



Klaudia Sztolsztener

**Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych
na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby**

Promotor pracy

Prof. dr hab. Adrian Chabowski

Promotor pomocniczy

Dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka

Zakład Fizjologii

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok 2022

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
moim Promotorom za życzliwość i merytoryczne wsparcie
w powstawanie niniejszej rozprawy doktorskiej.
Pragnę podziękować również wszystkim życzliwym osobom,
z którymi dane mi było współpracować,
za ich cierpliwość i wsparcie w trudnych momentach
podczas realizacji projektu.*

Niniejsza rozprawa doktorska została sfinansowana przez
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach zadań badawczych o numerach:
SUB/1/NN/20/001/1118, SUB/1/NN/21/002/1118 oraz SUB/1/DN/19/001/1118.

Spis treści

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. Transport kwasów tłuszczowych i metabolizm lipidów w wątrobie.....	15
3.2. Metabolizm sfingolipidów w wątrobie.....	16
3.3. Szlak insulinowy PI3K/Akt/mTOR w wątrobie.....	16
3.4. Stan zapalny i stres oksydacyjny w wątrobie	17
3.5. Rola deksametazonu w regulacji metabolizmu lipidowego komórek wątroby.....	18
4. Cele pracy	20
5. Materiały i metody	22
5.1. Model doświadczalny	22
5.1.1. Model zwierzęcy	22
5.1.2. Model komórkowy	24
5.2. Analiza histologiczna preparatów wątroby barwionych hematoksyliną i eozyną.....	25
5.3. Analiza stężenia oraz składu kwasowego wybranych frakcji lipidowych w tkance wątrobowej, osoczu, komórkach HepG2 oraz medium poinkubacyjnym metodą GLC	25
5.4. Analiza całkowitej ekspresji wybranych białek metodą Western Blot	26
5.5. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego z użyciem komercyjnie dostępnych kitów	27
5.6. Analiza stężenia sfingolipidów w tkance wątrobowej, komórkach HepG2 oraz medium poinkubacyjnym metodą HPLC	27

5.7. Analiza zawartości fosforylowanych form białek ze szlaku insulinowego za pomocą zestawu do testów multipleksowych	27
5.8. Analiza statystyczna	28
6. Wyniki	29
7. Wnioski.....	35
8. Publikacja nr. 1	36
9. Publikacja nr. 2	52
10. Publikacja nr. 3	69
11. Streszczenie w języku polskim	77
12. Streszczenie w języku angielskim	80
13. Oświadczenia współautorów	83
14. Bibliografia	98

Życiorys

Dane Personalne

Imię i Nazwisko: Klaudia Sztolsztener
Data i miejsce urodzenia: 26.12.1995, Ciechanów

Wykształcenie

2014-2019 Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, studia jednolite magisterskie, stacjonarne, Magister Analityki Medycznej

Publikacje naukowe

1. Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Harasim-Symbor E., Chabowski A.: *Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(22), 12478. IF=5.923, MNiSW=140.
2. Sztolsztener K., Harasim-Symbor E., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K.: *The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021, 132-138. IF=3.575, MNiSW=100.
3. Hodun K., Sztolsztener K., Chabowski A.: *Antioxidants supplementation reduces ceramide synthesis improving the cardiac insulin transduction pathway in a rodent model of obesity*. Nutrients, 2021, vol. 13, nr 10, s.19. IF=5.717, MNiSW=140.
4. 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*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, vol. 142, 12. IF=6.529, MNiSW=100.
5. Bielawiec P., Harasim-Symbor E., Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Chabowski A.: *Attenuation of oxidative stress and inflammatory response by chronic cannabidiol administration is associated with improved n-6/n-3 PUFA ratio in the white and red skeletal muscle in a rat model of high-fat diet-induced obesity*. Nutrients, 2021, vol. 13, nr 5, 25. IF=4.546, MNiSW=140.
6. Żywno H., Bzdęga W., Kołakowski A., Kurzyna P., Harasim-Symbor E., Sztolsztener K., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K.: *The influence of coumestrol on sphingolipid*

- signaling pathway and insulin resistance development in primary rat hepatocytes.* Biomolecules, 2021, vol. 11, nr 2, s.14. IF=4.082, MNiSW=100.
7. Bielawiec P., Harasim-Symbor E., Konstantynowicz-Nowicka K., Sztolsztener 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, vol. 10, nr 9, 15 pp. IF=4.082, MNiSW=100.
 8. Sztolsztener K., Chabowski A., Harasim-Symbor E., Bielawiec P., Konstantynowicz-Nowicka K.: *Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.* Biomolecules, 2020, vol. 10, nr 8, 15 pp. IF=4.082, MNiSW=100.

Konferencje naukowe

1. Bielawiec P., Harasim-Symbor E., Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Chabowski A.: *Attenuation of oxidative stress and inflammatory response by chronic cannabidiol administration is associated with improved n-6/n-3 PUFA ratio in the red skeletal muscle in a rat model of high fat diet-induced obesity.* International Cannabinoid Research Society. Jerusalem, Israel, 2021.
2. Konstantynowicz-Nowicka K., Sztolsztener K., Harasim-Symbor E.: *The influence of cannabidiol on fatty acid transporters and lipid accumulation during nonalcoholic fatty liver disease development.* International Cannabinoid Research Society. Jerusalem, Israel, 2021.
3. Sztolsztener K., Hodun K., Konstantynowicz-Nowicka K., Bielawiec P., Chabowski A.: *Beneficial effect of N-acetylcysteine on sphingolipid metabolism in the left ventricle of obese rats.* 4th Central European Biomedical Congress (CEBC); The impact of bioinformatics and omics on biology and medicine. Cracow, Poland, 2021.
4. Hodun K., Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Bielawiec P., Chabowski A.: *The effect of Alfa Lipoic Acid on cardiac sphingolipid metabolism in rats on a high-fat diet regime.* 4th Central European Biomedical Congress (CEBC); The Impact of bioinformatics and omics on biology and medicine. Cracow, Poland, 2021.
5. Bielawiec P., Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Hodun K., Chabowski A., Harasim-Symbor E.: *Impact of two-week cannabidiol administration on the n-6/n-3 PUFA ratio in the white skeletal muscle in a rat model of high fat diet-induced obesity.* 4th Central European Biomedical Congress (CEBC); The Impact of bioinformatics and omics on biology and medicine. Cracow, Poland, 2021.

6. Kurzyna P., Sztolsztener K.: *Protective influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human HepG2 cell line exposed to palmitate*. LXXV International Scientific and Practical Conference for Students and Young Scientists Actual Problems of Modern Medicine and Pharmacy 2021. Minsk, Republic of Belarus, 2021.

Udział w projektach naukowych

- 2021 Aplikacja grantowa PRELUDIUM 20 (numer identyfikacyjny: 2021/41/N/NZ3/02211): *Kompleksowa ocena wpływu kannabigerolu na sygnalizację TGF- β i jego regulację odkładania białek macierzy zewnątrzkomórkowej w zwłóknieniu wątroby indukowanym dietą bogatotłuszczową ubogą w cholinę u szczurów*. Narodowego Centrum Nauki.
- 2021 Współkierownik projektu statutowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: *Ocena zmian wewnątrzwątrobowego szlaku sfingolipidowego w szczurzym modelu NAFLD indukowanej dietą HFD*. Projekt statutowy kierowany przez dr n. med. Karolinę Konstantynowicz-Nowicką.
- 2021 Współwykonawstwo projektu statutowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: *Ocena wpływu kannabidiolu na ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych (CD36, FABPpm, FATP1, 4, 6) w mięśniu sercowym w szczurzym modelu otyłości indukowanej dietą bogatotłuszczową*. Projekt statutowy kierowany przez dr n. med. Ewę Harasim-Sybor.
- 2020 Współkierownik projektu statutowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: *Ocena prekursorów stanu zapalnego w rozwoju NAFLD indukowanej dietą bogatotłuszczową*. Projekt statutowy kierowany przez dr n. med. Karolinę Konstantynowicz-Nowicką.
- 2020 Współwykonawstwo projektu statutowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: *Wpływ kumestrolu na rozwój insulinooporności hepatocytów związanej ze zmianami w szlaku sfingolipidowym*. Projekt statutowy kierowany przez dr n. med. Karolinę Konstantynowicz-Nowicką.

Udział w szkoleniach/sympozbach/warsztatach

- 10-11.2021 Szkolenie dla osób uczestniczących w wykonywaniu procedur na zwierzętach doświadczalnych organizowane przez Wydziałowy Zespół ds. Dobrostanu Zwierząt, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Białystok.
- 04.2021 Szkolenie: Metody immunochemiczne w praktyce laboratoryjnej organizowane przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Warszawa.
- 03.2021 Szkolenie: Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia organizowane przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Warszawa.
- 10.2020 Szkolenie: Podstawy immunologii organizowane przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Warszawa.
- 10.2020 Szkolenie: Chromatografia gazowa – podstawy teoretyczne oraz praktyka wykonywania analiz organizowane przez firmę PRO-ENVIROMENT Polska. Warszawa.
- 02.2020 Szkolenie: Starzenie się krwinek czerwonych prawidłowych, przechowywanych oraz w patologiach organizowane przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Warszawa.
- 04-06.2019 Staż realizowany w ramach projektu: Program zintegrowanego rozwoju jakości kształcenia na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku. Białystok.

Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji/ osiągnięć	Liczba	Wartość Impact Factor	Wartość punktacji MNiSW
Prace oryginalne włączone do rozprawy	3	13.580	340
Prace oryginalne niewłączone do rozprawy	5	24.956	580
Streszczenia zjazdowe	6	-	-
RAZEM	14	38.536	920

Rozprawa doktorska

Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby

mgr Klaudia Sztolsztener

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	Impact Factor	MNiSW	Data publikacji	Rodzaj publikacji
Biomolecules	<i>Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.</i>	4.082	100	31.07.2020	Publikacja nr. 1 – praca oryginalna
International Journal of Molecular Sciences	<i>Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.</i>	5.923	140	19.11.2021	Publikacja nr. 2 – praca oryginalna
Biochemical and Biophysical Research Communications	<i>The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.</i>	3.575	100	13.11.2021	Publikacja nr. 3 – praca oryginalna

2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

15-LO (ang. *15-lipoxygenase*) – 15-lipooksygenaza

4-HNE (ang. *4-hydroxynonenal*) – 4-hydroksynonenal

AA (ang. *arachidonic acid*) – kwas arachidonowy

ABCA1 (ang. *ATP-binding cassette transporter A1*) – transporter kasety wiążącej ATP A1

AGE (ang. *advanced glycation end-products*) – końcowe produkty zaawansowanej glikacji

Alk-SMase (ang. *alkaline sphingomyelinase*) – zasadowa sfingomielinaza

ALP (ang. *alkaline phosphatase*) – fosfataza zasadowa

ASAH (ang. *ceramidase*) – ceramidaza

ASAH1 (ang. *acid ceramidase*) – kwaśna ceramidaza

ASAH2 (ang. *neutral ceramidase*) – obojętna ceramidaza

ASAH3 (ang. *alkaline ceramidase*) – zasadowa ceramidaza

BAD (ang. *Bcl-2-associated agonist of cell death*) – proapoptotyczne białko należące do rodziny Bcl-2

BCA (ang. *bicinchoninic acid*) – kwas bicynchoninowy

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina bydlęca

CAT (ang. *catalase*) – katalaza

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 (ang. *cyclooxygenase*) – cyklooksygenaza

COX-1, -2 (ang. *cyclooxygenase-1, -2*) – cyklooksygenaza 1, 2

DAG (ang. *diacylglycerols*) – diacyloglicerole

DEX (ang. *dexamethasone*) – deksametazon

DGAT1, 2 (ang. *diacylglycerol acyltransferase 1, 2*) – acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, 2

DNL (ang. *de novo lipogenesis*) – lipogeneza *de novo*

FA (ang. *fatty acids*) – kwasy tłuszczowe

FABPpm (ang. *plasma membrane fatty acid binding protein*) – błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe

FAME (ang. *fatty acid methyl esters*) – estry metylowych kwasów tłuszczowych

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 bydlęca

FFA (ang. *free fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe

GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GLC (ang. *gas-liquid chromatography*) – chromatografia gazowo-cieczowa

GLUT2 (ang. *glucose transporter 2*) – transporter glukozy 2

GSK3 α/β (ang. *glycogen synthase 3 α/β*) – syntaza glikogenu 3 α/β

H+E (ang. *haematoxylin and eosin staining*) – barwienie hematoksyliną i eozyną

HCC (ang. *hepatocellular carcinoma*) – rak wątrobowokomórkowy

HFD (ang. *high-fat diet*) – dieta bogatotłuszczowa

HL (ang. *hepatic lipase*) – lipaza wątrobowa

HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawną chromatografia cieczowa

HRP (ang. *horseradish peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa

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

MDA (ang. *malondialdehyde*) – dialdehyd malonowy

mTOR (ang. *mechanistic target of rapamycin*) – ssaczy cel rapamycyny

MTP (ang. *microsomal triglyceride transfer protein*) – mikrosomalne białko transportujące triacyloglicerole

