



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

DZIEDZINA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU

DYSCYPLINA NAUKI MEDYCZNE

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość
i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance
tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną
dieta bogatotłuszczową.**

Lek. Klaudia Katarzyna Berk

Promotor: prof. dr hab. Adrian Chabowski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka

Zakład Fizjologii UMB

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia
w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok 2023



**MEDICAL UNIVERSITY OF BIALYSTOK
FIELD OF MEDICAL AND HEALTH SCIENCES
SCIENTIFIC DISCIPLINE MEDICAL SCIENCES**

DOCTORAL THESIS

Evaluation of the effect of cannabidiol (CBD) on the content and metabolism of sphingolipids in subcutaneous and visceral adipose tissue in rats with insulin resistance induced by a high-fat diet.

Author: Klaudia Katarzyna Berk, M.D

First supervisor: Prof. Adrian Chabowski, M.D., PhD

Assisting supervisor: Karolina Konstantynowicz-Nowicka, M.Sc., PhD

Department of Physiology, MUB

Head of Department: Prof. Adrian Chabowski, M.D, PhD

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB

BIALYSTOK 2023

Podziękowanie

Rozprawa doktorska powstała pod skrzydłami Mojego Promotora Pana Prof. dr hab. n. med. Adriana Chabowskiego, któremu chciałabym podziękować za zaufanie, serdeczność i stworzenie warunków do rozwoju naukowego, począwszy od pracy w Studenckim Kole Naukowym „Kreatywny Fizjolog” na złożeniu rozprawy doktorskiej kończąc.

Chciałabym również podziękować mojej promotor Dr n. med. Karolinie Konstantynowicz-Nowickiej za wsparcie merytoryczne i mentalne, niezliczone godziny konsultacji, cierpliwość i zaangażowanie na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy.

Osobne, równie ważne podziękowanie składam na ręce mojej Mamy i mojego Partnera, bez których nie było mnie tu gdzie jestem.

*Praca została sfinansowana przez:
Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Sonata 13 o numerze
2017/26/D/NZ3/01119
oraz
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach projektów naukowych o numerach
SUB/1/DN/200/002/1118 i SUB/1/DN/21/007/1118*

Życiorys.....	6
Zestawienie publikacji.....	10
Rozprawa doktorska.....	11
1. Artykuły stanowiące cykl prac włączonych do rozprawy doktorskiej.....	11
2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	12
3. Wstęp.....	15
3.1. Metabolizm lipidów i sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej.....	15
Ryc. 1 Szlaki metabolizmu sfingolipidów.....	17
3.2. Szlak insulinowy IRS1/PI3K/Akt w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej.....	18
3.3. Rola endokannabinoidomu w modulowaniu gospodarki węglowodanowo-lipidowej.....	20
3.4. Rola kannabidiolu w regulacji metabolizmu węglowodanowo-lipidowego komórek podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej.....	22
4. Cele pracy.....	23
5. Materiały i metody.....	24
5.1. Model zwierzęcy.....	24
5.2. Analiza ekspresji enzymów ze szlaku metabolizmu sfingolipidów oraz wybranych białek i ich fosforylowanych form ze szlaku sygnalizacyjnego insuliny metodą Western Blot.....	26
5.3. Analiza stężenia sfingolipidów trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej metodą HPLC....	26
5.4. Analiza statystyczna.....	28
6. Wyniki.....	28
6.1 Wpływ kannabidiolu na stężenie sfingolipidów.....	28
6.2. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych w sfingolipidowy szlak syntezy <i>de novo</i> ceramidu.....	29
6.3. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych zarówno w sfingolipidowy szlak ratunkowy jak i syntezy <i>de novo</i> ceramidu.....	29
6.4. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych w sfingolipidowy szlak kataboliczny.....	30
6.5. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek ze szlaku sygnałowego insuliny.....	30
7. Wnioski.....	31
8. Publikacja nr 1.....	32
9. Publikacja nr 2.....	53
10. Streszczenie w języku polskim.....	65
11. Streszczenie w języku angielskim.....	67
12. Oświadczenia współautorów.....	69
13. Uchwała komisji etycznej.....	80
14. Referencje.....	80

Życiorys

Dane personalne

Imię i nazwisko: Klaudia Katarzyna Berk

Data i miejsce urodzenia: 27 czerwiec 1994 rok, Warszawa

Wykształcenie

2021-2025 lekarz medycyny, staż rezydencki w dziedzinie genetyka kliniczna, Podlaskie Centrum Genetyczne „Genetics”

2019-2022 lekarz medycyny, doktorant, Szkoła Doktorska, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2013-2019 kierunek lekarski, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Osiągnięcia

Publikacje naukowe

1. **Berk K**, Iłowska N, Konstantynowicz-Nowicka K, Chabowski A. Simple and facilitated diffusion of long chain fatty acids in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Postepy Hig Med Dosw* 2017;71. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7668> , IF=0,783, **MEiN=15**
2. Drygalski K, **Berk K**, Charytoniuk T, Iłowska N, Łukaszuk B, Chabowski A, et al. Does the enterolactone (ENL) affect fatty acid transporters and lipid metabolism in liver? *Nutr Metab* 2017;14. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0223-1>. IF=3,483, **MEiN=35**
3. Charytoniuk T, Drygalski K, Konstantynowicz-Nowicka K, **Berk K**, Chabowski A. Alternative treatment methods attenuate the development of NAFLD: A review of resveratrol molecular mechanisms and clinical trials. *Nutrition* 2017;34. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.001>, IF=3,734, **MEiN=30**
4. Charytoniuk T, Iłowska N, **Berk K**, Drygalski K, Chabowski A, Konstantynowicz-Nowicka K. The effect of enterolactone on sphingolipid pathway and hepatic insulin resistance development in HepG2 cells. *Life Sci* 2019;217:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.044>, IF=3,647, **MEiN=70**
5. **Berk K**, Powirtowska M, Korzeniecka-Kozerska A. **Micturition disorders as the first symptom of multiple pituitary hormone deficiency caused by craniopharyngioma**, *Journal of Paediatrics and Child Health*, 2018;54,s.105-106, 1034-4810, 1440-1754, IF= 1,954, **MEiN= 100**
6. **Berk K**, Drygalski K, Harasim-Symbor E, Charytoniuk T, Iłowska N, Łukaszuk B, et al. The effect of enterolactone on liver lipid precursors of inflammation. *Life Sci* 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.044>, IF=3,647, **MEiN=70**

7. Konstantynowicz-Nowicka K, **Berk K**, Chabowski A, Kasacka I, Bielawiec P, Łukaszuk B, et al. High-fat feeding in time-dependent manner affects metabolic routes leading to nervonic acid synthesis in NAFLD. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20153829>, IF=4,556, **MEiN=140**
8. Charytoniuk T, Harasim-Symbor E, Polak A, Drygalski K, **Berk K**, Chabowski A, et al. Influence of resveratrol on sphingolipid metabolism in hepatocellular carcinoma cells in lipid overload state. *Anticancer Agents Med Chem* 2019;19. <https://doi.org/10.2174/1871520619666181224161255>. IF=2,049 **MEiN=70**
9. **Berk K**, Powirtowska M, Blahuszewska A, Korzeniecka-Kozerska A. Retrospective evaluation of early risk factors in children with different types of micturition disorders. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2019;108. <https://doi.org/10.1111/apa.14659>. IF=2,111 **MEiN=100**
10. Heropolitanska-Pliszka E, **Berk K**, Maciejczyk M, Sawicka-Powierza J, Bernatowska E, Wolska-Kusnierz B, et al. Systemic redox imbalance in patients with chronic granulomatous disease. *J Clin Med* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9051397>. IF=4,242 **MEiN=140**
11. Charytoniuk T, Zywno H, Konstantynowicz-Nowicka K, **Berk K**, Bzdega W, Chabowski A. Can physical activity support the endocannabinoid system in the preventive and therapeutic approach to neurological disorders? *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21124221>. IF=5,924 **MEiN=140**
12. **Berk K**, Bzdega W, Konstantynowicz-Nowicka K, Charytoniuk T, Zywno H, Chabowski A. Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment. *J Clin Med* 2021;10:393. <https://doi.org/10.3390/jcm10030393>. IF=4,964 **MEiN=140**
13. Charytoniuk T, Sztolsztener K, Harasim-Symbor E, **Berk K**, Chabowski A, Konstantynowicz-Nowicka K. Cannabidiol – A phytocannabinoid that widely affects sphingolipid metabolism under conditions of brain insulin resistance. *Biomed Pharmacother* 2021;142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112057>. IF=7,419 **MEiN=100**
14. Charytoniuk T, Zywno H, **Berk K**, Bzdega W, Kolakowski A, Chabowski A, et al. The Endocannabinoid System and Physical Activity—A Robust Duo in the Novel Therapeutic Approach against Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23063083>. IF=6,208 **MEiN=140**
15. **Berk K**, Konstantynowicz-Nowicka K, Charytoniuk T, Harasim-Symbor E, Chabowski A. Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5382. <https://doi.org/10.3390/ijms23105382>. IF=6,208 **MEiN=140**

Konferencje naukowe:

1. 2016 **Berk K**,Łowska N,Charytoniuk T,Drygalski K. *The influence of Dexamethasone on hepatic lipid transport*. VI International Students' Conference of Young Medical Researchers, Wrocław, Polska
2. 2016 **Berk K**, Powirtowska M. *Micturition disorders as the first symptom on multiple pituitary hormone deficiency caused by craniopharyngioma- case report*. 3rd Lublin International Medical Congress for Students and Young Doctors. Lublin, Polska
3. 2016 Drygalski K,Charytoniuk T,Łowska N,**Berk K**. *Dexamethasone affects saturation index and intracellular lipid composition in primary rat hepatocytes in lipid overload*. 11th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Polska
4. 2016 Charytoniuk T,Drygalski K,**Berk K**,Łowska N. *The effect of dexamethasone on intrahepatic fatty acid transport and sphingolipid concentration in the presence of lipid overload in primary rat hepatocytes*. 11th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Polska
5. 2017 **Berk K**,Konstantynowicz-Nowicka K. *Is it possible that enterolactone intensify production of proinflammatory fatty acids in hepatocytes?* Acta Medica Marisiensis, Targu Mures, Rumunia
6. 2018 **Berk K**,Posmyk R. *Tacy sami a jednak różni - Zespół Beckwitha-Wiedemanna u jednego z bliźniąt monozygotycznych*. I Poznańska Studencka Konferencja Perinatologiczna "In et ex utero", Poznań, Polska
7. 2019 **Berk K**. *The effect of preptin on hepatocytes lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease*. LXXIII International Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists "Actual problems of modern medicine and pharmacy 2019", Mińsk, Białoruś
8. 2019 Charytoniuk T,**Berk K**,Konstantynowicz-Nowicka K. *Cannabidiol (CBD) as a new therapeutic approach for the brain sphingolipid accumulation*. Medical International Conference for Students "Medics". Bukareszt, Rumunia
9. 2019 **Berk K**. *Czy może mało oczywiste stać się oczywistym? Trisomia 18- w nietypowym wydaniu*. II Poznańska Studencka Konferencja Perinatologiczna "In et ex utero". Poznań, Polska
10. 2019 **Berk K**. *The effect of preptin on hepatocytes lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease* LXXIII International Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists "Actual problems of modern medicine and pharmacy 2019", Mińsk, Białoruś
11. 2019 Szewczak B,**Berk K**. *Noworodek z cechami zespołu Cornellii de Lange - zawiłości diagnostyki prenatalnej*. II Poznańska Studencka Konferencja Perinatologiczna "In et ex utero". Poznań, Polska
12. 2021 **Berk K**. *Ocena wpływu kannabidiolu na zawartość sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą*

bogatotłuszczową. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021. "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju." Lublin, Polska

13. 2022 **Bałydga P, Berk K**, *An unusual case of 18 trisomy in the usual world - follow-up of a 4-year-old boy with Edwards Syndrome*. European Conference Health and education outcomes of children across Europe with congenital anomalies, Poznan, Polska
14. 2022 **Berk K, Posmyk R**, *An unknown case of congenital kidney defect, severe microcephaly, and intellectual disability*, 32nd European Meeting on Dysmorphology. Barcelona, Hiszpania

Nagrody

- 2019 Wyróżnienie Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- 2019 Nagroda Prorektora ds. Nauki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za wybitne osiągnięcia naukowe
- 2016 Stypendium Ministra Zdrowia za wybitne osiągnięcia
- 2015-2018 Stypendium Naukowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Staż zagraniczne

- 2018 Kinderheilkunde, Päd. Nieren- Leber- und Stoffwechselerkrankungen, Klinikum der Medizinische Hochschule, Hannover, Niemcy;
- 2017 Department of Neonatology, Policlinico Universitario Fondazione Agostino Gemelli, Rzym, Włochy;
- 2016 Centro Integrado de Cirurgia de Ambulatoria, Porto, Portugalia

Udział w projektach naukowych

- 2021 Kierownik „Wpływ kannabidiolu (CBD) na metabolizm sfingolipidów i insulinowrażliwość podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej u szczurów z insulinopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową” nr projektu SUB/1/DN/21/007/1118
- 2020 Kierownik „Wpływ kannabidiolu (CBD) na dokomórkowy transport długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową” nr projektu SUB/1/DN/20/002/1118
- 2021 Wykonawca „Podłoże genetyczne w zespołach „Overgrowth” w populacji polskiej i litewskiej: podstawa szybkiej ścieżki diagnostycznej, jako prewencja nowotworów”, GOSPL, NCN/1/DA/21/001/1106
- 2019 Wykonawca „Wpływ preptyny na rozwój insulinoporności i wewnątrzkomórkową zawartość lipidów w komórkach HepG2 w warunkach otyłości” MNS/1/SD/19/001/999

Praca w kołach naukowych:

- Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego „Kreatywny Fizjolog” przy Zakładzie Fizjologii UMB, 2014-2018
- Członek Studenckiego Koła Naukowego Przy Klinice Pediatrii i Nefrologii UDSK, 2016-2018
- Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego Przy Klinice Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka, USK 2017-2018

Udział w organizacjach studenckich/ naukowych:

- 2015-2016 Skarbnik Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Medycyny IFMSA-Poland Oddział Białystok
- 2015-2019 Członek Rady Wydziału, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
- Od 2022 Członek Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka

Zestawienie publikacji

Rodzaj	Liczba	IF	MEiN
Prace oryginalne <u>włączone do rozprawy</u>	1	6,208	140
Prace przeglądowe <u>włączone do rozprawy</u>	1	4,964	140
Prace oryginalne niewłączone do rozprawy	9	33,108	655
Prace przeglądowe niewłączone do rozprawy	4	16,649	325
Streszczenia zjazdowe	14	-	-
RAZEM	<u>29</u>	<u>60,929</u>	<u>1260</u>

Rozprawa doktorska

Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową.

lek. Klaudia Katarzyna Berk

Promotor pracy: prof. dr hab. Adrian Chabowski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka

1. Artykuły stanowiące cykl prac włączonych do rozprawy doktorskiej

Nazwa czasopisma	Tytuł artykułu	IF	MEiN	Data publikacji	Rodzaj publikacji
Journal of Clinical Medicine	Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment	4,964	140	20.01.2021	Publikacja nr 1- praca przeglądowa
International Journal of Molecular Sciences	Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats	6,208	140	11.05.2022	Publikacja nr 2- praca oryginalna

2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

- 2-OG (ang. *2-oleoylglycerol*) – 2-oleoiloglicerol
- 2-LG (ang. *2-linoleoylglycerol*) – 2-linoleoiloglicerol
- AA (ang. *arachidonic acid*) – kwas arachidonowy
- AEA (ang. *N-arachidonylethanolamine*) – N-arachidonoilo-etanoloamina
- ASAH (ang. *ceramidase*) – ceramidaza
- ASAH1 (ang. *acid ceramidase*) – kwaśna ceramidaza
- ASAH2 (ang. *neutral ceramidase*) – obojętna ceramidaza
- ASAH3 (ang. *alkaline ceramidase*) – zasadowa ceramidaza
- BCA (ang. *bicinchoninic acid*) – kwas bicynchoninowy
- BM-MSC (ang. *bone marrow mesenchymal stem cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego
- BSA (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina bydłęca
- CB1R, 2 (ang. *cannabinoid receptor 1, 2*) – receptor kannabinoidowy 1, 2
- CER (ang. *ceramide*) – ceramid
- CerS2, 4, 6 (ang. *ceramide synthase 2, 4, 6*) – syntaza ceramidu 2, 4, 6
- CoA (ang. *coenzyme A*) – koenzym A
- COX-1, -2 (ang. *cyclooxygenase-1, -2*) – cyklooksygenaza 1, 2
- CPT1 (ang. *carnitine palmitoyltransferase 1*) – palmitoilotransferaza karnitynowa
- DAG (ang. *diacylglycerols*) – diacyloglicerole
- DGAT1, 2 (ang. *diacylglycerol acyltransferase 1, 2*) – acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, 2
- DNL (ang. *de novo lipogenesis*) – lipogeneza *de novo*
- ECS (ang. *endocannabinoid system*) – układ endokannabinoidowy
- FA (ang. *fatty acids*) – kwasy tłuszczowe
- FAAH (ang. *fatty acid amide hydrolase*) – hydrolaza amidu kwasu tłuszczowego
- FABPpm (ang. *plasma membrane fatty acid binding protein*) – błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
- FAT/CD36 (ang. *fatty acid translocase*) – translokaza kwasów tłuszczowych
- FATP2 (ang. *fatty acid transport protein 2*) – białko transportujące kwasy tłuszczowe 2
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydłęca |
- FFA (ang. *free fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe
- G3P (ang. *glycerol 3 phosphate*) – glicerolo 3 fosforan
- GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
- GLC (ang. *gas-liquid chromatography*) – chromatografia gazowo-cieczowa

GLUT4 (ang. *glucose transporter 4*) – transporter glukozy 4
GSK3 β (ang. *glycogen synthase 3 β*) – syntaza glikogenu 3 β
HFD (ang. *high-fat diet*) – dieta bogatotłuszczowa
HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
HOMA-IR (ang. *homeostasis model assessment of insulin resistance*)
HRP (ang. *horseradish peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa
HSL (ang. *hormone sensitive lipase*) – lipaza wrażliwa na hormony
IL-6 (ang. *interleukin-6*) – interleukina 6
IR (ang. *insulin resistance*) – insulinooporność
IRS (ang. *insulin receptor substrate*) – substrat receptora insulinowego
LCFA (ang. *long chain fatty acids*) – długołańcuchowe kwasy tłuszczowe
LOX (ang. *lipoxygenase*) – lipooksygenaza
LPL (ang. *lipoprotein lipase*) – lipaza lipoproteinowa
MAG (ang. *monoacylglycerol*) – monoacyloglicerol
MAGL (ang. *monoacylglycerol lipase*) – lipaza monoacyloglicerynowa
NAFLD (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*) – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby
NASH (ang. *non-alcoholic steatohepatitis*) – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby
OEA (ang. *Oleoylethanolamide*) – oleoiloetanolamina
PEA (ang. *palmitoylethanolamide*) – palmitoiloetanolamina
PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PIP3 (ang. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan
PI3K (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase*) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKB/Akt (ang. *protein kinase B*) – kinaza białkowa B
PL (ang. *phospholipids*) – fosfolipidy
PLIN (ang. *perlipin*) – perlipina
PPAR α , γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α , γ
PUFA (ang. *polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe
RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) – bufor radioimmunoprecypitacyjny
S1P (ang. *sphingosine-1-phosphate*) – sfingozyno-1-fosforan
SA1P (ang. *sphinganine-1-phosphate*) – sfinganino-1-fosforan
SAT (ang. *subcutaneous adipose tissue*) – podskórna tkanka tłuszczowa
SD (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe
SFA (ang. *sphinganine*) – sfinganina
SFO (ang. *sphingosine*) – sfingozyna
SPHK (ang. *sphingosine kinase*) – kinaza sfingozyny

SPHK1, 2 (ang. *sphingosine kinase 1, 2*) – kinaza sfingozyny 1, 2
SPT (ang. *serine palmitoyltransferase*) – palmitylotransferaza serynowa
SPTLC1, 2 (ang. *serine palmitoyltransferase 1, 2*) – palmitylotransferaza serynowa 1, 2
TAG (ang. *triacylglycerols*) – triacyloglicerole
TBST (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*) – sól fizjologiczna buforowana tris-em z Tween-20
TLC (ang. *thin-layer chromatography*) – cienkwarstwowa chromatografia cieczowa
TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α
TRP (ang. *transient receptor potential channel*) – receptor przejściowego potencjału
TRPV2 (ang. *transient receptor potential vanilloid type 2*) – receptory waniloidowe przejściowego potencjału 2
VAT (ang. *visceral adipose tissue*) – trzewna tkanka tłuszczowa
VLDL (ang. *very low-density lipoprotein*) – lipoproteina o bardzo niskiej gęstości

3. Wstęp

Szczegółowy opis problematyki badawczej związanej z wpływem kannabidiolu na metabolizm sfingolipidowy w obu typach tkanki tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością wywołaną dietą bogatotłuszczową znajduje się w niżej wymienionej publikacji włączonej do rozprawy:

Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5382.

Berk, K. Konstantynowicz-Nowicka, K. Charytoniuk, T. Harasim-Symbor, E. Chabowski, A.

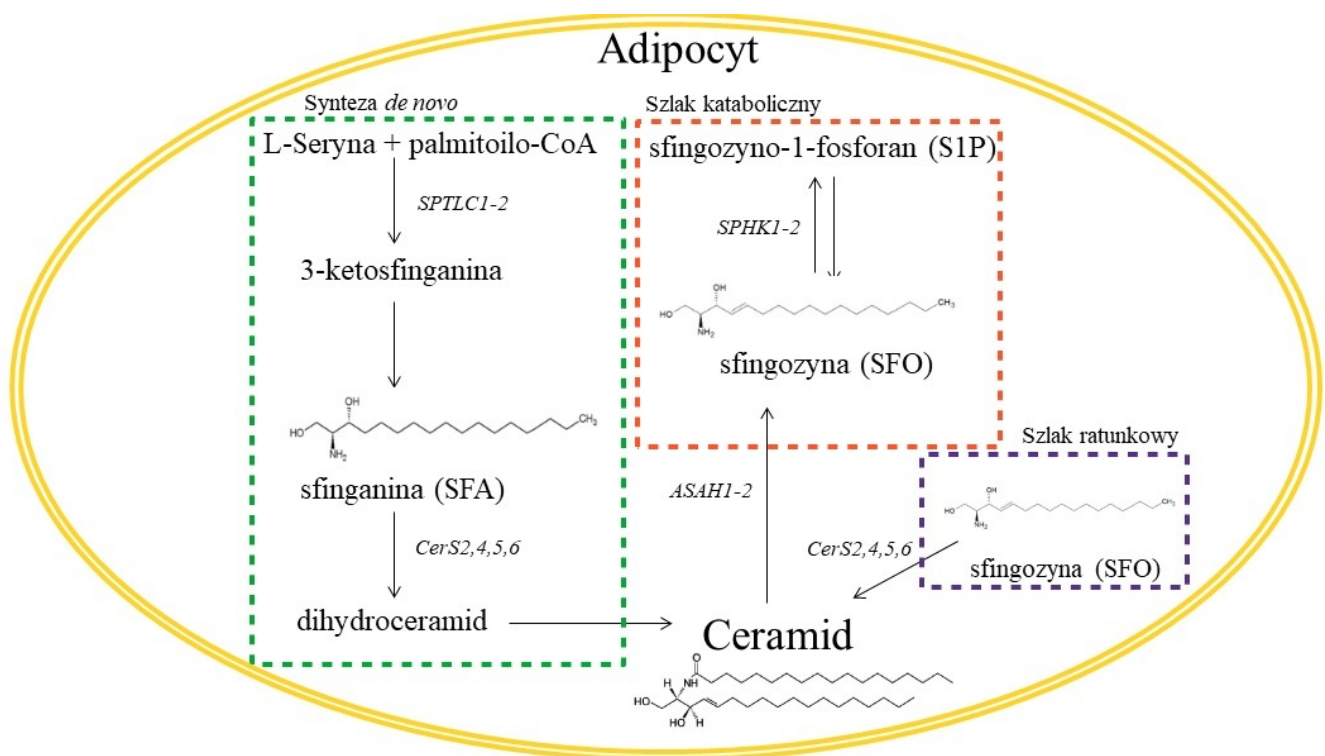
Otyłość definiowana jest jako stan nadmiernej akumulacji lipidów w organizmie człowieka, wynikająca z zachwiania równowagi pomiędzy ilością pozyskiwanej i wydatkowanej energii. W XXI wieku otyłość oraz choroby współistniejące stały się globalnym problemem zdrowotnym, co wygenerowało potrzebę nowych i bezpieczniejszych interwencji terapeutycznych [1]. Jedną z chorób współistniejących jest insulinooporność (IR). Jest to stan upośledzonej odpowiedzi biologicznej ważnych narządów metabolicznych (wątroby, mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej) na działanie insuliny krążącej we krwi, co zaburza gospodarkę węglowodanów, lipidów i białek [2,3]. Głównym rezerwuarem lipidów w organizmie (ok. 65-70%) jest tkanka tłuszczowa, która została podzielona ze względu na anatomiczne umiejscowienie przede wszystkim na podskórną (SAT) i trzewną (VAT) tkankę tłuszczową [4]. Depozyty te wykazują znaczne różnice morfologiczne, metaboliczne i funkcjonalne [5]. U zdrowych, szczupłych osób, SAT stanowi około 80% depozytów tłuszczu oraz jest fizjologicznym „buforem dla energii” w okresach ograniczonego wydatku energetycznego [6]. Tłuszcz zlokalizowany w jamie otrzewnowej został sklasyfikowany jako tkankowy, krezkowy i zaotrzewnowy. Szczupłe, zdrowe osoby nie mają dużych ilości tłuszczu trzewnego, który w dużej mierze należy do kategorii „tłuszczu ekotopowego”. Tkanka tłuszczowa trzewna jest wysoce aktywna metabolicznie, stale uwalnia wolne kwasy tłuszczowe (FFA) do krążenia wrotnego stając się tym samym źródłem lipidów dla innych tkanek. Otyłość trzewna wynikająca z akumulacji lipidów w VAT przyczynia się do rozwoju zespołu metabolicznego charakteryzującego się cechami takimi jak hiperinsulinemia, ogólnoustrojowy stan zapalny, dyslipidemia i miażdżyca tętnic [7].

