleanu M, Niculescu LS, Simionescu M, Sima AV. The altered expression of ABC transporters in the small intestine and liver of hyperlipidemic hamsters is associated with the activated ER stress and the dysfunctional HDL. *Atherosclerosis.*, **252**: e108, **2016**. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis. 2016.07.504.
4. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, **Cărnută MG**, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Sima AV. Specific circulating microRNAs levels associate with hypertension, hyperglycemia and dysfunctional HDL in acute coronary syndrome patients. *Cardiovasc. Res.*, 111(1): S56-S81, **2016**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvw149>.
5. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, **Cărnută MG**, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Hyperglycemia increases microRNAs in circulating HDL from acute coronary syndrome patients and modulates 155 miRNA processing machinery in human macrophages. *Atherosclerosis.*, **252**: e82, **2016**. DOI:10.1016/j.atherosclerosis. 2016.07.504.

COMUNICĂRI ORALE SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE - AUTOR PRINCIPAL

1. **Cărnută MG**, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M, Popescu AC, Popescu RM, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional high density lipoproteins with diminished anti-inflammatory potential discriminate between

acute coronary syndrome and stable coronary artery disease patients. Simpozion Academician Nicolae Cajal, 30 martie-1 aprilie **2017**.

2. **Cărnută MG**. Molecular mechanisms linking hyperlipidemia with dysfunctional hdl; decreased expression of paraoxonase 1 in the small intestine and liver of hyperlipidemic hamsters. International Atherosclerosis Research School (iARS), Praga, Republica Cehă, 23 – 29 august **2015**.
3. **Cărnută MG**, Stancu CS, Deleanu M, Sanda GM, Sima AV, Niculescu LS, Sima AV. Paraoxonase 1 protein and activity is decreased in serum and high density lipoproteins from vulnerable coronary artery disease patients. Al 7-lea Congres Național cu Participare Internațională și cea de-a 33-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Baia Mare, România, 11 - 14 iunie **2015**. *Bulletin of RSCB* 43, p. 40, **2015**.
4. **Cărnută MG**, Stancu CS, Deleanu M, Sanda GM, Sima AV. The study of dysfunctional high- density lipoproteins from patients with coronary artery disease. Al 6-lea Congres Național cu Participare Internațională și cea de-a 32-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Târgu Mureș, 4 – 7 iunie 2014, *Bulletin of RSCB* 42, p. 47, **2014**.

COMUNICĂRI ORALE SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE ȘI NAȚIONALE– CO-AUTOR

1. Simionescu N, **Cărnută MG**, Fuior E, Stancu CS, Raileanu M, Dulceanu MD, Dragan E, Sima AV, Niculescu LS. Molecular therapy to regulate dyslipidemia in experimental atherosclerosis; in vivo targeting of miR-486 and miR-92a. Simpozion Academician Nicolae Cajal, 30 martie-1 aprilie **2017**.
2. Stancu CS, **Cărnută MG**, Sanda GM, Toma L, Deleanu M, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional HDL in the small intestine of hyperlipidemic hamsters is generated by the increased er stress; reverse effect of lowering intestinal lipid transport by probiotics. Prezentare orală la al 4-lea Simpozion International de Adipobiologie și Adipofarmacologie (ISAA), București, România, 28 – 31 octombrie, **2015**.
3. Stancu CS, Sanda GM, **Cărnută MG**, Niculescu LS, Deleanu M, Rogoz D, Popescu AC, Popescu RM, Dimulescu DR, Sima AV. Novel predictive biomarkers associated to lipoproteins - indicators for the evolution of coronary artery disease. Al 6-lea Congres Național cu Participare Internațională și cea de-a 32-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Târgu Mureș, 4 – 7 iunie 2014, *Bulletin of RSCB* 42, p. 106, **2014**.

4. Stancu CS, **Cărnută MG**, Sanda GM, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Maya Simionescu M, Sima AV. Paraoxonase 1, oxidation products and apoAII levels in HDL₃ discriminate between acute coronary syndrome and stable CAD patients. Comunicare orală prezentată la al 55-lea Congres Național de Cardiologie, Sinaia, România, 21 – 24 septembrie 2016.

SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI EFECTUATE

1. Cursul internațional “Care and use of laboratory animals: mice, rats, zebrafish”, a patra ediție. Curs acreditat FELASA pentru specializare în lucru cu animale experimentale de laborator. Certificat pentru lucrul cu animalele de laborator (ID 051/15_3_2017) pentru modulele A, B, C și D. Universitatea din Heraklion, Creta, Grecia, 29 mai – 9 iunie, 2017.
2. Congresul Internațional de Medicină Regenerativă. Medicină regenerativă; cercetare și aplicații clinice, București, România, 14-17 iunie 2017.
3. Congresul „Nutraceuticals for early control of dyslipidemia: the clinical evidence”, Praga, Republica Cehă, 25 aprilie 2017.
4. Cursul „International Atherosclerosis Research School (iARS)”, Praga, Republica Cehă, 23 – 29 august 2015.
5. Simpozionul “Al IV-lea simpozion al Asociației Române pentru Știința animalelor de laborator”, București, România, 23 aprilie 2015.
6. Congresul „The first international society of regenerative medicine and surgery congress. New frontiers in regenerative medicine and surgery. Interdisciplinarity, research and clinical applications”, București, România, 15-16 mai 2015.

PREMII NAȚIONALE OBȚINUTE

1. Premiera Rezultatelor Cercetării UEFISCDI - Articole

- **Cărnută MG**, Stancu CS, Toma L, Sanda G1, Niculescu LS, Deleanu M, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep.*, 7(1): 7295, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07821-5. Articol premiat în 2017.
- Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, **Cărnută MG**, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Hyperglycemia

determines increased specific microRNAs levels in sera and HDL of acute coronary syndrome patients and stimulates microRNAs production in human macrophages. *PLoS ONE.*, 11(8): e0161201, **2016**. Articol premiat în **2016**.

- Stancu CS, **Cărnută MG**, Sanda GM, Toma L, Deleanu M, Niculescu LS, Sasson S, Simionescu M, Sima AV. Hyperlipidemia-induced hepatic and small intestine ER stress and decreased paraoxonase 1 expression and activity is associated with HDL dysfunction in Syrian hamsters. *Mol Nutr Food Res.*, 59(11): 2293-302, **2015**. Articol premiat în **2016**.

- Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, **Cărnută MG**, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. *PLoS ONE.*, 10(10): e0140958, **2015**. Articol premiat în **2015**.

2. Premiul pentru cea mai bună prezentare orală (Locul 1) la al 7-lea Congres Național cu Participare Internațională și cea de-a 33-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Baia Mare, România, 11 - 14 iunie **2015** pentru **Cărnută MG**, Stancu CS, Deleanu M, Sanda GM, Sima AV, Niculescu LS, Sima AV. Paraoxonase 1 protein and activity is decreased in serum and high density lipoproteins from vulnerable coronary artery disease patients.

3. Premiul pentru cea mai bună prezentare orală (Locul 2) la al 6-lea Congres Național cu Participare Internațională și cea de-a 32-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, Târgu Mureș, România, 4 - 7 iunie **2014** pentru **Cărnută MG**, Stancu CS, Deleanu M, Sanda GM, Sima AV. The study of dysfunctional high- density lipoproteins from patients with coronary artery disease.

BURSE OBTINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR

1. Young Investigator Fellowship pentru a participa la al 85-lea Congres al Societății Europene de Ateroscleroză (EAS), Praga, Republica Cehă, 23 – 26 aprilie **2017**.

2. Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR) : 2013-2016

❖ **Colaborator în 3 granturi naționale:**

1. PN-II-RU-TE-2014-4-0506 (TE11/2015) – „ Mecanisme moleculare ale rezistenței la insulină induse de hiperlipidemie; conexiuni metabolice între intestin, steatoza hepatică și ateroscleroză”. Director de proiect: Dr. Camelia S. Stancu.

2. **PN-II-RU-TE-2014-4-0290** (TE17/2015) – „Evaluarea strategiilor moleculare pentru a controla dislipidemia aterogenă prin modularea expresiei microARN”. Director de proiect: Dr. Loredan S. Niculescu.
3. **PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-0184** (PCCA127/2012) – „Identificarea de noi biomarkeri predictivi pentru evoluția bolii coronariene stabile și instabile, utilizând tehnici de lipidomică, proteomică și biologie moleculară”. Director de proiect: Acad. Anca V. Sima.