NAFLD (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*) – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

NASH (ang. *non-alcoholic steatohepatitis*) – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby

NF- $\kappa\beta$ (ang. *nuclear factor kappa β*) – czynnik jądrowy kappa β

Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) – czynnik jądrowy pochodzący z erytroidów (2) związany z czynnikiem 2

N-SMase (ang. *neutral sphingomyelinase*) – obojętna sfingomielinaza

P70 S6 Kinase (ang. *P70 ribosomal protein S6 kinase*) – kinaza rybosomalna p70S6

P90 S6 Kinase (ang. *P90 ribosomal protein S6 kinase*) – kinaza rybosomalna p70S6

PAP (ang. *phosphatidate phosphohydrolase*) – fosfohydrolaza fosfatydowa

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

PMSF (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) – fluorek fenylometylosulfonylu

PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*) – homolog fosfatazy i tensyny

PUFA (ang. *polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) – bufor radioimmunoprecypitacyjny

ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

S6RP (ang. *S6 ribosomal protein*) – białko rybosomalne S6

S1P (ang. *sphingosine-1-phosphate*) – sfingozy-no-1-fosforan

SA1P (ang. *sphinganine-1-phosphate*) – sfinganino-1-fosforan

SA-PE (ang. *streptavidin-phycoerythrin*) – streptawidyna-fikoerytryna

SD (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe

SFA (ang. *sphinganine*) – sfinganina

SFO (ang. *sphingosine*) – sfingozy-na

SOD2 (ang. *superoxide dismutase 2, mitochondrial*) – mitochondrialna dysmutaza nadadtlenkowa 2

SPHK (ang. *sphingosine kinase*) – kinaza sfingozy-ny

SPHK1, 2 (ang. *sphingosine kinase 1, 2*) – kinaza sfingozy-ny 1, 2

SPT (ang. *serine palmitoyltransferase*) – palmitylotransferaza serynowa

SPTLC2 (ang. *serine palmitoyltransferase 2*) – palmitylotransferaza serynowa 2

TAC (ang. *total antioxidant capacity*) – całkowita pojemność antyoksydacyjna

TAG (ang. *triacylglycerols*) – triacyloglicerole

TBST (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*) – sól fizjologiczna buforowana tris-em z Tween-20

TGF- β (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β

TLC (ang. *thin-layer chromatography*) – cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α

TSC1, 2 (ang. *tuberous sclerosis proteins 1 (hamartin), 2 (tuberin)*) – białka stwardnienia guzowego 1 (hamartyna), 2 (tuberyna)

VLDL (ang. *very low-density lipoprotein*) – lipoproteina o bardzo niskiej gęstości

3. Wstęp

Zwiększone stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) krążących w osoczu, których źródłem jest dieta bogatotłuszczowa (HFD), nasilona lipoliza tkanki tłuszczowej i wątrobowa lipogeneza *de novo* (DNL), odgrywa podstawową rolę w patogenezie stłuszczenia wątroby [1,2]. Nadmierne odkładanie lipidów w cytoplazmie hepatocytów, głównie w postaci triacylogliceroli (TAG), przewyższające 5% objętości komórki określane jest niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD), przy braku zwiększonego spożycia alkoholu [3]. Stłuszczenie wątroby jest wynikiem zachwiania równowagi między zwiększonym dokomórkowym transportem, niewystarczającą oksydacją kwasów tłuszczowych (FA) i sekrecją TAG w postaci lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) [4]. Warte uwagi jest to, że łagodne i odwracalne zmiany stłuszczeniowe wątroby mogą ulegać progresji do nieodwracalnych stanów chorobowych, tj. niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH), marskości wątroby, jak również raka wątrobowokomórkowego (HCC) [4,5]. Spośród licznych aspektów sprzyjających progresji NAFLD do NASH najbardziej istotnym wydaje się być przewlekły stan zapalny, dla mediatorów którego lipidowym prekursorem jest kwas arachidonowy (AA) zawarty głównie w fosfolipidach (PL) błon komórkowych hepatocytów. Dodatkowo, w wyniku zwiększonej akumulacji lipidów, bezpośrednia modyfikacja szlaku sygnałowego insuliny czy zaburzenie równowagi oksydacyjnej mitochondriów predysponuje do rozwoju NASH [6].

3.1. Transport kwasów tłuszczowych i metabolizm lipidów w wątrobie

Zwiększona ilość kwasów tłuszczowych w diecie, znacznie przewyższająca zapotrzebowanie energetyczne organizmu, prowadzi do rozrostu adipocytów, które odgrywają decydującą rolę w uwalnianiu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA) do krążenia wrotnego wątroby [7]. Proces dokomórkowego transportu kwasów tłuszczowych pozostaje pod ścisłą kontrolą białkowych przenośników, spośród których największą ekspresję w hepatocytach wykazują: translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36), błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm) oraz białko transportujące kwasy tłuszczowe 2 (FATP2). Nasilony transport LCFA do wnętrza hepatocytów, istotnie przewyższający zdolności oksydacyjne mitochondriów, sprzyja ich nadmiernej akumulacji we frakcji triacylogliceroli, konsekwencją czego jest rozwój stłuszczenia wątroby [8]. Zwiększone odkładanie lipidów w wątrobie związane jest nie tylko z nasilonym dokomórkowym transportem LCFA i wykorzystywaniem ich do syntezy TAG w procesie lipogenezy *de novo*, ale również

z procesem reestryfikacji kwasów tłuszczowych do innych frakcji lipidowych, takich jak diacyloglicerole (DAG) czy sfingolipidy [9,10].

3.2. Metabolizm sfingolipidów w wątrobie

Sfingolipidy stanowią liczną grupę bioaktywnych mediatorów lipidowych wchodzących w skład błon komórkowych, a także regulujących wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe [4,11]. Głównym reprezentantem tej grupy związków jest ceramid (CER). Wątroba jest centralnym miejscem dla jego syntezy, stąd też odznacza się największą podatnością na sfingolipotoksyczność tych związków [4].

Ceramid to związek, który położony jest w centrum przemian metabolicznych sfingolipidów, pomiędzy szlakami anabolicznym, katabolicznym i syntezy *de novo* [4]. Głównym długołańcuchowym kwasem tłuszczowym wykorzystywanym w szlaku syntezy *de novo* jest palmitynian, który w połączeniu z koenzymem A (CoA) stanowi bezpośredni substrat dla tego szlaku. Kondensacja palmitoilo-CoA i seryny regulowana przez aktywność enzymu palmitoilotransferazy serynowej (SPT) prowadzi do powstania 3-ketosfinganiny, która to z kolei zostaje przekształcona do sfinganiny (SFA) (reakcja katalizowana przez reduktazę 3-ketosfinganiny). Tak powstała cząsteczka SFA przyłącza resztę acetylową, co skutkuje powstaniem dihydroceramidu, a następnie w reakcji desaturacji sprzyja powstawaniu ceramidu [11]. Jednocześnie, sfinganina może ulegać reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazę sfinganiny (SPHK), w wyniku czego powstaje sfinganino-1-fosforan (SA1P) [12]. Co więcej, CER może powstawać również w procesie katabolizmu sfingozyny (SFO) w tzw. szlaku ratunkowym. Równolegle, CER stanowi także prekursor dla SFA, która następnie ulega fosforylacji do sfingozyno-1-fosforanu (S1P), a reakcje są odpowiednio katalizowane przez ceramidazy (ASAH) i kinazy sfingozyny. Ostatnim ze szlaków syntezy ceramidu jest proces hydrolizy sfingomieliny pod wpływem obojętnej i zasadowej sfingomielinazy (N-SMase i Alk-SMase) [13]. Z uwagi na fakt, iż wszystkie wyżej wymienione frakcje sfingolipidowe są cząsteczkami aktywnymi biologicznie, mogą one zmieniać różne szlaki sygnałowe w komórce, w tym szlak insulinowy.

3.3. Szlak insulinowy PI3K/Akt/mTOR w wątrobie

Niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby często towarzyszy insulinooporność (IR). Związane jest to z nadmierną akumulacją sfingolipidów wewnątrz hepatocytów, która powoduje zaburzenia w szlaku sygnalizacyjnym insuliny. Zaburzenia te dotyczą przede

wszystkim stopnia fosforylacji białek ze szlaku insulinowego, których hamowanie jest ściśle związane z całkowitym bądź częściowym zniesieniem wrażliwości komórek na insulinę [14].

W szlaku sygnałowym PI3K/Akt/mTOR do pełnej aktywacji wymagana jest fosforylacja kinazy białkowej B (PKB/Akt) w obrębie jej domeny regulatorowej Ser473. Po aktywacji, Akt wiążąc się z 3,4,5-trifosforanem fosfatydyloinozytolu (PIP3), produktem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), zmienia fosforylację białek aktywując bądź hamując wiele szlaków wewnątrzkomórkowych [15]. Dodatkowo, aktywność Akt może być hamowana przez homolog fosfatazy i tensyny (PTEN). PTEN wykazuje jednocześnie aktywność fosfataz białkowych i lipidowych, a jego fosforylacja w miejscu regulatorowym Ser380 prowadzi do degradacji PIP3 [16,17]. Aktywna fosforylowana forma Akt hamuje z kolei aktywność lizosomalnego kompleksu białkowego stwardnienia guzowego (TSC1 i TSC2), co prowadzi do akumulacji i nasilenia aktywności kompleksu mTOR (ssaczy cel rapamycyny) [15]. Białko mTOR jest regulatorem metabolizmu lipidowego, który w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak zwiększona ilość składników odżywczych, promuje proces lipogenezy z jednoczesnym hamowaniem procesu glukoneogenezy w wątrobie [18]. Co więcej, kompleks białka mTOR pośrednicząc w fosforylacji rybosomalnych kinaz białkowych S6 – P70 S6 kinase i P90 S6 kinase, na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego ujemnego, hamuje fosforylację receptora dla insuliny (IRS) w miejscu regulatorowym Ser636/Ser639. Mechanizm ten ma istotne znaczenie w rozwoju insulinooporności i zaostrzeniu wewnątrzwątrobowych zmian w ekspresji białek szlaku PI3K/Akt/mTOR. Specyficzne dla tego szlaku jest to, że aktywowana przez fosforylację forma Akt (pAkt Ser473) nasila translokację i zakotwiczenie w błonę komórkową hepatocytów specyficznych białkowych transporterów glukozy (GLUT2) ułatwiając dokomórkowy transport glukozy. Ponadto, pAkt hamuje fosforylację kinazy glikogenowej (pGSK3 α/β Ser21/Ser9), która odpowiada za stymulację syntezy glikogenu w wątrobie, bierze udział w proliferacji, a także programowanej śmierci komórek [15].

3.4. Stan zapalny i stres oksydacyjny w wątrobie

Lipotoksyczność, spowodowana zmianą metabolizmu lipidów i nadmiernym ich magazynowaniem w cytoplazmie hepatocytów, jest ściśle związana z przewlekłym stanem zapalnym i może predysponować do progresji NAFLD do NASH [6]. Postępujący rozwój stłuszczenia w tkance wątrobowej bardzo często związany jest ze zmianami zapalnymi, których wyrazem jest naciek komórek zapalnych uwidoczniiony w procesie barwienia hematoksyliną i eozyną (H+E). Analiza histologiczna zrazików wątroby jednoznacznie wskazuje

na powstawanie zmian o charakterze mikropęcherzykowym, w którym cytoplazma hepatocytów wypełniona jest licznymi małymi wakuolami [19].

Procesy zapalne są naturalnym mechanizmem obronnym zachodzącym w odpowiedzi na działanie czynników uszkodzających. Podczas tych procesów dochodzi do wzmożonej syntezy prozapalnych mediatorów stanu zapalnego i zmniejszonego powstawania mediatorów przeciwzapalnych, których wspólnymi prekursorami są wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) z rodziny n-6, a przede wszystkim kwas arachidonowy. Metabolizm kwasu arachidonowego regulowany jest przez dwie podstawowe grupy enzymów: cyklooksygenazy (COX) i lipooksygenazy (LOX). W reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez COX i LOX powstaje grupa mediatorów zwanych eikozanoidami, która obejmuje prozapalne cząsteczki prostaglandyn i leukotrienów oraz przeciwzapalne lipoksyny i pochodne kwasów hydroeikozatetraenowych [20]. Podczas rozwoju i progresji chorób wątroby metabolizm AA jest silnie zaktywowany do produkcji prozapalnych mediatorów w rejonie objętym procesem zapalnym. Ponadto, komórki wątroby objęte procesem zapalnym w stanie aktywacji zaczynają wydzielać prozapalne cytokiny, głównie interleukinę 6 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) [21]. Te kluczowe prozapalne cytokiny regulują produkcję wielu mediatorów komórkowych, w tym syntezę białek ostrej fazy, czy też pośredniczą w metabolizmie lipidów w przewlekłych chorobach wątroby o podłożu zapalnym [22].