3.1. Metabolizm lipidów i sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa działa jako „centrum” bilansu energetycznego, które integruje wymagania energetyczne pozostałych narządów wewnętrznych, takich jak wątroba, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, trzustka oraz mózg [8]. W okresie dodatniego bilansu energetycznego adipocyty akumulują wolne kwasy tłuszczowe głównie (90-99%) pod postacią

triacylogliceroli (TAG) [9]. Kwasy tłuszczowe mogą pochodzić z dwóch różnych źródeł tj. z krążących TAG i/lub lipogenezy *de novo* (DNL) [10]. Krążące TAG są pierwotnie syntezowane w wątrobie i pakowane do lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL). Kiedy lipoproteiny przemieszczają się do tkanki tłuszczowej, TAG ulegają hydrolizie do niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) głównie przez stymulowane insuliną działanie lipazy lipoproteinowej (LPL) w śródbłonku naczyń tkanki tłuszczowej [11]. Uwolnione NEFA przechodzą przez błonę komórkową adipocytów na drodze biernej dyfuzji lub przy udziale białek transportowych takich jak: translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36), białka transportujące kwasy tłuszczowe (FATP 1 i 4), błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm) [12,13]. Jednocześnie, insulina stymuluje wychwyt glukozy przez adipocyty, co napędza proces DNL. Kwasy tłuszczowe zostają przekształcone w TAG w procesie estryfikacji przy użyciu glicero-3-fosforanu (G3P) – substratu uzyskanego podczas glukoneogenezy [14]. Podskórna tkanka tłuszczowa cechuje się większym współczynnikiem syntezy TAG przez co magazynuje ich więcej niż tkanka tłuszczowa wisceralna. Wynika to z faktu obecności większej ilości receptorów insulinowych, większej aktywności LPL i mniejszej odpowiedzi lipolitycznej na katecholaminy w adipocytach podskórnych depozytów w porównaniu do komórek tłuszczowych zlokalizowanych w okolicach narządów wewnętrznych [15,16]. W okresie zwiększonego zapotrzebowania energetycznego tj. głodzenia i wysiłku fizycznego, adipocyty mobilizują zmagazynowany tłuszcz do zaspokojenia potrzeb energetycznych innych narządów poprzez lipolizę, w której każda cząsteczka TAG ulega hydrolizie do diacylogliceroli (DAG) i monoacylogliceroli (MAG). Końcowymi produktami lipolizy są trzy cząsteczki kwasów tłuszczowych i jedna cząsteczka glicerolu [9]. Uwolnione kwasy tłuszczowe mogą ulec procesowi β -oksydacji w wątrobie, mięśniach szkieletowych lub tkance tłuszczowej, a glicerol może zostać wykorzystany jako prekursor glukoneogenezy w wątrobie [17]. W adipocytach etapem ograniczającym szybkość β -oksydacji jest transport acyl-CoA do mitochondriów w obecności, palmitoilotransferazy karnitynowej (CPT1). Zmniejszenia aktywności CPT-1, nadmiar kwasów tłuszczowych i/lub inne dysfunkcje mitochondriów skutkują szkodliwym wpływem na różnicowanie adipocytów, metabolizm lipidów, wrażliwość komórek na insulinę, zdolność oksydacyjną i proces termogenezy co w konsekwencji prowadzi do rozwoju chorób metabolicznych [18]. Co więcej, kwasy tłuszczowe powstałe w procesie hydrolizy TAG, mogą być również substratami do syntezy innych frakcji lipidowych m.in. sfingolipidów, które stanowią obligatoryjny składnik wszystkich błon eukariotycznych [19]. Ceramid (CER) uważany jest za centralny punkt w procesach przemiany sfingolipidów obejmujących szlak kataboliczny, anaboliczny i syntezy *de novo* [20]. Główną drogą powstawania ceramidów jest szlak syntezy *de novo*, w którym zachodzi kondensacja seryny i palmitoil-CoA powstałego z połączenia kwasu palmitynowego i koenzymu A (CoA). W procesie tym, regulowanym przez aktywność enzymu palmitoilotransferazy serynowej

(SPT) dochodzi do powstania 3-ketosfinganiny, która zostaje przekształcona do sfinganiny (SFA) (reakcja katalizowana przez reduktazę 3-ketosfinganiny) [21]. Następnie, poprzez przyłączenie reszty acetylowej do SFA powstaje dihydroceramid, który w procesie desaturacji zostaje przekształcony do ceramidu. Kolejnym szlakiem syntezy ceramidu jest proces hydrolizy błonowej sfingomieliny katalizowany przez obojętną i zasadową sfingomielinazę (N-SMase i Alk-Smase). Dodatkowo, CER może być również wytwarzany z rozpadu sfingozyiny (SFO) poprzez działanie syntazy ceramidu (CerS1-6) w tzw. szlaku ratunkowym, który odpowiada nawet za 90% całkowitej biosyntezy sfingolipidów [22]. Powstały CER ulega degradacji przy udziale ceramidaz (ASAHI, ASAHI2) w kierunku sfingozyiny (SFO), która może powrócić na szlak sfingolipidowy lub ulec reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazy sfingozyiny (SPHK1, SPHK2) do sfingozyino-1-fosforanu (S1P) [19] (Ryc. 1). Bioaktywne metabolity sfingolipidów, przede wszystkim ceramid (CER) i sfingozyino-1-fosforan (S1P) regulują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne i metaboliczne w adipocytach oraz stanowią ważne mediatory w rozwoju patologicznych następstw otyłości [23,24].



Ryc. 1 Szlaki metabolizmu sfingolipidów.

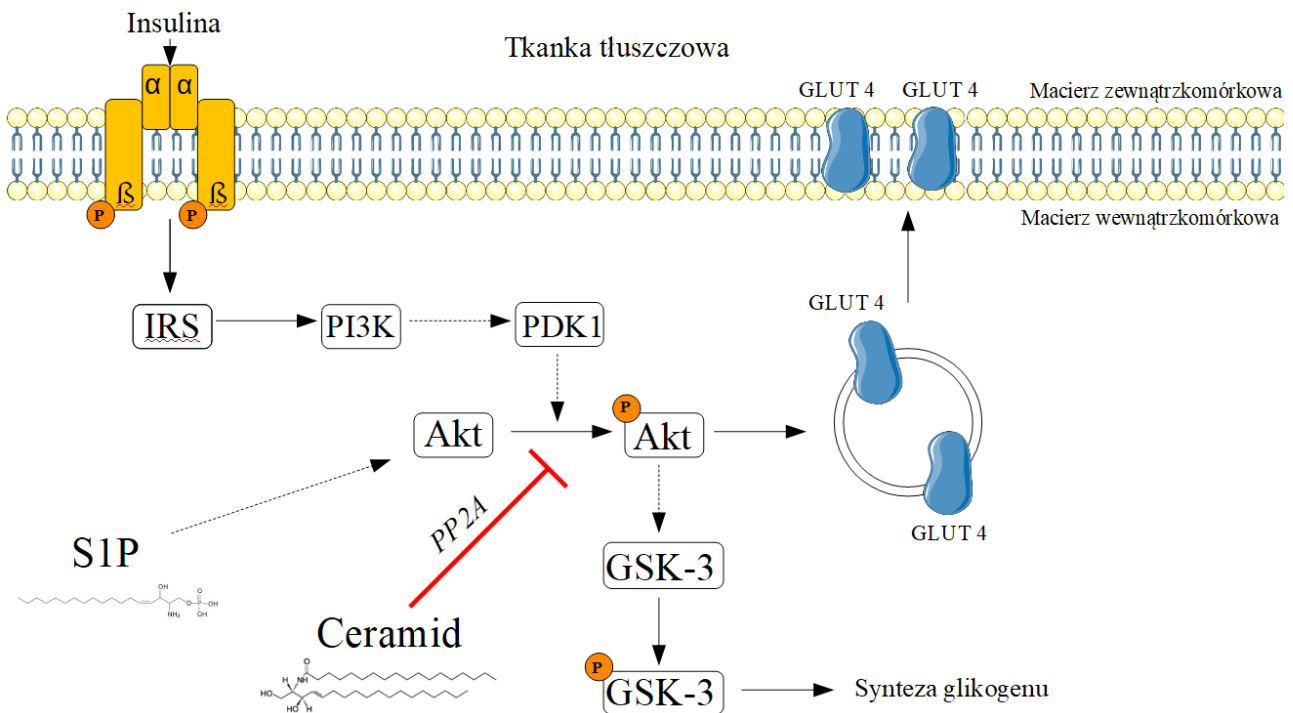
3.2. Szlak insulinowy IRS1/PI3K/Akt w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej

Wiadomym jest, że wrażliwość adipocytów na insulinę pośrednio reguluje czynność wątroby i mięśni poprzez modulację ogólnoustrojowej homeostazy węglowodanowo-lipidowej [25]. Duża pula lipidów w tkance tłuszczowej spowodowana nadmiernym dokomórkowym napływem niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) prowokuje hipertrofię adipocytów i hiperlipolityczny fenotyp oporności na insulinę związany z dysfunkcją wewnątrzkomórkowego szlaku IRS1/PI3K/Akt [26]. W biologicznym działaniu insuliny w tkance tłuszczowej pośredniczą błonowe, swoiste receptory insulinowe (IR) o aktywności kinazy tyrozynowej, które fosforylują reszty tyrozynowe białek docelowych takich jak substraty receptora insuliny 1 i 2 (insulin receptor substrate, IRS 1/2) oraz izoformy białka Shc które są głównie zaangażowane w aktywację kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAP) i są sprzężone z efektami mitogennymi [27]. Fosfotyrozynowe formy IRS1/2 aktywują szlak sygnałowy 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), co generuje metaboliczną odpowiedź na hormon [28]. Fosfatydyloinozytolo-3,4,5-fosforan (PIP3) powstały przez aktywację PI3K, reguluje aktywację kinazy 1 zależnej od fosfoinozytydu (PDK1), która z kolei aktywuje białkową kinazę B (protein kinase B, PKB), zwaną białkiem Akt. Fosforylowana w serynie 473 forma Akt (pAkt Ser473), intensyfikuje translokację, zakotwiczenie i fuzję w błonie komórkowej adipocytów pęcherzyków z transporterem glukozy 4 (glucose transporter type 4, GLUT4) co nasila dokomórkowy transport glukozy [29]. Co więcej, pAkt hamuje fosforylację kinazy glikogenu 3 (pGSK3 β Ser9). GSK3 reguluje aktywność enzymatyczną syntazy glikogenu odpowiedzialnej za biosyntezę glikogenu, jak też katalizuje fosforylację substratów zaangażowanych w syntezę białek, proliferacji i różnicowanie komórek [30] (Ryc. 2). Ponadto, pAkt zmniejsza lipolizę tkanki tłuszczowej poprzez aktywację fosfodiesterazy 3B (PDE3B) obniżając poziom 3',5'-cyklicznego adenylozomonodifosforanu (cAMP) i hamując aktywność kinazy białkowej A (PKA), która fosforyluje dwa kluczowe enzymy zaangażowane w proces hydrolizy TAG: lipazę hormonowrażliwą (ang. Hormone Sensitive Lipase, HSL) oraz perlipinę (PLIN) [15]. Insulina stymuluje również magazynowanie lipidów w adipocytach poprzez dwa skoordynowane procesy: lipogenezę poprzez aktywację enzymów lipogennych, takich jak karboksylaza acetylo-CoA [31] i liaza ATP-cytrynianowa [18] oraz tworzenie szkieletu glicerydowego TAG z glukozy uzyskanej w procesie glikolizy [33].

Do aktywnych biologicznie lipidów, które wpływają na aktywność enzymatyczną białek zaangażowanych w szlak przekaźnictwa insulinowego należą DAG, CER i S1P. DAG pełni rolę wtórnych przekaźników regulujących procesy proliferacji i różnicowania komórek. Ich nadmierna akumulacja w adipocytach prowadzi do aktywacji poszczególnych izoform kinazy białkowej C (PKC) co upośledza proces translokacji GLUT4 do błony komórkowej [26]. Zaobserwowano, że

u osób otyłych oraz otyłych z insulinoopornością istnieje dodatnia korelacja między całkowitą zawartością DAG w podskórnej tkance tłuszczowej a HOMA-IR [34]. Wciąż jednak nie wiadomo, w jaki sposób diacyloglicerole przyczyniają się do rozwoju insulinooporności tkanki tłuszczowej. Zwiększona zawartość ceramidów w hepatocytach, mięśniach szkieletowych i adipocytach osób z otyłością i insulinoopornością wynika z nadmiernej ilości NEFA – substratów w procesie syntezy ceramidów *de novo* [35–37]. Wykazano, że koncentracja ceramidów w podskórnej tkance tłuszczowej jest wyższa u otyłych pacjentek z T2DM w porównaniu z otyłymi pacjentkami bez insulinooporności [38]. Wiadomo, że u myszy z otyłością indukowaną dietą bogatotłuszczową po podaniu inhibitora enzymów szlaku syntezy *de novo* ceramidu, zahamowanie jego produkcji, poprawia komórkową wrażliwość na insulinę w adipocytach [39]. Ceramid hamuje działanie szlaku insulinowego głównie poprzez interakcję z fosfatazą białkową 2A (PP2A) odpowiadająca za defosforylację białka Akt [34]. Inhibicja szlaku sygnałowego Akt/PKB, prowadzi do zmniejszenia translokacji GLUT4 do błony plazmatycznej co finalnie zmniejsza komórkowy wychwyt glukozy. Zauważono także, że akumulacja ceramidów w tkance tłuszczowej w otyłości z towarzyszącą insulinoopornością zaburza działanie insuliny powodując zmniejszenie hamowania lipazy hormonowrażliwej (HSL) co skutkuje zwiększonym stężeniem FFA w osoczu [41].

Kolejną bioaktywną molekułą z grupy sfingolipidów, która wpływa na białka ze szlaku insulinowego jest S1P. Związek ten działa poprzez receptory S1PR1-5, które są sprzężone z białkiem G. Aktywacja receptorów S1PR moduluje proces adipogenezy, wzrost komórek, apoptozę jak również eskaluje rozwój stanu zapalnego w tkance tłuszczowej [42]. Zahamowanie osi S1P/SphK1 w modelu zwierzęcym, promuje adipogenezę oraz wzrost ekspresji cytokin przeciwzapalnych (IL-10 i adiponektyny), zmniejsza infiltrację makrofagów tkanki tłuszczowej i ekspresję cytokin prozapalnych (TNF α , IL-6) co związane jest ze zwiększeniem sygnalizacji insulinowej w adipocytach i mięśniach szkieletowych oraz poprawą ogólnoustrojowej wrażliwości na insulinę i tolerancję glukozy [43].



Ryc. 2 Interakcja sfingolipidów z insulinowym szlakiem przekazywania sygnału. Czerwonym kolorem oznaczono które elementy w insulinowym szlaku przekazywania sygnału są zaburzone przez sfingolipidy. Linia ciągłą oznacza wpływ bezpośredni natomiast przerywana pośredni za pośrednictwem kilku innych białek sygnałowych.

3.3. Rola endokannabinoidom w modulowaniu gospodarki węglowodanowo-lipidowej

W ciągu ostatniej dekady endokannabinoidom (eCBome) wzbudził duże zainteresowanie w kontekście chorób metabolicznych [44]. Jest to wewnętrzny system sygnalizacyjny zaangażowany w wiele procesów fizjologicznych, w tym funkcje kognitywne, proces zapamiętywania, odczuwanie bólu, regulację snu, termogenezę, modulację odpowiedzi immunologicznej oraz kontrolę gospodarki energetycznej [45]. Endokannabinoidom odgrywa kluczową rolę w fizjologicznej regulacji homeostazy organizmu, pobudzaniu łaknienia, a także przesuwaniu bilansu energetycznego w kierunku magazynowania energii, poprzez działanie na ośrodkowy układ nerwowy oraz na tkanki obwodowe takie jak adipocyty, hepatocyty, komórki wysp trzustkowych, przewód pokarmowy i mięśnie szkieletowe [46,47]. Konserwatywną część endokannabinoidom stanowi układ endokannabinoidowy (ang. endocannabinoid System, ECS)

obejmujący receptory kannabinoidowe CB1R i CB2R, ich lipidowe ligandy, N-arachidonoilo-etanolamina (AEA) i 2-arachidonoyl glicerolu (2-AG), a także enzymy biorące udział w ich metabolizmie [48]. AEA i 2-AG wytwarzane są w między innymi w błonie komórek neuronu postsynaptycznego z omega 6 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W ich biosyntezie bierze udział fosfolipaza, a w inaktywacji tych związków odpowiednio: hydrolaza amidu kwasu tłuszczowego (FAAH) i lipaza monoacyloglicerynowej (MAGL). Produktem degradacji są kwas arachidonowy (AA) i etanolamina. AEA i 2-AG działają para- i autokrynnie poprzez receptory CB1R i CB2R, które są receptorami sprzężonymi z białkiem G (ang. G protein coupled receptors, GPCRs) [49]. CB1R jest najczęstszym receptorem GPCR w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków [50]. Największe zagęszczenie CB1R występuje w strukturach węchowych mózgu i hipokampie. Dodatkowo, CB1R jest obecny w korze zakrętu obręczy oraz korze czołowej i ruchowej. W jądrze migdałowatym, prążkowiu, głębokich jądrach mózdzku, pniu mózgu, rdzeniu kręgowym, międzymózgowiu i podwzgórzu, kumulacja CB1R jest stosunkowo niska [51]. Poza tym, CB1R znajduje się w adipocytach, mięśniach szkieletowych, nadnerczach, trzustce, wątrobie, komórkach przewodu pokarmowego i innych tkankach obwodowych [52]. Historycznie, CB2R uważany był za receptor obwodowy zlokalizowany głównie w komórkach odpornościowych. Jednakże, na początku XXI wieku potwierdzono obecność CB2R w strukturach mózgu, takich jak prążkowie, podwzgórze, kora mózgowa, hipokamp, ciało migdałowate i istota czarna [53]. Niemniej jednak, CB2R występuje przede wszystkim na powierzchni makrofagów, osteocytów, osteoklastów, komórek Kupffera i limfocytów B przez co odgrywa istotną rolę w procesach zapalnych [44,45]. Poszerzenie koncepcji układu endokannabinoidowego do endokannabinoidomu było spowodowane odkryciem wielu innych mediatorów pochodzących z kwasów tłuszczowych, takich jak N-palmitoilo-, N-oleoilo-etanolamina (PEA, OEA), 2-oleoilo-, 2-linoleoiloglicerol (2-OG, 2-LG), i eter 2-arachidonoilogliceryny (2-AGE, eter noladyny), które działają m.in na receptory sprzężone z białkiem G takie jak GPR55, receptory waniloidowe przejściowego potencjału (TRPV) i receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów α i γ (PPAR α i PPAR γ) [45,56]. Wiadomo, że diety bogatotłuszczowe (~40% energii pochodzącej z tłuszczu) niezależnie od składu poszczególnych kwasów tłuszczowych modulują endokannabinoidom poprzez modulację ekspresji receptorów, poziomu endokannabinoidów oraz powodowanie specyficznych w zależności od rodzaju tkanki zmian w ekspresji enzymów anabolicznych i katabolicznych [57,58]. Wykazano, że poziom krążącego 2-AG jest podwyższony u osób z otyłością co koreluje z akumulacją trzewnej tkanki tłuszczowej, która cechuje się zwiększoną ekspresją CB1R oraz obniżoną ekspresją FAAH w porównaniu do tkanki tłuszczowej podskórnej [59]. Aktywacja receptora CB1 w tkance tłuszczowej wykazuje wielokierunkowe efekty. Jednym z nich jest udział w promowaniu różnicowania i dojrzewania adipocytów czemu

towarzyszy wzrost ekspresji receptorów PPAR- γ [60]. W kontekście metabolizmu lipidowego, eksperyment przeprowadzony na modelu mysim wykazał że stymulacja CB1R aktywuje działanie lipazy lipoproteinowej, która dostarcza egzogenne kwasy tłuszczowe do syntezy triacylogliceroli [61]. Z drugiej strony, zahamowanie aktywności cAMP za pośrednictwem receptora CB1 zmniejsza lipolizę i stymuluje produkcję TAG [60]. Co więcej, badania *in vitro* ujawniły, że aktywacja CB1R zwiększa zarówno podstawowy jak i stymulowany insuliną wychwyty glukozy przez wyizolowane komórki z trzewnej tkanki tłuszczowej m.in. wpływając bezpośrednio na translokację transportera glukozy typu 4 (GLUT4) do błony komórkowej [62,63]. Wszystko to w warunkach nadmiernej aktywacji ECS prowadzi do dyslipidemii tj. wzrostu TAG i lipoprotein o małej gęstości (LDL) w surowicy i odgrywa kluczową rolę w rozwoju insulinooporności (IR) a w konsekwencji także i zespołu metabolicznego [64]. Dlatego też stale poszukuje się substancji mogących poprzez interakcję z eCBome leczyć choroby związane z nadmierną akumulacją lipidów. W ostatniej dekadzie, pojawiły się doniesienia literaturowe o wpływie fitokannabinoidów na poszczególne składniki endokannabinidomu [45] co zwiększyło zainteresowanie potencjalnym działaniem terapeutycznym tych związków w leczeniu otyłości.

3.4. Rola kannabidiolu w regulacji metabolizmu węglowodanowo-lipidowego komórek podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej

Kannabidiol (CBD) jest organicznym związkiem chemicznym z grupy fitokannabinoidów pochodzącym z konopii siewnej (*Cannabis sativa*), pozbawionym potencjału uzależniającego [65]. Farmakokinetyka CBD oraz obserwowane efekty zależą od postaci i drogi podania. Podawany doustnie jest metabolizowany przez szereg wątrobowych izoenzymów cytochromu P450. Ze względu na swój wysoce lipofilny charakter, może gromadzić się w tkance tłuszczowej, z której zostaje powoli uwalniany do krwioobrotu w dawce subterapeutycznej aby zostać zmetabolizowany przez układ żółciowy i nerkowy [66]. Kannabidiol (CBD) jest dobrze znany ze swoich właściwości przeciwpyschotycznych, przeciwlękowych, uspokajających, przeciwpadaczkowych i przeciwbólowych [67,68]. Jest również jednym z najlepiej poznanych fitokannabinoidów, który moduluje homeostazę węglowodanów i lipidów głównie poprzez interakcję z receptorami endokannabinidomu [69]. Szerokie spektrum działania CBD obejmuje receptory CB1 i CB2 oraz GPR18, GPR55, GPR 119, 5HT1A i TRPV2 [69]. W kontekście bezpośredniego działania na tkankę tłuszczową, Silvestri i wsp. wykazali, że CBD w sposób zależny od dawki i czasu zmniejsza akumulację wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli w adipocytach 3T3-L1 poddanych działaniu kwasu oleinowego [70]. Ponadto, badanie *in vitro* przeprowadzone również na adipocytach 3T3-L1 potwierdziło, że CBD poprzez nasilenie procesu mitochondrialnego utleniania kwasów tłuszczowych oraz aktywację szlaku beta adrenergicznego zmniejsza ilość lipidów

magazynowanych w komórkach tłuszczowych [71]. W aspekcie gospodarki węglowodanowej wykazano, że syntetyczny analog CBD poprawia kontrolę glikemii w mysim modelu cukrzycy typu 1, powodując zmniejszenie stężenia glukozy i glukagonu oraz normalizując poziom insuliny i profil lipidowy w osoczu [72]. Co więcej, wiadomo, że CBD znacznie zmniejsza występowanie i opóźnia początek jawnej cukrzycy u samic myszy szczepu NOD z cukrzycą o podłożu autoimmunologicznym [73]. Dodatkowo, badanie *in vitro* wykazało, że CBD zapobiega upośledzeniu szlaku insulinowego wywołanego palmitynianem w adipocytach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-MSC) [74]. Biorąc pod uwagę potencjalnie korzystne działanie CBD, może on znaleźć szerokie zastosowanie w leczeniu nie tylko otyłości ale także chorób metabolicznych z nią związanych.

4. Cele pracy

Rosnąca w ciągu ostatnich dekad globalna epidemia otyłości oraz powiązanej z nią insulinoporności stanowi wielowymiarowy problem zdrowotny. Jednym z kluczowych mechanizmów przyczyniających się do rozwoju insulinoporności jest nadmierna podaż kwasów tłuszczowych w diecie. Głównym magazynem lipidów w organizmie jest podskórna i trzewna tkanka tłuszczowa. Wrażliwość na insulinę obu tkankowych depozytów tłuszczu reguluje pośrednio ogólnoustrojową gospodarkę węglowodanowo-lipidową. Zgromadzone w nadmiarze kwasy tłuszczowe, estryfikowane są do złożonych frakcji lipidowych m.in. sfingolipidów. Do tej grupy związków należą dwie główne bioaktywne cząstki sygnałowe: ceramid (CER) i sfingozyno-1-fosforan (S1P). Ich nadmierna wewnątrzkomórkowa akumulacja indukuje dysfunkcyjny fenotyp adipocytów poprzez blokowanie szlaku przekazywania insulinowego oraz promowanie przewlekłego stanu zapalnego. Brak skutecznego leczenia otyłości i chorób współtowarzyszących doprowadził do szczegółowych badań farmakologicznych i fizjologicznych nad organicznymi związkami chemicznymi z grupy fitokannabinoidów pochodzących z konopii siewnej (*Cannabis sativa*). Badania sugerują, że substancje te, mogą stanowić cenne narzędzie terapeutyczne w minimalizowaniu niepoemyślnych skutków insulinoporności w kontekście chorób metabolicznych. Dlatego też, istotne wydało się określenie czy kannabidiol, jeden z najlepiej przebadanych fitokannabinoidów, poprzez wpływ na metabolizm sfingolipidów wywoła korzystny wpływ na insulinowrażliwość tkanki tłuszczowej. Biorąc pod uwagę różną aktywność metaboliczną trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej, działanie kannabidiolu na opisywane parametry zostało oznaczone w obu depozytach tkanki tłuszczowej. Szczegółowymi celami wykonanego projektu była ocena:

1. Wpływu podaży kannabidiolu na akumulację wybranych frakcji sfingolipidowych tj. sfingozyny (SFO), sfinganiny (SFA), ceramidu (CER), sfingozyno-1-fosforanu (S1P) i sfinganino-1-fosforanu (SFA1P) w depozytach tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową.
2. Wpływu podaży kannabidiolu na ekspresję białek enzymatycznych zaangażowanych w sfingolipidowy szlak syntezy *de novo* ceramidu (SPTLC1, SPTLC2), białek wspólnych dla szlaku ratunkowego i szlaku syntezy *de novo* (Cers2,4,5,6) oraz białek enzymatycznych ze szlaku katabolicznego ceramidu (ASAH1,ASAH2, SPHK1, SPHK2) w obu depozytach tkanki tłuszczowej.
3. Zmiany stopnia ekspresji białek całkowitych i ich form fosforylowanych z insulinowego szlaku przekąźnictwa sygnału pod wpływem działania kannabidiolu w depozytach tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową.

5. Materiały i metody

Szczegółowy opis metodyki badań w zastosowanym modelu eksperymentalnym znajduje się w niżej wymienionej publikacji włączonej do rozprawy:

Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5382.

Berk, K. Konstantynowicz-Nowicka, K. Charytoniuk, T. Harasim-Symor, E. Chabowski, A.

5.1. Model zwierzęcy

Zgodę na wykonanie badań na zwierzętach uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach przy Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (nr zgody 71/2018). Badanie zostało przeprowadzone na samcach szczurów szczepu Wistar, o początkowej masie 70-100g, które były przetrzymywane w pomieszczeniu o regulowanym cyklu dobowym (12h dzień, 12h noc), temperaturze ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) i wilgotności powietrza 35-60% z nieograniczonym dostępem do wody i standardowej diety dla gryzoni. Doświadczenie zostało wykonane po tygodniu aklimatyzacji. Zwierzęta podzielono losowo na 4 grupy eksperymentalne gdzie każda z grup składała się z 10 osobników. Liczebność grupy została obliczona przy pomocy analiz wykonywanych w serwisie internetowym (<http://www.biomath.info>, dostęp 1 stycznia 2021 r.). Wyodrębniono następujące grupy eksperymentalne:

I) kontrolna karmiona standardową paszą dla gryzoni (rozkład kcal = 62% węglowodanów, 16% tłuszczu i 22% białka, Labofeed B, Kcynia, Polska),

II) badana z insulinoopornością indukowaną poprzez podawanie diety bogatotłuszczowej (HFD, rozkład kcal = 20% węglowodanów, 59% tłuszczu i 21% białka; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) przez okres 7 tygodni, w ilości odpowiadającej dziennemu spożyciu kalorii zwierząt otrzymujących standardową karmę,

III) kontrolna otrzymująca dootrzewnowo kannabidiol w stężeniu 10 mg/kg m.c. w objętości 1 ml/kg,

IV) badana z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową (HFD) otrzymującą dootrzewnowo kannabidiol w stężeniu 10 mg/kg m.c. w objętości 1 ml/kg.

Iniekcje dootrzewnowe syntetycznego CBD (THC Pharm GmbH, Frankfurt, Niemcy) były wykonywane raz dziennie o tej samej porze dnia przez okres 14 następujących po sobie dni (szósty i siódmy tydzień eksperymentu). Bezpośrednio przed podaniem, CBD rozpuszczano w nośniku składającym się z etanolu, Tweenu-80 i 0,9% NaCl w ilościach odpowiednio 3:1:16. Na koniec eksperymentu szczury poddano anestezji poprzez wziewne podanie izofluranu. Próbkę podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej pobrane od uśpionych zwierząt, zostały zamrożone w temperaturze ciekłego azotu (-196°C) i były przechowywane do dalszej analizy w -80°C.

Szczegółowe analizy próbek trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej uzyskanych od zwierząt eksperymentalnych objęły badanie:

1. tkankowego stężenia sfinganiny (SFA), ceramidu (CER), sfingozyny (SFO), sfingozyno-1-fosforanu (S1P) i sfinganino-1-fosforanu (SFA1P) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC),
2. całkowitej ekspresji enzymów sfingolipidowego szlaku syntezy *de novo*: palmitoilotransferazy serynowej 1 i 2 (SPTLC1, SPTLC2) metodą Western Blot
3. całkowitej ekspresji enzymów sfingolipidowego szlaku katabolicznego: kinazy 1 i 2 sfingozyny (SPHK1 i SPHK2), kwaśnej i obojętnej ceramidazy (ASAH1, ASAH2) metodą Western Blot
4. całkowitej ekspresji enzymów zaangażowanych w sfingolipidowy szlak syntezy *de novo* jak i szlak ratunkowy: syntazy ceramidu 2, 4, 5 i 6 (CerS2, CerS4, CerS5 i CerS6) metodą Western Blot
5. całkowitej ekspresji białek: kinazy białkowej B (Akt) i kinazy syntazy glikogenu 3β (GSK3β) z sygnałowego szlaku insulinowego oraz ich fosforylowanych form: fosfokinazy białkowej B (pAkt (Ser473)) i fosfokinazy syntazy glikogenu 3β (pGSK3β (Ser9)) metodą Western Blot.