BIBLIOGRAFIE

1. Stancu, C.S., L. Toma, and A.V. Sima, *Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(2): p. 433-46.
2. Aaronson, P.I., J.P. Ward, and M.J. Connolly, *The Cardiovascular System at a Glance, Fourth Edition*. John Wiley & Sons, Ltd. Published 2013: p. 3-14.
3. Manduteanu, I. and M. Simionescu, *Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?* J Cell Mol Med, 2012. **16**(9): p. 1978-90.
4. Sima, A.V., C.S. Stancu, and M. Simionescu, *Vascular endothelium in atherosclerosis*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 191-203.
5. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 297-329.
6. Schwartz, S.M., et al., *Plaque rupture in humans and mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 705-13.
7. Ridker, P.M., et al., *HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial*. Lancet, 2010. **376**(9738): p. 333-9.
8. Toth, P.P., et al., *Should low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) be treated?* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014. **28**(3): p. 353-68.
9. Banach, M., et al., *Lipids, blood pressure and kidney update 2015*. Lipids Health Dis, 2015. **14**: p. 167.
10. Merzouk, H., et al., *Fetal macrosomia related to maternal poorly controlled type 1 diabetes strongly impairs serum lipoprotein concentrations and composition*. J Clin Pathol, 2000. **53**(12): p. 917-23.
11. Rader, D.J. and A.R. Tall, *The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis?* Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1344-6.
12. Landray, M.J., et al., *Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients*. N Engl J Med, 2014. **371**(3): p. 203-12.
13. Schwartz, G.G., et al., *Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2012. **367**(22): p. 2089-99.
14. Rohatgi, A., et al., *HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events*. N Engl J Med, 2014. **371**(25): p. 2383-93.
15. Saleheen, D., et al., *Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(7): p. 507-13.
16. Navab, M., et al., *HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(4): p. 222-32.
17. Recalde, D., et al., *Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(4): p. 756-61.
18. Van Linthout, S., et al., *Human apolipoprotein A-I gene transfer reduces the development of experimental diabetic cardiomyopathy*. Circulation, 2008. **117**(12): p. 1563-73.
19. de Souza, J.A., et al., *Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(3): p. 608-20.
20. Van Lenten, B.J., et al., *Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2758-67.
21. Heinecke, J.W., *The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S167-71.

22. Davidsson, P., et al., *Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(2): p. 156-63.
23. Shah, A.S., et al., *Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(10): p. 2575-85.
24. Zheng, C. and M. Aikawa, *High-density lipoproteins: from function to therapy*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(23): p. 2380-3.
25. Wouters, K., et al., *Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice*. *Clin Chem Lab Med*, 2005. **43**(5): p. 470-9.
26. Lo, C.M., et al., *Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation?* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(1): p. G344-52.
27. von Eckardstein, A. and D. Kardassis, *High Density Lipoproteins From Biological Understanding to Clinical Exploitation*. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2015. **224**: p. 10-12.
28. Tietge, U.J. and A.K. Groen, *Role the TICE?: advancing the concept of transintestinal cholesterol excretion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(7): p. 1452-3.
29. Bounafaa, A., et al., *Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients*. *Clin Biochem*, 2014. **47**(18): p. 318-25.
30. Uno, K. and S.J. Nicholls, *Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis*. *Biomark Med*, 2010. **4**(3): p. 361-73.
31. Larach, D.B., E.M. deGoma, and D.J. Rader, *Targeting high density lipoproteins in the prevention of cardiovascular disease?* *Curr Cardiol Rep*, 2012. **14**(6): p. 684-91.
32. Camont, L., M.J. Chapman, and A. Kontush, *Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease*. *Trends Mol Med*, 2011. **17**(10): p. 594-603.
33. Eren, E., N. Yilmaz, and O. Aydin, *High Density Lipoprotein and it's Dysfunction*. *Open Biochem J*, 2012. **6**: p. 78-93.
34. Arora, S., S.K. Patra, and R. Saini, *HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease*. *Clin Chim Acta*, 2016. **452**: p. 66-81.
35. Kim, J.G., et al., *Silent Coronary Artery Disease in Symptomatic Candidates for Carotid Revascularization Intervention*. *Eur Neurol*, 2016. **76**(1-2): p. 69-74.
36. Navab, M., et al., *The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S145-9.
37. Mackness, M. and B. Mackness, *Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles*. *Gene*, 2015. **567**(1): p. 12-21.
38. Panchal, S.K. and L. Brown, *Rodent models for metabolic syndrome research*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 351982.
39. Sullivan, M.P., et al., *The gerbil, hamster, and guinea pig as rodent models for hyperlipidemia*. *Lab Anim Sci*, 1993. **43**(6): p. 575-8.
40. Stancu, C.S., et al., *Probiotics determine hypolipidemic and antioxidant effects in hyperlipidemic hamsters*. *Mol Nutr Food Res*, 2014. **58**(3): p. 559-68.
41. Hussain, M.M., *Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation*. *Curr Opin Lipidol*, 2014. **25**(3): p. 200-6.
42. Litvinov, D., H. Mahini, and M. Garelnabi, *Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases*. *N Am J Med Sci*, 2012. **4**(11): p. 523-32.