Nadmiar kwasów tłuszczowych może także bezpośrednio wywołać stres oksydacyjny i nasilić produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) [6]. Za główną przyczynę zwiększonej produkcji ROS uznaje się wzmożony proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach i peroksysomach komórek wątroby. Podczas gdy, przeciwny mechanizm, czyli wewnątrzkomórkowy system antyoksydacyjny, jest mniej wydajny w wątrobie wykazującej zmiany tłuszczeniowe [23]. Ponadto, ROS mogą aktywować również proces peroksydacji lipidów, podczas którego powstają półprodukty i końcowe produkty utleniania kwasów tłuszczowych, głównie błonowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, odpowiednio dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksynonenal (4-HNE). Związki te mogą potęgować dalsze uwalnianie ROS i wzmacniać uszkodzenie wątroby [24,25].

3.5. Rola deksametazonu w regulacji metabolizmu lipidowego komórek wątroby

Deksametazon (DEX) jest syntetycznym analogiem glikokortykosteroidów (kortyzolu i kortykosteronu) wywołującym podobne działanie do naturalnie występujących hormonów kory nadnerczy. DEX wykazuje silne właściwości przeciwzapalne, dzięki czemu jest powszechnie stosowany w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym

[26,27]. Ekspozycja na deksametazon powoduje także istotne zmiany w metabolizmie lipidów związane z rozwojem zaburzeń lipidowych w wątrobie, prawdopodobnie zmieniając homeostazę energetyczną całego organizmu [27]. Mechanizmy, poprzez które glikokortykosteroidy wpływają na metabolizm lipidowy w komórkach wątroby są wielokierunkowe. Liczne dane literaturowe wskazują, że DEX pośredniczy przede wszystkim w nasileniu aktywności lipogenezy *de novo* i syntezy TAG, a tym samym sprzyja akumulacji większych ilości TAG w wątrobie [28,29]. Efekt ten jest wywoływany przez zwiększenie ekspresji genu ANGPTL4, który koduje białko regulujące wewnątrzkomórkową lipolizę. W wyniku tego procesu, uwolnione do krążenia kwasy tłuszczowe są aktywnie transportowane krążeniem wrotnym do wątroby w celu syntezy i odkładania frakcji triacylogliceroli. Ponadto, zwiększona mobilizacja kwasów tłuszczowych z adipocytów promuje syntezę ceramidu w wątrobie, głównie poprzez nasilenie szlaku syntezy *de novo* [29]. Deksametazon jest także silnym aktywatorem fosfohydrolazy fosfatydowej (PAP), enzymu, który odpowiada za defosforylację kwasu fosfatydowego do nieorganicznego fosforanu i diacyloglicerolu. W wyniku tego procesu wytworzony diacyloglicerol stanowi bezpośredni prekursor do syntezy triacylogliceroli (reakcja katalizowana przez acylotransferazy błony retikulum endoplazmatycznego) prowadząc do akumulacji lipidów w wątrobie [27,30,31]. Niektóre badania sugerują, że DEX poprzez zmianę aktywności lipazy wątrobowej (HL) stymuluje wydzielanie lipoprotein o bardzo niskiej gęstości bogatych w triacyloglicerole i estry cholesterolu (proces lipolitycznej mobilizacji zmagazynowanych TAG). Zwiększone wątrobowe wydzielanie VLDL do osocza może mieć działanie ochronne na rozwój prostego stłuszczenia wątroby poprzez ograniczenie syntezy lipotoksycznych mediatorów, tj. CER i TAG [32]. Jednak szybkość syntezy triacylogliceroli znacznie przekracza wewnątrzwątrobową lipolizę TAG w konsekwencji prowadząc do akumulacji TAG w cytoplazmie hepatocytów i rozwoju stłuszczenia wątroby [27].

W badaniach przeprowadzonych na myszach C57BL/6J, deksametazon pośrednio zmniejsza stopień proliferacji hepatocytów poprzez hamowanie ekspresji genów kodujących czynniki zapalne, tj. IL-6 oraz TNF- α , co istotnie ogranicza syntezę prozapalnych cytokin [33]. Dodatkowo, deksametazon redukuje aktywność mikrosomalnych Δ 5- i Δ 6-desaturaz, efektem czego jest zmniejszenie syntezy kwasu arachidonowego, głównie we frakcji fosfolipidów błonowych. Zatem, spadek stężenia AA, prekursora mediatorów zapalnych, ogranicza rozwój stanu zapalnego w komórkach wątroby poddanych ekspozycji na steroidy i hamuje progresję prostych zmian stłuszczeniowych do stłuszczeniowego zapalenia wątroby [34,35].

4. Cele pracy

Wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie lipidów oraz w regulacji homeostazy energetycznej całego organizmu. To właśnie równowaga między dokomórkowym transportem, utylizacją i eksportem kwasów tłuszczowych (FA), syntezą lipidów oraz wydatkowaniem FA w procesie β -oksydacji jest niezbędna do zachowania prawidłowej czynności komórek wątroby. Wewnątrzkomórkowa zawartość lipidów regulowana w odpowiedzi na zwiększoną zawartość kwasów tłuszczowych w diecie sprzyja powstawaniu prostych zmian stłuszczeniowych w wątrobie. Nadmiar sfingolipidów, takich jak sfingozyna czy ceramid, odkładany w cytoplazmie hepatocytów pośredniczy także w sterowaniu szeregiem szlaków sygnałowych, które odgrywają istotną rolę w patogenezie niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD) i jego progresji do nieodwracalnych zmian o podłożu zapalnym – NASH (niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby). Tak więc, istotne jest zbadanie rozwoju wczesnych zmian w metabolizmie lipidów jakie zachodzą w komórkach wątroby w odpowiedzi na zastosowanie karmienia wysokotłuszczowego, ze szczególnym uwzględnieniem prozapalnych związków lipidowych, tj. kwasu arachidonowego (AA). Dlatego też, zasadne wydaje się zbadanie zależnych od czasu zmian wewnątrzwątrobowej zawartości wybranych frakcji lipidowych (w tym kwasu arachidonowego) w toku rozwoju NAFLD, które pozwolą jednoznacznie sprecyzować ich wpływ na rozwoju stanu zapalnego jako potencjalnego czynnika progresji stłuszczenia do NASH. Dokładne ustalenie szeregu zmian zachodzących w metabolizmie lipidowym komórek wątroby znacznie ułatwi znalezienie celowanego środka do zapobiegania progresji prostego stłuszczenia do nieodwracalnych stanów chorób wątroby. Potencjalnym związkiem wydaje się być deksametazon, który jest powszechnie stosowanym środkiem farmakologicznym w leczeniu chorób o podłożu zapalnym. Przeprowadzone badania pozwolą, ocenić przypuszczalnie „ochronny” wpływ deksametazonu na transport FA oraz przemiany lipidów w komórkach HepG2 poddanych ekspozycji na palmitynian, a przede wszystkim na aktywność szlaków n-3 i n-6 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (n-3, n-6 PUFA).

Mając na uwadze powyższe, celem zrealizowanych badań była:

1. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a stopniem akumulacji kwasu arachidonowego, rozwojem stanu zapalnego i zmian oksydacyjnych w wątrobie,
2. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a wewnątrzwątrobową akumulacją wybranych frakcji sfingolipidowych,
3. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a stopniem fosforylacji białek ze szlaku insulinowego PI3K/Akt/mTOR w wątrobie,

4. Ocena wpływu krótkotrwałej (16 h) oraz długotrwałej (40 h) ekspozycji ludzkich komórek nowotworu wątrobowokomórkowego na deksametazon, z uwzględnieniem zmian w ekspresji transporterów kwasów tłuszczowych, wybranych frakcji lipidowych oraz aktywności szlaków n-3 i n-6 PUFA.

5. Materiały i metody

Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych modeli doświadczalnych i metodyki badań znajdują się w niżej wymienionych pracach włączonych do rozprawy:

- a. Publikacja nr. 1 – Sztolsztener K., Chabowski A., Harasim-Symbor E., Bielawiec P., Konstantynowicz-Nowicka K.: *Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development*. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, nr 8, 15 pp.
- b. Publikacja nr. 2 – Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Harasim-Symbor E., Chabowski A.: *Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22), 12478.
- c. Publikacja nr. 3 – Sztolsztener K., Harasim-Symbor E., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K.: *The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 132-138.

5.1. Model doświadczalny

5.1.1. Model zwierzęcy

Badania z wykorzystaniem modelu zwierzęcego zostały przeprowadzone na samcach szczurów rasy Wistar o początkowej masie 100-150g. Zgodę na przeprowadzenie badań na zwierzętach uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (28 maj 2008; numer zgody: 32/2008). Przez pierwszy tydzień badań wszystkie szczury były karmione standardową dietą dla gryzoni i trzymane w warunkach stałej temperatury ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), wilgotności powietrza 35-60% oraz w cyklu dnia świetlnego 12/12 godzin. Po tygodniu aklimatyzacji zwierzęta zostały losowo rozdzielone na dwie grupy (grupa kontrolna i badana) i przetrzymywane pojedynczo w klatkach z zachowanym stałym kontaktem wzrokowym. Szczury z grupy kontrolnej karmione były standardową dietą o zredukowanej zawartości tłuszczów (57,1% węglowodany, 30,5% białka, 12,4% tłuszcze). Natomiast, szczury z grupy badanej otrzymywały dietę bogatotłuszczową (HFD; 60,0% tłuszcze, 20,0% węglowodany, 20,0% białka; New Brunswick, NJ, USA) przez okres 1, 2, 3, 4 oraz 5 tygodni. Przez cały czas trwania eksperymentu zwierzęta miały zapewniony nieograniczony dostęp do wody oraz paszy standardowej lub bogatotłuszczowej

(grupa kontrolna lub badana). Na koniec każdego tygodnia eksperymentalnego, szczury wprowadzono w stan głębokiej narkozy poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu (80mg/kg masy ciała). Od uśpionych zwierząt, do próbek zawierających heparynę, pobrano krew z żyły głównej dolnej, a po jej odwirowaniu zebrano osocze do dalszych analiz. Następnie, wątrobę szczurów wypreparowano i zamrożono w temperaturze ciekłego azotu do dalszych analiz biochemicznych.

Szczegółowe badania w eksperymencie na modelu zwierzęcym objęły ocenę:

- a. stopnia akumulacji lipidów i zmian morfologii komórek wątroby za pomocą barwienia hematoksylina+eozyna (H+E) w preparatach histologicznych,
- b. stężenia kwasu arachidonowego we frakcjach fosfolipidów (PL), triacylogliceroli (TAG), diacylogliceroli (DAG) oraz wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w tkance wątrobowej oraz osoczu z użyciem metody chromatografii gazowo-cieczowej (GLC),
- c. całkowitej ekspresji białek ze szlaku zapalnego, takich jak: cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2), 15-lipoksygenaza (15-LO), jądrowy czynnik transkrypcyjny związany z czynnikiem erytroidalnym 2 (Nrf2), jądrowy czynnik kappa β (NF- $\kappa\beta$), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), interleukina 6 (IL-6) metodą Western Blot,
- d. całkowitej ekspresji białek zaangażowanych w proces lipogenezy: acylotransferaz diacyloglicerolowych 1 i 2 (DGAT1 i DGAT2) metodą Western Blot,
- e. parametrów stresu oksydacyjnego, tj. dysmutaza ponadtlenkowa 2 (SOD2), katalaza (CAT), całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC), dialdehyd malonowy (MDA), 4-hydroksynonenal (4-HNE), zaawansowane końcowe produkty glikacji (AGE) z użyciem komercyjnie dostępnych kitów kolorymetrycznych lub ELISA
- f. metabolizmu sfingolipidów poprzez zbadanie:
 - i. tkankowego stężenia sfinganiny (SFA), sfinganino-1-fosforanu (SA1P), ceramidu (CER), sfingozyny (SFO), sfingozyno-1-fosforanu (S1P) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC),
 - ii. całkowitej ekspresji enzymów szlaku sfingolipidowego, takich jak: palmitoilotransferaza serynowa 2 (SPTLC2), syntaza ceramidu 2, 4 i 6 (CerS2, CerS4 i CerS6), kinaza 1 i 2 sfingozyny (SPHK1 i SPHK2), kwaśna, obojętna i zasadowa ceramidaza (ASAH1, ASAH2 i ASAH3), zasadowa i obojętna sfingomielinaza (Alk-SMase i N-SMase) metodą Western Blot,
- g. zawartości fosforylowanych form białek ze szlaku insulinowego: substratu receptora insulinowego (pIRS(Ser636/Ser639)), homologu fosfatazy i tensyny (pPTEN(Ser380)),

kinazy białkowej B (pAkt(Ser473)), kinazy syntazy glikogenu 3 α/β (pGSK3 α/β (Ser21/Ser9)), proapoptotycznego białka należącego do rodziny Bcl-2 (pBAD(Ser136)), ssaczego celu rapamycyny (pmTOR(Ser2448)), rybosomalnej kinazy białkowej S6 (pP70 S6 kinase(Thr389)), białka rybosomalnego S6 (pS6RP(Ser235/Ser236)) za pomocą zestawu do testów multipleksowych.