5.2. Analiza ekspresji enzymów ze szlaku metabolizmu sfingolipidów oraz wybranych białek i ich fosforylowanych form ze szlaku sygnalizacyjnego insuliny metodą Western Blot

W celu określenia całkowitej ekspresji białek ze szlaku sygnalizacji insuliny, ich fosforylowanych form oraz enzymów szlaku sfingolipidowego tkanka tłuszczowa trzewna i podskórna została zalana buforem lizującym RIPA (bufor radioimmunoprecypitacyjny) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz i poddana została homogenizacji ręcznej przy użyciu homogenizatora w temperaturze 4°C. Stężenie białka w supernatancie uzyskanym po odwirowaniu próbek zostało oznaczone metodą z użyciem kwasu bityczoninowego (BCA) stosując jako wzorzec albuminę surowicy bydlęcej (BSA). W pierwszej kolejności, białko zostało rozdzielone z zastosowaniem elektroforezy na 10% żelu poliakrylamidowym Criterion TGX Stain-Free (BioRad, Hercules, CA, USA), w którym po ekspozycji na światło ultrafioletowe (UV) tryptofan obecny w próbkach białek utworzył fluorescencyjny produkt, który został poddany transferowi na błony nitrocelulozowe lub błony z polifluorku winylidenu (PVDF). Następnie fluorescencyjne białko całkowite obecne na błonie było oświetlane światłem UV i ulegało detekcji za pomocą urządzenia do obrazowania *charge-coupled device* (CCD). Następnie celem zablokowania wiązań niespecyficznych, błony poddano inkubacji w buforze soli fizjologicznej buforowanej tris-em z Tween 20 (TBST) zawierającym 5% odtłuszczone mleko w proszku lub BSA przez 90 min. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, błony zostały poddane dwunastogodzinnej inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi. Następnego dnia membrany, po 3-krotnym przepłukaniu buforem TBST, inkubowano przez godzinę z przeciwciałami II-rzędowymi znakowanymi peroksydazą chrzanową (HRP). Aby zobrazować miejsce wiązania znakowanych przeciwciał na membranie, w ostatnim etapie błonę inkubowano z chemiluminescencyjnym substratem (Clarity Western ECL Substrate, BioRad, Hercules, CA, USA). Następnie, ekspresję białek oznaczano densytometrycznie przy użyciu systemu do wizualizacji ChemiDoc (Image Laboratory Software Version 6.0.1; BioRad, Warszawa, Polska). Otrzymany obraz badanego białka i białka całkowitego był nakładany na siebie w systemie do wizualizacji błon ImageLab w celu normalizacji ekspresji badanego białka. Ekspresję białek przedstawiono jako procent zmian w stosunku do grupy kontrolnej w której ekspresję ustalono jako 100%.

5.3. Analiza stężenia sfingolipidów trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej metodą HPLC

Proces homogenizacji i ekstrakcji sfingolipidów przeprowadzano w temperaturze 4°C za pomocą wcześniej schłodzonych odczynników w celu uniknięcia hydrolizy S1P. Ze wszystkich prób pobrano 20-30 mg tkanki, która była homogenizowana w lodzie w obecności mieszaniny 25mM HCl i 1M NaCl. Następnie, do prób został dodany metanol (Merck) zakwaszony HCl oraz standard wewnętrzny (10pmol C17-sfingozyny, Avanti Polar Lipids) po czym powtarzano homogenizację. W dalszej kolejności, próbki były sonifikowane przez 1min. w wodzie z lodem. Z uzyskanych

próbek wyekstrahowano lipidy poprzez dodanie 750µl chloroformu (Merck), 750µl 1M NaCl (Merck) i 75µl 3N NaOH (Sigma Aldrich). Po dokładnym wymieszaniu i odwirowaniu próbki, górną fazę wodną zawierającą S1P przenoszono do nowych probówek. Kolejno, do warstwy dolnej (chloroformowej) dodawano 750µl mieszaniny metanol: 1M NaCl (1:1, v/v) oraz 39µl 3N NaOH w celu wyekstrahowania pozostałości S1P. Po odwirowaniu fazę wodną dołączono do uzyskanej wcześniej i powtórzono cały proces. Następnie, do warstwy chloroformowej, zawierającej SFO i SFA, dodano 1,2ml 0,15M roztworu KOH w metanolu (Merck) po czym poddano próbki godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Po tym czasie, dodano mieszaninę 1,2ml chloroformu, 1,5ml wody alkalicznej oraz 300µl 2N NH₄OH (Merck). Po dokładnym wymieszaniu i odwirowaniu, warstwę wodną usunięto a warstwa chloroformowa była trzykrotnie przemywana wodą alkaliczną, po czym przenoszono ją do nowej probówki. Do połączonych faz wodnych zawierających S1P dodawano 390µl buforu reakcyjnego (200mM Tris-HCl, 75mM MgCl₂·6H₂O, 2M glicyna, Sigma) oraz 50µl fosfatazy alkalicznej (Fluka). Po dokładnym wymieszaniu na dnie probówki ostrożnie umieszczano 600µl chloroformu. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, chloroformowa warstwa zawierająca SFO była następnie przenoszona do nowej probówki. Pozostałości SFO były dwukrotnie ekstrahowane z warstwy wodnej przy pomocy 900µl CHCl₃. Połączone warstwy chloroformowe trzykrotnie przemywano 1,5ml wody alkalicznej, po czym przenoszono je do nowej probówki. Wszystkie próbki były następnie odparowywane pod strumieniem azotu, po czym zalewano je 120µl etanolu absolutnego (POCH) i inkubowano 25min. w temperaturze 67°C. Po ostygnięciu dodawano 15µl OPA-reagentu (10mg o-ftalaldehydu (Fluka), 200µl etanolu, 20µl 2-merkaptioetanolu (Sigma) i 10ml 3% kwasu borowego (Merck) o pH 10,5 uzyskanym przez dodanie KOH) a następnie inkubowano próby przez 20min. w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Zawartość uzyskanych w ten sposób o-ftalaldehydowych pochodnych sfingozyny i sfinganiny była następnie określana przy pomocy chromatografu cieczowego Varian ProStar wyposażonego w kolumnę Varian OmniSpher 5 C18 (4,6mm x 150mm) oraz detektor fluorescencyjny. Analiza ilościowa została wykonana w oparciu o krzywe wzorcowe sporządzone na bazie komercyjnie dostępnych wzorców sfingozyny, sfinganiny (Sigma) oraz sfingozyno-1-fosforanu (Avanti Polar Lipids). Zawartość ceramidu określano w tym samym ekstrakcie chloroformowym, który był używany do oznaczania poziomu SFO i SFA. 50µl chloroformu przenoszono do nowej probówki do której następnie dodawano standard wewnętrzny (40pmol ceramidu zawierającego kwas palmitynowy i C17-sfingozynę). Po odparowaniu pod strumieniem azotu dodawano 1,2ml 1M KOH w 90% roztworze metanolu a następnie inkubowano próbki przez 1 godzinę w temperaturze 90°C. SFO uwolnioną w trakcie reakcji alkalicznej metanolizy ceramidu oznaczano później w sposób identyczny z wyżej opisanym. Analiza ilościowa została wykonana w oparciu o krzywą

wzorcową sporządzoną na bazie C18-ceramidu (Avanti Polar Lipids). Stężenie badanych frakcji sfingolipidowych zostało wyrażone w nanomolach na miligram tkanki.

5.4. Analiza statystyczna

Uzyskane dane wyrażono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Jednorodność wariancji oraz normalność rozkładu danych oceniono odpowiednio za pomocą testu Bartletta i testu Shapiro-Wilka. Ocenę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwukierunkowej analizy ANOVA, a następnie odpowiedniego testu post-hoc (tj. test t-Studenta dla par) przy użyciu GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Różnice uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

6. Wyniki

Szczegółowy opis uzyskanych wyników znajduje się w niżej wymienionej pracy włączonej do rozprawy:

Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5382.

Berk, K. Konstantynowicz-Nowicka, K. Charytoniuk, T. Harasim-Symbor, E. Chabowski, A.

W opisie wyników wykorzystano odniesienia do figur zamieszczonych w wyżej wymienionej publikacji.

6.1 Wpływ kannabidiolu na stężenie sfingolipidów

W podskórnej tkance tłuszczowej zauważyliśmy znaczny wzrost SFO, SFA, S1P i ceramidu w grupie HFD (+106,9%; +36,2%; +72,4%; +41,5%; $p < 0,05$; Figura 1A, B, C, Publikacja nr 2).

W grupie szczurów, którym wstrzyknięto CBD, poziom SFO był istotnie podwyższony (+66,4%; $p < 0,05$; ryc. 1A, Publikacja nr. 2) w porównaniu ze szczurami karmionymi standardową dietą.

Po jednoczesnym podaniu HFD i CBD zaobserwowaliśmy znaczny wzrost poziomów SFO i S1P w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej (+47,0%, +35,8%; $p < 0,05$; Figura 1A, C, Publikacja nr 2) oraz znaczny spadek zawartości SFO, SFA i CER w porównaniu ze szczurami karmionymi HFD (odpowiednio -59,9%, -41,6%, -48,8%; $p < 0,05$; Figura 1A, B, E, Publikacja nr 2).

W trzewnej tkance tłuszczowej dieta bogatołuszczowa spowodowała znaczne obniżenie poziomu SFO (-152,7%; $p < 0,05$; Figura 1A, Publikacja 2) i wyraźny wzrost SFA, S1P, SFA1P i CER (+70,6%; +200,4%; +43,9%; +32,6%; $p < 0,05$; Figura 1B, C, D, E, Publikacja nr 2). W grupie

szczurów, którym wstrzykiwano CBD wykazano znaczny spadek poziomów SFO i SFA w porównaniu z grupą kontrolną (-100,4%; -43,4% $p < 0,05$, Figura 1A, B, Publikacja nr 2). Jednoczesne podawanie diety bogatotłuszczowej i CBD spowodowało obniżenie poziomów SFO, SFA, S1P i SFA1P w porównaniu z grupą kontrolną (-84,7%, -67,2%; -100,6%, -25,1%; $p < 0,05$; Figura 1A, B, C, D, Publikacja nr 2). Ponadto, w tej grupie szczurów wykazano znacznie obniżone poziomy SFA, S1P, SFA1P i CER (-137,7%; -301,2%; -68,9%; -42,2%; $p < 0,05$; Figura 1B, C, D, E, Publikacja nr 2), zaś poziom SFO został istotnie podwyższony w porównaniu z grupą HFD (+68%; $p < 0,05$; Figura 1A, Publikacja nr 2).

6.2. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych w sfingolipidowy szlak syntezy *de novo* ceramidu

Analiza Western Blot wykazała istotne zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w szlak sfingolipidowy. W SAT ekspresja SPTLC1 była znacząco zmniejszona we wszystkich grupach eksperymentalnych w porównaniu z grupą kontrolną (HFD: -32,2%; CBD: -65,4% ; HFD+CBD: -76,6%; $p < 0,05$; Figura 2A, Publikacja nr 2). W VAT zaobserwowaliśmy jedynie znaczny spadek ekspresji SPTLC1 w grupie HFD + CBD w porównaniu z grupą szczurów karmionych HFD (-30,5%; $p < 0,05$; Figura 2A, Publikacja nr 2). Dodatkowo, dieta bogatotłuszczowa spowodowała wzrost ekspresji SPTLC2 zarówno w podskórnej (+203%), jak i trzewnej (+76,9%) tkance tłuszczowej w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$) (Figura 2B, Publikacja nr 2). Ponadto, jednoczesna podaż CBD i HFD spowodowała znaczny spadek ekspresji SPTLC2 w SAT (-209,3%) i VAT (-72,5%) w porównaniu z grupą szczurów karmionych wyłącznie dietą wysokotłuszczową ($p < 0,05$) (Figura 2B, Publikacja nr 2).

6.3. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych zarówno w sfingolipidowy szlak ratunkowy jak i syntezy *de novo* ceramidu

Ekspresja białkowa enzymu CerS2 była znacząco podwyższona tylko w SAT w grupie szczurów karmionych HFD w porównaniu ze szczurami karmionymi standardową karmą (+47,2%; $p < 0,05$, Figura 3A, Publikacja nr 2). W VAT ekspresja CerS2 była zmniejszona w grupie HFD + CBD w porównaniu ze szczurami karmionymi HFD (-27,9%, $p < 0,05$, Figura 3A, Publikacja nr 2). Z drugiej strony zauważyliśmy znaczny wzrost ekspresji białkowej enzymu CerS4 we wszystkich grupach eksperymentalnych w porównaniu z kontrolą (HFD: +139,5%; CBD: +135,5%; HFD+CBD: 139,6%; $p < 0,05$; Figura 3B, Publikacja nr 2). W trzewnej tkance tłuszczowej wykazaliśmy znaczny wzrost ekspresji CerS4 w grupach HFD i HFD+CBD w porównaniu do

grupy kontrolnej (+53,5% i +73,4%; $p < 0,05$; Figura 3B, Publikacja nr 2). W przypadku CerS5 zauważyliśmy, że tylko bogatotłuszczowa karma powodowała wyraźny wzrost ekspresji tego białka, co było widoczne w dwóch typach tkanki tłuszczowej (VAT: +26,2%; SAT: +34,1%; $p < 0,05$; Figura 3C, Publikacja nr 2). Co więcej, w VAT wzrost ten został znacznie zmniejszony przez podaż CBD w porównaniu do tego w grupie HFD (-27,4%, $p < 0,05$; Figura 3C, Publikacja nr 2). Całkowita ekspresja CerS6 w SAT znacznie wzrosła w porównaniu z grupą kontrolną w przypadku zwierząt karmionych bogatotłuszczową dietą i zwierząt karmionych dietą standardową, którym wstrzyknięto CBD (+78,3% i +72,5%; $p < 0,05$; Figura 3D, Publikacja nr 2). Jednoczesne podawanie HFD i CBD spowodowało znaczny spadek ekspresji CerS6 w porównaniu do szczurów karmionych HFD (-84, 3%, $p < 0, 05$; Figura 3D, Publikacja nr 2). Co ciekawe, całkowita ekspresja CerS6 w VAT była wyraźnie podwyższona tylko w grupie HFD+CBD w porównaniu ze szczurami karmionymi standardową lub wysokotłuszczową dietą (+55%, $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną; +63,4%, $p < 0,05$ vs. grupa HFD; Figura 3D, Publikacja nr 2).

6.4. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek zaangażowanych w sfingolipidowy szlak kataboliczny

W tkance podskórnej wzrost całkowitej ekspresji ASAH1 (+58,6%, $p < 0,05$; Figura 4A, Publikacja nr 2) nastąpił w grupie szczurów karmionych HFD w porównaniu ze szczurami karmionymi standardową karmą. Wzrost ten został istotnie obniżony po dwóch tygodniach iniekcji CBD (-63%, $p < 0,05$; Figura 4A, Publikacja nr 2). Wyraźny wzrost ekspresji ASAH2 został zauważony u szczurów karmionych HFD, jak również u zwierząt karmionych HFD którym podawano CBD, w porównaniu z grupą kontrolną (+45,1% i +59%, $p < 0,05$; Figura 4B, Publikacja nr 2). W trzewnej tkance tłuszczowej zanotowano istotny wzrost ekspresji SPHK1 u szczurów karmionych HFD i u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową którym podano CBD (+ 76, 9% i + 37, 5%, $p < 0, 05$; Figura 4C, Publikacja nr 2). Zaobserwowano także, że dwutygodniowe podawanie CBD szczurom karmionym HFD spowodowało widoczny spadek ekspresji SPHK1 w porównaniu do grupy zwierząt karmionej tylko HFD (-65,6%, $p < 0,05$; Figura 4C, Publikacja nr 2).

6.5. Wpływ kannabidiolu na ekspresję białek ze szlaku sygnałowego insuliny

Analizując ekspresję białek zaangażowanych w insulinowy szlak sygnałowy, zauważono w podskórnej tkance tłuszczowej znaczne zmniejszenie stosunku pGSK3 β /GSK3 β (-74, 3%, $p < 0, 05$; Figura 5B, Publikacja nr 2) w grupie szczurów karmionych HFD oraz istotny statystycznie wzrost stosunku pGSK3 β / GSK3 β w grupie leczonej CBD w porównaniu do grupy kontrolnej (+121,9%, $p < 0,05$; Figura 5B, Publikacja nr 2). W trzewnej tkance tłuszczowej sama

bogatotłuszczowa karma wyindukowała spadek współczynnika fosforylacji Akt (-48, 8%; $p < 0, 05$; Figura 5A, Publikacja nr 2) w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak podczas podawania diety bogatotłuszczowej podawanie CBD spowodowało odwrotny skutek czyli podniesienie stosunku pAkt/Akt w porównaniu z grupą kontrolną (+47,3%, $p < 0,05$; Figura 5A, Publikacja nr 2) i HFD (+96,4 %, $p < 0,05$; Figura 5A, Publikacja nr 2). Podobnie, stwierdziliśmy zmniejszony stosunek pGSK3 β /GSK3 β u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową (35,5%, $p < 0,05$; Figura 5A, Publikacja nr 2) w porównaniu do tego w grupie kontrolnej, a dodatkowo był on znacznie zwiększony u szczurów po dootrzewnowej iniekcji CBD.

7. Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika iż:

1. Podaż kannabidiolu zmniejsza zawartość sfinganiny i ceramidu w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową. Ponadto kannabidiol w trzewnej tkance tłuszczowej zmniejszył również akumulację sfingozyno-1-fosforanu i sfinganino-1-fosforanu, zaś w podskórnej tkance tłuszczowej zmniejszeniu uległa depozycja sfingozyny.
2. Zastosowanie kannabidiolu w szczurzym modelu insulinooporności zmniejsza ekspresję białek enzymatycznych zaangażowanych w szlak syntezy *de novo* zarówno w trzewnej jak i podskórnej tkance tłuszczowej. Natomiast wykazuje różny efekt na pozostałe szlaki metaboliczne sfingolipidów. W trzewnej tkance tłuszczowej kannabidiol zwiększa ekspresję enzymów ze szlaku katabolicznego a w podskórnych depozytach, kannabidiol zmniejsza ekspresję białek enzymatycznych uczestniczących w tzw. szlaku ratunkowym. Wszystkie wyżej wymienione zmiany w szlakach enzymatycznych sfingolipidów, finalnie prowadzą do obniżenia zawartości ceramidu w obu typach tkanki tłuszczowej.
3. Zastosowanie kannabidiolu w szczurzym modelu insulinooporności powoduje uwrażliwienie na insulinę adipocytów trzewnej tkanki tłuszczowej poprzez podwyższenie współczynnika ekspresji pAkt (Ser473)/Akt i pGSK3 β (Ser9)/GSK3 β co koreluje ze zmniejszeniem zawartości większości wewnątrzkomórkowych frakcji sfingolipidowych czyli sfinganiny, ceramidu, sfingozyno-1-fosforanu i sfinganino-1-fosforanu.
4. Zmniejszenie stopnia insulinooporności adipocytów wynikające z podawania kannabidiolu jest bardziej wyrażone w trzewnej tkance tłuszczowej w porównaniu do tkanki tłuszczowej podskórnej i stanowi asumpt do dalszych badań nad korzyściami terapeutycznymi kannabidiolu w leczeniu insulinooporności.

Review

Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment

 Klaudia Berk ^{*}, Wiktor Bzdega [†], Karolina Konstanynowicz-Nowicka, Tomasz Charytoniuk [†], Hubert Zywno [†] and Adrian Chabowski [†]

 Department of Physiology, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland; wzbdega@gmail.com (W.B.); karolina.konstanynowicz@umb.edu.pl (K.K.-N.); tomasz.charytoniuk@umb.edu.pl (T.C.); hubert.zywno@gmail.com (H.Z.); adrian@umb.edu.pl (A.C.)
^{*} Correspondence: klaudia.berk@gmail.com

Abstract: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most frequent chronic liver disease in adults in developed countries, with a global prevalence as high as one billion. The pathogenesis of NAFLD is a multifactorial and multi-step process. Nowadays, a growing body of research suggests the considerable role of the endocannabinoid system (ECS) as a complex cell-signaling system in NAFLD development. Although increased endocannabinoid tone in the liver highly contributes to NAFLD development, the complex effects and impacts of plant-derived cannabinoids in the aspect of NAFLD pathophysiology are yet not fully understood, and effective medications are still in demand. In our review, we present the latest reports describing the role of ECS in NAFLD, focusing primarily on two types of cannabinoid receptors. Moreover, we sum up the recent literature on the clinical use of natural cannabinoids in NAFLD treatment. This review is useful for understanding the importance of ECS in NAFLD development, and it also provides the basis for more extensive clinical phytocannabinoids testing in patients suffering from NAFLD.

Keywords: endocannabinoid system; endocannabinoid receptors; NAFLD; phytocannabinoids; marijuana; cannabidiol



Citation: Berk, K.; Bzdega, W.; Konstanynowicz-Nowicka, K.; Charytoniuk, T.; Zywno, H.; Chabowski, A.

Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 393. <https://doi.org/10.3390/jcm10030393>

Received: 5 January 2021
 Accepted: 19 January 2021
 Published: 20 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The term “non-alcoholic fatty liver disease” (NAFLD) involves simple fat accumulation in the liver and may progress to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis, and, in some cases, hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Over the past decade, the prevalence of NAFLD (nearly 30% in the general adult population) is increasing worldwide with each passing year due to sedentary lifestyles and the unlimited availability of fat- and calorie-rich diets in modern western society [2]. The incidence of NAFLD increases with age, with a tendency to occur in men before 50 years of age and women after 50 years of age [3]. NAFLD is considered the most frequent liver disease in the world, the second most common cause of liver transplantation, and a primary cause of the development of hepatocellular carcinoma. Given these facts and the lack of effective treatment, NAFLD is a relevant problem for all health systems. Unsurprisingly, the pathogenesis of NAFLD is associated with fat deposition in the liver. Particularly, increased accumulation of triacylglycerols (TAG) is characteristic of NAFLD development. Steatosis occurs as a result of the imbalance between lipid storage (from accelerated free fatty acids (FFA) influx and *de novo* synthesis) and hepatic lipid clearance (decreased oxidation of FFA in the liver and decreased synthesis of low-density lipoproteins (VLDLs)). The complex and multifactorial process of NAFLD development was explained initially by the “two hits” model. The “first hit” included hepatic steatosis as a consequence of metabolic syndrome and excessive TAG deposition in hepatocytes. The “second hit” seemed to be necessary to develop non-alcoholic steatohepatitis (NASH) from NAFLD. However, this model was too simple to fully describe the complexity of NAFLD. In 2010, Tilg and Moschen proposed the “multiple hit” model, suggesting

that different risk factors such as insulin resistance, adipocytes dysfunction, nutritional factors, gut microbiota, and genetic and epigenetic factors act simultaneously on both intrahepatic and extrahepatic pathways, which finally leads to steatosis or inflammation [4]. The previous model assumed that NAFLD always precedes inflammation. According to the “multiple hit” model, depending on which signaling pathways are activated by risk factors, hepatic lipid overload or NASH development may occur [5]. Currently, there are only a few specific pharmaceutical strategies available to treat NAFLD. However, none of them is ideal. Many of the promising results from rodent studies on phytocannabinoids and the endocannabinoid system (ECS) have fueled hopes of implementing novel therapeutic approaches and targets in humans. In our review, we aim to discuss the latest reports describing the changes in the ECS and its components on the development and progression of NAFLD. Furthermore, we will summarize the clinical studies analyzing the effects of natural cannabinoids in NAFLD treatment.

2. Endocannabinoid System (ECS)

The endocannabinoid system is described as a widespread cellular signaling machine with an active physiological role in nearly all the organs and tissues. Initially, scientists distinguished two types of cannabinoid receptors (CBRs) and their endogenous ligands (anandamide, AEA, and 2-arachidonoyl glycerol, 2-AG) as well as two enzymes (fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL)) responsible for ligand metabolism. In the current literature, ECS has been expanded to an “-ome”; the concept of the endocannabinoidome (eCBome) includes not only endogenic ligands (eCBs) but also approximately 50 receptors and metabolic enzymes and more than 20 congeners of AEA and 2-AG with important physiopathological activities [6].

One of the major substances that may affect ECS activity are phytocannabinoids—chemicals found in *Cannabis* plants (marijuana). Despite the first reports of marijuana as an appetite inducer and pain killer derived from ancient civilizations, medical interest in marijuana usage in the context of ECS increased after isolation and characterization of the *Cannabis* major psychoactive component Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in 1964 [7]. After nearly 30 years, the main endogenously produced cannabinoids, AEA and 2-AG, were uncovered [7]. So far, their effects have been most widely studied in the central nervous system, where they modulate cognition, memory, learning, or energy balance [8,9]. Due to considerable advances in biotechnology, ECS components were detected in peripheral organs, including the liver.

In the neurons, eCBs produced “on-demand” are the retrograde synaptic messengers that, by preventing the development of excessive neuronal activity, play an important regulatory role. AEA and 2-AG are also present in the liver at concentrations comparable to the brain [10]; eCBs act as autocrine or paracrine agents through synthesis in a different or the same cell type, expressing cannabinoid receptor type 1 (CB1R). There is no doubt that AEA is synthesized from membrane phospholipid precursors, mainly by the sequential action of *N*-acyltransferase (NAT) and *N*-acyl-phosphatidylethanolamines-specific phospholipase D (NAPE-PLD), whereas the synthesis of 2-AG is regulated by two diacylglycerol lipases (DAGL α and β). The enzyme responsible for AEA degradation is FAAH, while 2-AG is hydrolyzed by MAGL. It is worth noting that eCBs also have biological features that extend beyond interaction with cannabinoid receptors. As an alternative pathway, eCBs may be oxidized by cyclooxygenase-2 (COX-2), distinct lipoxygenases (LOXs), or cytochromes P450 (CYPs) and therefore they may participate indirectly in inflammatory mediation [11,12]. Cannabinoids regulate biological processes by binding with different affinities to 7-transmembrane G protein-coupled-receptors, mainly cannabinoid receptors (CBRs) type 1 and type 2. The CB1 receptor was originally described as the “brain type” cannabinoid receptor because its levels of expression were high in the brain and central nervous system (CNS) [13]. However, in recent studies, lower levels of CB1R expressions were also found in peripheral nerves, the gastrointestinal tract, the cardiovascular system, and reproductive systems as well as in other tissues [14]. CB2 receptors are largely

restricted to immune and hematopoietic cells, although functionally relevant expression has been found in specific regions of the brain and in the myocardium, the gastrointestinal tract, or reproductive cells [15]. CBRs constitute a family of transmembrane proteins that mediate many cellular processes. Stimulation of both CB1R and CB2R leads to activation of $G_{i/o}$ protein-coupled receptors that, through inhibition of adenylyl cyclase activity, lead to a decrease in cAMP levels. They may also activate mitogen-activated kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), p38 mitogen-activated protein kinases, and c-Jun N-terminal kinase (JNK), as well as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway. Depending on the circumstances, the outcome of CBR-mediated signaling could be the promotion of cell survival or cell death [16].

To date, we also know that several putative cannabinoid receptors mediate in the metabolic actions of cannabinoids. These include non-CB1R and non-CB2R cannabinoid-related orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): GPR18, 55, and 119 [17–19].

Few investigations underlie the molecular mechanisms of GPCRs functions in the liver. GPR55 has been deeply explored in adipocytes. However, the direct signaling pathways of this receptor in hepatocytes have been unknown until recently. Studies on mice imply that GPR55 helps to sustain and/or reinforce insulin action in the liver cells [20]. Moreover, GPR55 might interact with CB2 in immune cells [21]. Considering this, researchers assumed that crosstalk between GPR55 and CB2 signaling may appear in tissues where both CB2 and GPR55 are co-expressed, including the liver, which may have an impact on hepatic glucose metabolism [22]. In the case of GPR119, it was presented that this receptor inhibited hepatic lipid accumulation by stimulating the phosphorylation of AMPK and consequently reduced the expression of transcription factors and enzymes involved in lipogenesis [23]. In contrast to GPR55 and 119, GPR18 is engaged in obesity-mediated inflammation, but there is a lack of evidence of its direct effects on hepatocytes [24].