43. Shao, B., S. Pennathur, and J.W. Heinecke, *Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6375-86.
44. Toth, P.P. and M.H. Davidson, *High-density lipoproteins: marker of cardiovascular risk and therapeutic target*. J Clin Lipidol, 2010. **4**(5): p. 359-64.
45. Haraguchi, Y., et al., *Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2014. **234**(2): p. 288-94.
46. Kostapanos, M.S. and M.S. Elisaf, *High density lipoproteins and type 2 diabetes: Emerging concepts in their relationship*. World J Exp Med, 2014. **4**(1): p. 1-6.
47. Shamir, R., et al., *Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(3): p. 336-44.
48. Mackness, B., et al., *Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA*. IUBMB Life, 2010. **62**(6): p. 480-2.
49. Gouedard, C., et al., *Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(4): p. 945-56.
50. Khateeb, J., et al., *Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 119-25.
51. Hummasti, S. and G.S. Hotamisligil, *Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes*. Circ Res, 2010. **107**(5): p. 579-91.
52. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
53. Ahmed, M., *Non-alcoholic fatty liver disease in 2015*. World J Hepatol, 2015. **7**(11): p. 1450-9.
54. Fuchs, M., *Non-alcoholic Fatty liver disease: the bile Acid-activated farnesoid x receptor as an emerging treatment target*. J Lipids, 2012. **2012**: p. 934396.
55. Papandreou, D., et al., *Investigation of anthropometric, biochemical and dietary parameters of obese children with and without non-alcoholic fatty liver disease*. Appetite, 2012. **59**(3): p. 939-44.
56. Pizzini, A., et al., *The Role of Omega-3 Fatty Acids in Reverse Cholesterol Transport: A Review*. Nutrients, 2017. **9**(10).
57. Baranowski, M., *Biological role of liver X receptors*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59 Suppl 7**: p. 31-55.
58. Chan, S.M., et al., *Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 2095-105.
59. Singletary, K.W., *Ginger An Overview of Health Benefits*. Nutr Today, 2010. **45**: p. 171-183.
60. Arablou, T., et al., *The effect of ginger consumption on glycemic status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus*. Int J Food Sci Nutr, 2014. **65**(4): p. 515-20.
61. Hosseinzadeh, A., et al., *Protective Effect of Ginger (Zingiber officinale Roscoe) Extract against Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis Induced by Interleukin-1beta in Cultured Chondrocytes*. Cells Tissues Organs, 2017. **204**(5-6): p. 241-250.
62. Mohamed, O.I., et al., *Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver*. Pharm Biol, 2016. **54**(7): p. 1164-72.

63. Li, Y., et al., *Preventive and Protective Properties of Zingiber officinale (Ginger) in Diabetes Mellitus, Diabetic Complications, and Associated Lipid and Other Metabolic Disorders: A Brief Review*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 516870.
64. Graupera, I., et al., *Adipocyte Fatty-Acid Binding Protein is Overexpressed in Cirrhosis and Correlates with Clinical Outcomes*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 1829.
65. Maeyashiki, C., et al., *HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **484**(3): p. 636-641.
66. Frederico, M.J., et al., *Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(11): p. 1381-8.
67. Li, X., et al., *SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR*. Mol Cell, 2007. **28**(1): p. 91-106.
68. Mayoral, R., et al., *Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPARgamma activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity*. Mol Metab, 2015. **4**(5): p. 378-91.
69. Hsieh, J., et al., *TTC39B deficiency stabilizes LXR reducing both atherosclerosis and steatohepatitis*. Nature, 2016. **535**(7611): p. 303-7.