5.1.2. Model komórkowy

Badania zostały wykonane w systemie hodowli komórkowych na ludzkich komórkach raka wątrobowokomórkowego (HepG2) zakupionych w ATCC (American Type Culture Collection, USA). Zgodę na przeprowadzenie badań na modelu komórkowym uzyskano od Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (24 czerwiec 2021; numer zgody: APK.002.325.2021). Komórki HepG2 były inkubowane w medium o wysokim stężeniu glukozy (4,5g/l) DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Pan Biotech, Aidenbach, Niemcy) wzbogaconym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i 1% antybiotykiem/antymykotykiem (penicylina/streptomycyna, Gibco) w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po osiągnięciu zagęszczenia powyżej 85% oraz ocenie morfologii i żywotności komórek z wykorzystaniem barwienia Trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) w komorze Bürkera, komórki zostały wykorzystane do przeprowadzenia właściwego eksperymentu.

Po osiągnięciu zagęszczenia powyżej 85%, komórki inkubowano z 0,5mM roztworem kwasu palmitynowego, 1 μ M roztworem deksametazonu oraz w roztworze zawierającym jednocześnie 0,5mM kwas palmitynowy i 1 μ M deksametazon w dwóch punktach czasowych, 16 i 40 godzin inkubacji. Po zakończeniu inkubacji, medium poinkubacyjne zebrano i zamrożono w temperaturze ciekłego azotu. Natomiast, komórki zebrano, a następnie zlizowano w buforze radioimmunoprecypitacyjnym (RIPA) zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) i zamrożono w temperaturze ciekłego azotu.

Szczegółowe badania w eksperymencie na modelu komórkowym objęły ocenę:

- a. stężenia oraz składu kwasowego w poszczególnych frakcjach: triacylogliceroli i diacylogliceroli metodą GLC w medium poinkubacyjnym oraz w lizatach komórkowych,
- b. wewnątrzkomórkowej aktywności szlaków n-3 i n-6 kwasów tłuszczowych we frakcjach TAG i DAG z wykorzystaniem techniki GLC,

- c. całkowitej ekspresji białek zaangażowanych w proces dkomórkowego transportu kwasów tłuszczowych, tj. translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36), błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPm), białko transportujące kwasy tłuszczowe 2 (FATP2), oraz sekrecji kwasów tłuszczowych do medium, tj. mikrosomalne białko transportujące triacyloglicerole (MTP), transporter kasety wiążącej ATP A1 (ABCA1) metodą Western Blot,
- d. zawartości sfinganiny, ceramidu i sfingozyny metodą HPLC w medium poinkubacyjnym oraz w lizatach komórkowych.

5.2. Analiza histologiczna preparatów wątroby barwionych hematoksyliną i eozyną

W celu określenia zmian w morfologii komórek pobrano te same fragmenty płatów wątroby od każdego ze szczurów z grup kontrolnej i badanej. Fragmenty tkanek wątroby utrwalono w 10% wodnym roztworze formaldehydu, a w dalszej kolejności poddano procesowi odwodnienia w szeregu alkoholi etylowych o wzrastających stężeniach: 70%, 95% i alkoholu absolutnym. Odwodnione próby wątroby zalano ksylenem, a następnie umieszczono w ciekłej parafinie w celu otrzymania bloczka parafinowego. Tkanki wątroby zatopione w bloczkach parafinowych cięto na mikrotomie otrzymując skrawki o grubości 4µm, które umieszczono na szkiełkach podstawowych. Skrawki preparatów pozbawiono parafiny i uwodniono w roztworze ksylenu i alkoholi etylowych o zmniejszających stężeniach. Skrawki następnie przepłukano w wodzie destylowanej i wykonano barwienie H+E. W celu wykonania barwienia szkiełka z preparatami histologicznymi zanurzono w roztworze hematoksyliny, kolejno płukano w wodzie bieżącej i wodzie destylowanej, a następnie zanurzono w roztworze eozyny. Tak przygotowane preparaty poddano procesowi odwodnienia z wykorzystaniem roztworów ksylenu i alkoholi etylowych i nakryto szkiełkiem nakrywkowym. Ocenę histologiczną preparatów wykonało 3 niezależnych histologów, z odpowiednim doświadczeniem badawczym, przy pomocy mikroskopu świetlnego Olympus BX41 wyposażonego w kamerę Olympus DP12 (Hamburg, Niemcy).

5.3. Analiza stężenia oraz składu kwasowego wybranych frakcji lipidowych w tkance wątrobowej, osoczu, komórkach HepG2 oraz medium poinkubacyjnym metodą GLC

Lipidy z materiału badawczego wyekstrahowano przy pomocy mieszaniny roztworów chloroform/metanol w stosunku objętościowym 2:1. Do otrzymanych ekstraktów dodano standard wewnętrzny zawierający kwas heptadekanowy, diheptadekanowy oraz

triheptadekanowy. Następnie ekstrakty rozwinięto na chromatograficznych płytkach szklanych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego i rozdzielono na poszczególne frakcje lipidowe – PL, TAG, DAG i FFA metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w buforze rozdzielającym heptan/eter izopropylowy/kwas octowy w stosunku objętościowym 60:40:3. Eluenty zawierające poszczególne frakcje lipidowe rozdzielone na żelu krzemionkowym poddano transmetylacji w 14% metanolemowym roztworze trójfluorku boru, a następnie rozpuszczono w heksanie. Estry metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) w każdej z frakcji lipidowych oznaczono ilościowo, na podstawie czasów retencji standardów, metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GLC; chromatograf gazowy Hewlett-Packard 5890 Series II wyposażony w kolumnę kapilarną Hewlett-Packard-INNOWax oraz detektor płomieniowo-jonizujący, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Całkowita ilość frakcji lipidowych została oszacowana jako suma poszczególnych kwasów tłuszczowych w obrębie każdej z ocenianych frakcji lipidowych.

5.4. Analiza całkowitej ekspresji wybranych białek metodą Western Blot

W celu określenia całkowitej ekspresji białek ze szlaku zapalnego, enzymów regulujących proces lipogenezy, transporterów kwasów tłuszczowych oraz enzymów szlaku sfingolipidowego wątrobę zhomogenizowano a komórki HepG2 zlizowano w buforze RIPA zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz. Następnie w uzyskanych próbach oznaczono stężenie białka metodą z użyciem kwasu bicynchoninowego (BCA).

Początkowo przeprowadzono rozdział elektroforetyczny białek w 10% żelu poliakrylamidowym (TGX Stain-Free Precast Gel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Po elektroforezie wykonano transfer białek na membrany nitrocelulozowe. W dalszej kolejności, w celu zablokowania niespecyficznych wiązań, membrany inkubowano w 5% roztworze surowiczej albuminy bydlęcej (BSA) lub w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku rozpuszczonych w buforze TBST (Tris-Buffered Saline with Tween 20) i poddano całonocnej inkubacji z odpowiednimi I-rzędowymi przeciwciałami. Następnego dnia membrany inkubowano z II-rzędowymi przeciwciałami znakowanymi peroksydazą chrzanową (HRP). Celem wizualizacji miejsc wiązania znakowanych przeciwciał na membranie wykorzystano chemiluminescencyjny substrat (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a następnie otrzymane sygnały odczytano densytometrycznie w systemie do wizualizacji ChemiDoc (Image Laboratory Software, Bio-Rad, Warszawa, Polska). Ekspresję wybranych białek znormalizowano do białka całkowitego lub w oparciu o ekspresję białka referencyjnego GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego).

5.5. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego z użyciem komercyjnie dostępnych kitów

Przed ilościowym określeniem zawartości składników stresu oksydacyjnego wątrobę zhomogenizowano w buforach RIPA lub PBS. Stężenia wybranych parametrów w homogenatach wątroby oznaczono z wykorzystaniem komercyjnych zestawów testów kolorymetrycznych i testów typu ELISA. Absorbancję tych biomarkerów mierzono spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika mikroplętek (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Następnie z otrzymanych krzywych standardowych obliczono stężenia markerów stresu oksydacyjnego zgodnie z protokołami producentów.

5.6. Analiza stężenia sfingolipidów w tkance wątrobowej, komórkach HepG2 oraz medium poinkubacyjnym metodą HPLC

W obecności standardów wewnętrznych (C17-sfingozyno-1-fosforanu i C17-sfingozyny), z materiału badawczego wyekstrahowano sfingolipidy przy użyciu mieszaniny roztworów metanolu i kwasu solnego. Zawartość sfinganino-1-fosforanu oraz sfingozyno-1-fosforanu oznaczono metodą pośrednią za pomocą fosfatazy alkalicznej (ALP, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w procesie defosforylacji odpowiednio do sfinganiny i sfingozyny. Niewielką ilość wyekstrahowanych lipidów przeniesiono do nowej próbki zawierającej N-palmitoilo-D-erytro-sfingozynę (zasada C17) jako standard wewnętrzny, a następnie poddano hydrolizie alkalicznej w celu konwersji ceramidu do sfingozyny. W kolejnym etapie, sfinganina i sfingozyna, defosforylowane zasady sfingoidowe oraz sfingozyna pochodząca z ceramidu zostały poddane procesowi derywatywacji. Otrzymane o-ftalaldehadowe pochodne sfingolipidów analizowano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC; Varian ProStar, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.7. Analiza zawartości fosforylowanych form białek ze szlaku insulinowego za pomocą zestawu do testów multipleksowych

Tkanekę wątrobową zlizowano w odpowiednim buforze lizującym (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zawierającym fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i czynnik lizy komórek QG (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Otrzymany lizat odwirowano, a w supernatancie próbek oznaczono całkowite stężenie białka z wykorzystaniem metody BCA.

Zawartość fosforylowanych form wybranych białek ze szlaku insulinowego – pIRS, pPTEN, pAkt, pGSK3 α/β , pBAD, pmTOR, pP70 S6 Kinase, pS6RP, oznaczono za pomocą zestawu do testów multipleksowych wykorzystujących kowalencyjnie sprzężone kulki magnetyczne. Zgodnie z protokołem producenta, dodanie przeciwciał detekcyjnych oraz koniugatu streptawidyna-fikoerytryna (SA-PE) spowodowało wytworzenie kompleksu, który następnie został uwidoczniiony poprzez dodanie zawiesiny zawierającej kowalencyjnie sprzężone kulki magnetyczne. Na koniec analizy odczytano stężenie analitów w próbkach badanych za pomocą cytometru przepływowego w systemie Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

5.8. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie wyniki przedstawiono jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe (SD). W celu statystycznego porównania danych z oznaczeń w eksperymentach zastosowano test Shapiro-Wilka oraz test Bartletta, aby zapewnić rozkład normalny i jednorodność wyników. Różnice statystyczne pomiędzy badanymi grupami analizowano za pomocą testu ANOVA, a następnie odpowiedniego testu post hoc (test Tukeya i t-test). Analizę statystyczną dla wszystkich oznaczeń wykonano z użyciem programów GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) oraz Statistica 10 (StatSoft, Kraków, Polska). Za poziom istotności statystycznej uznano $p < 0,05$.

6. Wyniki

Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych modeli doświadczalnych i uzyskanych wyników badań znajdują się w niżej wymienionych pracach włączonych do rozprawy:

- a. Publikacja nr. 1 – Sztolsztener K., Chabowski A., Harasim-Symbor E., Bielawiec P., Konstantynowicz-Nowicka K.: *Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development*. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, nr 8, 15 pp.
- b. Publikacja nr. 2 – Sztolsztener K., Konstantynowicz-Nowicka K., Harasim-Symbor E., Chabowski A.: *Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22), 12478.
- c. Publikacja nr. 3 – Sztolsztener K., Harasim-Symbor E., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K.: *The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 132-138.

W opisie wyników wykorzystano odniesienia do figur zamieszczonych w wyżej wymienionych publikacjach włączonych do rozprawy.

W obrazie histologicznym tkanki wątrobowej, dieta bogatołuszczowa spowodowała rozwój zmian stłuszczeniowych (w stopniu lekkim do ciężkiego) w kolejnych punktach diety eksperymentalnej (1, 2, 3, 4, 5 tygodni karmienia HFD), którym towarzyszyło występowanie zmian zapalnych i martwiczych hepatocytów, określanych jako zwyrodnienie balonowate (Figura 1 B-F; Publikacja nr. 1). Zmianom tym towarzyszył znaczny wzrost wewnątrzwątrobowej zawartości kwasu arachidonowego we wszystkich badanych frakcjach lipidowych, tj. DAG, TAG, FFA i PL, w każdym tygodniu żywienia wysokotłuszczowego w zakresie od 25,2% do 945,5% w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,05$, Figura 2 A-D; Publikacja nr. 1). Wyżej wymieniony wzrost stężenia kwasu arachidonowego związany był ze zwiększeniem ekspresji białek odpowiedzialnych za syntezę mediatorów zapalnych, tj. COX-1 i 15-LO, ale dopiero w 3, 4 i 5 tygodniu diety HFD (COX-1 – 3 tyg.: +54,5%, 4 tyg.: +33,4%, 5 tyg.: +61,3%; 15-LO – 3 tyg.: +358,8%, 5 tyg.: +134,9%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 4 A i C, odpowiednio; Publikacja nr. 1). Jednocześnie wykazano zmniejszenie poziomu ekspresji białka TGF- β w ostatnim tygodniu karmienia wysokotłuszczowego (-34,5%;

vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 B; Publikacja nr.1). Ponadto, nasileniu ekspresji enzymów wątrobowego szlaku zapalnego towarzyszyła zmiana parametrów równowagi oksydacyjnej komórek wątroby. Karmienie dietą bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe spowodowało znaczne obniżenie poziomu naturalnie występujących enzymów antyoksydacyjnych w wątrobie – SOD2 (1 tyg.: -31,1%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 7 A; Publikacja nr. 1) już w pierwszym tygodniu diety HFD i CAT (5 tyg.: -29,6%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 7 B; Publikacja nr. 1) w ostatnim, piątym tygodniu eksperymentu. Z kolei w grupach szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową przez okres 2, 3 i 4 tygodni zaobserwowano zwiększony poziom produktu peroksydacji lipidów, tj. MDA (2 tyg.: +27,1%, 3 tyg.: +52,5%, 4 tyg.: +48,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 7 D; Publikacja nr. 1). W wyniku rozwoju zaburzeń metabolicznych spowodowanych dietą HFD stwierdzono również istotne zmiany w poziomie produktów glikacji AGE w pierwszym i ostatnim tygodniu trwania eksperymentu (1 tyg.: +77,6%, 5 tyg.: -47,3%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 7 F; Publikacja nr. 1).