Despite many inaccuracies in the understanding of the exact mechanisms of GPCR action, recent advances in research concerning pharmacological manipulation of these receptors assume that GPR18, 55, and 119 may be promising therapeutic targets for the prevention and treatment of metabolic disorders, including NAFLD [25,26].

CB1R and CB2R occur in high abundance in the central nervous system but have also been identified in human liver tissue. The major cannabinoid receptor present in hepatocytes, hepatic sinusoidal cells, or stellate cells is CB1R [27]. Currently, special attention has been paid to the CB1R isoform b (CB1Rb), which is absent in the brain and prominently expressed in hepatocytes and in pancreatic β -cells [28]. Generally, CB2R is widespread among cells of the immune system and is responsible for the immunomodulatory effects of cannabinoids and endocannabinoids [29]. Considering it in the liver, CB2R was identified mainly in Kupffer cells and stellate cells, and it is up regulated during pathology, especially occurring with inflammation such as NASH. However, the expression of this receptor in healthy hepatocytes is weak [30]. Although CBRs were believed to be functional only at plasma membranes, it is currently known that they are also expressed in intracellular organelle, e.g., mitochondria, where their role is not fully understood [31]. Experimental Wistar rats showed that expression of hepatic CBRs has a rhythmic daily pattern, with a higher expression of cannabinoid receptors during the light period [32]. What is more, plasma endocannabinoid concentrations also show a circadian rhythm, which could cause different CBR activation depending on the time of day [33].

Interestingly, the molecular basis of diurnal changes in cannabinoid receptors may be impacted by functional interactions with other receptor systems, such as orexin and other receptors [34]. For further consideration, it should be mentioned that both CBRs are species-dependent, which explains the discrepancy between their pharmacological effects in mice, rats, and humans. Therefore, their effects in one species cannot be directly extrapolated to others [35].

3. Cannabinoid System in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Development and Progression—The Role of CB1R and CB2R and PPARs

By virtue of low CBR expression in the healthy liver, the endocannabinoid system in this tissue was considered to be non-meaningful. Nonetheless, various studies conducted on animal models and samples from the human liver revealed changes in CBR expression in many liver pathologies, prompting ECS to be recognized as a causative factor of this organ's dysfunction [36].

The action of ECS, by inducing lipogenesis and inhibiting lipolysis in peripheral tissues as well as increasing appetite by anandamide and 2-arachidonoylglycerol, promotes fat accumulation that is the main feature of NAFLD occurrence [37–39]. Therefore, ECS overactivation accompanies metabolic pathologies such as obesity or hepatic steatosis. As shown in a rat model, the first changes in the endocannabinoid system that represent a higher risk of NAFLD development may already occur in prenatal life. Maternal high-fat diet feeding during the perinatal phase induced sex-specific long-term changes in the liver ECS components (i.e., increased protein expression of CB1R and CB2R) of the adult offspring [40]. The upregulation of hepatic CB1R in liver steatosis and fibrosis was repeatedly confirmed by human, animal, and *in vitro* studies [41,42]. What is more, the inhibition of CB1R eliminated these abnormalities, which is the ultimate proof for the significant participation of CB1R in the development of the above-mentioned disease [43]. CB1R affects lipid metabolism in the liver in many different ways. The activation of hepatic CB1R stimulated *de novo* lipogenesis through induction of the lipogenic transcription factor SREBP1c and its targets [41]. What is more, CB1R is also linked with stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) activity. According to Liu et al., high fat diet induced (HFD) hepatic steatosis and insulin resistance development occurred bidirectionally. HFD upregulated SCD1 activity and, as a result, increased the production of monounsaturated fatty acids (MUFA), which inhibited FAAH activity and increased hepatic AEA levels. Moreover, increased endogenous levels of MUFA activated CB1R, which promoted *de novo* lipogenesis through induction of lipogenic gene expression including SCD1, creating a positive feedback loop [44]. Additionally, CB1R also regulates fatty acid oxidation. CB1^{−/−} mice had higher basal CPT1 mRNA levels than wild-type mice, and treatment with CB1R antagonist decreased the CPT1 activity [45]. Interestingly, the inhibition of CB1R diminished hepatic fatty acid uptake by the regulation of FAT/CD36 expression [46]. Otherwise, recent studies conducted on mice demonstrated a novel molecular mechanism of CB1R action—downregulation of perilipin 2 (PLIN2) by CB1R knockout leads to suppression of lipogenesis and TAG synthesis [47]. These findings prompt further research exploring pharmacologic modulation of the CB1-PLIN2 axis, which might represent a novel therapeutic approach for NAFLD treatment.

The role of CB1R has also been described in insulin resistance (IR), which is one of the most common metabolic abnormalities associated with NAFLD. Considering the epidemiological data, nearly 70–80% of individuals with obesity or type 2 diabetes mellitus (T2DM) suffer from simple steatosis [1,48]. As one of the “multiple hits”, IR plays a crucial role in the establishment of lipotoxicity, oxidative stress, and inflammation development in the liver [49]. Consequently, in patients suffering from NAFLD, genetic, extracellular, and intracellular factors disturb insulin signaling pathways, contributing to maintenance and worsening of the inappropriate response of cells to insulin [50]. It still remains an open question of whether insulin resistance is the cause or consequence of hepatocytes lipid overload [49].

As shown by O'Hara et al., CB1R activation in the central nervous system is sufficient for the induction of insulin resistance in the liver [51]. However, several studies showed that treatment with non-brain penetrant CB1R antagonists favoring the peripheral CB1R action improved glycemic control, body weight, and metabolic profile in obese patients. Undoubtedly, CB1R is involved in the modulation of basal insulin secretion and glucose-stimulated insulin secretion from β pancreatic cells [52]. Furthermore, CB1R-mediated increase in glycogenolysis and/or gluconeogenesis resulted in the increased hepatic glucose

production that is revealed in primary hepatocytes [53]. Moreover, CB1R overexpression interrupted insulin signaling and clearance, leading to insulin resistance development in mouse livers [54]. Because changes in CB1R expression interfere with the insulin transmission pathway, they may also indirectly contribute to liver steatosis. Scientists suspect that, in obesity, CB2R may also magnify fatty liver progression by inducing adipose tissue inflammation and insulin resistance development in peripheral tissues [55]. Studies conducted on diet-induced obesity (DIO) mice showed that knocking out the *Cnr2* gene encoding CB2R declined hepatic steatosis and improved peripheral insulin sensitivity [38].

Studies on CB2R focus on its immune-modulatory character, but this receptor may also be involved in diet-induced metabolic changes [56]. However, the exact CB2R role in NAFLD and metabolic disorder development is unclear because literature data in this context are contradictory [55]. The changes in CB2R-dependent pathways significantly contribute to the development of insulin resistance and NAFLD but with a different mechanism of action than the CB1R [57]. Because of the peripheral localization (immune system, bones, lungs, gastrointestinal tract, testicles) of CB2R, its action in the central nervous system is less pronounced than CB1R [58,59]. As shown in in vitro experiment on HepG2 cells, CB2R directly modulated lipid metabolism by targeting genes involved in lipid synthesis and by elevating the expression of CB1R [42]. What is more, the genetic inactivation of CB2R reduced the steatosis and liver triacylglycerol concentration caused by high-fat diet in mice [57]. Interestingly, tissue fractionation in this study revealed that, during obesity development, the elevated expression of the *Cnr2* gene was derived mainly from the non-parenchymal liver cells, while the expression of this gene in hepatocytes was inappreciable [57]. However, research on human liver biopsies uncover the CB2R expression on hepatocytes in NAFLD patients but not in the healthy liver [60]. Therefore, whether *Cnr2* gene expression or CB2R expression is present in healthy hepatocytes remains an open question. There is no doubt, however, that the expression of CB2R varies in a state of impaired lipid metabolism in humans. Currently, it is known that CB2R mRNA level correlates positively with key hepatic lipogenic enzyme gene expression from fatty acid de novo synthesis pathway, namely Acetyl-coenzyme A carboxylase 1 (ACC1) in the liver-derived from an obese woman [61]. These data showed that activation of CB2R caused lipotoxicity and took part in NAFLD progression. However, this research did not answer the question of whether CB2R modulated lipid uptake and fatty acid transport. Interestingly, increased CB2R mRNA is linked with the elevation of hepatic pro-inflammatory molecules (IL6, TNF α , resistin) as well as anti-inflammatory adiponectin, suggesting a dual role of CB2R in liver pathologies [61].

In addition to reversible hepatic steatosis, CBRs are also involved in the further mechanism of NAFLD deterioration such as innate immune activation, inflammation, cell death, or fibrosis leading to progressive liver damage [19]. Most studies used CBRs agonists/antagonists to interrogate the important role of these receptor isoforms in liver failure [62]. In the case of CB1R, it was reported that antagonism of this receptor diminished hematopoietic stem cell (HSC) activation and proinflammatory cytokine production in mice with HFD-induced NAFLD [63,64]. Additionally, in a rodent study, it was noted that inhibition of CB1R reduced hepatic fibrosis through decreased TGF- β production or collagen deposition in cirrhotic livers [64]. However, by CB2R occurrence in immune cells, its role in the inflammation was more widely discussed. Antifibrogenic CB2R properties in the human liver were first presented by Boris Julien et al. [65]. Studies conducted by Guillot et al. on cultured Th17 lymphocytes revealed that activation of CB2R reduced profibrogenic cytokine, namely interleukin 17 production (IL-17), but not antifibrogenic interleukin 22. Moreover, in macrophages and hepatic myofibroblasts, which also express CB2R, activation of this receptor reduced the proinflammatory response. Knowing that progression of NAFLD is connected with various events, the antifibrogenic properties of CB2R result from not only antiproliferative and antiapoptotic effects on myofibroblasts and inhibited Kupffer cell proinflammatory response but also on inhibition of IL-17 release that induces immune and fibrogenic effects in the liver [66]. In line with this conclusion are

studies where chronic CB2R stimulation with selective agonist contributed to the regression of liver fibrosis. Observed changes were associated with diminished liver inflammation and collagen deposition, and consequently reduced fibrosis [67].

In recent years, it has been suggested that non-cannabinoid receptors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are also part of the endocannabinoid system [68]. These nuclear factors have three isotypes (PPAR α , PPAR β / δ , PPAR γ), and they are characterized by different tissue distribution patterns and ligand specificities, which highlight their distinct functions [69]. In general, PPARs are crucial in the genetic regulation of the complex pathways of mammalian metabolism, including lipid and glucose homeostasis, inflammation, and cell proliferation [70]. Preclinical as well as clinical studies have demonstrated that PPARs play a key role in regulating adipogenesis and inhibiting liver fibrosis and, through them, NAFLD development [19].

Since 2002, evidence has existed that endocannabinoids, endocannabinoid-like compounds, phytocannabinoids, and synthetic cannabinoid ligands bind to and activate PPARs [68]. The mechanisms of PPAR activation by individual phytocannabinoids have been summarized by O'Sullivan et al., who revealed that THC and CBD activate PPAR γ and do not activate PPAR α [69]. Importantly, there are still many cannabinoids whose activity regarding PPARs is not clear. What is more, it is still unknown why some cannabinoids exert the same physiological effects, one through the PPAR action and the other through a different receptor, although both have the same ability to activate PPARs. It appears that there are still many unestablished factors that could influence the interactions between cannabinoids and PPARs [69].

4. Phytocannabinoids

The *Cannabis sativa* plant is rich in a broad spectrum of phytochemicals including cannabinoids, terpenoids, sterols, and flavonoids. Phytocannabinoids (natural cannabinoids contained in the *Cannabis* plant) are considered to be the most active ingredients of marijuana that may be found in the human body of all the above mentioned. Most of the phytocannabinoids are found in female *Cannabis* inflorescence [70].

Among many phytocannabinoids found in *Cannabis*, the most studied agents are Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), and tetrahydrocannabivarin (THCV) [71].

There are plenty of *Cannabis sativa* varieties (cultivars) existing, and each one has an individual combination of bioactive compounds. In this case, especially important is the proportion of THC:CBD:THCV, which is the cause of the unique and different pharmacodynamic and medicinal properties of various *Cannabis* extracts [72]. *Cannabis* also contains a large number of acidic precursors of the aforementioned molecules, respectively: Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA), and tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA). These compounds may reveal interesting therapeutic properties, such as attenuation of body weight gain and amelioration of glucose-insulin homeostasis in a mouse model of HFD-induced obesity after administration of THCA [73]. However, the current knowledge in the field of phytocannabinoid acids is limited and requires further examination [74]. Therefore, the effect of medicinal *Cannabis* should be considered as the "entourage effect" of *cannabis* as a whole [70]. When analyzing the effects of the individual phytocannabinoids presented in our review, their complex pharmacology should be considered. The different effects on the response of several phytocannabinoids studied *in vivo* are possibly related to the competition and displacement of endogenous cannabinoids, with the different centers (orthosteric and allosteric) and with the biased signalling of cannabinoid target receptors [72]. Additionally, phytocannabinoids interact with each other. For instance, CBD has the ability to antagonize THC effects by CB1R and non-CB1 receptor mechanisms of action. However, CBD may also potentiate some THC effects in an additive or synergistic fashion [75].

Promising research results regarding clinical application of cannabinoids in many morbidities and increasing acceptance of the clinical use of marijuana and its derivatives has led the pharmaceutical industry to research new compounds based on *Cannabis* [76].

This was accompanied by a growing awareness of the role of the endocannabinoid system in our body. Currently, THC and CBD are the two major active compounds of Cannabis. Table 1 provides a summary of the main opposing characteristics of these substances that account for the differential effects exerted on the human body.

Table 1. Comparison of selected features of tetrahydrocannabinol (THC) versus cannabidiol (CBD).

Feature	THC	CBD	Reference
Interaction with receptors: a) CB1R b) CB2R	+ (partial agonist) - (weak antagonist)	- (negative allosteric modulator) - (inverse agonist)	[77–79]
Psychoactive effect	Yes	No	[80]
Appetite stimulation	Yes	No	[80]
Cardiovascular stimulation (inducing tachycardia and hypertension)	Yes	No	[80]
Anticonvulsant effect	Yes	No	[80]
Therapeutic indications approved by the FDA ¹	Anorexia associated with weight loss in AIDS ³ patients Nausea and vomiting associated with anticancer chemotherapy Multiple sclerosis spasticity	Lennox-Gastaut syndrome Dravet syndrome	[81–84]
Formulations available on US pharmaceutical market	Nabilone (trade name Cesamet) synthetic THC analog available as oral capsule Dronabinol (trade name Marinol)—synthetic formulation of the main THC constituent enantiomer found in Cannabis: [(–)-trans-Δ ⁹ -tetrahydrocannabinol] as an oily resin in capsules	Epidiolex [®] —pharmaceutical formulation of CBD as an oral solution	[82–84]
Combination drugs available on US ² pharmaceutical market	Nabiximol (trade name Sativex)—oral spray standardized in composition, formulation, and dose, delivering of 2.7 mg THC and 2.5 mg CBD per dose.		[85]

¹ FDA, Food and Drug Administration; ² US, United States; ³ AIDS, Acquired Immunodeficiency Syndrome.

5. Effects of Prolonged Cannabis Use in the Context of NAFLD and its Comorbidities

Progressive legalization of marijuana across the world allowed researchers to observe its interesting properties in encouraging or counteracting many metabolic and psychiatric diseases. Although Cannabis use is generally considered an unhealthy, addictive habit, there is growing strong evidence that it can be protective against the development of metabolic disturbances leading to hepatic steatosis and its progression.

This is a particularly interesting fact because dysregulation of the endocannabinoid system is undoubtedly one of the most important factors in the development of NAFLD. Moreover, Cannabis use is expected to increase over the coming years as a new therapeutic agent for many disorders.

On the other hand, it is well documented that chronic cannabis use (CCU) has been associated with metabolic disturbances ascertained as detrimental factors leading to NAFLD development. Firstly, CCU is undoubtedly linked with increased appetite and calorie overconsumption [86,87]. What is more, this appetite dysregulation is augmented by a higher intake of highly-palatable, unhealthy foods that are rich in refined sugar and fat [88–90]. On the other hand, a multitude of studies analyzing the metabolic effects of

CCU observed plenty of beneficial effects that could counteract the development of NAFLD. It has been shown that prolonged *Cannabis* use is linked with decreased prevalence of insulin resistance [91,92] and hyperlipidemia and metabolic syndrome [93,94], as well as decreased frequency of diabetes mellitus occurrence [89]. In the aspect of CCU and obesity, an overwhelming majority of studies have shown a decreased prevalence of obesity among marijuana users. However, one study showed increased visceral adiposity in *Cannabis* smokers, but this study considered only 30 *cannabis* smokers [95–97]. Mounting evidence indicates that current or past marijuana use is associated with a lower risk of NAFLD development, regardless of the presence of metabolic risk factors [95,98–100]. At first glance, this association is contradictory to the role of ECS in NAFLD development. Although it is clearly proven that increased endocannabinoid tone in liver and brain relates to obesity and metabolic syndrome and contributes to the development of NAFLD, the complex effects and impact of phytocannabinoids in relation to NAFLD pathophysiology are not yet fully clear (Figure 1).

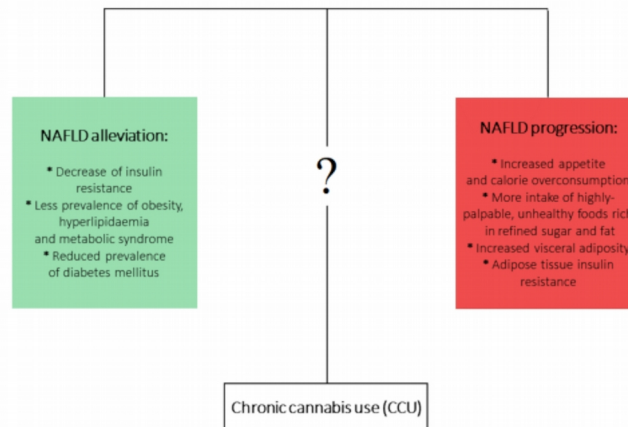


Figure 1. The opposite metabolic effects of chronic *Cannabis* use (CCU).

One of the possible mechanisms responsible for the positive influence of *Cannabis* use on the prevalence of NAFLD and other metabolic diseases may include the antagonistic action of CBD and THCV on CB1R [101,102]. Additionally, CBD has been described as acting as a negative allosteric modulator of CB1R in HEK 293A and in STHdhQ7/Q7 cells, two model systems that highly express CB1R [90]. Antagonism of CB1R improves the insulin sensitivity of hepatocytes [45], decreases intrahepatic triglyceride synthesis [41], and decreases secretion of very-low-density lipoprotein (VLDL) [27]. Diminished IR may contribute to improved hepatic steatosis, hepatomegaly, and metabolic syndrome by restoring the optimal hepatic glucose metabolism and decreasing liver fat accumulation [49].

Moreover, the anti-inflammatory effects of phytocannabinoids should be emphasized, as they can inhibit secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and adipokines (leptin) and lead to the upregulation of inflammatory mediators such as cell transcription factor (NF- κ B) [63]. Excessive inflammatory response plays a robust role in NAFLD development and progression to NASH [103]. CBD has been shown to alleviate liver inflammation induced by a high fat-cholesterol (HFC) diet in mice by inhibition of NF- κ B and can likewise restrain NLRP3 inflammasome activation, which both lead to a reduction in inflammatory response [104–106]. Another possible mechanism that is involved in the beneficial properties of *Cannabis* is development of tolerance and down-regulation of CB1R from repetitive THC use. THC should theoretically induce or worsen NAFLD

by its agonistic role regarding CB1R. However, it has been proven that repetitive use of THC may result in decreased CB1R density, which may contribute to a dose-dependent inverse relationship between marijuana use and NAFLD occurrence [78,93,107]. Finally, the most important factor is that *Cannabis* is a source of not only THC, CBD, and THCV but also various other phytocannabinoids such as cannabidiol (CBDV), cannabigerol (CBG), cannabigerovarin (CBGV), cannabigerolic acid (CBGA), and cannabinol (CBN). The therapeutic potential of these compounds remains largely unexplored. Thus, there is a need for further research directed at establishing whether phytocannabinoids are indeed 'a neglected pharmacological treasure trove' [78,108]. Perhaps, without knowledge about the exact amount and the strain of *cannabis* used by study participants, it will not be possible to clearly assess which of the phytocannabinoids contained in marijuana are responsible for the beneficial or harmful effects related to the pathogenesis of NAFLD (Table 2). Therefore, more research is needed to evaluate which of the phytocannabinoid and non-cannabinoid receptors are responsible for those positive effects related to prolonged marijuana use and NAFLD occurrence [98,109].

Table 2. Clinical studies analyzing the effects of *Cannabis* use on Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression and development.

Main Outcome	Research Model	Participants	Method	Reference
↓ prevalence of NAFLD	Population-based case-control study	5,950,391 <i>Cannabis</i> users from the HCUP-NIS ⁷ database.	Presence of NAFLD diagnosis among patients.	[110]
↓ prevalence of NAFLD	Cross-sectional study	22,366 adult participants of USNHANES ⁸ and NHANES III surveys. Healthy adults (>20 years) with no history of excessive alcohol abuse, viral hepatitis or pregnancy. Age, gender, and ethnicity-adjusted analysis. Current and past users of <i>Cannabis</i> compared to non-users, independent of metabolic risk factors	Hepatic steatosis examination: Serum alanine aminotransferase (ALT) Liver ultrasonography	[97]
No difference in intrahepatic fat content and OGTT ³ . ↑ % of abdominal visceral fat	Cross-sectional, case-control study	60 patients of JH-BPRU ⁹ in Baltimore and CRC-NIH ¹⁰ in Bethesda <i>Cannabis</i> smokers (<i>n</i> = 30) and control subjects (<i>n</i> = 30) matched for age, sex, ethnicity, and BMI ¹¹ .	Abdominal and intrahepatic fat content were assessed by MRI and MRS ⁴ scan. Insulin-sensitivity was evaluated with OGTT.	[82]
↓ prevalence of metabolic syndrome	Cross-sectional study	8478 adult participants of NHANES survey. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence of metabolic syndrome examined by biochemical markers, BP ¹⁴ and waist circumference	[81]
↓ fasting insulin levels ↓ prevalence of IR ¹ ↓ waist circumference	Cross-sectional study	4657 participants of NHANES survey. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence of insulin resistance by HOMA-IR ⁵ calculation. Assessment of waist circumference.	[78]

Table 2. Cont.

Main Outcome	Research Model	Participants	Method	Reference
↓ prevalence of obesity	Cross-sectional study	52,375 participants of NESARC ¹² and NCS-R ¹³ surveys of US nationally representative samples. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence of obesity examined by BMI calculation.	[80]
↓ prevalence of NAFLD	Prospective cohort study	838 HIV-HCV ¹⁵ coinfecting patients, adjusted for BMI, hazardous alcohol consumption and current or lifetime use of lamivudine/zidovudine. Current and past <i>Cannabis</i> users	NAFLD examination using liver ultrasonography	[99]
↓ prevalence of IR	Follow-up study	703 HIV-HCV coinfecting patients. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence of insulin resistance by HOMA-IR calculation.	[79]
↓ prevalence of NAFLD, ↓ overtime increment of steatosis score No difference in fibrosis score	Follow-up study	390 patients with diagnosed non-affective psychosis. Current and past <i>Cannabis</i> users	NAFLD and NASH examination using clinical FLI ⁶ score.	[86]
↓ prevalence of T2DM ² in <i>Cannabis</i> users	Cross-sectional study	10,896 adult participants of NHANES III survey. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence of T2DM defined based on self-report or abnormal glycaemic parameters	[76]
No increase in prevalence or progression of hepatic fibrosis	Meta-analysis	5,973,595 participants of 9 studies including patients with NAFLD/HCV/HIV coinfection. Current and past <i>Cannabis</i> users	Prevalence and progression of hepatic fibrosis among <i>Cannabis</i> users	[100]

¹ IR, Insulin resistance; ² T2DM, Diabetes mellitus type 2; ³ OGTT, Oral glucose tolerance test; ⁴ MRS, Magnetic resonance spectroscopy; ⁵ HOMA-IR, Homeostatic model assessment for insulin resistance; ⁶ FLI, Fatty liver index; ⁷ HCUP-NIS, Healthcare Cost and Utilization Project-National Inpatients Sample database; ⁸ NHANES, The National Health and Nutrition Examination Survey; ⁹ JH-BPRU, Johns Hopkins Behavioral Pharmacology Research Unit in Baltimore; ¹⁰ CRC-NIH in Bethesda-Clinical Research Center, The National Institute of Health Center in Bethesda; ¹¹ BMI, Body Mass Index; ¹² NESARC, National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions; ¹³ NCS-R, National Comorbidity Survey Replication; ¹⁴ BP, Blood Pressure; ¹⁵ HIV/HCV, Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus; ↓, decrease; ↑, increase.

6. THC and NAFLD

Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) is the main active compound of *Cannabis sativa* and is responsible for its psychoactive effect. THC acts as a partial agonist at CB1R and CB2R and as an agonist of the transient receptor potential channel of the vanilloid 2 subtype (TRPV-2) [79]. THC is useful in the treatment of many diseases associated with a lack of appetite such as chemotherapy-induced nausea, AIDS, and anorexia nervosa due to its antiemetic and orexigenic effect. It is also used in the treatment of non-cachexic diseases such as chronic pain, neuropathic pain, spasticity due to multiple sclerosis, and other neurological disorders [80,86,111,112].

In some of the medical conditions listed above, the orexigenic properties of THC are extremely useful. Conversely, in individuals suffering from obesity and metabolic syndrome, the action of THC will be highly undesirable because, acting as a CB1R agonist

in the central nervous system, THC increases the qualitative ratings of hunger, leading to calorie overconsumption [113,114]. THC exacerbates endocannabinoid tone in the liver not only by direct agonism at CB1R/CB2R, but also by increasing total AEA and 2-AG levels in hepatocytes by competing with them in binding to fatty acid binding protein-1 (FABP-1), making eCBs less available for enzymatic degradation and hydrolysis [115]. In the light of the cited studies, it is highly probable that THC promotes development of NAFLD, although there is a lack of studies focusing strictly on THC. Considering the impact of marijuana on the liver and the pro-steatotic effects of THC as a constituent of *Cannabis*, it may be suspected that protective properties are exerted by factors other than the THC phytocannabinoids present in *Cannabis*. Given the cumulative impact of marijuana, the alleged adverse, pro-steatotic effects of THC as a constituent of *Cannabis* are apparently offset by other phytocannabinoids [116].

7. CBD and NAFLD

The second abundant component of Cannabis extracts, CBD, functions as a non-competitive negative allosteric modulator of CB1R and an inverse antagonist of CB2R [77,101]. CBD is also an inverse agonist for the orphan G-protein coupled receptors 3, 6, 12, 18, and 55 (GPR3, GPR6, GPR12, GPR 18, and GPR55) [79,117].

Despite crossing the blood-brain barrier (BBB), CBD does not cause psychoactive effects (distinct like CB1R agonists such as THC); consequently, it lacks abuse potential. Additionally, though its agonistic influence on CB1R, CBD does not cause depressive effects characteristic of rimonabant, a withdrawn antiobesity drug, acting as an inverse antagonist of CB1R [75]. CBD, due to its easy availability on the market (there are plenty of unverified formulations sold as dietary supplements), is widely advertised as a potentially supportive factor in the treatment of various diseases, although its properties in suggested indications are often questionable, except for the control of refractory seizures [118]. Cannabidiol generally exerts no serious side effects, but if any of these appear, the ones most often reported are gastrointestinal problems or somnolence [119,120]. It seems that the only particular concern about acute high dosing of CBD is the risk of hepatotoxicity and drug interactions. These effects were clearly demonstrated in a mouse model where CBD induced hepatotoxicity in doses that were scaled for mouse equivalent doses from the maximum recommended human CBD dose in EPIDIOLEX® (20 mg/kg) [121]. In fact, the clinical characteristic of EPIDIOLEX® (a drug containing an oral solution of CBD) confirms mild risk of hepatic enzymes elevation, especially in patients with coexisting moderate to severe hepatic impairment and/or were being treated in combination with hepatotoxic drugs [84]. However, in *in vivo* studies on murine models of NAFLD, CBD has shown an anti-oxidative, anti-inflammatory, and hepatoprotective effect [122–124]. Studies conducted by Silvestri et al. have shown its substantial antisteatotic effectiveness, as CBD was able to directly dose and time dependently reduce accumulated intracellular lipid levels [125]. In the cited study, a human hepatosteatotic model was established using liver Human Hepatocyte Line 5 (HHL-5) cells, where steatosis was induced by incubation with oleic acid. What is more, the observed effects were independent of CB1 or TRPV1 receptor activation but were probably caused by post-translational modification of various proteins: extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), the cAMP-response element binding protein (CREB), the proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40), AMP-activated protein kinase alpha2 (AMPK α 2), and the signal transducer and activator of transcription proteins (STATs), which are the key factors controlling hepatic lipid metabolism [125].