Zwiększona zawartość kwasów tłuszczowych w diecie spowodowała istotne statystycznie zmiany ekspresji białek regulujących proces lipogenezy w wątrobie. W odniesieniu do ekspresji DGAT1, w 1 i 2 tygodniu diety HFD odnotowano wzrost, natomiast w 4 tygodniu diety HFD spadek całkowitej ekspresji tego białka (1 tyg.: +95,8%, 2 tyg.: +116,8%, 4 tyg.: -37,5%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 6 A; Publikacja nr. 1). Podczas gdy, ekspresja DGAT2 istotnie wzrosła w każdym tygodniu eksperymentalnego karmienia szczurów dietą bogatotłuszczową (1 tyg.: +472,9%, 2 tyg.: +279,2%, 3 tyg.: +358,7%, 4 tyg.: +454,7%, 5 tyg.: +434,9%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 6 B; Publikacja nr. 1).

W przypadku szlaku sfingolipidowego, karmienie dietą bogatotłuszczową spowodowało wzrost SFA, CER, SFO w wybranych tygodniach trwania eksperymentu (SFA – 3 tyg.: +40,9%, 5 tyg.: +54,2%; CER – 4 tyg.: +28,1%, 5 tyg.: +30,7%; SFO – 1 tyg.: +73,6%, 2 tyg.: +41,7%, 3 tyg.: +40,4%, 4 tyg.: +24,7%, 5 tyg.: +18,2%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 1 A, C i D, odpowiednio; Publikacja nr. 2). Natomiast, w 4 tygodniu diety HFD zaobserwowano spadek SFA (4 tyg.: -24,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 1 A; Publikacja nr. 2). Stwierdzono także zmiany zawartości wątrobowych SA1P, S1P i stosunku S1P/CER, gdzie odnotowano spadek wyżej wymienionych parametrów (SA1P – 3 tyg.: -47,1%; S1P – 3 tyg.: -36,9%, 4 tyg.: -33,3%; stosunek S1P/CER – 2 tyg.: -43,0%, 3 tyg.: -43,8%, 4 tyg.: -48,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 1 B, E i F, odpowiednio; Publikacja nr. 2).

W odniesieniu do zmian stężenia poszczególnych związków ze szlaku sfingolipidów ekspresja enzymów regulujących aktywność tego szlaku również uległa istotnym zmianom. W badaniach stwierdzono obniżoną ekspresję SPTLC2 ze szlaku syntezy *de novo* już

w pierwszym tygodniu diety HFD, a spadek ten uległ pogłębieniu w każdym kolejnym tygodniu karmienia eksperymentalnego (1 tyg.: -40,4%, 2 tyg.: -46,1%, 3 tyg.: -60,2%, 4 tyg.: -52,8%, 5 tyg.: -58,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 2 A; Publikacja nr. 2). Co więcej, zaobserwowano także zmniejszenie ekspresji enzymów współdzielących szlak syntezy *de novo* i tzw. szlak ratunkowy – CerS2 i CerS6 (CerS2 – 1 tyg.: -36,5%, 2 tyg.: -74,1%, 3 tyg.: -81,0%, 4 tyg.: -69,1%, 5 tyg.: -70,4%; CerS6 – 1 tyg.: -47,1%, 2 tyg.: -41,2%, 3 tyg.: -68,7%, 4 tyg.: -44,6%, 5 tyg.: -63,1%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 2 B i D, odpowiednio; Publikacja nr. 2) z wyjątkiem CerS4, którego wzrost ekspresji odnotowano w ostatnich dwóch tygodniach trwania eksperymentu (CerS4 – 4 tyg.: +82,3%, 5 tyg.: +104,8%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 2 C; Publikacja nr. 2). Dodatkowo, w szlaku katabolicznym sfingolipidów ekspresja SPHK2, ASAH2 i ASAH3 uległa obniżeniu po zastosowaniu diety bogatotłuszczowej (SPHK2 – 1 tyg.: -51,9%, 2 tyg.: -72,6%, 3 tyg.: -78,4%, 4 tyg.: -72,1%, 5 tyg.: -64,0%; ASAH2 – 5 tyg.: -23,4%; ASAH3 – 1 tyg.: -59,9%, 2 tyg.: -60,0%, 3 tyg.: -64,3%, 4 tyg.: -38,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 3 B, D i E, odpowiednio; Publikacja nr. 2). Przeciwny efekt został zaobserwowany w przypadku ekspresji ASAH1 i ASAH2 (ASAH1 – 2 tyg.: +97,7%; ASAH2 – 1 tyg.: +103,9%, 3 tyg.: +112,6%, 4 tyg.: +94,9%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 2 C i D, odpowiednio; Publikacja nr. 2). Z kolei w szlaku sfingomieliny, ekspresja Alk-SMase i N-SMase uległa zwiększeniu odpowiednio w 3 i 5 tygodniu diety bogatotłuszczowej (Alk-SMase – 3 tyg.: +30,1%; N-SMase – 5 tyg.: +27,2%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 3 A i B, odpowiednio; Publikacja nr. 2).

Karmienie dietą bogatotłuszczową wyraźnie zmieniło fosforylację białek ze szlaku insulinowego w komórkach wątroby. W odniesieniu do grupy kontrolnej, szczury karmione dietą HFD wykazały obniżony poziom fosforylowanych form białek Akt i GSK3 α/β w prawie wszystkich tygodniach trwania eksperymentu (pAkt (Ser473) – 1 tyg.: -27,3%, 2 tyg.: -22,4%, 3 tyg.: -38,4%, 4 tyg.: -15,5%; GSK3 α/β (Ser21/Ser9) – 1 tyg.: -41,4%, 2 tyg.: -43,0%, 3 tyg.: -40,2%, 4 tyg.: -46,3%, 5 tyg.: -20,2%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 C i D, odpowiednio; Publikacja nr. 2). Dodatkowo, w homogenatach tkanki wątroby zaobserwowano znaczne zmniejszenie poziomu pPTEN (Ser 380), ale jedynie w pierwszych dwóch tygodniach podawania karmy bogatej w nasycone kwasy tłuszczowe (1 tyg.: +11,3%, 2 tyg.: +12,7%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 B; Publikacja nr. 2). Wykazano również istotny statystycznie spadek poziomu pmTOR na początku badań (pmTOR (Ser2448) – 1 tyg.: -21,5%, 2 tyg.: -18,2%, 3 tyg.: -25,7%, 4 tyg.: -16,8%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 F; Publikacja nr. 2), a następnie wzrost poziomu pmTOR w ostatnim tygodniu podawania karmy bogatotłuszczowej (pmTOR (Ser2448) – 5 tyg.: +8,5%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 F; Publikacja nr. 2). W szlaku insulinowym odnotowano również zwiększenie zawartości

fosforylowanej kinazy P70 S6 w każdym tygodniu karmienia eksperymentalnego (pP70 S6 Kinase (Thr389) – 1 tyg.: +22,6%, 2 tyg.: +22,6%, 3 tyg.: +28,8%, 4 tyg.: +17,8%, 5 tyg.: +29,8%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 G; Publikacja nr. 2). Odwrotny efekt w trakcie całego eksperymentalnego podawania diety HFD stwierdzono w kwestii poziomu pS6RP (Ser235/Ser236) (1 tyg.: -78,6%, 2 tyg.: -70,8%, 3 tyg.: -80,7%, 4 tyg.: -64,1%, 5 tyg.: -35,3%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 5 H; Publikacja nr. 2), a także w ekspresji GLUT2 (1 tyg.: -45,2%, 2 tyg.: -50,3%, 3 tyg.: -68,3%, 4 tyg.: -58,2%, 5 tyg.: -61,0%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura S1A; Publikacja nr. 2).

Krótkotrwała (16 h) i długotrwała (40 h) ekspozycja komórek HepG2 na palmitynian i/lub deksametazon spowodowała wzrost wewnątrzkomórkowej puli TAG w odniesieniu do odpowiednich grup kontrolnych (16 h i 40 h – PA: +83,7%, +91,7%, DEX: +18,1%, +17,2%, DEX+PA: +80,6%, +133,3%, odpowiednio; $p < 0,05$, Figura 1A; Publikacja nr. 3) oraz odpowiednich grup PA (40 h – DEX+PA: +21,7%; $p < 0,05$, Figura 1A; Publikacja nr. 3). Ponadto, stwierdzono wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości DAG jedynie po 40 h inkubacji komórek HepG2 z DEX+PA (+63,3% i 52,0%; vs. kontrola i PA, odpowiednio, $p < 0,05$, Figura 1 C; Publikacja nr. 3). Zewnątrzkomórkowa ilość TAG uległa zwiększeniu po 16 h inkubacji z PA (+34,1%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 1 B; Publikacja nr. 3) oraz zmniejszeniu po 16 h ekspozycji na DEX+PA (-37,8%; vs. PA, $p < 0,05$, Figura 1 B; Publikacja nr. 3). Jednocześnie, odnotowano wzrost zawartości TAG w medium po 40 h inkubacji w wybranych grupach badanych w odniesieniu do kontroli (PA: +25,1%, DEX: +176,1%, DEX+PA: +272,4%; $p < 0,05$, Figura 1B; Publikacja nr. 3), jak również wzrost w odniesieniu do grupy PA (DEX+PA: +197,7%; $p < 0,05$, Figura 1B; Publikacja nr. 3). Dodatkowo, zewnątrzkomórkowa zawartość DAG uległa redukcji w wyniku krótkotrwałej inkubacji w grupie DEX+PA (-27,1% i -30,9%; vs. kontrola i PA, odpowiednio, $p < 0,05$, Figura 1 D; Publikacja nr. 3). Z kolei po 40 h ekspozycji na DEX i DEX+PA odnotowano wzrost zawartości DAG w medium poinkubacyjnym (DEX: +87,8%, vs. kontrola; DEX+PA: +146,4% i 154,0%, vs. kontrola i PA, odpowiednio; $p < 0,05$, Figura 1D; Publikacja nr. 3).

W komórkach HepG2 we frakcji TAG zaobserwowano wzrost zawartości kwasów C16:0, C16:1 i C18:1 po 40 h inkubacji z deksametazonem i palmitynianem w stosunku do odpowiednich grup PA ($p < 0,05$, Figura 2 A; Publikacja nr. 3). Podobne obserwacje poczyniono we frakcji zewnątrzkomórkowej TAG, gdzie zawartość kwasów C16:0, C16:1, C18:0 i C18:1 uległa zwiększeniu (vs. PA; $p < 0,05$, Figura 2 B; Publikacja nr. 3). W przypadku zawartości zewnątrzkomórkowej frakcji TAG i DAG 16 h inkubacja z DEX+PA spowodowała wyraźny spadek zawartości kwasów C16:0 i C16:1 (vs. PA; $p < 0,05$, Figura 2 B i D; Publikacja

nr. 3). Przedłużona inkubacja komórek HepG2 z deksametazonem w połączeniu z palmitynianem spowodowała istotny statystycznie wzrost zawartości kwasów C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 oraz C16:0, C16:1 i C18:1 odpowiednio w wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej w puli DAG (vs. PA; $p < 0,05$, Figura 2 C i D; Publikacja nr. 3).