The antisteatotic effect of CBD in the liver has also been confirmed by an *in vivo* model of ob/ob mice, where CBD administration at a dose of 3 mg/kg for 4 weeks substantially reduced liver TAG content [125].

High anti-inflammatory efficiency of CBD was confirmed in high-fat/high-cholesterol (HFC) fed mice, where CBD alleviated liver inflammation through decreased inflammation pathway protein expression, namely NF- κ B, p65, and NLRP3 inflammasome [105]. Another study confirmed that CBD can reduce the extent of liver inflammation, oxida-

tive/nitrative stress, and cell death triggered by the ischemia/reperfusion mechanism. CBD suppressed the acute inflammatory response by the inhibition of Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cell activation (ICAM-1), which led to decreased pro-inflammatory cytokines (TNF- α) and chemokine (CCL3, CXCL2) expression, and likewise diminished the delayed inflammatory cell infiltration [126]. To sum up (Table 3), numerous studies pronounced that CBD treatment may give dual benefits in dealing with NAFLD, not only by decreasing hepatosteatosis but also by relieving associated inflammation, which would protect from NAFLD progression and complications in which excessive inflammation plays a crucial role [127]. Additionally, it has been proposed that targeting NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways in macrophages, with the use of CBD, might be a novel treatment method for the fibrotic complication, NASH [110].

Table 3. Studies analyzing the in vitro and in vivo effects of CBD in NAFLD and related diseases.

Main Outcome	Research Model	Dose of CBD	Reference
Reduced TAG levels in HHL5 ¹ cells, independently of CB1R or TRPV1R action Reduced TAG content of larvae yolk sacs Reduced liver TAG ⁸ content in ob/ob mice	HHL5 cell culture Zebrafish ² embryos and larvae Female ob/ob mice	10 μ M of CBD for 3 days 5 μ M of CBD for 3 days 3 mg/kg for 4 weeks	[125]
CBD alleviated lipid accumulation and steatohepatitis induced by HFC ⁵ diet (\downarrow of serum ALT and TAG concentration, \downarrow of hepatic TAG content in group treated with HFC+CBD versus HFC-only)	Male C57BL/6J mice fed with HFC diet and normal diet as control	5 mg/kg of CBD for 8 weeks	[92]
CBD attenuated markers of I/R-induced hepatic injury: ALT ⁶ , AST ⁷ , proinflammatory chemokine, cytokine, and adhesion molecule expression, NF- κ B ⁴ activation, cell necrosis and inflammatory cell infiltration.	Male C57BL/6J mice CB2 -/- mice exposed for hepatic I/R ³	3 and 10 mg/kg of CBD	[123]
Dose-dependent decrease in rats weight gain	Male Wistar rats	2.5 and 5 mg/kg/day for 14 days	[124]

¹ HHL5, Human hepatocyte line 5; ² Zebrafish, Danio rerio; ³ I/R, ischemia/reperfusion; ⁴ NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ⁵ HFC diet, high-fat cholesterol diet; ⁶ ALT, alanine transaminase; ⁷ AST, aspartate transaminase; ⁸ TAG, triacylglycerols; \downarrow , decrease.

Despite the very promising results of in vitro and in vivo animal studies, clinical studies have not confirmed any spectacular properties of CBD in relation to NAFLD treatment.

Important data about the possible positive influence of CBD comes from the completed phase II of a clinical study that evaluated the effects of GWP42003 (which is an acronym of CBD, a title given by GW Pharma—the company responsible for the study) on liver fat accumulation and other metabolic parameters in patients with fatty liver disease, compared to a placebo group. Participants self-administered CBD orally, in a daily dose of 200/400/800 mg (depending on the group) for 8 weeks. At the end of the investigation, liver triacylglycerol levels measured by MRI scan did not differ significantly. Moreover, mean total serum cholesterol concentration and total serum triacylglycerol were not significantly decreased, and there was no change in the ratio of HDL-C to LDL-C. During the trial, serious adverse effects were not disclosed, and the main reported mild adverse effects were diarrhea, dyspepsia, and nausea [128].

Another pilot clinical study determined the efficacy and safety of CBD alone, or in combination with THCv in patients with type 2 diabetes. Patients were divided into five groups that administered, respectively, 100 mg of CBD, 100 mg of CBD combined with 5 mg of THCv, 5 mg of CBD and 5 mg THCv, only 5 mg THCv, or only placebo. After 13 weeks of treatment, in the groups treated with CBD alone or in combination with THCv, the liver triacylglycerol accumulation measured by MRI scan did not differ significantly. There was also no significant difference in mean total serum triglyceride or cholesterol concentration.

However, in a group of subjects treated with 100 mg of CBD or 5 mg CBD + 5 mg THCV, mild deterioration occurred, as participants significantly gained in subcutaneous and internal fat [129] (Table 4). These cases demonstrate that studies on cell/animal models do not always predict direct clinical effects and pharmacology in humans, which underlies the need for clinical testing compounds *in vivo* before stating a conclusion on their suitability for a given purpose [75].

Table 4. Clinical studies analyzing the effects of CBD on liver fat accumulation.

Main Outcome	Research Model	Participants and CBD Dose	Method	Reference
No significant changes in visceral adiposity or liver TAG assessed by MRI/MRS after treatment.	Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study	62 subjects with T2DM treated with 200 mg CBD daily or placebo for 13 weeks	MRI/MRS ¹ scan to examine the liver fat content at the beginning and at end of treatment visit	[126]
Mean liver TAG levels did not significantly ($p > 0.05$) differ between the CBD and placebo groups.	Randomized, partially blind, placebo-controlled, dose-ranging phase 2 clinical study	25 participants with NAFLD treated with 200/400/800 mg of CBD daily or placebo for 8 weeks	MRI/MRS ¹ scan to examine the liver fat content at the baseline and at end of treatment visit	[125]
Mean % of liver fat did not change significantly ($p > 0.05$) after treatment.	Randomized, double blind, placebo controlled, parallel group, phase 2 clinical study	13 participants with T2DM treated with 100 mg CBD daily or placebo for 13 weeks	MRI/MRS ¹ scan to examine the liver fat content at the baseline and at end of treatment	[105]

¹ MRI/MRS, Magnetic Resonance Imaging/Magnetic Resonance Spectroscopy.

The possible reason for the lack of a decent therapeutic effect in clinical studies may be the low dose of CBD. The doses used in the cited clinical studies ranged from 100 to 800 mg/day, which, in the case of a 70 kg individual, will equal 1.4 to 11.4 mg/kg/day. Moreover, plasma concentrations were not measured in any study, thus it is not clear how much administered CBD reached the bloodstream. Rodent studies typically used 2.5 to 10 mg/kg/day, and most of the metabolic positive effects were seen at higher doses [130,131]. However, the question should be asked whether increasing the dose of CBD to one that caused a metabolic effect in mice will not cause unacceptable side effects, which would affect inpatient's low compliance.

Finally, it is worth noting that the mechanism of CBD activity observed in some of the cited studies may be not associated with the direct effects on CB receptors, but through inverse agonism for non-CB1R and non-CB2R cannabinoid-related orphan G protein-coupled receptors (GPCRs), GPR3 and GPR12, or by agonism of GPR55. [117,132] All of these receptors are expressed in the liver and despite the fact that their exact function in hepatic lipid metabolism is currently not fully known, it is worth mentioning. For instance, GPR3 or GPR12 knock-out mice displayed increased adiposity and liver fat accumulation [117]. Studies on GPR55 have an ambiguous character. In an experiment conducted by Lipina et al., GPR55 knock-out mice developed obesity, and it displayed a reduction in insulin signaling capacity [20]. On the other hand, in some research, no tendency to increased adiposity was seen in GPR55 knock-out mice compared to wild type mice [133,134]. Development of agents affecting these orphan receptors may be an approach that could provide new therapeutic possibilities [117].

8. THCv and NAFLD

Tetrahydrocannabivarin (THCV), after CBD, is known as a non-psychoactive analog of THC presented in *Cannabis*. It has interesting pharmacodynamic properties in humans, as it can act on cannabinoid receptors in a dose-dependent manner. In low doses, it acts as a neutral antagonist of CB1R and a partial agonist of CB2R, while in high doses it acts as a CB1R/CB2R agonist. Moreover, THCV is also acting on GPR55 and transient receptor potential channels (TRP), but the effects of THCV on this type of receptors are relatively less well documented [75,80,130]. In the presence of other cannabinoids, THCV acts as a competitive antagonist of CB1R. It can reverse many of the effects mediated by THC in vivo, as it was shown to antagonize CB1R and CB2R mediated effects in mice models in the presence of THC or anandamide [78,102]. Furthermore, THCV was shown to diminish the THC-mediated tachycardia and psychogenic effects in humans, which confirms its antagonistic potential on CB1R. At the same time, it does not cause the depressive effects associated with central CB1R antagonism [135].

There are in vivo studies (Table 5) that have shown that THCV can be a promising agent in preventing the development of NAFLD and its complications. In research using obese mice, THCV showed many positive properties in the context of counteracting NAFLD. Therapy with THCV improved glucose-insulin metabolism, reduced body weight, decreased appetite, and, most importantly, reduced hepatic lipid accumulation [136]. Supporting this data are studies conducted on human hepatocytes, where THCV was effective in reducing intracellular triacylglycerol levels [125]. The molecular mechanism of THCV action that contributes to its therapeutic effect remains unknown. However, in vitro studies proposed that beneficial effects of THCV were due to antagonism of CB1R, mainly in the liver and adipose tissue, while other reports claimed that THCV acted directly on hepatocytes, without impact on any known receptor [125]. In human hepatocytes, THCV lowered intracellular lipid levels and stimulated lipolysis through activation of AMPK2 α , STATs, and ERK1/2, which are the key transcription factors regulating the cellular energy metabolism [125]. The above mentioned positive properties of THCV have led to the commencement of several clinical studies in which the effect of this compound on improving metabolic parameters in diabetic patients was examined [129]. Some improvements in glycemic parameters have been observed in the group administering 5 mg of THCV through 13 weeks versus placebo—a decrease in fasting glucose levels and amelioration in insulin β cell function measured by HOMA2 index [129]. However, none of the cited clinical studies (Table 6) showed a significant improvement in liver lipid accumulation. The lack of ameliorating effects in the liver triglyceride accumulation may be a consequence of low THCV dose (5 mg) [129]. Perhaps the application of a higher dose could bring some significant effects in lipid metabolism improvement, bearing in mind the fact that doses that effectively reduced liver steatosis in rats were significantly higher (12.5 mg/kg) [136]. It is worth emphasizing that the use of higher doses of THCV in humans did not cause any notable side effects [135]. What is more, a study with healthy humans demonstrated that oral administration of 10 mg THCV can positively modulate brain neuronal regions that are associated with appetite dysregulation and obesity development. Thus, it could be suspected that THCV may be an anti-obesity medication [137]. Undoubtedly, more research is needed (perhaps using higher doses) to determine whether THCV can find a place in NAFLD therapy.

Table 5. In vitro and rat in vivo studies analyzing the effects of THCv in NAFLD and its comorbidities development.

Main Outcome	Research Model	Dose of THCv	Reference
Reduction of body mass, an increase of energy expenditure, improvement of glucose tolerance, and amelioration of insulin resistance. No significant effect on liver TAG content. Increase of energy expenditure, significant reduction of liver TAG content.	-DIO ¹ mice -ob/ob mice	12.5 mg/kg of THCv for 30 days 12.5 mg/kg of THCv for 30 days	[129]
Reduced TAG levels in HHL5 cells, independently of CB1R or TRPV1R action. Reduced TAG content of larvae yolk sacs	-HHL5 ² cell culture -Zebrafish ³ embryos and larvae	10 µM of THCv for 3 days 10 µM for 3 days	[125]
Decrease in body weight, hypophagia	Male C57 BL6 mice	3 mg/kg of THCv for 2 days	[131]

¹ DIO, Diet-induced obesity; ² HHL5, Human hepatocyte line 5; ³ Zebrafish, Danio rerio.

Table 6. Clinical studies analyzing the effects of THCv in NAFLD and related disorders development.

Main Outcome	Research Model	Participants	Method	Reference
Mean % of liver fat did not change significantly (<i>p</i> > 0.05) after treatment	Randomized, double blind, placebo controlled, parallel group, phase 2 clinical study	13 participants with T2DM treated with 5 mg of THCv daily or placebo for 13 weeks	MRI/MRS ¹ scan to examine the liver fat content at the baseline and at end-of-treatment	[105]
No significant changes in liver TAG concentration or visceral adiposity in any of the treatment groups.	Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study	62 subjects with T2DM treated with 5 mg of THCv daily or placebo for 13 weeks	MRI/MRS scan to examine the liver fat content at the beginning and at end-of-treatment visit	[126]
Increase of neural responding to rewarding and aversive stimuli	Double-blind clinical study	20 healthy participants received 10 mg of THCv daily or placebo	fMRI ² scan to examine neural response to rewarding and aversive food stimuli	[130]

¹ MRI/MRS, Magnetic Resonance Imaging/Magnetic Resonance Spectroscopy; ² fMRI, Functional Magnetic Resonance Imaging.

9. Conclusions

Our review comprehensively summarized investigations showing the involvement of two CBR types in NAFLD development and progression. It seems that these components

of the ECS system may be a valuable target in the treatment of NAFLD and its systemic complications. Furthermore, based on the presented clinical studies, we demonstrated that the pharmacological effect of phytocannabinoids counteracting NAFLD exist. However, the lack of therapeutic methods in hepatosteatosis treatment motivates scientists to investigate the possibilities of ECS action modifications, the system that is strongly engaged in NAFLD pathophysiology. Extending knowledge about the usefulness of natural cannabinoids in NAFLD and its comorbidities treatment seems extremely important, bearing in mind that obesity and its metabolic sequelae are a 21st-century global epidemic.

Author Contributions: Conceptualization, K.K.-N. and K.B.; methodology, K.B.; software, A.C.; validation, H.Z., T.C. and K.B.; formal analysis, H.Z.; investigation, W.B. and K.B.; resources, T.C.; data curation, T.C.; writing—original draft preparation, K.B. and W.B.; writing—review and editing, K.K.-N., K.B. and W.B.; visualization, K.B.; supervision, K.K.-N.; project administration, A.C.; funding acquisition, K.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kanwar, P.; Kowdley, K.V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **2016**, *20*, 225–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Diehl, A.M.; Brunt, E.M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **2012**, *55*, 2005–2023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lonardo, A.; Bellentani, S.; Argo, C.K.; Ballestri, S.; Byrne, C.D.; Caldwell, S.H.; Cortez-Pinto, H.; Grieco, A.; Machado, M.V.; Miele, L.; et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig. Liver Dis.* **2015**, *47*, 997–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tilg, H.; Moschen, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **2010**, *52*, 1836–1846. [[CrossRef](#)]
5. Buzzetti, E.; Pinzani, M.; Tsochatzis, E.A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **2016**, *65*, 1038–1048. [[CrossRef](#)]
6. Cristino, L.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2020**, *16*, 9–29. [[CrossRef](#)]
7. Maccarrone, M.; Bab, I.; Bíró, T.; Cabral, G.A.; Dey, S.K.; Di Marzo, V.; Konje, J.C.; Kunos, G.; Mechoulam, R.; Pacher, P.; et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 277–296. [[CrossRef](#)]
8. Baggelaar, M.P.; Maccarrone, M.; van der Stelt, M. 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Prog. Lipid Res.* **2018**, *71*, 1–17. [[CrossRef](#)]
9. Horne, E.A.; Stella, N. The ins and outs of endocannabinoid signaling in healthy and diseased brain. *Future Lipidol.* **2008**, *3*, 435–452. [[CrossRef](#)]
10. Siegmund, S.V.; Qian, T.; De Minicis, S.; Harvey-White, J.; Kunos, G.; Vinod, K.Y.; Hungund, B.; Schwabe, R.F. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2798–2806. [[CrossRef](#)]
11. Urquhart, P.; Nicolaou, A.; Woodward, D.F. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 366–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. De Bus, I.; Witkamp, R.; Zuilhof, H.; Albada, B.; Balvers, M. The role of n-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2019**, *144*, 106351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Herkenham, M.; Lynn, A.B.; Little, M.D.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; De Costa, B.R.; Rice, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1932–1936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zou, S.; Kumar, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 833.
15. Pacher, P.; Mechoulam, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 193–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wold, E.A.; Chen, J.; Cunningham, K.A.; Zhou, J. Allosteric Modulation of Class A GPCRs: Targets, Agents, and Emerging Concepts. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 88–127. [[CrossRef](#)]
17. Ye, L.; Cao, Z.; Wang, W.; Zhou, N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2019**, *12*, 239–248. [[CrossRef](#)]

18. Morales, P.; Reggio, P.H. GPCRs and Insulin Receptor Signaling in Conversation: Novel Avenues for Drug Discovery. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2017**, *19*, 1436–1444.
19. Bazwinsky-Wutschke, I.; Zipprich, A.; Dehghani, F. Endocannabinoid System in Hepatic Glucose Metabolism, Fatty Liver Disease, and Cirrhosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2516. [[CrossRef](#)]
20. Lipina, C.; Walsh, S.K.; Mitchell, S.E.; Speakman, J.R.; Wainwright, C.L.; Hundal, H.S. GPR55 deficiency is associated with increased adiposity and impaired insulin signaling in peripheral metabolic tissues. *FASEB J.* **2019**, *33*, 1299–1312. [[CrossRef](#)]
21. Balenga, N.A.B.; Aflaki, E.; Kargl, J.; Platzer, W.; Schröder, R.; Blättermann, S.; Kostenis, E.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* **2011**, *21*, 1452–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Simcocks, A.C.; O’Keefe, L.; Jenkin, K.A.; Mathai, M.L.; Hryciw, D.H.; McAinch, A.J. A potential role for GPR55 in the regulation of energy homeostasis. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1145–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yang, J.W.; Kim, H.S.; Im, J.H.; Kim, J.W.; Jun, D.W.; Lim, S.C.; Lee, K.; Choi, J.M.; Kim, S.K.; Kang, K.W. GPR119: A promising target for nonalcoholic fatty liver disease. *FASEB J.* **2016**, *30*, 324–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rajaraman, G.; Simcocks, A.; Hryciw, D.H.; Hutchinson, D.S.; McAinch, A.J. G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 92–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, J.W.; Choi, Y.W.; Kim, Y.M.; Kang, K.W. Therapeutic application of GPR119 ligands in metabolic disorders. *Diabetes Obes. Metab.* **2018**, *20*, 257–269. [[CrossRef](#)]
26. Reggio, P.H.; Shore, D.M. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 69.
27. Tam, J.; Liu, J.; Mukhopadhyay, B.; Cinar, R.; Godlewski, G.; Kunos, G. Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology* **2011**, *53*, 346–355. [[CrossRef](#)]
28. González-Mariscal, I.; Krzysik-Walker, S.M.; Doyle, M.E.; Liu, Q.R.; Cimbri, R.; Santa-Cruz Calvo, S.; Ghosh, S.; Cieala, A.; Moaddel, R.; Carlson, O.D.; et al. Human CB1 Receptor Isoforms, present in Hepatocytes and β -cells, are Involved in Regulating Metabolism. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33302. [[CrossRef](#)]
29. Turcotte, C.; Blanchet, M.R.; Laviolette, M.; Flamand, N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4449–4470. [[CrossRef](#)]
30. Wu, H.M.; Kim, T.H.; Kim, A.; Koo, J.H.; Joo, M.S.; Kim, S.G. Liver X Receptor α -Induced Cannabinoid Receptor 2 Inhibits Ubiquitin-Specific Peptidase 4 Through miR-27b, Protecting Hepatocytes From TGF- β . *Hepatology. Commun.* **2019**, *3*, 1373–1387. [[CrossRef](#)]
31. Busquets-Garcia, A.; Bains, J.; Marsicano, G. CB 1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology* **2018**, *43*, 4–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bazwinsky-Wutschke, I.; Zipprich, A.; Dehghani, F. Daytime-Dependent changes of cannabinoid receptor type 1 and type 2 expression in rat liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vaughn, L.K.; Denning, G.; Stuhr, K.L.; De Wit, H.; Hill, M.N.; Hillard, C.J. Endocannabinoid signalling: Has it got rhythm? *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 530–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Thompson, M.D.; Sakurai, T.; Rainero, I.; Maj, M.C.; Kukkonen, J.P. Orexin receptor multimerization versus functional interactions: Neuropharmacological implications for opioid and cannabinoid signalling and pharmacogenetics. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Joshi, N.; Onaivi, E.S. Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: Cham, Switzerland, 2019.
36. Wang, M.; Meng, N.; Chang, Y.; Tang, W. Endocannabinoids signaling: Molecular mechanisms of liver regulation and diseases. *Front. Biosci. Landmark* **2016**, *21*, 1488–1501.
37. Ruiz de Azua, I.; Lutz, B. Multiple endocannabinoid-mediated mechanisms in the regulation of energy homeostasis in brain and peripheral tissues. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 1341–1363. [[CrossRef](#)]
38. Agudo, J.; Martin, M.; Roca, C.; Molas, M.; Bura, A.S.; Zimmer, A.; Bosch, F.; Maldonado, R. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* **2010**, *53*, 2629–2640. [[CrossRef](#)]
39. Kirkham, T.C. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav. Pharmacol.* **2005**, *16*, 297–313. [[CrossRef](#)]
40. Miranda, R.A.; De Almeida, M.M.; Da Rocha, C.P.D.; de Brito Fassarella, L.; De Souza, L.L.; De Souza, A.F.P.; De Andrade, C.B.V.; Fortunato, R.S.; Pazos-Moura, C.C.; Trevenzoli, I.H. Maternal high-fat diet consumption induces sex-dependent alterations of the endocannabinoid system and redox homeostasis in liver of adult rat offspring. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)]
41. Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, S.; Batakai, S.; Harvey-White, J.; Mackie, K.; Offertaler, L.; Wang, L.; et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1298–1305. [[CrossRef](#)]
42. De Gottardi, A.; Spahr, L.; Ravier-Dall’Antonia, F.; Hadengue, A. Cannabinoid receptor 1 and 2 agonists increase lipid accumulation in hepatocytes. *Liver Int.* **2010**, *30*, 1482–1489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dibba, P.; Li, A.; Cholankeril, G.; Iqbal, U.; Gadiparthi, C.; Khan, M.; Kim, D.; Ahmed, A. Mechanistic Potential and Therapeutic Implications of Cannabinoids in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicines* **2018**, *5*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Liu, J.; Cinar, R.; Xiong, K.; Godlewski, G.; Jourdan, T.; Lin, Y.; Ntambi, J.M.; Kunos, G. Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 18832–18837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Osei-Hyiaman, D.; Liu, J.; Zhou, L.; Godlewski, G.; Harvey-White, J.; Jeong, W.I.; Bátkai, S.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Buettner, C.; et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 3160–3169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tam, J.; Godlewski, G.; Earley, B.J.; Zhou, L.; Jourdan, T.; Szanda, G.; Cinar, R.; Kunos, G. Role of adiponectin in the metabolic effects of cannabinoid type 1 receptor blockade in mice with diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2014**, *306*, E457–E468. [[CrossRef](#)]
47. Irungham, K.; Churin, Y.; Matono, T.; Weglage, J.; Ocker, M.; Glebe, D.; Hardt, M.; Koepfel, A.; Roderfeld, M.; Roeb, E. Cannabinoid receptor 1 knockout alleviates hepatic steatosis by downregulating perilipin 2. *Lab. Investig.* **2019**, *100*, 454–465. [[CrossRef](#)]
48. Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z.M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 274–285. [[CrossRef](#)]
49. Mu, W.; Xuefang, C.; Liu, Y.; Qianzhou, L.; Gaolin, L.; Jigang, Z.; Xiaoyu, L. Potential nexus of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: Insulin resistance between hepatic and peripheral tissues. *Front. Pharmacol.* **2019**, *9*, 1566. [[CrossRef](#)]
50. Sabio, G.; Das, M.; Mora, A.; Zhang, Z.; Jun, J.Y.; Hwi, J.K.; Barrett, T.; Kim, J.K.; Davis, R.J. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* **2008**, *322*, 1539–1543. [[CrossRef](#)]
51. O'Hare, J.D.; Zielinski, E.; Cheng, B.; Scherer, T.; Buettner, C. Central endocannabinoid signaling regulates hepatic glucose production and systemic lipolysis. *Diabetes* **2011**, *60*, 1055–1062. [[CrossRef](#)]
52. Jourdan, T.; Godlewski, G.; Kunos, G. Endocannabinoid regulation of β -cell functions: Implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2016**, *18*, 549–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chanda, D.; Kim, D.K.; Li, T.; Kim, Y.H.; Koo, S.H.; Lee, C.H.; Chiang, J.Y.L.; Choi, H.S. Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of endoplasmic reticulum-bound transcription factor cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH) in primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27971–27979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liu, J.; Zhou, L.; Xiong, K.; Godlewski, G.; Mukhopadhyay, B.; Tam, J.; Yin, S.; Gao, P.; Shan, X.; Pickel, J.; et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1218–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bermudez-Silva, F.J.; Sanchez-Vera, I.; Suárez, J.; Serrano, A.; Fuentes, E.; Juan-Pico, P.; Nadal, A.; Rodríguez de Fonseca, F. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *565*, 207–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rossi, F.; Bellini, G.; Luongo, L.; Manzo, I.; Tolone, S.; Tortora, C.; Bernardo, M.E.; Grandone, A.; Conforti, A.; Docimo, L.; et al. Cannabinoid receptor 2 as antiobesity target: Inflammation, fat storage, and browning modulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 3469–3478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Deveaux, V.; Cadoudal, T.; Ichigotani, Y.; Teixeira-Clerc, F.; Louvet, A.; Manin, S.; Van Nhieu, J.T.; Belot, M.P.; Zimmer, A.; Even, P.; et al. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5844. [[CrossRef](#)]
58. Sáez, T.; Salsoso, R.; Leiva, A.; Toledo, F.; de Vos, P.; Faas, M.; Sobrevia, L. Human umbilical vein endothelium-derived exosomes play a role in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 499–508. [[CrossRef](#)]
59. Atwood, B.K.; MacKie, K. CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 467–479. [[CrossRef](#)]
60. Mendez-Sanchez, N.; Zamora-Valdes, D.; Pichardo-Bahena, R.; Barredo-Prieto, B.; Ponciano-Rodríguez, G.; Bermejo-Martínez, L.; Chavez-Tapia, N.C.; Baptista-González, H.A.; Uribe, M. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **2007**, *27*, 215–219. [[CrossRef](#)]
61. Auguet, T.; Berlanga, A.; Guiu-Jurado, E.; Terra, X.; Martínez, S.; Aguilar, C.; Filiu, E.; Alibalic, A.; Sabench, F.; Hernández, M.; et al. Endocannabinoid receptors gene expression in morbidly obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 502542. [[CrossRef](#)]
62. Dibba, P.; Li, A.; Cholankeril, G.; Iqbal, U.; Gadiparthi, C.; Khan, M.; Kim, D.; Ahmed, A. The Role of Cannabinoids in the Setting of Cirrhosis. *Medicines* **2018**, *5*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jorgačević, B.; Vučević, D.; Vesković, M.; Mladenović, D.; Vukićević, D.; Vukićević, R.J.; Todorović, V.; Radosavljević, T. The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on adipokine and proinflammatory cytokine concentration in adipose and hepatic tissue in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *97*, 120–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Baldassarre, M.; Giannone, F.A.; Napoli, L.; Tovoli, A.; Ricci, C.S.; Tufoni, M.; Caraceni, P. The endocannabinoid system in advanced liver cirrhosis: Pathophysiological implication and future perspectives. *Liver Int.* **2013**, *33*, 1298–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Julien, B.; Grenard, P.; Teixeira-Clerc, F.; Van Nhieu, J.T.; Li, L.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 742–755. [[CrossRef](#)]
66. Guillot, A.; Hamdaoui, N.; Bizy, A.; Zoltani, K.; Souktani, R.; Zafrani, E.S.; Mallat, A.; Lotersztajn, S.; Lafdil, F. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology* **2014**, *59*, 296–306. [[CrossRef](#)]