We frakcji TAG zaobserwowano zmniejszenie aktywności szlaków n-3 PUFA po krótkotrwałej inkubacji komórek HepG2 w grupach PA i DEX+PA oraz wzrost aktywności tego w szlaku w wyniku przedłużonej inkubacji w tych samych grupach (16 h – PA: -29,3%, DEX+PA: -30,8%; 40 h – PA: +61,6%, DEX+PA: +40,4%; vs. kontrola, $p < 0,05$, Figura 3 A; Publikacja nr. 3). Jednocześnie, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w aktywności szlaku n-6 PUFA we frakcji TAG w żadnym punkcie czasowym eksperymentu. W przypadku frakcji DAG aktywność szlaków kwasów n-3 i n-6 uległa znacznemu obniżeniu po 16 h inkubacji komórek HepG2 w wybranych grupach (n-3 PUFA – PA: -44,9%, DEX+PA: -44,0%; vs. kontrola; DEX+PA: -40,0%; vs. PA; oraz n-6 PUFA – PA: -19,4%, DEX: -32,6%, DEX+PA: -32,5%; vs. kontrola; DEX+PA: -16,3%; vs. PA, $p < 0,05$, Figura 3 C; Publikacja nr. 3). Przedłużona inkubacja komórek HepG2 zmieniła wyżej wymienione efekty szlaków n-3 i n-6 PUFA w DAG (n-3 PUFA – PA: -48,8%; vs. kontrola; DEX+PA: +55,6%; vs. PA; oraz n-6 PUFA – PA: -15,3%, DEX: -43,9%, DEX+PA: -36,5%; vs. kontrola; DEX+PA: -25,0%; vs. PA, $p < 0,05$, Figura 3 C; Publikacja nr. 3).

W odniesieniu do transporterów kwasów tłuszczowych, obniżenie ekspresji FAT/CD36 stwierdzono po krótkiej inkubacji komórek HepG2 z deksametazonem i palmitynianem w stosunku do grupy kontrolnej (-25,5%; $p < 0,05$, Figura 4 A; Publikacja nr. 3). Natomiast, w odniesieniu do właściwych grup kontrolnych, 16 h i 40 h ekspozycja na palmitynian i/lub deksametazon spowodowała wzrost ekspresji białka FABPpm (16 h – PA: +29,2%, DEX: +38,2%, DEX+PA: +50,0%; 40 h – DEX: +54,5%, DEX+PA: +75,8%; $p < 0,05$, Figura 4 B; Publikacja nr. 3). Jednocześnie, nie odnotowano żadnych zmian w ekspresji FATP2 podczas trwania eksperymentu. Wykazano również, że ekspresja białek regulujących sekrecję kwasów tłuszczowych do medium hodowlanego uległa znacznemu zwiększeniu w poszczególnych grupach badanych. Tak więc, w odniesieniu do właściwej grupy kontrolnej ekspresja MTP była zwiększona po 16 h i 40 h inkubacji z DEX oraz po 40 h z DEX+PA (DEX: +22,3% i 22,7%, odpowiednio, DEX+PA: +39,8%; $p < 0,05$, Figura 4 B; Publikacja nr. 3). Z kolei, wzrost ekspresji ABCA1 w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w wybranych grupach eksperymentalnych (16 h – DEX: +24,8%, DEX+PA: +24,5%; oraz 40 h – PA: +29,6%, DEX: +72,5%, DEX+PA: +60,7%; $p < 0,05$, Figura 4 E; Publikacja nr. 3). W grupie DEX+PA po 40 h

inkubacji zaobserwowano wzrost ekspresji ABCA1 również w stosunku do grupy traktowanej palmitynianem (+31,3%; $p < 0,05$, Figura 4 E; Publikacja nr. 3).

7. Wnioski

1. Dieta bogatołuszczowa zwiększa wewnątrzwątrobową akumulację bezpośredniego prekursora mediatorów zapalnych, tj. kwasu arachidonowego, głównie we frakcji fosfolipidów błonowych, już w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia karmienia eksperymentalnego, a zmiana ta jest zintensyfikowana w kolejnych tygodniach stosowania diety HFD.
2. Akumulacja kwasu arachidonowego (rozpoczynająca się już w pierwszym tygodniu stosowania diety bogatołuszczowej) oraz nasilona ekspresja COX-1 i 15-LO, enzymów kontrolujących syntezę eikozanoidów i prostanoidów (w trzecim tygodniu karmienia HFD) korelują z powstawaniem i nasileniem stanu zapalnego podczas rozwoju NAFLD.
3. Dieta bogatołuszczowa ułatwia rozwój stresu oksydacyjnego w wątrobie w wyniku zmniejszenia zawartości enzymów antyoksydacyjnych oraz nasilenia procesów peroksydacji lipidów, czego odzwierciedleniem jest wzrost stężenia MDA i 4-HNE w homogenatach wątroby.
4. Zwiększona akumulacja ceramidu w komórkach wątroby, obserwowana w ostatnich tygodniach diety HFD, wynika z nasilonej hydrolizy sfingomieliny oraz aktywacji tzw. szlaku ratunkowego z jednoczesnym hamowaniem katabolizmu ceramidu.
5. Nasilona wewnątrzwątrobowa akumulacja SFO już w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia stosowania diety bogatołuszczowej nasila rozwój insulinooporności, a efekt ten jest potęgowany w trzech ostatnich tygodniach karmienia eksperymentalnego poprzez zwiększone stężenia SFA i CER, co wskazuje na to, że ceramid nie jest bezpośrednią przyczyną rozwoju IR w komórkach wątroby.
6. Krótkotrwała ekspozycja na deksametazon zwiększa ekspresję dokomórkowych transporterów dla kwasów tłuszczowych, co sprzyja nasilonej akumulacji lipidów we frakcjach TAG, DAG oraz CER w komórkach HepG2.
7. Długotrwała stymulacja deksametazonem zwiększa sekrecję TAG i DAG do medium hodowlanego, co ujawnia protekcyjne działanie DEX na rozwój stłuszczenia w komórkach HepG2.
8. Jednoczesne zwiększenie aktywności przeciwzapalnego szlaku n-3 PUFA i zmniejszenie aktywności prozapalnego szlaku n-6 PUFA we frakcjach TAG i DAG komórek HepG2 wskazuje na ochronny wpływ deksametazonu na rozwój zapalenia, co istotnie ogranicza proces progresji NAFLD do NASH.

8. Publikacja nr. 1

Klaudia Sztolsztener, Adrian Chabowski, Ewa Harasim-Symbor, Patrycja Bielawiec,
Karolina Konstantynowicz-Nowicka

*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver
disease development.*

Biomolecules

2020, 10(8):1133

IF=4.082, MNiSW=100

Article

Arachidonic Acid as an Early Indicator of Inflammation during Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Development

Klaudia Sztolsztener ^{*}, Adrian Chabowski , Ewa Harasim-Symbor, Patrycja Bielawiec  and Karolina Konstantynowicz-Nowicka

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

^{*} Correspondence: klaudia.sztolsztener@umb.edu.pl

Received: 15 June 2020; Accepted: 29 July 2020; Published: 31 July 2020



Abstract: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disease characterized by excessive lipid deposition. Lipid metabolism disturbances are possibly associated with hepatocyte inflammation development and oxidative balance impairment. The aim of our experiment was to examine the first moment when changes in plasma and liver arachidonic acid (AA) levels as a pro-inflammatory precursor may occur during high-fat diet (HFD)-induced NAFLD development. Wistar rats were fed a diet rich in fat for five weeks, and after each week, inflammation and redox balance parameters were evaluated in the liver. The AA contents in lipid fractions were assessed by gas–liquid chromatography (GLC). Protein expression relevant to inflammatory and lipogenesis pathways was determined by immunoblotting. The oxidative system indicators were determined with assay kits. Our results revealed that a high-fat diet promoted an increase in AA levels, especially in the phospholipid (PL) fraction. Importantly, rapid inflammation development via increased inflammatory enzyme expression, elevated lipid peroxidation product content and oxidative system impairment was caused by the HFD as early as the first week of the experiment. Based on these results, we may postulate that changes in AA content may be an early indicator of inflammation and irreversible changes in NAFLD progression.

Keywords: arachidonic acid; inflammation; inflammatory precursor; lipid accumulation; oxidative stress; non-alcoholic fatty liver disease

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver diseases in Western societies [1,2]. Today, it is estimated that nearly 25% of the global population might be suffering from NAFLD [1,3,4]. This condition is characterized by histological changes resulting from excessive lipid deposition in more than 5% of the liver cell volume without the inordinate consumption of alcohol [1,5,6]. In nearly all Western countries, the major causes of the liver disease's occurrence that may be distinguished are high-calorie and high-fat diets. Moreover, recent studies confirmed a significant association between the progression of NAFLD and the increasing number of type 2 diabetes and obesity cases [6,7]. In the sera of obese patients with coexisting fatty liver, there are significant changes in the levels of adiponectin, leptin and resistin. These molecules, together with pro-inflammatory cytokines, released from the adipose tissue can be involved in hepatic steatosis development [8].

The development of NAFLD often begins with mild fatty liver changes and may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), characterized by inflammation accompanying excessive lipid

accumulation, a condition that is reversible. However, progressive NASH leads to more severe irreversible changes, such as the development of liver fibrosis, cirrhosis and finally liver failure or hepatocellular carcinoma (HCC) [1,2,4–6].

Prolonged, increased dietary fat consumption, exceeding the energy requirements of the body, results in the excessive accumulation of lipids in hepatocytes, mitochondrial dysfunction and oxidative balance impairment in the liver. The excessive deposition of lipids primarily in the triacylglycerol (TAG) fraction may initiate a cascade of changes leading to the increased accumulation of diacylglycerols (DAGs) and ceramides (CERs) [2,9]. The excessive accumulation of these lipid fractions may cause an impairment in lipid metabolism, an inflammatory response and the evolution of oxidative stress [10,11]. What is most important in the pathophysiology of NAFLD is not only the quantities of the major lipid classes accumulating in the liver, which are crucial for steatosis deterioration, but also the composition of the fatty acids in these fractions [10]. Interestingly, the excessive accumulation of free fatty acids (FFAs) can determine the sensitization of the liver to a series of “hits”, thereby leading to steatosis and the development of NASH [1].

Overnutrition and, especially, high-fat feeding serve as an exogenous source of arachidonic acid (AA, C20:4), which belongs to the n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and is associated with metabolic disorders. An increased supply of PUFAs can cause the intensified generation of pro-inflammatory lipid compounds such as arachidonic acid and AA derivatives, contributing to cellular inflammatory signaling [2]. Oxidative stress and associated inflammation play a key role in the development and progression of NAFLD. It has long been recognized that arachidonic acid is a precursor of pro-inflammatory compounds also known as eicosanoids, i.e., prostaglandins, leukotrienes and thromboxane A₂, whose increased deposition may cause NAFLD deterioration [2,12].

As previously noted, it is important to determine the time point when the inflammation and associated irreversible changes develop in the hepatocytes. Changes in the activity of enzymes responsible for the oxidative stress pathway are good indicators of when medical intervention should be implemented. Therefore, the following study aims to determine changes in lipid composition during NAFLD development. The data presented herein concern the differences in the content of AA in selected lipid fractions in high-fat diet (HFD)-induced NAFLD at different time points, which is considered to play the main role in the progression of oxidative stress and inflammation occurrence. Thus, our study will investigate the potential relationship between AA content and inflammation occurrence during non-alcoholic fatty liver disease development.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Model

The experiment was carried out on male Wistar rats initially weighing 100–150 g and that were housed in standard holding conditions (temperature of 22 ± 2 °C, with a reverse light–dark cycle of 12/12 h) with unrestricted access to water and food. To ensure that the animals did not compensate by eating or drinking less, the amount of water and food was monitored throughout the experiment. Then, after a one-week period of acclimatization, all the rats were divided into two groups: (1) a control group ($n = 6$ in each group) fed with a basal diet with reduced fat-calorie content (57.1% carbohydrates, 30.5% protein and 12.4% fat; Σ saturated: 36.0%, Σ MUFA: 24.7%, Σ PUFA: 39.3%), (2) a high-fat diet group ($n = 6$ per group in each week of the diet) fed a diet rich in fatty acids (the energy content of the high-fat diet was distributed as follows: 60% fat, 20% carbohydrates and 20% protein; Σ saturated: 72.0%, Σ MUFA: 16.8%, Σ PUFA: 11.2%; overall calories: 5.21 kcal/g). The high-fat diet was supplied by the Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ, USA, cat no. D12492), and the fatty acid composition of the experimental diet was determined by gas–liquid chromatography (GLC). All values are expressed as percentages of the total molar amount of fatty acids. Moreover, two control groups were distinguished: the first in the 1st week and the second in the 5th week, both receiving standard rodent chow. On the basis of no considerable changes being observed upon the same assessment between the two control

groups, the results were referred to as being from one control group (0 week). Fasted overnight animals, at the end of the experiment, at different time points (1, 2, 3, 4 and 5 weeks) were anaesthetized by the intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg of body weight) and euthanized by bleeding them to death. From the inferior vena cava, the blood was collected into heparinized tubes and then centrifuged to obtain plasma, which was used in analysis. The liver tissue was promptly removed and frozen in liquid nitrogen using pre-cooled aluminum tongs and stored at -80°C until measurements. The animal study was consistent with the guidelines approved by the Ethics Committee on Animal Care at the Medical University of Białystok (28 May 2008, approval number: 32/2008).

2.2. Liver Histological Analysis

For analysis, the specific parts of the liver lobes from each rat were fixed in a 10% aqueous formaldehyde solution and then were dehydrated in a series of alcohols. Thereby, the prepared liver tissues were embedded in paraffin. Sections (4 μm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H + E) as described by Konstantynowicz-Nowicka et al. [13].

The prepared histological slides were evaluated under a light Olympus BX41 microscope equipped with an Olympus DP12 camera (200 \times magnification; 20 \times lens, 10 \times eyepiece; Hamburg, Germany) by three independent pathologists. In our previous study [13], the same tissues were evaluated for NAFLD occurrence with the use of the NAFLD activity score (NAS) system, which showed that NAFLD occurred after 3 weeks of a HFD.

2.3. Analysis of the Liver and Plasma Lipid Contents

The individual fatty acid methyl esters in the obtained plasma and liver samples were extracted with a solution of chloroform/methanol (2:1, *v/v*) (the method of Folch) [14] and separated into fractions—DAGs, TAGs, FFAs and phospholipids (PLs)—using thin-layer chromatography (TLC) [15]. The separated fractions were transmethylated with a 14% methanol solution of boron trifluoride and quantitated in accordance with the retention times of standards using gas-liquid chromatography—GLC (Hewlett Packard 5890 Series II Gas Chromatograph; Agilent Technologies, CA, USA; containing a capillary column and flame ionization detector—HP-INNOWax)—as described previously in detail [15]. Based on the fatty acid composition, the arachidonic acid content in the particular lipid fraction was expressed in nanomoles per gram of tissue.

2.4. Immunoblotting

In brief, Western blotting was used to determine the expression of proteins involved in: eicosanoid and prostanoid synthesis pathways—cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 15-lipoxygenase (15-LO) with antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) with an antibody from Abcam, Cambridge, UK; lipogenesis—diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) with an antibody from Novus Biotechnologicals, Centennial, CO, USA, and diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) with an antibody from Santa Cruz Biotechnology, Inc.; inflammatory processes—nuclear factor- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) and transforming growth factor β (TGF- β) with antibodies from Cell Signaling, and interleukin-6 (IL-6) with an antibody from Abcam as previously described by Konstantynowicz-Nowicka et al. [16]. Due to the assessment of both high- and low-weight proteins, a wet and semi-dry transfer system was used. All the proteins were electrophoretically separated on 10% TGX Stain-Free Precast Gels (BioRad, Warsaw, Poland) then transferred to nitrocellulose or polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, depending on the transfer method. After blocking in TTBS buffer containing 5% nonfat dry milk or 5% bovine serum albumin (BSA), the membranes were immunoblotted with primary antibody and probed with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

The determination of the total protein concentration in the liver tissue was performed with the use of a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit with BSA as a standard. Densitometric analysis of the immunoblotting signal was performed with a ChemiDoc visualization system (BioRad). The expression

of the analyzed proteins was standardized to the total protein expression, and the control was set at 100%.

2.5. Determination of the Oxidative and Antioxidative Parameters

Prior to the determination of oxidative stress components, the liver tissue was homogenized in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (25 mg of tissue/250 μ L of buffer) for malonyldialdehyde (MDA); in ice-cold phosphate buffer saline (PBS) at 20 mg of tissue/1 mL of PBS for superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT) and total antioxidant capacity (TAC); and in that at 10 mg of tissue/90 μ L of PBS for 4-hydroxynonenal (4-HNE) and advanced glycation end-product (AGE) determinations. Then, we centrifuged the obtained homogenates in RIPA buffer at 1,600 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 10 min to quantify MDA. In order to quantify CAT, SOD2 and TAC, homogenates in PBS were centrifuged at 12,000 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 5 min, and samples were centrifuged at 5,000 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 5 min to assess 4-HNE and AGEs. Then, the supernatant fractions were relocated into separate tubes and stored at -80 $^{\circ}$ C for further analysis.

The liver's concentrations of CAT and SOD2 were determined with commercial ELISA kits from Cloud-Clone Corp. (Houston, TX, USA). The absorbance of these biomarkers was measured spectrophotometrically at 450 nm by the use of a microplate reader (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek). Finally, the oxidative stress enzyme concentrations were calculated from the obtained standard curves. The results are expressed in picograms and nanograms per milligram of tissue for SOD2 and CAT, respectively.

For the quantitative determination of the MDA content in the liver homogenates, we used the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). This method is based on the reaction of MDA binding with thiobarbituric acid (TBA), and the resulting MDA-TBA adducts were measured colorimetrically at 530 nm. Next, the MDA values were calculated and are expressed in nanomoles per milligram of tissue.

To determine 4-HNE and AGE concentrations, we used ELISA kits from Biorbyt (Cambridge, UK). The absorbance was assessed spectrophotometrically at 450 nm. Then, the oxidative component concentrations were obtained from standard curves. The expressed amounts of 4-HNE and AGE are reported as picograms and nanograms per milligram of tissue, respectively.

Moreover, the parameter of the TAC of the liver tissue was determined by the use of a colorimetric TAC assay kit (Abcam). The absorbance was measured spectrophotometrically at 570 nm. Then, the parameter was calculated according to the manufacturer's protocols and is expressed as nanomoles per milligram of tissue.

2.6. Data Analysis

The data from experiment are expressed as the mean \pm standard deviation. Our statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5 (California, USA). The assumptions of the methods used in the analysis (normality of the data distribution and homogeneity of the variance) were checked using the Shapiro-Wilk test and Bartlett's test. Statistical differences between groups were examined by one-way test ANOVA followed by an appropriate post-hoc test (Tukey's test and *t*-test). For all the data, a *p*-value < 0.05 was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. Changes in the Liver Histology

Overall, in Figure 1 are shown representative histological images of the H + E-stained liver sections. Histological alterations were evaluated by three independent pathologists. Five-week high-fat feeding affected the level of lipid deposits in the liver, and increased hepatocyte ballooning was observed. In the control group (0 week), after H + E staining were observed radially arranged hepatic trabeculae without ballooning degeneration (Figure 1A). All evaluated sections at the end of the experiment at the

different time points (1, 2, 3, 4 and 5 weeks) showed slight to severe steatosis with a linear increase in balloon degeneration (Figure 1B–E) as compared to the control group. With each consecutive week of our study, the steatosis took on a more severe course. The pathologists noticed visible disorganization of the liver parenchyma in response to high-fat feeding. The highest grade of steatosis and ballooning occurred at the fifth week of HFD feeding (Figure 1F).

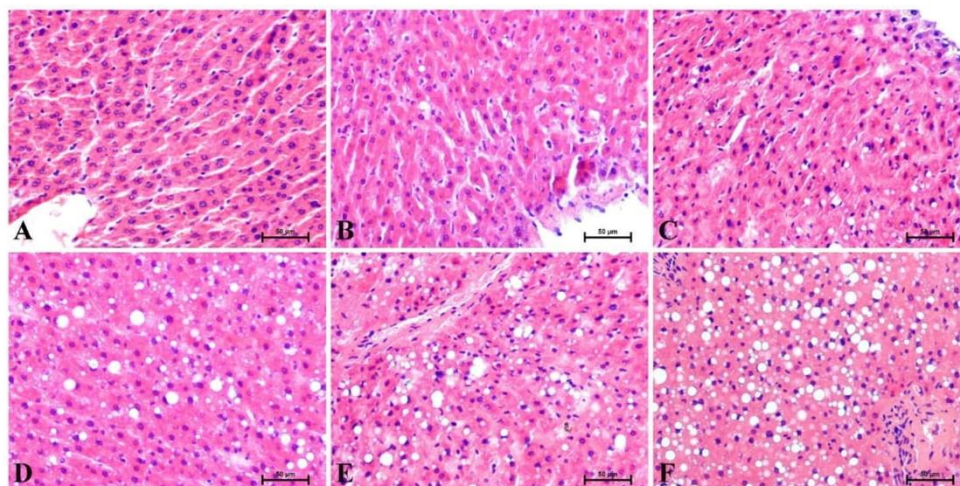


Figure 1. Representative hematoxylin and eosin (H + E) stains of the liver sections at the individual time points from (A) 0 week, as the control group, and the experimental HFD weeks: (B) 1, (C) 2, (D) 3, (E) 4 and (F) 5. The results from each rat ($n = 6$) were collected as independent determinations of the specific parts of the liver lobes. 200 \times magnification. On the lower right, the calibration bar equals 50 μm .

3.2. Changes in the Arachidonic Acid Content in the Liver and Plasma

In the liver, we observed significantly increased arachidonic acid content in the DAG fraction at each week in the high-fat feeding group (first week: +107.2%; second week: +94.9%; third week: +77.5%; fourth week: +59.8%; fifth week: +123.8%; $p < 0.001$; Figure 2A) compared to the control group. Moreover, in the TAG fraction, the level of AA gradually increased in all the examined groups and these changes were statistically significant (first week: +405.2%; second week: +498.7%; third week: +571.4%; fourth week: +815.0%; fifth week: +945.5%; $p < 0.001$; Figure 2B) in comparison with the control group. In the each week of high-fat feeding, we also found significantly increased arachidonic acid content in the FFAs (first week: +134.7%; second week: +93.7%; third week: +41.6%; fourth week: +25.2%; fifth week: +97.4%; $p < 0.001$; Figure 2C) and PLs (first week: +89.5%; second week: +86.4%; third week: +108.9%; fourth week: +104.9%; fifth week: +119.3%; $p < 0.0001$; Figure 2D) from that in the control group.

In the plasma, we observed markedly reduced arachidonic acid content in the DAG fraction only in the fourth week (fourth week: -33.2% ; $p < 0.01$; Figure 3A). Furthermore, we also noticed an increased level of AA in TAG at the end of our study (fifth week: +46.4%; $p < 0.05$; Figure 3B). In the FFA and PL fractions, no significant changes in the arachidonic acid concentration during HFD feeding were found from that in the control group (Figure 3C,D).

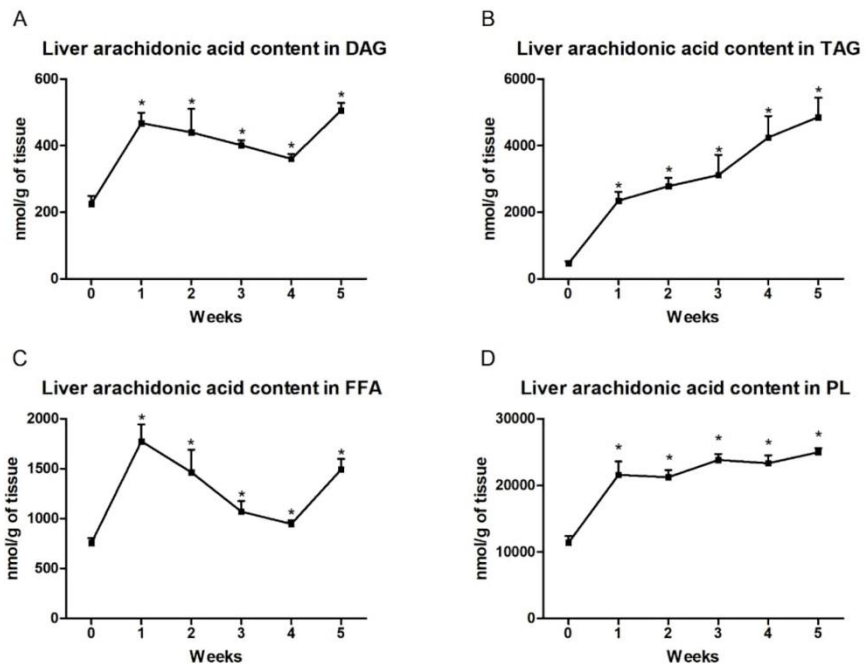


Figure 2. Liver contents of arachidonic acid in the (A) diacylglycerol (DAG), (B) triacylglycerol (TAG), (C) free fatty acid (FFA) and (D) phospholipid (PL) fractions. Changes in the arachidonic acid content in the selected lipid fractions were examined by the gas–liquid chromatography (GLC) method. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

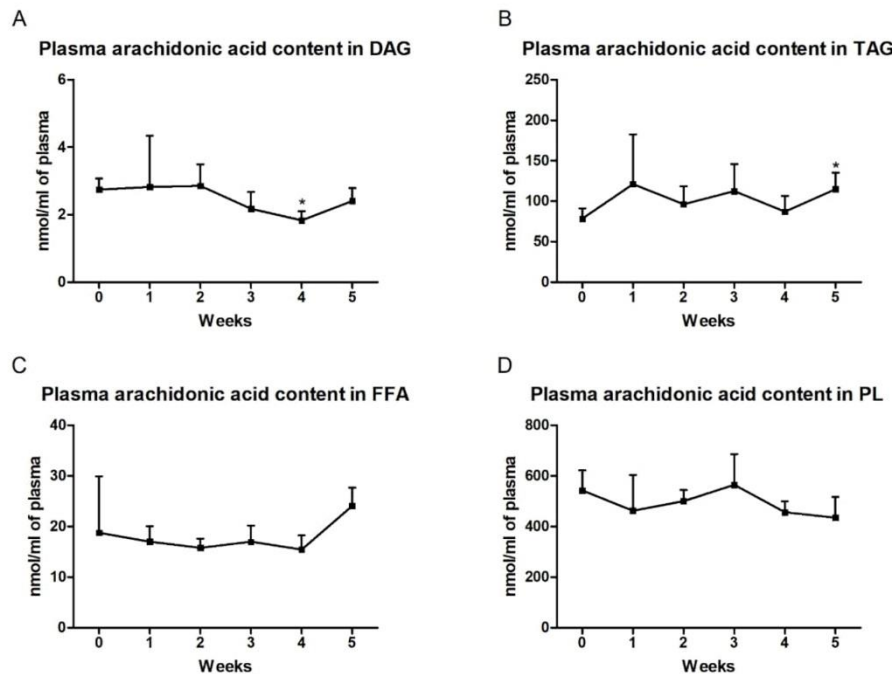


Figure 3. Plasma contents of arachidonic acid in the (A) diacylglycerol (DAG), (B) triacylglycerol (TAG), (C) free fatty acid (FFA) and (D) phospholipid (PL) fractions. Changes in the arachidonic acid content in the selected lipid fractions were examined by the gas–liquid chromatography (GLC) method. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

3.3. Changes in the Expression of Proteins Involved in Eicosanoid and Prostanoid Synthesis Pathways

The COX-1 expression in the liver homogenates showed a significant rise at the end of our study (third week: +54.5%, $p < 0.05$; fourth week: +33.4%, $p < 0.05$; fifth week: +61.3%, $p < 0.01$; Figure 4A). In the case of 15-LO expression, a substantial increase in the third and fifth weeks of high-fat feeding (third week: +358.8%, $p < 0.001$; fifth week: +134.9%, $p < 0.05$; Figure 4D) was observed. However, COX-2 and Nrf-2 expression remained unchanged in each week of high-fat diet from that in the control group (Figure 4B,C).