67. Muñoz-Luque, J.; Ros, J.; Fernández-Varo, G.; Tugues, S.; Morales-Ruiz, M.; Alvarez, C.E.; Friedman, S.L.; Arroyo, V.; Jiménez, W. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 475–483. [CrossRef]
68. O'Sullivan, S.E. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: An update and review of the physiological relevance. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2013**, *2*, 17–25. [CrossRef]
69. O'Sullivan, S.E. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 1899–1910. [CrossRef]
70. Jin, D.; Dai, K.; Xie, Z.; Chen, J. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14. [CrossRef]
71. Aizpurua-Olaizola, O.; Soydaner, U.; Öztürk, E.; Schibano, D.; Simsir, Y.; Navarro, P.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 324–331. [CrossRef]
72. Wu, J. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: Yesterday, today, and tomorrow. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 297–299. [CrossRef] [PubMed]
73. Palomares, B.; Ruiz-Pino, F.; Navarrete, C.; Velasco, I.; Sánchez-Garrido, M.A.; Jimenez-Jimenez, C.; Pavicic, C.; Vazquez, M.J.; Appendino, G.; Bellido, M.L.; et al. Tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A) reduces adiposity and prevents metabolic disease caused by diet-induced obesity. *Sci. Rep.* **2019**, *171*, 113693. [CrossRef] [PubMed]
74. Franco, R.; Rivas-Santisteban, R.; Reyes-Resina, I.; Casanovas, M.; Pérez-Olives, C.; Ferreira-Vera, C.; Navarro, G.; Sánchez de Medina, V.; Nadal, X. Pharmacological potential of varinic-, minor-, and acidic phytocannabinoids. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104801. [CrossRef] [PubMed]
75. McPartland, J.M.; Duncan, M.; Di Marzo, V.; Pertwee, R.G. Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 737–753. [CrossRef]
76. Goyal, H.; Rahman, M.R.; Perisetti, A.; Shah, N.; Chhabra, R. Cannabis in liver disorders: A friend or a foe? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *30*, 1283–1290. [CrossRef]
77. Laprairie, R.B.; Bagher, A.M.; Kelly, M.E.M.; Denovan-Wright, E.M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4790–4805. [CrossRef]
78. Pertwee, R.G. The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 199–215. [CrossRef]
79. Morales, P.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; Volume 103, pp. 103–131.
80. Borgelt, L.M.; Franson, K.L.; Nussbaum, A.M.; Wang, G.S. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy* **2013**, *33*, 195–209. [CrossRef]
81. Product Monograph. Eliquis[®]. 2010. ISBN 1866234234. Available online: https://www.pfizer.ca/sites/default/files/201910/ELIQUIS_PM_229267_07Oct2019_Marketed_E.pdf (accessed on 20 November 2020).
82. U.S. Food and Drug Administration. Cesamet (nabilone) Capsules. Nda 18-677/S-011; 2006. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/018677s011lbl.pdf (accessed on 10 November 2020).
83. U.S. Food and Drug Administration. Marinol (Dronabinol) Technical Sheet. Nda 18-651/s-021; 2004. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/018651s021lbl.pdf (accessed on 10 November 2020).
84. Greenwich Biosciences Inc. Full prescribing information of EPIDIOLEX. Prescr. Inf. Leaflet, 2018. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210365lbl.pdf (accessed on 10 November 2020).
85. GW Pharma, L. Part III: Consumer Information Sativex[®]. Prod. Monogr.; 2015. Available online: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00016162.PDF (accessed on 10 November 2020).
86. Kirkham, T.C. Cannabinoids and appetite: Food craving and food pleasure. *Int. Rev. Psychiatry* **2009**, *21*, 163–171. [CrossRef]
87. Foltin, R.W.; Fischman, M.W.; Byrne, M.F. Effects of smoked marijuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite* **1988**, *11*, 1–14. [CrossRef]
88. Rodondi, N.; Pletcher, M.J.; Liu, K.; Hulley, S.B.; Sidney, S. Marijuana Use, Diet, Body Mass Index, and Cardiovascular Risk Factors (from the CARDIA Study). *Am. J. Cardiol.* **2006**, *98*, 478–484. [CrossRef] [PubMed]
89. Rajavashisth, T.B.; Shaheen, M.; Norris, K.C.; Pan, D.; Sinha, S.K.; Ortega, J.; Friedman, T.C. Decreased prevalence of diabetes in marijuana users: Cross-sectional data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *BMJ Open* **2012**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
90. Smit, E.; Crespo, C.J. Dietary intake and nutritional status of US adult marijuana users: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Public Health Nutr.* **2001**, *4*, 781–786. [CrossRef] [PubMed]
91. Penner, E.A.; Buettner, H.; Mittleman, M.A. The impact of marijuana use on glucose, insulin, and insulin resistance among US adults. *Am. J. Med.* **2013**, *126*, 583–589. [CrossRef] [PubMed]
92. Carrieri, M.P. Cannabis use and reduced risk of insulin-resistance in HIV-HCV infected patients: A longitudinal analysis (ANRS HEPAVIH CO-13). *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 40–48. [CrossRef]
93. Le Strat, Y.; Le Foll, B. Obesity and cannabis use: Results from 2 representative national surveys. *Am. J. Epidemiol.* **2011**, *174*, 929–933. [CrossRef]

94. Vidot, D.C.; Prado, G.; Hlaing, W.W.M.; Florez, H.J.; Arheart, K.L.; Messiah, S.E. Metabolic Syndrome Among Marijuana Users in the United States: An Analysis of National Health and Nutrition Examination Survey Data. *Am. J. Med.* **2016**, *129*, 173–179. [[CrossRef](#)]
95. Muniyappa, R.; Sable, S.; Ouwerkerk, R.; Mari, A.; Gharib, A.M.; Walter, M.; Courville, A.; Hall, G.; Chen, K.Y.; Volkow, N.D.; et al. Metabolic effects of chronic cannabis smoking. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 2415–2422. [[CrossRef](#)]
96. Sansone, R.A.; Sansone, L.A. Marijuana and body weight. *Innov. Clin. Neurosci.* **2014**, *11*, 50–54.
97. Hayatbakhsh, M.R.; O'Callaghan, M.J.; Mamun, A.A.; Williams, G.M.; Clavarino, A.; Najman, J.M. Cannabis use and obesity and young adults. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **2010**, *36*, 350–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Kim, D.; Kim, W.; Kwak, M.S.; Chung, G.E.; Yim, J.Y.; Ahmed, A. Inverse association of marijuana use with nonalcoholic fatty liver disease among adults in the United States. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Vázquez-Bougon, J.; Ortiz-García de la Foz, V.; Suarez-Pereira, I.; Iruzubieta, P.; Arias-Loste, M.T.; Setién-Suero, E.; Ayesa-Arriola, R.; Gómez-Revuelta, M.; Crespo, J.; Crespo Facorro, B. Cannabis consumption and non-alcoholic fatty liver disease. A three years longitudinal study in first episode non-affective psychosis patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2019**, *95*, 109677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Adejumo, A.C.; Alliu, S.; Ajayi, T.O.; Adejumo, K.L.; Adegala, O.M.; Onyeakusi, N.E.; Akinjero, A.M.; Durojaiye, M.; Bukong, T.N. Cannabis use is associated with reduced prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176416. [[CrossRef](#)]
101. Thomas, A.; Baillie, G.L.; Phillips, A.M.; Razdan, R.K.; Ross, R.A.; Pertwee, R.G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 613–623. [[CrossRef](#)]
102. Thomas, A.; Stevenson, L.A.; Wease, K.N.; Price, M.R.; Baillie, G.; Ross, R.A.; Pertwee, R.G. Evidence that the plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol is a cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 917–926. [[CrossRef](#)]
103. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 11. [[CrossRef](#)]
104. Brauner-Reuther, V.; Viviani, G.L.; Mach, F.; Montecucco, F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 727–735. [[CrossRef](#)]
105. Huang, Y.; Wan, T.; Pang, N.; Zhou, Y.; Jiang, X.; Li, B.; Gu, Y.; Huang, Y.; Ye, X.; Lian, H.; et al. Cannabidiol protects livers against nonalcoholic steatohepatitis induced by high-fat high cholesterol diet via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 21224–21234. [[CrossRef](#)]
106. Ribeiro, A.; Ferraz-De-Paula, V.; Pinheiro, M.L.; Vitoretto, L.B.; Mariano-Souza, D.P.; Quinteiro-Filho, W.M.; Akamine, A.T.; Almeida, V.I.; Quevedo, J.; Dal-Pizzol, F.; et al. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A2A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *678*, 78–85. [[CrossRef](#)]
107. Hirvonen, J.; Goodwin, R.S.; Li, C.T.; Terry, G.E.; Zoghbi, S.S.; Morse, C.; Pike, V.W.; Volkow, N.D.; Huestis, M.A.; Innis, R.B. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol. Psychiatry* **2012**, *17*, 642–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Mechoulam, R. Plant cannabinoids: A neglected pharmacological treasure trove. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 913–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Dibba, P.; Li, A.A.; Cholankeril, G.; Ali Khan, M.; Kim, D.; Ahmed, A. Potential Mechanisms Influencing the Inverse Relationship Between Cannabis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Commentary. *Nutr. Metab. Insights* **2019**, *12*, 117863881984748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Mridha, A.R.; Wree, A.; Robertson, A.A.B.; Yeh, M.M.; Johnson, C.D.; Van Rooyen, D.M.; Haczeyni, F.; Teoh, N.C.H.; Savard, C.; Ioannou, G.N.; et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, 1037–1046. [[CrossRef](#)]
111. Koppel, B.S.; Brust, J.C.M.; Fife, T.; Bronstein, J.; Yousof, S.; Gronseth, G.; Gloss, D. Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2014**, *82*, 1556–1563. [[CrossRef](#)]
112. Maroon Joseph, B.J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg. Neurol. Int.* **2018**, *9*, 91. [[CrossRef](#)]
113. Wiley, J.L.; Burston, J.J.; Leggett, D.C.; Alekseeva, O.O.; Razdan, R.K.; Mahadevan, A.; Martin, B.R. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 293–300. [[CrossRef](#)]
114. Koch, J.E.; Matthews, S.M. Δ^9 -tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in lewis rats: Effects of peripheral and central administration. *Nutr. Neurosci.* **2001**, *4*, 179–187. [[CrossRef](#)]
115. McIntosh, A.L.; Martin, G.G.; Huang, H.; Landrock, D.; Kier, A.B.; Schroeder, F. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces endocannabinoid accumulation in mouse hepatocytes: Antagonism by Fabp1 gene ablation. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 646–657. [[CrossRef](#)]
116. Farrimond, J.A.; Hill, A.J.; Whalley, B.J.; Williams, C.M. Cannabis constituents modulate δ^9 -tetrahydrocannabinol induced hyperphagia in rats. *Psychopharmacology* **2010**, *210*, 97–106. [[CrossRef](#)]
117. Laun, A.S.; Shrader, S.H.; Brown, K.J.; Song, Z.H. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: Their biological functions and interaction with cannabidiol. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 300–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. White, C.M. A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. *J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *59*, 923–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

119. Viudez-Martínez, A.; García-Gutiérrez, M.S.; Medrano-Relinque, J.; Navarrón, C.M.; Navarrete, F.; Manzanares, J. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 358–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Iffland, K.; Grotenhermen, F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2017**, *2*, 139–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Ewing, L.E.; Skinner, C.M.; Quick, C.M.; Kennon-McGill, S.; McGill, M.R.; Walker, L.A.; ElSohly, M.A.; Gurley, B.J.; Koturbash, I. Hepatotoxicity of a Cannabidiol-rich cannabis extract in the mouse model. *Molecules* **2019**, *24*, 1694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Yang, L.; Rozenfeld, R.; Wu, D.; Devi, L.A.; Zhang, Z.; Cederbaum, A. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *68*, 260–267. [[CrossRef](#)]
123. Costa, B.; Colleoni, M.; Conti, S.; Parolaro, D.; Franke, C.; Trovato, A.E.; Giagnoni, G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *369*, 294–299. [[CrossRef](#)]
124. Vilela, L.R.; Gomides, L.F.; David, B.A.; Antunes, M.M.; Diniz, A.B.; De Araújo Moreira, F.; Menezes, G.B. Cannabidiol rescues acute hepatic toxicity and seizure induced by cocaine. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 523418. [[CrossRef](#)]
125. Silvestri, C.; Paris, D.; Martella, A.; Melck, D.; Guadagnino, I.; Cawthorne, M.; Motta, A.; Di Marzo, V. Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 1382–1390. [[CrossRef](#)]
126. Mukhopadhyay, P.; Rajesh, M.; Horváth, B.; Bátkai, S.; Park, O.; Tanchian, G.; Gao, R.Y.; Patel, V.; Wink, D.A.; Liaudet, L.; et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrate stress, and cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1368–1381. [[CrossRef](#)]
127. Czaja, A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 2515–2532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. GW Research Ltd. *Study to Evaluate the Effect of GWP42003 on Liver Fat Levels in Participants With Fatty Liver Disease*; GW Research Ltd.: London, UK, 2014.
129. GW Research Ltd. *GWMD1092—GWP42003: GWP42004 Together Plus Alone in Type II Diabetes*; GW Research Ltd.: London, UK, 2014.
130. Jadoon, K.A.; Ratcliffe, S.H.; Barrett, D.A.; Thomas, E.L.; Stott, C.; Bell, J.D.; O'Sullivan, S.E.; Tan, G.D. Efficacy and safety of cannabidiol and tetrahydrocannabinol on glycemic and lipid parameters in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 1777–1786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Millar, S.A.; Stone, N.L.; Bellman, Z.D.; Yates, A.S.; England, T.J.; O'Sullivan, S.E. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *85*, 1888–1900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Tuduri, E.; Imbernon, M.; Hernández-Bautista, R.J.; Tojo, M.; Fernø, J.; Diéguez, C.; Nogueiras, R. GPR55: A new promising target for metabolism? *J. Mol. Endocrinol.* **2009**, *58*, R191–R202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Bjursell, M.; Ryberg, E.; Wu, T.; Greasley, P.J.; Bohlooly-Y, M.; Hjorth, S. Deletion of Gpr55 results in subtle effects on energy metabolism, motor activity and thermal pain sensation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167965. [[CrossRef](#)]
134. Wu, C.S.; Chen, H.; Sun, H.; Zhu, J.; Jew, C.P.; Wager-Miller, J.; Straiker, A.; Spencer, C.; Bradshaw, H.; Mackie, K.; et al. GPR55, a G-Protein Coupled Receptor for Lysophosphatidylinositol, Plays a Role in Motor Coordination. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60314. [[CrossRef](#)]
135. Englund, A.; Atakan, Z.; Kralj, A.; Tunstall, N.; Murray, R.; Morrison, P. The effect of five day dosing with THC on THC-induced cognitive, psychological and physiological effects in healthy male human volunteers: A placebo-controlled, double-blind, crossover pilot trial. *J. Psychopharmacol.* **2016**, *30*, 140–151. [[CrossRef](#)]
136. Wargent, E.T.; Zaibi, M.S.; Silvestri, C.; Hislop, D.C.; Stocker, C.J.; Stott, C.G.; Guy, G.W.; Duncan, M.; Di Marzo, V.; Cawthorne, M.A. The cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutr. Diabetes* **2013**, *3*, e68. [[CrossRef](#)]
137. Rzepa, E.; Tudge, L.; McCabe, C. The CB1 neutral antagonist tetrahydrocannabinol reduces default mode network and increases executive control network resting state functional connectivity in healthy volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2016**, *19*, 1–7. [[CrossRef](#)]

Article

Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats

Klaudia Berk ^{*}, Karolina Konstantynowicz-Nowicka, Tomasz Charytoniuk , Ewa Harasim-Symbor  and Adrian Chabowski 

Department of Physiology, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland; karolina.konstantynowicz@umb.edu.pl (K.K.-N.); tomasz.charytoniuk@umb.edu.pl (T.C.); eharasim@umb.edu.pl (E.H.-S.); adrian@umb.edu.pl (A.C.)

^{*} Correspondence: klaudia.berk@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-7488-5585

Abstract: Available data suggest that cannabidiol (CBD) may ameliorate symptoms of insulin resistance by modulating the sphingolipid concentrations in particular organs. However, it is not entirely clear whether its beneficial actions also involve adipose tissues in a state of overnutrition. The aim of the study was to evaluate the effect of CBD on sphingolipid metabolism pathways and, as a result, on the development of insulin resistance in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of an animal model of HFD-induced insulin resistance. Our experiment was performed on Wistar rats that were fed with a high-fat diet and/or received intraperitoneal CBD injections. We showed that CBD significantly lowered the ceramide content in VAT by reducing its *de novo* synthesis and increasing its catabolism. However, in SAT, CBD decreased the ceramide level through the inhibition of salvage and *de novo* synthesis pathways. All of these changes restored adipose tissues' sensitivity to insulin. Our study showed that CBD sensitized adipose tissue to insulin by influencing the metabolism of sphingolipids under the conditions of increased availability of fatty acids in the diet. Therefore, we believe that CBD use may be considered as a potential therapeutic strategy for treating or reducing insulin resistance, T2DM, and metabolic syndrome.

Keywords: cannabidiol; insulin resistance; sphingolipids; adipose tissue; ceramide



Citation: Berk, K.; Konstantynowicz-Nowicka, K.; Charytoniuk, T.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5382. <https://doi.org/10.3390/ijms23105382>

Academic Editor: Chiara Laezza

Received: 18 April 2022

Accepted: 9 May 2022

Published: 11 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the 21st century, obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) have become a global health problem, and the need for the development of novel and safer therapeutic interventions is great. Obesity-related comorbidities generate high costs for health systems and diminish patients' quality of life. One of these comorbidities is insulin resistance (IR), which is a pathophysiological state where vital metabolic organs (liver, muscle, adipose tissues) demonstrate reduced sensitivity to the activity of insulin [1–3]. IR may be distinguished as a risk factor for the occurrence of T2DM together with chronic inflammation and excessive visceral fat deposition [4].

Human adipose tissue is commonly divided, according to the regional fat distribution, into subcutaneous (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) [5]. These two classes of fat deposits have intrinsically distinct gene expression profiles and different lipid metabolisms [6,7]. VAT exerts higher lipolytic activity and lower insulin sensitivity than SAT [8]. The accumulation of lipids in VAT impairs insulin sensitivity in metabolically obese, normal-weight individuals [9]. On the other hand, preferential deposition of fat in subcutaneous deposits, such as those detected in most women, positively correlates with metabolically healthy obesity. It is a condition in which, despite the occurrence of obesity, individuals may be protected from T2DM and the development of cardiovascular diseases [10].

Undoubtedly, adipocytes' insulin sensitivity indirectly regulates liver and muscle function by modulating systemic glucose and fatty acid homeostasis [11]. A large lipid pool in adipose tissue caused by excessive non-esterified fatty acids (NEFAs) influx provokes the hypertrophy of adipocytes and a hyper-lipolytic phenotype that is resistant to insulin [12]. Furthermore, the disruption of lipid metabolism pathways results in elevated plasma levels of triacylglycerols (TAGs) [13], ceramide (CER) [14], and sphingosine-1-phosphate (S1P) [15] in obese individuals [13]. CER and S1P are sphingolipids that are key bioactive signaling molecules in adipose tissue [16]. Altered sphingolipid metabolism induces a dysfunctional adipose tissue phenotype by blocking insulin signaling and adipogenesis and promoting chronic inflammation [17]. Thus, a new therapeutic strategy focused on the modulation of sphingolipid metabolism is needed in order to restore the regular function and insulin sensitivity of adipose tissue [18].

The lack of an effective insulin resistance treatment has led to extensive pharmacological and physiological research, particularly on non-euphoric phytocannabinoids. One of them is CBD, which is found in medicinal and fiber-type *Cannabis sativa* plants (*hemp*) and

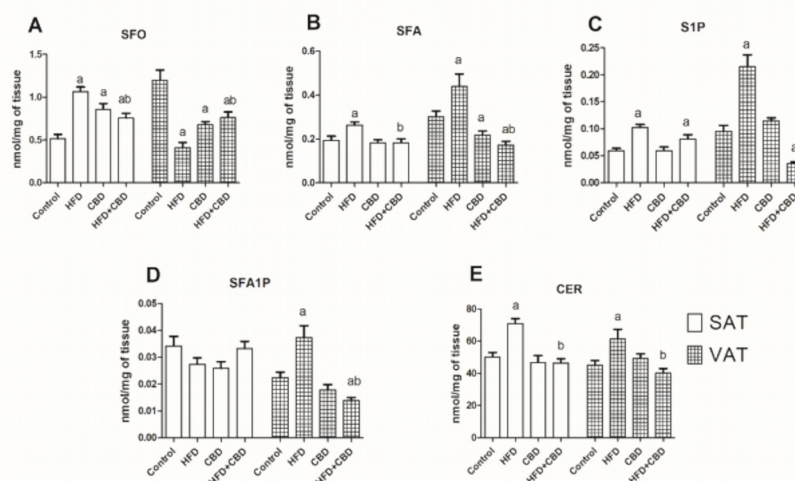


Figure 1. The concentrations of sphingolipids in the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of rats fed a standard rat chow (control) or high-fat diet (HFD) after chronic cannabidiol (CBD) treatment: (A) sphingosine (SFO), (B) sphinganine (SFA), (C) sphingosine-1-phosphate (S1P), (D) sphinganine-1-phosphate (SFA1P), (E) ceramide (CER). The data are presented as mean values \pm SD, $n = 10$ in each group. ^a $p < 0.05$: significant difference: control group vs. experimental group; ^b $p < 0.05$: significant difference: HFD vs. HFD+CBD.

The simultaneous administration of the high-fat diet and CBD resulted in a reduction in the SFO, SFA, S1P, and SFA1P levels compared to the control group (-84.7% , -67.2% , -100.6% , -25.1% ; $p < 0.05$; Figure 1A,B,C,D, respectively). Furthermore, the levels of SFA, S1P, SFA1P, and CER were markedly reduced (-137.7% ; -301.2% ; -68.9% ; -42.2% ; $p < 0.05$; Figure 1B,C,D,E, respectively), and the SFO level was significantly elevated compared to the HFD group ($+68\%$; $p < 0.05$; Figure 1A).

2.2. Influence of CBD on the Sphingolipid Metabolism Enzymes in SAT and VAT of Rats Fed with Standard and High-Fat Diets

A Western blotting analysis revealed that in SAT, the expression of serine palmitoyltransferase, long-chain base subunit 1 (SPTLC1) was significantly decreased in all of the experimental groups compared to the control group (HFD: -32.2% ; CBD: -65.4% ; HFD+CBD: -76.6% ; $p < 0.05$; Figure 2A). In VAT, we only observed a significant decline in SPTLC1 expression in the HFD+CBD group in comparison with that of the HFD-fed subjects (-30.5% ; $p < 0.05$; Figure 2A). The induction of obesity with the high-fat diet resulted in an increase in SPTLC2 expression in both subcutaneous ($+203\%$) and visceral ($+76.9\%$) adipose tissue compared to that of the control ($p < 0.05$) (Figure 2B). Moreover, the chronic presence of CBD during the high-fat feeding caused a significant decrease in SPTLC2 expression in SAT (-209.3%) and VAT (-72.5%) compared with that in the group of rats fed with only a high-fat diet ($p < 0.05$) (Figure 2B).

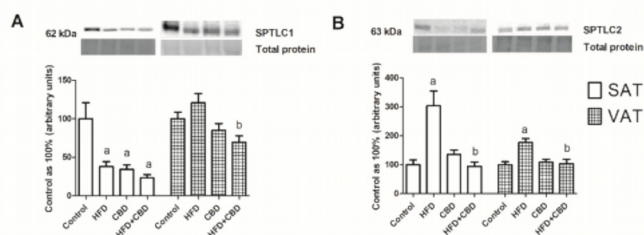


Figure 2. The total expression of proteins from de novo sphingolipid synthesis, e.g., (A) serine palmitoyltransferase, long-chain base subunit 1 (SPTLC1) and (B) serine palmitoyltransferase, long-chain base subunit 2 (SPTLC2), in the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of rats fed a standard diet (control) or high-fat diet (HFD) after chronic CBD treatment. The total expression of the above proteins was standardized to the total protein expression, and the control group was set to 100%. The data are expressed as mean values \pm SD, $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: significant difference: control group vs. experimental group; ^b $p < 0.05$: significant difference: HFD vs. HFD+CBD.

As shown in Figure 3A, the CerS2 expression was significantly elevated only in the SAT in the group of HFD-fed rats compared to rats fed a standard chow (+47.2%; $p < 0.05$). In VAT, the CerS2 expression was reduced in the HFD+CBD group in comparison with that of the HFD-fed rats (−27.9%, $p < 0.05$).

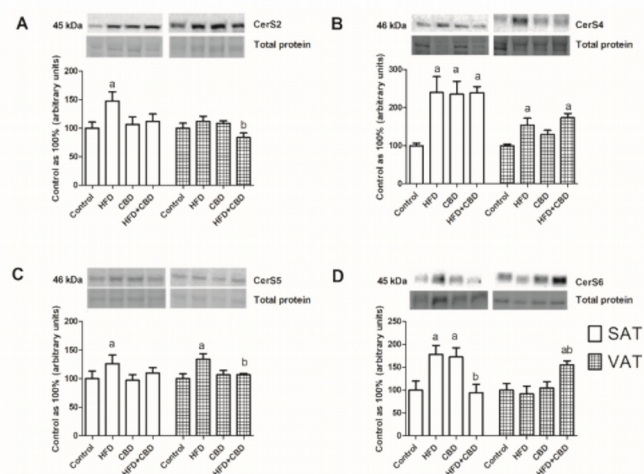


Figure 3. The total expression of proteins from both de novo ceramide synthesis and salvage pathways, e.g., (A) ceramide synthase 2 (CerS2), (B) ceramide synthase 4 (CerS4), (C) ceramide synthase 5 (CerS5), and (D) ceramide synthase 6 (CerS6), in the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of rats fed a standard diet (control) or high-fat diet (HFD) after CBD treatment. The total expression of the above proteins was standardized to the total protein expression, and the control group was set to 100%. The data are expressed as mean values \pm SD, $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: significant difference: control group vs. experimental group; ^b $p < 0.05$: significant difference: HFD vs. HFD+CBD.

On the other hand, we noticed a substantial increase in CerS4 expression in all of the experimental groups in comparison with the control subjects (HFD: +139.5%; CBD: +135.5%; HFD+CBD: 139.6%; $p < 0.05$; Figure 3B). In visceral adipose tissue, we exhibited a significant increase in CerS4 expression in both groups of rats fed with a high-fat chow and untreated or treated with CBD (+53.5% and +73.4%, respectively; $p < 0.05$; Figure 3B).

In the case of CerS5, we noticed that only high-fat chow caused a marked elevation of this protein's expression, which was visible in the two types of adipose tissues (VAT: +26.2%; SAT: +34.1%; $p < 0.05$; Figure 3C). Moreover, in VAT, this increase was significantly diminished by CBD injections compared to that in the HFD group ($-27.4%$, $p < 0.05$; Figure 3C).

The total expression of CerS6 in SAT increased considerably compared to that of the control subjects in the case of animals fed with a high-fat chow and that of the animals that were injected with CBD (+78.3% and +72.5%, respectively; $p < 0.05$; Figure 3D). The simultaneous administration of the HFD and CBD caused a substantial decline in the CerS6 expression in comparison with that in the SAT of the HFD-fed rats ($-84.3%$, $p < 0.05$; Figure 3D). Interestingly, the total CerS6 expression in VAT was elevated prominently only in the HFD+CBD group compared to the rats fed with a standard or high-fat diet (+55%, $p < 0.05$ vs. control group; +63.4%, $p < 0.05$ vs. HFD group; Figure 3D).

The expression of enzymes involved in ceramide metabolism is presented in Figure 4. In subcutaneous adipose tissue, we observed a significant increase in the total ASAHI1 expression (+58.6%, $p < 0.05$; Figure 4A) in the HFD group compared to the rats with fed a standard chow, and it further declined during the two weeks with CBD injections ($-63%$, $p < 0.05$; Figure 4A). In VAT, the total ASAHI1 expression was unchanged in all of the examined groups ($p > 0.05$; Figure 4A). Similarly, significant alterations in ASAHI2 expression were visible only in SAT. We noticed that there was pronounced increase in this protein's expression after the HFD treatment, as well as the HFD and CBD treatment, compared to that in the control group (+45.1% and +59%, respectively, $p < 0.05$; Figure 4B).

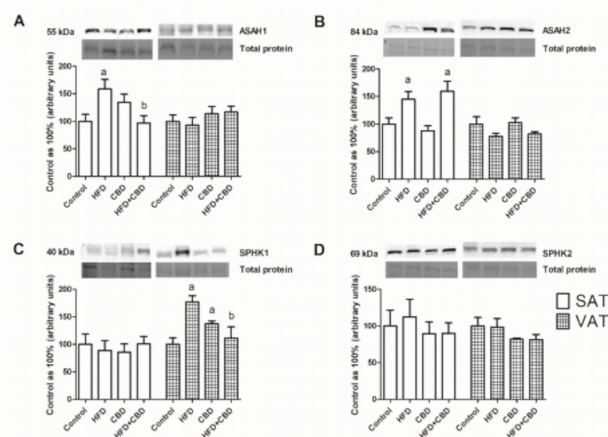


Figure 4. The total expression of proteins from sphingolipid catabolism, e.g., (A) acid ceramidase (ASAHI1), (B) acid ceramidase (ASAHI2), (C) sphingosine kinase 1 (SPHK1), and (D) sphingosine kinase 2 (SPHK2), in the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of rats fed a standard diet (control) or high-fat diet (HFD) after chronic CBD treatment. The total expression of the above proteins was standardized to the total protein expression, and the control group was set to 100%. The data are expressed as mean values \pm SD, $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: significant difference: control group vs. experimental group; ^b $p < 0.05$: significant difference: HFD vs. HFD+CBD.

The total SPHK1 expression did not change in subcutaneous adipose tissue. On the other hand, in visceral adipose tissue, we revealed a marked increase in the SPHK1 expression in the HFD-fed rats and in the rats treated by CBD (+76.9% and +37.5%, respectively, $p < 0.05$; Figure 4C). Importantly, we also observed that the two-week administration of CBD in the HFD rats resulted in a visible decrease in the SPHK1 expression (−65.6%, $p < 0.05$; Figure 4C). The SPHK2 expression level remained unchanged in both the SAT and VAT of all of the examined groups (Figure 4D).

2.3. Influence of CBD on the Expression of Insulin Signaling Pathway Proteins in SAT and VAT of Rats Fed with Standard and High-Fat Diets

In subcutaneous adipose tissue, there was a significant diminution in the phosphorylated GSK3 β to unphosphorylated GSK3 β ratio (−74.3%, $p < 0.05$; Figure 5B) for the high-fat diet, and there was a substantial elevation of the GSK3 β phosphorylation ratio in the chronic presence of CBD compared to the control animals (+121.9%, $p < 0.05$; Figure 5B).

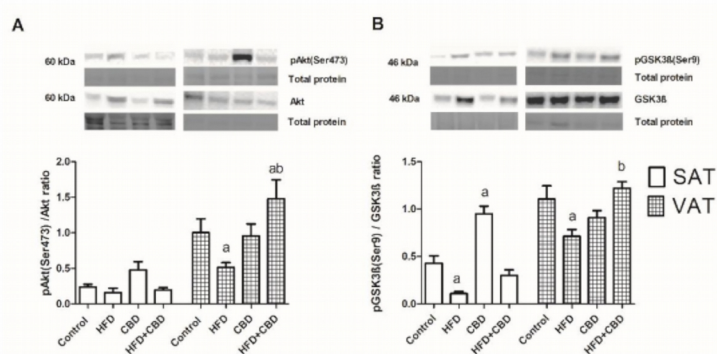


Figure 5. The total expression of proteins belonging to the insulin signaling pathway, e.g., (A) pAkt (Ser 473)/Akt and (B) pGSK3 β (Ser9)/GSK3 β , in the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of rats fed a standard diet (control) or high-fat diet (HFD) after chronic cannabidiol (CBD) treatment. The total expression of the above proteins was standardized to the total protein expression, and the control group was set to 100%. The data are expressed as mean values \pm SD, $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: significant difference: control group vs. experimental group; ^b $p < 0.05$: significant difference: HFD vs. HFD+CBD.

In visceral adipose tissue, the high-fat chow alone induced a decrease in the Akt phosphorylation ratio (−48.8%; $p < 0.05$; Figure 5A) compared to the control. However, while administering the high-fat diet, the administration of CBD had the opposite effect of elevating the pAkt to Akt ratio in comparison with those of the control (+47.3%, $p < 0.05$; Figure 5A) and HFD groups (+96.4%, $p < 0.05$; Figure 5A). Similarly, we found a reduced pGSK3 β to GSK3 β ratio in the rats fed a high-fat diet (35.5%, $p < 0.05$; Figure 5A) compared to that in the control group, and it was further considerably increased with the CBD injections.

3. Discussion

Over the last decade, phytocannabinoids, including CBD, have become emerging players in ameliorating the symptoms of insulin resistance, T2DM, and metabolic syndrome [26]. The most common features of the above-mentioned metabolic diseases are disturbances in lipid metabolism and subsequent insulin resistance. This problem is even more alarming because effective treatment of such diseases does not exist.

The effects of CBD on adipocyte lipid metabolism were first explored by Silvestri et al. in an *in vitro* study, demonstrating that CBD applied simultaneously with oleic acid (OA) reduced triacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes [21]. Because the deposited TAGs may be esterified into various fractions, we resolved to evaluate the influence of CBD on a class of lipids that are more biologically active compared with other lipid fractions, namely, sphingolipids. Thus, in our experiment, which was performed on a rat model, the effects of CBD on sphingolipid concentration and their metabolism, e.g., for ceramide biosynthesis pathway enzymes were assessed. Furthermore, we formulated a hypothesis that CBD, by interfering with the sphingolipid metabolism pathway, may modulate adipocyte insulin sensitivity. Our previous study showed that chronic CBD treatment during excessive fat intake led to the alleviation of *de novo* CER synthesis, restored content of S1P, and an enhanced insulin signaling pathway and glycogen recovery in rat skeletal muscles [27].

The sphingolipid metabolic pathway includes simple molecules, such as ceramide, and a plurality of more complex sphingolipids, in which ceramide represents the central node in the biosynthesis and catabolism of sphingolipids [28]. The main route of ceramide formation is the *de novo* synthesis pathway, where the condensation of serine and palmitoyl-CoA by serine palmitoyl transferases (SPTLC1, SPTLC2) takes place [24]. It is well known that nutrient oversupply specifically, with saturated fatty acids intensifies the *de novo* ceramide synthesis pathway, which generates increased levels of CER in several tissues, including adipose tissue [17,29]. This phenomenon was also demonstrated in the present study in both types of adipose tissue derived from rats fed with a high-fat diet. Importantly, the higher CER level induced by the HFD was reduced in response to CBD injections. Interestingly, the decreased CER content in fat deposits after CBD administration was in line with the study conducted by Łuczaj et al., who indicated a decrease in CER levels in keratinocytes after topical application of CBD in UVA-irradiated rats [30].

The beneficial impact of CBD on subcutaneous adipose tissue observed in our experiment on insulin-resistant rats was mainly achieved through the inhibition of *de novo* ceramide synthesis, which manifested as a considerable decrease in the ceramide concentration of the precursor sphinganine (SFA). Moreover, this is consistent with the decreased expression of enzymes involved in sphingolipid synthesis, SPTLC2 and CerS6, after the CBD and HFD treatment. It is known that high CerS6 expression in the adipose tissue of obese humans is essential for the formation of unfavorable C16:0 ceramide, which is correlated with the development of insulin resistance in adipocytes, but not the whole body [18,31,32]. As we showed, CBD administration during the HFD feeding attenuated the CerS6 expression induced by lipid oversupply, which strongly suggests its positive metabolic effect. It is worth emphasizing that, in VAT, the inhibition of the *de novo* ceramide synthesis route was much more pronounced than in subcutaneous fat deposits. In this type of tissue, the reduction in SFA concentration was more visible, and a decreased expression of key *de novo* ceramide synthesis enzymes SPTLC1, SPTLC2, and CerS2/5 was observed. It is worth highlighting that CBD may act similarly to myriocin, a selective inhibitor of SPTLC that, through the inhibition of ceramide biosynthesis, induces profound changes in skeletal muscle ceramide content with an improvement in systemic insulin action [33]. However, due to the fact that myriocin exerts adverse effects, such as hepatotoxicity [34], CBD appears to be a more beneficial alternative in the treatment of IR.

In addition to the *de novo* synthesis and sphingomyelin hydrolysis, CER can also be produced from the breakdown of sphingosine through the action of ceramide synthases (CerS1-6) in the salvage pathway, which is even responsible for 90% of total sphingolipid biosynthesis [28,35]. Once formed, CER can undergo degradation because of the actions of ceramidases (ASAH1, ASAH2) toward sphingosine, which can return to the sphingolipid pathway or be transformed by sphingosine kinases (SPHK1, SPHK2) into sphingosine-1 phosphate (S1P) [36,37]. In SAT, the substantial decrease in the intracellular SFO content with the simultaneously lowered expression of enzymes involved in the salvage pathway (CerS6) and CER catabolism (ASAH1) proved the inhibition of both routes after CBD injection.

tions in IR rats. On the other hand, in VAT, under conditions of high fatty acid availability, cannabidiol favored ceramide catabolism more than its synthesis in the salvage pathway, which was reflected by the higher SFO level with increased CerS6 and ASAH1 expression. This effect seems to be very important because SFO, as a ceramide derivative with proapoptotic properties, modulates key cellular processes, has thereby been linked with metabolic disorders [38,39]. However, a further step of sphingolipid catabolism in VAT was inhibited, as evidenced by the lower SPHK1 expression with a diminished intracellular S1P content. We hypothesized that the pronounced decline in S1P concentration may also have resulted from the intensified transport of this molecule outside the cells or the redirection of S1P to further degradation into hexadecenal and ethanolamide-1-phosphate. However, at this stage of research, these are just assumptions that should be clarified in the future. Our findings are in accordance with those of the study conducted by Wang et al., where, in mice with diet-induced obesity, SPHK1 deficiency was associated with reduced S1P concentration and enhanced insulin sensitivity in epididymal adipose tissue [40]. Moreover, numerous studies have shown that obese subjects had increased SPHK1 expression accompanied by raised deposition of S1P not only in adipose tissue, but also several other tissues [40,41]. Although the specific role played by S1P in metabolic maladies remains unclear [32], some authors suggested that genetic disturbance of the SPHK1/S1P signaling pathway in HFD-fed mice led to improved systemic insulin sensitivity [40]. Based on this, we suspect that inhibition of SPHK1 by CBD may be considered as a potential therapeutic approach to restoring normal insulin activity in obesity.

Among all of the sphingolipids, there is a particular interest in ceramide because it promotes the development of adipocyte insulin resistance to the greatest extent [42]. Ceramide disrupts transport of glucose into the cells through the dephosphorylation of protein kinase B (Akt/PKB), by blocking the transfer of Akt/PKB to the plasma membrane, or by targeting protein phosphatase 2A (PP2A). Moreover, accumulation ceramide in VAT more than in SAT is associated with obesity and metabolic syndrome [43,44]. Many recent publications have summarized that the diminution of ceramide deposition in adipocytes improved their insulin sensitivity. As a consequence, it contributed to the normalization of glucose homeostasis in the whole body, which also resolved the progression of hepatic steatosis [45–47]. In the present study, CBD administration in HFD-fed rats elevated the pAkt (Ser473)/Akt and pGSK3 β (Ser9)/GSK3 β expression ratios, but only in VAT. These findings corresponded with the reduced ceramide content, which proved the restoration of insulin sensitivity through the action of the examined phytocannabinoid in visceral fat deposits. However, we did not observe any crucial changes in the expression of insulin pathway proteins in SAT between the groups of rats that were fed with a high-fat chow and were untreated or treated with CBD. In this fat deposit, the only change that was observed was an increase in the pGSK3 β (Ser9)/GSK3 β ratio and the trend toward an increase in the p/Akt (Ser473)/Akt ratio only after CBD treatment. This may have resulted from the reduced lipolytic activity and higher insulin sensitivity of the subcutaneous fat regions, which are specialized to provide long-term storage of excessive fatty acids, thus protecting other tissues from lipotoxic effects [8,48]. These CBD-dependent changes in insulin signaling pathway are consistent with our previous study where two-week CBD administration caused a substantial reduction in insulin plasma concentration and the trend toward a decrease in HOMA-IR value in the HFD-fed rats [27].

Our observations suggest the distinct effects of CBD on two types of fat deposits in the context of intracellular insulin signaling, and they complement the reports on the anti-diabetic properties of CBD [49,50].

4. Materials and Methods

4.1. Animal Model

This study was conducted on male Wistar rats (initial body weight: 70–100 g), which were housed in approved animal-holding facilities (at 22 ± 2 °C, a 12 h/12 h light–dark cycle, with unlimited access to water and to a selected chow). Experiments were carried

out after one week of the animals' acclimatization. In our experiment, we used $n = 10$ animals in every experimental group, as was counted using an internet service (<http://www.biomath.info>, accessed on 1 January 2021). The animals were randomly selected for particular groups, and their body mass was monitored during the study. To make sure that the animals did not compensate by eating and drinking less, the amounts of food and water were monitored. This study was approved by the Animal Ethics Committee in Olsztyn (approval number 71/2018).

4.2. Study Design

The control group and CBD group were fed with standard rat chow (kcal distribution = 62% carbohydrates, 16% fat, and 22% protein). In the HFD and HFD+CBD groups, insulin resistance was induced through the administration of a high-fat diet (HFD; kcal distribution = 20% carbohydrates, 59% fat, and 21% protein; Labofeed B, Kcynia, Poland) for a period of 7 weeks in an amount corresponding to the daily caloric intake of the animals receiving standard chow. The synthetic CBD (THC Pharm GmbH, Frankfurt, Germany) was administered intraperitoneally at a concentration of 10 mg/kg of body mass once a day and, at the same time, for 14 consecutive days (sixth and seventh weeks of the experiment). The dose of CBD was chosen based on an analysis of data from the literature [51]. Immediately before administration, CBD was dissolved in the vehicle (3:1:16, namely ethanol, Tween-80, and 0.9% NaCl, respectively). The rats were anesthetized through the inhalation of isoflurane, and then subcutaneous and visceral fat samples were taken from the sleeping animals. The collected tissues were frozen at the temperature of liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) and stored for further analysis at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3. Sphingolipid Analysis

The ceramide, sphinganine (SFA), sphingosine (SFO), sphinganine-1-phosphate (SFA1P), and sphingosine-1-phosphate (SIP) contents in the visceral and subcutaneous adipose tissues were estimated by using high-performance liquid chromatography (HPLC), as described in the method developed by Min et al. and as previously described [52]. In brief, the lipids from the homogenates of rat adipose tissue were extracted with the use of chloroform. Subsequently, an aliquot of the lipid extract was transferred into a fresh tube containing an internal standard (N-palmitoyl-D-erythrospingosine). Then, the samples were subjected to alkaline hydrolysis to deacylate the ceramide. Two sphingolipid metabolites that were released from ceramide during the analytical process, free sphinganine and sphingosine, were then converted into their o-phthalaldehyde derivatives and analyzed by using a standard HPLC system (PROSTAR; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a fluorescence detector and C-18 reversed-phase columns (Varian Inc. Omnispher 5, $6 \times 150\text{ mm}$).

4.4. Western Blotting Analysis

The expression of proteins that were directly engaged in sphingolipid metabolism and the insulin signaling pathway was detected by using a routine Western blotting procedure, as previously described [53]. In brief, samples of the visceral and subcutaneous adipose tissues were homogenized in RIPA buffer with the addition of protease and phosphatase inhibitors (Roche). Next, the total protein concentration in the homogenates of the adipose tissues was estimated with a bicinchoninic acid assay (BCA) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. After the dilution of the homogenates, the same amount of protein ($20\text{ }\mu\text{g}$) was loaded and separated using 10% Criterion TGX Stain-Free precast gel electrophoresis and shifted into nitrocellulose membranes. Afterwards, the membranes were blocked with TTBS buffer containing 5% nonfat dry milk or BSA for phosphorylated proteins for 90 min at room temperature. Subsequently, membranes were immunoblotted with primary antibodies: serine palmitoyltransferases (SPTLC1, SPTLC2; 1:500; Abcam, Cambridge, UK), ceramide synthases (CerS2, CerS4, CerS5, CerS6; 1:500; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), sphingosine kinases (SPHK1, SPHK2; 1:500; Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, USA), acid ceramidase (ASAH1, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA), neutral ceramidase (ASAH2, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA), protein kinase B (Akt/PKB, 1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phosphorylated protein kinase B (pAkt/PKB (Ser473), 1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA), and phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (p/GSK3 β (Ser9) 1:500, Santa Cruz Paso Robles, CA, USA). Then, the nitrocellulose membranes were incubated with the appropriate horseradish-peroxidase-labeled (HRP) secondary anti-goat or anti-mouse antibodies. The protein expressions were assayed densitometrically using the ChemiDoc visualization system (Image Laboratory Software Version 6.0.1; BioRad, Warsaw, Poland). Equal protein loading was presented by CCD imager and UV illumination using TGX stain-free system. Next, the image of total protein and protein of interest overlapped in ImageLab system. The expression of all of the proteins was standardized to the total protein expression by using the stain-free method, and the control was set to 100%.

4.5. Statistical Analysis

All data were expressed as the mean and standard deviation. The assumptions of the methods used in our analysis, that is, the normality of the data distribution (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of the variance (Bartlett’s test), were tested. Statistical differences were established based on the results of one-way ANOVA followed by an appropriate post hoc test (i.e., pairwise Student t-test) using GraphPad Prism 7. Differences in the levels of analyzed parameters were considered at $p < 0.05$.

5. Conclusions

Our data indicated that, under conditions of overnutrition, CBD injections modulated sphingolipid metabolism, leading finally to a reduction in the ceramide content in two types of adipose tissues. In visceral adipose tissue, the action of CBD was more directed toward the inhibition of the de novo ceramide synthesis pathway and the intensification of its catabolism. On the other hand, in subcutaneous fat depots, CBD restrained the de novo ceramide synthesis and salvage synthesis routes. All of these changes ultimately sensitized adipose tissue to insulin, especially in the visceral deposits. Therefore, CBD use may be considered as a potential therapeutic strategy for treating or reducing insulin resistance, T2DM, and metabolic syndrome.

Author Contributions: Conceptualization, E.H.-S. and K.B.; methodology, K.K.-N.; software, T.C.; validation, K.B. and K.K.-N.; formal analysis, A.C.; investigation, K.K.-N.; resources, E.H.-S.; data curation, K.B.; writing—original draft preparation, K.B.; writing—review and editing, K.K.-N. and A.C.; visualization, K.B.; supervision, A.C.; project administration, T.C.; funding acquisition, K.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the National Science Center [grant number 2017/26/D/NZ3/01119] and the Medical University of Białystok [grant number SUB/1/DN/21/007/1118].

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the animal Ethics Committee in Olsztyn (No. 71/2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Czech, M.P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 804–814. [CrossRef] [PubMed]
- Abdullah, K.M.; Arefeen, A.; Shamsi, A.; Alhumaydhi, F.A.; Naseem, I. Insight into the in Vitro Antiglycation and in Vivo Antidiabetic Effects of Thiamine: Implications of Vitamin B1 in Controlling Diabetes. *ACS Omega* **2021**, *6*, 12605–12614. [CrossRef] [PubMed]
- Shahwan, M.; Alhumaydhi, F.; Ashraf, G.M.; Hasan, P.M.Z.; Shamsi, A. Role of polyphenols in combating Type 2 Diabetes and insulin resistance. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *206*, 567–579. [CrossRef] [PubMed]
- Rains, J.L.; Jain, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 567–575. [CrossRef] [PubMed]
- Schoettl, T.; Fischer, I.P.; Ussar, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb162958. [CrossRef] [PubMed]
- Hill, J.H.; Solt, C.; Foster, M.T. Obesity associated disease risk: The role of inherent differences and location of adipose depots. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2018**, *33*, 20180012. [CrossRef]
- Passaro, A.; Miselli, M.A.; Sanz, J.M.; Dalla Nora, E.; Morieri, M.L.; Colonna, R.; Pišot, R.; Zuliani, G. Gene expression regional differences in human subcutaneous adipose tissue. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 202. [CrossRef]
- Bódis, K.; Roden, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e13017. [CrossRef]
- Dvorak, R.V.; DeNino, W.F.; Ades, P.A.; Poehlman, E.T. Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes* **1999**, *48*, 2210–2214. [CrossRef]
- Kim, J.Y.; Tfayli, H.; Michaliszyn, S.F.; Lee, S.; Arslanian, S. Distinguishing characteristics of metabolically healthy versus metabolically unhealthy obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2016**, *105*, 1603–1611. [CrossRef]
- Czech, M.P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. *Mol. Metab.* **2020**, *34*, 27–42. [CrossRef] [PubMed]
- Fazakerley, D.J.; Krycer, J.R.; Kearney, A.L.; Hocking, S.L.; James, D.E. Muscle and adipose tissue insulin resistance: Malady without mechanism? *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 1720–1732. [CrossRef] [PubMed]
- Bowles, N.P.; Karatsoreos, I.N.; Li, X.; Vemuri, V.K.; Wood, J.A.; Li, Z.; Tamashiro, K.L.K.; Schwartz, G.J.; Makriyannis, A.M.; Kunos, G.; et al. A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 285–290. [CrossRef] [PubMed]
- Haus, J.M.; Kashyap, S.R.; Kasumov, T.; Zhang, R.; Kelly, K.R.; Defronzo, R.A.; Kirwan, J.P. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* **2009**, *58*, 337–343. [CrossRef]
- Samad, F.; Hester, K.D.; Yang, G.; Hannun, Y.A.; Bielawski, J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: A potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* **2006**, *55*, 2579–2587. [CrossRef]
- Lambert, J.M.; Anderson, A.K.; Cowart, L.A. Sphingolipids in adipose tissue: What's tipping the scale? *Adv. Biol. Regul.* **2018**, *70*, 19–30. [CrossRef]
- Choi, S.; Snider, A.J. Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 520618. [CrossRef]
- Turpin, S.M.; Nicholls, H.T.; Willmes, D.M.; Mourier, A.; Brodesser, S.; Wunderlich, C.M.; Mauer, J.; Xu, E.; Hammerschmidt, P.; Brönneke, H.S.; et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 678–686. [CrossRef]
- Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Btkai, S.; Patel, V.; Saito, K.; Matsumoto, S.; Kashiwaya, Y.; Horvth, B.; Mukhopadhyay, B.; Becker, L.; et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *56*, 2115–2125. [CrossRef]
- Bielawiec, P.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. Phytocannabinoids: Useful Drugs for the Treatment of Obesity? *Special Focus Cannabidiol. Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 114. [CrossRef]
- Silvestri, C.; Paris, D.; Martella, A.; Melck, D.; Guadagnino, I.; Cawthorne, M.; Motta, A.; Di Marzo, V. Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 1382–1390. [CrossRef] [PubMed]
- Kirkham, T.C. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav. Pharmacol.* **2005**, *16*, 297–313. [CrossRef] [PubMed]
- Noreen, N.; Muhammad, F.; Akhtar, B.; Azam, F.; Anwar, M.I. Is cannabidiol a promising substance for new drug development? A review of its potential therapeutic applications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2018**, *28*, 73–86. [CrossRef] [PubMed]
- Tidhar, R.; Futerman, A.H. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 2511–2518. [CrossRef]
- Fellous, T.; De Maio, F.; Kalkan, H.; Carannante, B.; Boccella, S.; Petrosino, S.; Maione, S.; Di Marzo, V.; Iannotti, F.A. Phytocannabinoids promote viability and functional adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through different molecular targets. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *175*, 113859. [CrossRef]
- Berk, K.; Bzdega, W.; Konstantynowicz-Nowicka, K.; Charytoniuk, T.; Zywno, H.; Chabowski, A. Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 393. [CrossRef]

27. Bielawiec, P.; Harasim-Sybor, E.; Konstanynowicz-Nowicka, K.; Sztolszterer, K.; Chabowski, A. Chronic cannabidiol administration attenuates skeletal muscle de novo ceramide synthesis pathway and related metabolic effects in a rat model of high-fat diet-induced obesity. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1241. [\[CrossRef\]](#)
28. Gault, C.R.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *688*, 1–23.
29. Torretta, E.; Barbacini, P.; Al-Daghri, N.M.; Gelfi, C. Sphingolipids in obesity and correlated comorbidities: The contribution of gender, age and environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5901. [\[CrossRef\]](#)
30. Łuczaj, W.; Domingues, M.D.R.; Domingues, P.; Skrzydlewska, E. Changes in lipid profile of keratinocytes from rat skin exposed to chronic uva or uvb radiation and topical application of cannabidiol. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1178. [\[CrossRef\]](#)
31. Candi, E.; Tesaro, M.; Cardillo, C.; Lena, A.M.; Schinzari, F.; Rodia, G.; Sica, G.; Gentileschi, P.; Rovella, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; et al. Metabolic profiling of visceral adipose tissue from obese subjects with or without metabolic syndrome. *Biochem. J.* **2018**, *475*, 1019–1035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Blachnio-Zabielska, A.U.; Koutsari, C.; Tchkonina, T.; Jensen, M.D. Sphingolipid content of human adipose tissue: Relationship to adiponectin and insulin resistance. *Obesity* **2012**, *20*, 2341–2347. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Ussher, J.R.; Koves, T.R.; Cadete, V.J.J.; Zhang, L.; Jaswal, J.S.; Swyrd, S.J.; Lopaschuk, D.G.; Proctor, S.D.; Keung, W.; Muoio, D.M.; et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **2010**, *59*, 2453–2494. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Salaun, E.; Lefeuvre-Orfila, L.; Cavey, T.; Martin, B.; Turlin, B.; Ropert, M.; Loreal, O.; Derbré, F. Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* **2016**, *120*, 178–187. [\[CrossRef\]](#)
35. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1010–1018. [\[CrossRef\]](#)
36. Blachnio-Zabielska, A.U.; Pulka, M.; Baranowski, M.; Nikolajuk, A.; Zabielski, P.; Górska, M.; Górski, J. Ceramide metabolism is affected by obesity and diabetes in human adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 550–557. [\[CrossRef\]](#)
37. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175–191. [\[CrossRef\]](#)
38. Woodcock, J. Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life* **2006**, *58*, 462–466. [\[CrossRef\]](#)
39. Quinville, B.M.; Deschenes, N.M.; Ryckman, A.E.; Walia, J.S. A comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5793. [\[CrossRef\]](#)
40. Wang, J.; Badeanlou, L.; Bielański, J.; Ciaraldi, T.P.; Samad, F. Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2014**, *306*, E756–E768. [\[CrossRef\]](#)
41. Geng, T.; Sutter, A.; Harland, M.D.; Law, B.A.; Ross, J.S.; Lewin, D.; Palanisamy, A.; Russo, S.B.; Chavin, K.D.; Cowart, L.A. SphK1 mediates hepatic inflammation in a mouse model of NASH induced by high saturated fat feeding and initiates proinflammatory signaling in hepatocytes. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2359–2371. [\[CrossRef\]](#)
42. Aburasayn, H.; Al Batran, R.; Ussher, J.R. Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2016**, *311*, E423–E435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Choromańska, B.; Myśliwiec, P.; Rzak Hady, H.; Dadan, J.; Myśliwiec, H.; Chabowski, A.; Miklosz, A. Metabolic Syndrome is Associated with Ceramide Accumulation in Visceral Adipose Tissue of Women with Morbid Obesity. *Obesity* **2019**, *27*, 444–453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Kotronen, A.; Seppänen-Laakso, T.; Westerbacka, J.; Kiviluoto, T.; Arola, J.; Ruskeepää, A.L.; Yki-Järvinen, H.; Orešič, M. Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity* **2010**, *18*, 937–944. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sokolowska, E.; Blachnio-Zabielska, A. The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 577. [\[CrossRef\]](#)
46. Xia, J.Y.; Holland, W.L.; Kusminski, C.M.; Sun, K.; Sharma, A.X.; Pearson, M.J.; Sifuentes, A.J.; McDonald, J.G.; Gordillo, R.; Scherer, P.E. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 266–278. [\[CrossRef\]](#)
47. Chaurasia, B.; Tippett, T.S.; Monibas, R.M.; Liu, J.; Li, Y.; Wang, L.; Wilkerson, J.L.; Rufus Sweeney, C.; Pereira, R.F.; Sumida, D.H.; et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* **2019**, *365*, 386–392. [\[CrossRef\]](#)
48. Tchkonina, T.; Thomou, T.; Zhu, Y.; Karagiannides, I.; Pothoulakis, C.; Jensen, M.D.; Kirkland, J.L. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 644–656. [\[CrossRef\]](#)
49. Horvth, B.; Mukhopadhyay, P.; Hask, G.; Pacher, P. The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 432–442. [\[CrossRef\]](#)
50. Chaves, Y.C.; Genaro, K.; Stern, C.A.; de Oliveira Guaita, G.; de Souza Crippa, J.A.; da Cunha, J.M.; Zaneli, J.M. Two-weeks treatment with cannabidiol improves biophysical and behavioral deficits associated with experimental type-1 diabetes. *Neurosci. Lett.* **2020**, *729*, 135020. [\[CrossRef\]](#)
51. Navarrete, F.; Aracil-Fernández, A.; Manzanares, J. Cannabidiol regulates behavioural alterations and gene expression changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 2676–2688. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

10. Streszczenie w języku polskim

Otyłość jest przewlekłym, nawracającym schorzeniem związanym ze znaczną chorobowością i śmiertelnością. Ze względu na globalnie wysoką częstość występowania i jej negatywny wpływ na zdrowie, otyłość oraz towarzysząca jej insulinooporność stanowią poważne problemy zdrowia publicznego, a ich zapobieganie i leczenie stały się priorytetem w planach zdrowotnych zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się.

Insulinooporność to stan upośledzonej odpowiedzi biologicznej ważnych narządów metabolicznych (wątroby, mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej) na stymulację insuliny krążącej we krwi, co skutkuje zaburzeniem gospodarki węglowodanów, lipidów i białek. Wiadomym jest, że tkanka tłuszczowa stanowi „centrum” bilansu energetycznego organizmu a wrażliwość adipocytów na insulinę pośrednio reguluje czynność metaboliczną wątroby i mięśni. Akumulacja nadwyżki energetycznej w postaci lipidów w depozytach tłuszczu prowadzi do hipertrofii adipocytów i ich hiperlipolitycznego fenotypu oporności na insulinę. Do aktywnych biologicznie lipidów, które interferują z wewnątrzkomórkowym szlakiem insulinowym należą sfingolipidy, spośród których szczególnym zainteresowaniem cieszą się ceramid i sfingozyno-1-fosforan. Wielokrotnie potwierdzono, że nadmierna akumulacja tych cząstek przyczynia się do rozwoju insulinooporności tkanki tłuszczowej.

Liczne dane literaturowe potwierdzają, że endokannabinoidom (eCBome), wewnętrzny system sygnalizacyjny zaangażowany w regulację bilansu energetycznego organizmu, odgrywa kluczową rolę w patogenezie chorób metabolicznych m.in. otyłości i cukrzycy typu 2. W skład endokannabinoidomu wchodzi układ endokannabinoidowy (ECS) zbudowany z receptorów kannabinoidowych CB1R i CB2R sprzężonych z białkiem G, ich lipidowych ligandów, N-arachidonoilo-etanolaminy (AEA) i 2-arachidonoyl glicerolu (2-AG), a także enzymów biorących udział w ich metabolizmie. Największe zagęszczenie CB1R występuje w ośrodkowym układzie nerwowym, natomiast ekspresja CB2R widoczna jest głównie na komórkach układu immunologicznego przez co odgrywa on istotną rolę w procesach zapalnych. Poza ECS, do składowych endokannabinoidomu zalicza się liczne mediatory pochodzące z kwasów tłuszczowych, które działają m.in na receptory sprzężone z białkiem G takie jak GPR55, receptory waniloidowe przejściowego potencjału (TRPV) i receptory aktywowane przez proliferatory peroksosomów α i γ (PPAR α i PPAR γ). Wielokrotnie potwierdzono, że diety bogatotłuszczowe prowadzą do nadmiernej aktywacji endokannabinoidomu poprzez modulację ekspresji receptorów, poziomu endokannabinoidów oraz powodowanie zmian w ekspresji enzymów anabolicznych i katabolicznych co w konsekwencji prowadzi do rozwoju cech zespołu metabolicznego takich jak dyslipidemia czy insulinooporność.

Aktualnie wiadomym jest, że kannabidiol (CBD), fitokannabinoid pozbawiony psychoaktywnych właściwości, poprzez interakcję z receptorami endokannabinoidom wykazuje działanie przeciwcukrzycowe oraz w sposób korzystny metabolicznie moduluje gospodarkę lipidową. Wciąż jednak brak jest doniesień dotyczących wpływu tego związku na insulinowrażliwość tkanki tłuszczowej.

Celem pracy była ocena wpływu CBD na szlaki metabolizmu sfingolipidów i przekąźnictwa insulinowego w podskórnej (SAT) i trzewnej (VAT) tkance tłuszczowej w zwierzęcym modelu insulinooporności indukowanej dietą bogatotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni.

Badania zostały przeprowadzone na szczurach rasy Wistar, losowo przydzielonych do czterech grup – (I) grupa kontrolna karmiona standardową karmą dla gryzoni, (II) grupa HFD karmiona dietą bogatotłuszczową, (III) grupa CBD karmiona standardową karmą dla gryzoni otrzymująca dootrzewnowe zastrzyki z kannabidiolem, (IV) grupa HFD+CBD karmiona dietą HFD otrzymująca dootrzewnowe zastrzyki z kannabidiolem. Zawartość poszczególnych frakcji sfingolipidowych oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Oznaczenia ekspresji białek ze szlaku sfingolipidowego oraz szlaku przekąźnictwa insulinowego wykonano metodą Western Blot.

Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że kannabidiol podany w iniekcji szczurom z wyindukowaną otyłością i insulinoopornością spowodował istotny spadek sfinganiny i ceramidu w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej. Spadek zawartości sfingolipidów wynikał z zahamowania szlaku syntezy *de novo* ceramidów w obu depozytach. Co więcej, w trzewnej tkance tłuszczowej kannabidiol zwiększył ekspresję enzymów ze szlaku katabolicznego, a w podskórnych depozytach zmniejszył ekspresję białek uczestniczących w tzw. szlaku ratunkowym. Obniżona zawartość ceramidów korelowała z istotną poprawą wrażliwości na insulinę komórek trzewnej tkanki tłuszczowej.

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, można stwierdzić, że kannabidiol wywiera potencjalnie korzystny wpływ na metabolizm podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej w warunkach zwiększonej biodostępności kwasów tłuszczowych. Dlatego też w przyszłości, zasadne wydaje się prowadzenie bardziej szczegółowych badań nad fitokannabinoidami, które to mogą okazać się cennymi terapeutykami stosowanymi w leczeniu szeroko pojętej grupy zaburzeń metabolicznych.

11. Streszczenie w języku angielskim

Obesity is a chronic, relapsing disease associated with substantial morbidity and mortality. Due to the globally high prevalence and its negative impact on health, obesity and the accompanying

insulin resistance are serious public health problems, and their prevention and treatment have become a priority in health plans in developed and developing countries.

Insulin resistance is a state of impaired biological response of important metabolic organs (liver, skeletal muscles, adipose tissue) to the stimulation of insulin circulating in the blood, which results in disturbances in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. It is known that adipose tissue is the "center" of the body's energy balance, and the sensitivity of adipocytes to insulin indirectly regulates the metabolic activity of the liver and muscles. Accumulation of the energy surplus in the form of lipids in fat deposits leads to adipocyte hypertrophy and their hyperlipolytic phenotype, which is resistant to insulin.

Biologically active lipids that interfere with the intracellular insulin pathway include sphingolipids, of which ceramide and sphingosine-1-phosphate are of particular interest. It has been repeatedly confirmed that the excessive accumulation of these molecules contributes to the development of insulin resistance of adipose tissue.

Numerous studies confirm that the endocannabinoid (eCBome), the complex, internal signaling system involved in the regulation of the body's energy balance, plays a key role in the pathogenesis of metabolic diseases, e.g. obesity and type 2 diabetes. The endocannabinoidome includes the endocannabinoid system (ECS) composed of G protein-coupled CB1R and CB2R cannabinoid receptors, their lipid ligands, N-arachidonoyl-ethanolamine (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), and the enzymes involved in their metabolism. The highest concentration of CB1R occurs in the central nervous system, while CB2R expression is visible mainly on the immune cells, therefore it plays an important role in inflammatory processes. In addition to the ECS, the components of the endocannabinoidome include numerous mediators derived from fatty acids that act, among others, on G protein-coupled receptors such as GPR55, transient potential vanilloid receptors (TRPV) and peroxisome proliferator-activated receptors α and γ (PPAR α and PPAR γ). It has been repeatedly confirmed that high-fat diets lead to excessive activation of the endocannabinoidome by modulating the expression of receptors, the level of endocannabinoids and causing changes in the expression of anabolic and catabolic enzymes, which in turn leads to the development of the features of metabolic syndrome such as dyslipidemia or insulin resistance. Currently, it is known that cannabidiol (CBD), a phytocannabinoid lacks of abuse potential, exhibits antidiabetic activity and it modulates the lipid metabolism by targeting endocannabinoidome receptors. However, there are still no reports on the effect of this phytocannabinoid on the insulin sensitivity of adipose tissue.

The aim of the study was to evaluate the effect of CBD on the sphingolipid metabolism and insulin signalling pathway in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue in an animal model of insulin resistance induced by a high-fat diet (HFD) for 7 weeks.

The study was conducted on Wistar rats, randomly selected for the four groups - (I) control group fed with standard rodent chow, (II) HFD group fed with a high-fat diet, (III) CBD group fed with standard rodent chow receiving intraperitoneal injections of cannabidiol, (IV) HFD+CBD group fed HFD diet receiving intraperitoneal injections of cannabidiol. The content of sphingolipid fractions was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The expression of proteins that were directly engaged in sphingolipid metabolism and the insulin signalling pathway was detected by using a routine Western blotting procedure.

The performed experiment shows that cannabidiol injected into insulin resistant rats caused a significant decrease in the concentrations of sphinganine and ceramide in visceral and subcutaneous adipose tissue. In VAT by reducing its *de novo* synthesis and increasing its catabolism. However, in SAT, CBD decreased the ceramide level through the inhibition of salvage and *de novo* synthesis pathways. All of these changes restored adipose tissues' sensitivity to insulin.

Considering all the above observations, it can be assumed that cannabidiol has a potentially beneficial impact on the metabolism of subcutaneous and visceral adipose tissue in conditions of increased bioavailability of fatty acids in the diet. Thus, performing more detailed research on CBD seems reasonable, because it may turn out to be used as a potential therapeutic strategy for treating or reducing insulin resistance, T2DM, and metabolic syndrome.

12. Oświadczenia współautorów

<i>Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment</i>		
Autorzy	Udział w przygotowaniu publikacji	Procentowy udział
Doktorant – lek. Klaudia Berk	Opracowanie koncepcji pracy, zebranie piśmiennictwa, pisanie manuskryptu i zarządzanie projektem	70 %
Wiktor Bzdęga	Graficzna oprawa manuskryptu oraz zebranie piśmiennictwa	10 %
dr. n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka	Opracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna i korekta manuskryptu	10 %
Hubert Żywno	Zebranie piśmiennictwa	5 %
Prof. dr. Hab. Adrian Chabowski	Ocena merytoryczna i korekta manuskryptu	5 %

<i>Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats</i>		
Autorzy	Udział w publikacji	Procentowy udział
Doktorant – lek. Klaudia Berk	Opracowanie koncepcji pracy, współuczestnictwo w wykonaniu analiz, zarządzanie projektem, zbieranie piśmiennictwa i pisanie manuskryptu.	70%
Dr n. med. Karolina Konstantynowicz- Nowicka	Współuczestnictwo w wykonywaniu analiz, ocena merytoryczna i korekta manuskryptu	10%
Lek. Tomasz Charytoniuk	Zebranie piśmiennictwa	5%
Dr n. med Ewa Harasim-Symbor	Współtworzenie analiz i ocena merytoryczna manuskryptu	10%
Prof. dr. n. med. Adrian Chabowski	Ocena merytoryczna i korekta manuskryptu	5%

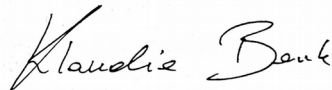
Białystok, 04/04/2023r.

lek. Klaudia Berk
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment*” autorów: Klaudii Berk, Wiktora Bzdega, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Huberta Żywno, Adrian Chabowskiego opublikowany w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 70% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu piśmiennictwa, pisaniu manuskryptu i zarządzaniu projektem.



Białystok, 04/04/2023r.

Wiktor Bzdęga
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment*” autorów: Klaudii Berk, Wiktora Bzdęga, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Huberta Żywno, Adrian Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 10% polegał na graficznej oprawie manuskryptu oraz zebraniu piśmiennictwa.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Wiktor
Bzdęga

Białystok, 04/04/2023r.

Dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment*” autorów: Klaudii Berk, Wiktora Bzdęga, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Huberta Żywno, Adrian Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 10% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Karolina Konstantynowicz-Nowicka

Białystok, 04/04/2023r.

Hubert Żywno
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment*” autorów: Klaudii Berk, Wiktora Bzdęga, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Huberta Żywno, Adrian Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 5% polegał na zebraniu piśmiennictwa.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Hubert Żywno

Białystok, 04/04/2023r.


Prof. dr. hab n. med Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Phytocannabinoids—A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment*” autorów: Klaudii Berk, Wiktora Bzdęga, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Huberta Żywno, Adriana Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 5% polegał na ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

KIEROWNIK
Zakład Fizjologii

prof. dr hab. Adrian Chabowski

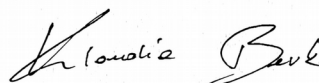
Białystok, 04/04/2023r.

lek. Klaudia Berk
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats*” autorów: Klaudii Berk, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Ewy Harasim-Symbor, Adrian Chabowskiego opublikowany w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 70% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współuczestnictwie w wykonaniu analiz, zarządzaniu projektem, zbieraniu piśmiennictwa i pisaniu manuskryptu.



Białystok, 04/04/2023r.

Dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats*” autorów: Klaudii Berk, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Ewy Harasim-Sybor, Adrian Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 10% polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu analiz, ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Karolina Konstantynowicz-Nowicka

Białystok, 04/04/2023r.

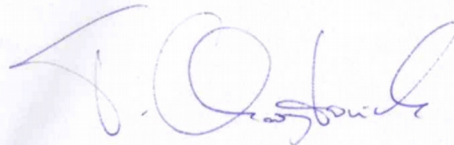
Lek. Tomasz Charytoniuk
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats*” autorów: Klaudii Berk, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Ewy Harasim-Symbor, Adrian Chabowskiego opublikowany w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 5% polegał na zebraniu piśmiennictwa.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Białystok, 04/04/2023r.

Dr n. med Ewa Harasim-Symbor
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats*” autorów: Klaudii Berk, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Ewy Harasim-Symbor, Adria Chabowskiego opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 10% polegał na współtworzeniu analiz i ocenie merytorycznej manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Harasim-Symbor Ewa

Białystok, 04/04/2023r.

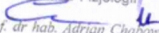
Prof. dr. hab n. med Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Kilińskiego 1,
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji „*Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats*” autorów: Klaudii Berk, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Tomasza Charytoniuk, Ewy Harasim-Symbor, Adrian Chabowskiego opublikowany w *Journal of Clinical Medicine* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową**” wynoszący 5% polegał na ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Klaudię Berk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

KIEROWNIK
Zakładu Fizjologii

prof. dr. hab. Adrian Chabowski

13. Uchwała komisji etycznej

UCHWAŁA NR 71/2018

z dnia 25.09.2018 r.

Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 / art. 48 ust. 1 pkt. 2¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Ocena roli kannabidiolu w regulacji ekspresji białkowych transporterów kwasów tłuszczowych (FAT/CD36, FABPm i FATP1,4,6) w mięśniu sercowym szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową” z dnia 18.09.2018 r., złożonego przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim (0022), adres ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok, zaplanowanego przez Karolina Konstantynowicz-Nowicka², przy udziale³ (nie dotyczy) Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ⁴

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku 72/2018.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **badania podstawowe (A), sercowo-naczyniowy układ krążenia i limfy.**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **łagodna.**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków: **144 szt., Szczur wędrowny (*Rattus norvegicus*); stado niekrewniacze; Wistar Cmdb:Wi, wiek – 4 tygodnie, masa ciała – 60-100g.**
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Konstantynowicz-Nowicka Karolina, Harasim-Symbor Ewa, Koźluk Anna, Zabrocka Grażyna, Agnieszka Popielska, Aneta Czeladko, Małgorzata Mackiewicz, Katarzyna Podlaskczyk, Anna Maraszkiwicz, Julia Szewczyk, Elżbieta Emilia Łapińska, Ewelina Białous.**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ **od 15.10.2018 do 31.12.2020.**
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: **Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Centrum Medycyny Doświadczalnej (0099).**
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: **nie dotyczy**
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez, w sposób: **nie dotyczy**

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Niewłaściwy zapis usunąć

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

9. Doświadczenie **nie zostanie**⁷ poddane ocenie retrospektywnej.

§ 3

Uzasadnienie: Po dokonaniu oceny wniosku zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) Lokalna Komisja Etyczna w Olsztynie stwierdza, że projekt nie budzi zastrzeżeń pod względem celowości jego wykonania, liczby użytych zwierząt oraz zasadności i klasyfikacji procedur objętych wnioskiem i wyraża zgodę na przeprowadzenie doświadczenia. Osobą odpowiedzialną za przeprowadzenie badań zgodnie z procedurami opisanymi we wniosku jest **Karolina Konstantynowicz-Nowicka**.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
10-718 Olsztyn, ul. Czapowskiego 13/4
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego komisji
PRZEWODNICZĄCY
Lokalnej Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
.....
prof. dr hab. Jerzy Juszkiewicz

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje: Osoba planująca doświadczenie; Zespół ds. dobrostanu.

⁷ Niewłaściwy zapis usunąć

14. Referencje

1. Tong, Y.; Xu, S.; Huang, L.; Chen, C. Obesity and insulin resistance: Pathophysiology and treatment. *Drug Discov. Today* 2022, 27.
2. Czech, M.P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat. Med.* **2017**, 23, 804–814.
3. Rains, J.L.; Jain, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50, 567–575.
4. Schoettl, T.; Fischer, I.P.; Ussar, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 2018.
5. Hill, J.H.; Solt, C.; Foster, M.T. Obesity associated disease risk: The role of inherent differences and location of adipose depots. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2018**, 33, 20180012.
6. Reddy, P.; Lent-Schochet, D.; Ramakrishnan, N.; McLaughlin, M.; Jialal, I. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clin. Chim. Acta* 2019, 496.
7. Bódis, K.; Roden, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **2018**, 48, e13017.
8. Qatanani, M.; Lazar, M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007, 21.
9. Ahmadian, M.; Duncan, R.E.; Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Sul, H.S. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol.* 2007.
10. Wong, R.H.F.; Sul, H.S. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: A transcriptional perspective. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010, 10.
11. Merkel, M.; Eckel, R.H.; Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase: Genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 2002, 43.
12. Glatz, J.F.C.; Luiken, J.J.F.P.; Bonen, A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease. *Physiol. Rev.* 2010.
13. Schwenk, R.W.; Holloway, G.P.; Luiken, J.J.F.P.; Bonen, A.; Glatz, J.F.C. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2010**.
14. Ameer, F.; Scanduzzi, L.; Hasnain, S.; Kalbacher, H.; Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* 2014.
15. Duncan, R.E.; Ahmadian, M.; Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Sul, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 2007, 27.
16. Wajchenberg, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2000, 21.

17. Bolsoni-Lopes, A.; Alonso-Vale, M.I.C. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2015, 59.
18. Serra, D.; Mera, P.; Malandrino, M.I.; Mir, J.F.; Herrero, L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxidants Redox Signal.* 2013.
19. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, 19, 175–191.
20. Gault, C.R.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, 688, 1–23.
21. Tidhar, R.; Futerman, A.H. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2013**, 1833, 2511–8.
22. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **2008**, 20, 1010–8.
23. Lambert, J.M.; Anderson, A.K.; Cowart, L.A. Sphingolipids in adipose tissue: What's tipping the scale? *Adv. Biol. Regul.* **2018**, 70, 19–30.
24. Green, C.D.; Maceyka, M.; Cowart, L.A.; Spiegel, S. Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown. *Cell Metab.* 2021, 33.
25. Czech, M.P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. *Mol. Metab.* **2020**, 34, 27–42.
26. Petersen, M.C.; Shulman, G.I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol. Rev.* 2018, 98.
27. Virkamäki, A.; Ueki, K.; Kahn, C.R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1999, 103.
28. Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (80-.).* 2002, 296.
29. Ng, Y.; Ramm, G.; Lopez, J.A.; James, D.E. Rapid Activation of Akt2 Is Sufficient to Stimulate GLUT4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes. *Cell Metab.* **2008**, 7.
30. Patel, S.; Doble, B.; Woodgett, J.R. Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: A double-edged sword? In Proceedings of the Biochemical Society Transactions; 2004; Vol. 32.
31. Witters, L.A.; Kemp, B.E. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267.
32. Berwick, D.C.; Hers, I.; Heesom, K.J.; Kelly Moule, S.; Tavaré, J.M. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277.
33. Beale, E.G.; Hammer, R.E.; Antoine, B.; Forest, C. Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J.* **2002**, 16.

34. Błachnio-Zabielska, A.U.; Baranowski, M.; Hirnle, T.; Zabielski, P.; Lewczuk, A.; Dmitruk, I.; Górski, J. Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids* **2012**.
35. Perry, R.J.; Samuel, V.T.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2014, *510*.
36. Samuel, V.T.; Shulman, G.I. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* 2012, *148*.
37. Blachnio-Zabielska, A.U.; Chacinska, M.; Vendelbo, M.H.; Zabielski, P. The Crucial Role of C18-Cer in Fat-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *40*.
38. Błachnio-Zabielska, A.U.; Pułka, M.; Baranowski, M.; Nikołajuk, A.; Zabielski, P.; Górski, M.; Górski, J. Ceramide metabolism is affected by obesity and diabetes in human adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 550–7.
39. Chaurasia, B.; Kaddai, V.A.; Lancaster, G.I.; Henstridge, D.C.; Sriram, S.; Galam, D.L.A.; Gopalan, V.; Prakash, K.N.B.; Velan, S.S.; Bulchand, S.; et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab.* **2016**.
40. Stratford, S.; Hoehn, K.L.; Liu, F.; Summers, S.A. Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*.
41. Li, Y.; Talbot, C.L.; Chaurasia, B. Ceramides in Adipose Tissue. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020.
42. Jun, D.J.; Lee, J.H.; Choi, B.H.; Koh, T.K.; Ha, D.C.; Jeong, M.W.; Kim, K.T. Sphingosine-1-phosphate modulates both lipolysis and leptin production in differentiated rat white adipocytes. *Endocrinology* **2006**, *147*.
43. Wang, J.; Badeanlou, L.; Bielawski, J.; Ciaraldi, T.P.; Samad, F. Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2014**, *306*, E756-68.
44. Rossi, F.; Punzo, F.; Umamo, G.R.; Argenziano, M.; Miraglia Del Giudice, E. Role of cannabinoids in obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2018.
45. Di Marzo, V.; Silvestri, C. Lifestyle and metabolic syndrome: Contribution of the endocannabinoidome. *Nutrients* **2019**, *11*.
46. Kirkham, T.C.; Williams, C.M.; Fezza, F.; Di Marzo, V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: Stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*.
47. Schulz, P.; Hryhorowicz, S.; Rychter, A.M.; Zawada, A.; Słomski, R.; Dobrowolska, A.; Krela-Kaźmierczak, I. What role does the endocannabinoid system play in the pathogenesis of obesity? *Nutrients* 2021, *13*.

48. Wang, J.; Ueda, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009, **89**.
49. Di Marzo, V. Endocannabinoids: Synthesis and degradation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2008, **160**.
50. Kendall, D.A.; Yudowski, G.A. Cannabinoid receptors in the central nervous system: Their signaling and roles in disease. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, **10**.
51. Mackie, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2005**, **168**.
52. Matias, I.; Di Marzo, V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007, **18**.
53. Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Gong, J.P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P.A.; Myers, L.; Mora, Z.; Tagliaferro, P.; Gardner, E.; et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. In Proceedings of the Annals of the New York Academy of Sciences; 2006; Vol. 1074.
54. Bie, B.; Wu, J.; Foss, J.F.; Naguib, M. An overview of the cannabinoid type 2 receptor system and its therapeutic potential. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 2018, **31**.
55. Dhopeswarkar, A.; Mackie, K. CB2cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Mol. Pharmacol.* **2014**, **86**.
56. Cristino, L.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2020.
57. Karvela, A.; Paola Rojas-Gi, A.; Samkinidou, E.; Papadaki, H.; Pappa, A.; Georgiou, G.; Spiliotis, B.E. Endocannabinoid (EC) receptor, CB1, and EC enzymes' expression in primary adipocyte cultures of Lean and Obese Pre-pubertal Children in Relation to Adiponectin and Insulin. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2010**, **23**.
58. Naughton, S.S.; Mathai, M.L.; Hryciw, D.H.; McAinch, A.J. Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int. J. Endocrinol.* 2013, **2013**.
59. Blüher, M.; Engeli, S.; Klötting, N.; Berndt, J.; Fasshauer, M.; Bátkai, S.; Pacher, P.; Schön, M.R.; Jordan, J.; Stumvoll, M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* **2006**, **55**.
60. Matias, I.; Gonthier, M.P.; Orlando, P.; Martiadis, V.; De Petrocellis, L.; Cervino, C.; Petrosino, S.; Hoareau, L.; Festy, F.; Pasquali, R.; et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, **91**.
61. Cota, D.; Marsicano, G.; Tschöp, M.; Grübler, Y.; Flachskamm, C.; Schubert, M.; Auer, D.; Yassouridis, A.; Thöne-Reineke, C.; Ortmann, S.; et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* **2003**, **112**.

62. Pagano, C.; Pilon, C.; Calcagno, A.; Urbanet, R.; Rossato, M.; Milan, G.; Bianchi, K.; Rizzuto, R.; Bernante, P.; Federspil, G.; et al. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*.
63. Gasperi, V.; Fezza, F.; Pasquariello, N.; Bari, M.; Oddi, S.; Finazzi Agrò, A.; Maccarrone, M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*.
64. Di Marzo, V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* **2008**, *51*.
65. Andre, C.M.; Hausman, J.F.; Guerriero, G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.* **2016**.
66. Lucas, C.J.; Galettis, P.; Schneider, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *84*.
67. Bielawiec, P.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. Phytocannabinoids: Useful Drugs for the Treatment of Obesity? Special Focus on Cannabidiol. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2020**, *11*, 114.
68. Britch, S.C.; Babalonis, S.; Walsh, S.L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology (Berl)*. **2021**, *238*.
69. Noreen, N.; Muhammad, F.; Akhtar, B.; Azam, F.; Anwar, M.I. Is cannabidiol a promising substance for new drug development? A review of its potential therapeutic applications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2018**, *28*, 73–86.
70. Silvestri, C.; Paris, D.; Martella, A.; Melck, D.; Guadagnino, I.; Cawthorne, M.; Motta, A.; Di Marzo, V. Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 1382–90.
71. Parray, H.A.; Yun, J.W. Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**.
72. McKillop, A.M.; Moran, B.M.; Abdel-Wahab, Y.H.A.; Gormley, N.M.; Flatt, P.R. Metabolic effects of orally administered small-molecule agonists of GPR55 and GPR119 in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic and incretin-receptor-knockout mice. *Diabetologia* **2016**.
73. Weiss, L.; Zeira, M.; Reich, S.; Har-Noy, M.; Mechoulam, R.; Slavin, S.; Gallily, R. Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity* **2006**.
74. Fellous, T.; De Maio, F.; Kalkan, H.; Carannante, B.; Boccella, S.; Petrosino, S.; Maione, S.; Di Marzo, V.; Iannotti, F.A. Phytocannabinoids promote viability and functional adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through different molecular targets. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *175*, 113859.