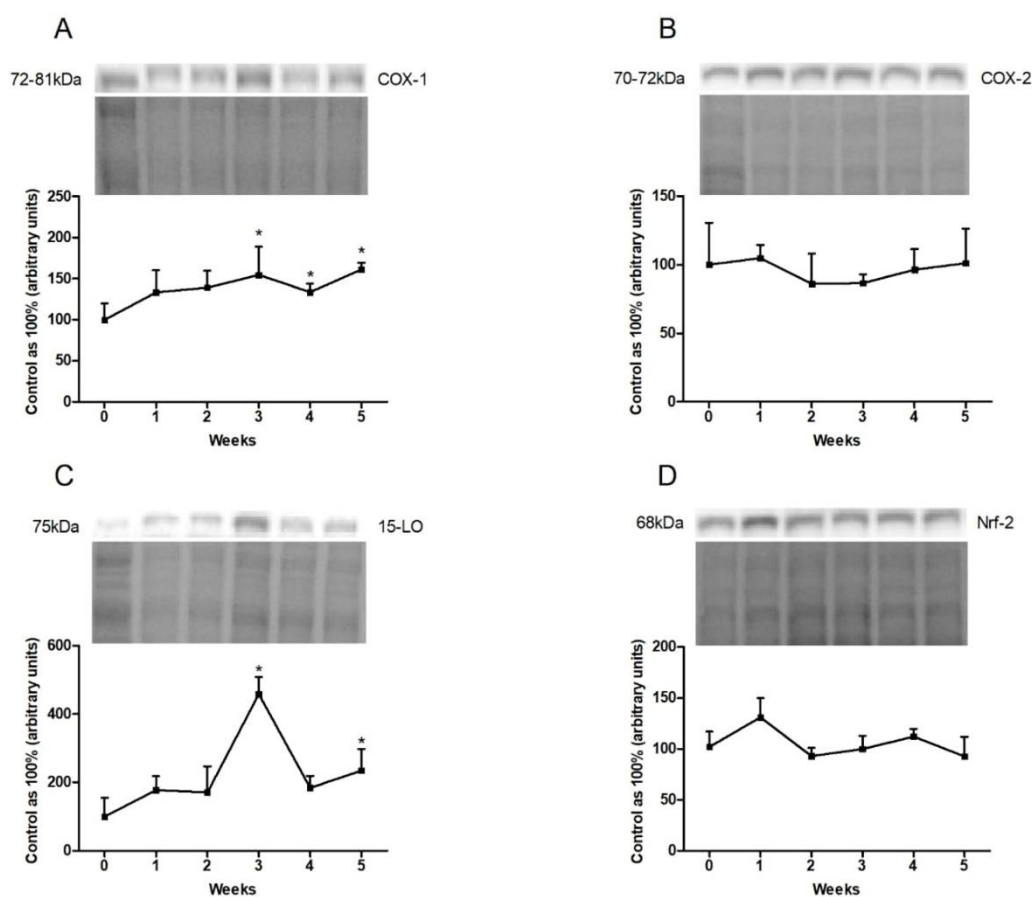


Figure 4. Representative Western blots illustrating the expression of proteins from eicosanoid and prostanoid synthesis pathways, i.e., (A) cyclooxygenase-1 (COX-1), (B) cyclooxygenase-2 (COX-2), (C) 15-lipoxygenase (15-LO) and (D) nuclear factor erythroid 2—related factor 2 (Nrf-2) in the liver homogenates. The protein expression was determined by the Western blotting method, as described in detail in the Materials and Methods section. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

3.4. Changes in the Expression of Inflammatory Pathway Proteins

In the liver homogenates, we showed a trend toward an increase in the expression of NF- κ B at the end of the experiment (fifth week: $p = 0.1380$; Figure 5A). Furthermore, the high-fat feeding resulted in a reduced expression of TGF- β in the last week of our study (fifth week: -34.5% , $p < 0.001$; Figure 5B). We also observed a trend toward to an increase in IL-6 expression in the fifth week of the HFD (fifth week: $p = 0.0886$; Figure 5C).

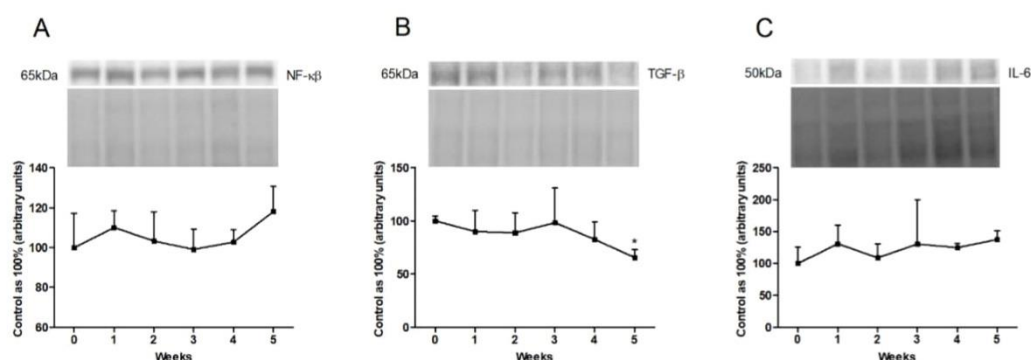


Figure 5. Representative Western blots illustrating the expression of inflammatory pathway proteins, i.e., (A) nuclear factor- κ B (NF- κ B), (B) transforming growth factor β (TGF- β) and (C) interleukin-6 (IL-6) in the liver homogenates. The protein expression was determined by the Western blotting method, as described in detail in the Materials and Methods section. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

3.5. Changes in the Expression of Proteins Directly Involved in Lipogenesis Pathway

In the liver homogenates, the total expression of DGAT1 increased significantly in the first and second weeks (first week: +95.8%; second week: +116.8%; $p < 0.01$; Figure 6A). By contrast, the HFD provoked a significant decrease in the fourth week (fourth week: -37.5% ; $p < 0.05$; Figure 6A) as compared with the expression in the standard chow-fed group. In addition, we observed a substantial rise in DGAT2 expression in all the experimental model groups (first week: +472.9%; $p < 0.01$; second week: +279.2%; third week: +358.7%; $p < 0.05$; fourth week: +454.7%; fifth week: +434.9%; $p < 0.01$; Figure 6B).

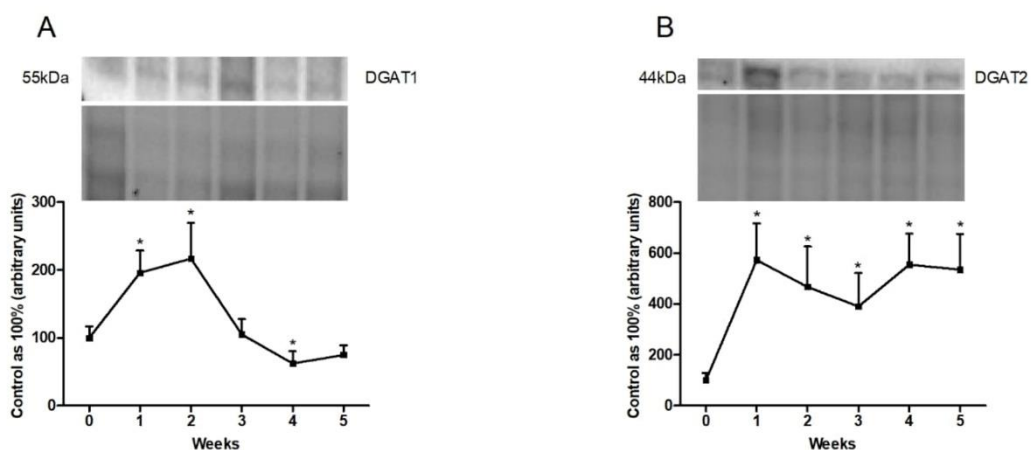


Figure 6. Representative Western blots illustrating the expression of proteins involved in lipogenesis, i.e., (A) diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) and (B) diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) in the liver homogenates. The protein expression was determined by the Western blotting method, as described in detail in the Materials and Methods section. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

3.6. Changes in the Oxidative and Antioxidative Parameters

The high-fat feeding induced a lower hepatic SOD2 concentration at the beginning of our experiment (first week: -31.1% ; $p < 0.05$; Figure 7A) than in the standard chow-fed group. In addition,

rats in the high-fat administration group exhibited significantly decreased hepatic catalase values only in the last week of the experiment (fifth week: -29.6% ; $p < 0.05$; Figure 7B). To our surprise, we found no significant differences in the total antioxidant capacity between the HFD and the control groups at any time of the experiment (Figure 7C). In the liver homogenates, the level of MDA increased substantially in the second, third and fourth weeks of the HFD (second week: $+27.1\%$; third week: $+52.5\%$; fourth week: $+48.7\%$; $p < 0.01$; Figure 7D). During the high-fat chow administration, we observed a trend towards to an increase in the 4-HNE content in the first two weeks of the HFD (first week: $p = 0.1204$; second week: $p = 0.0810$; Figure 7E). In the case of AGE concentration, we noticed a considerable increment in the first week of the HFD (first week: $+77.6\%$; $p < 0.05$; Figure 7F) and a considerable reduction at the end of our experiment (fifth week: -47.3% ; $p < 0.01$; Figure 7F) from the concentration in the control group.

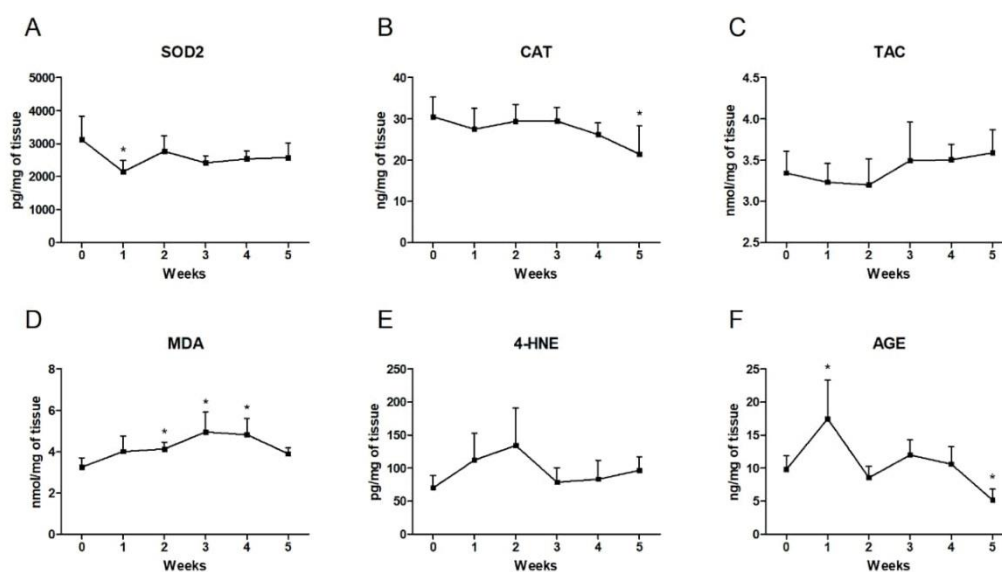


Figure 7. Modulation of the oxidant and antioxidant indicators, i.e., (A) superoxide dismutase 2 (SOD2), (B) catalase (CAT), (C) total antioxidant capacity (TAC), (D) malonyldialdehyde (MDA), (E) 4-hydroxynonenal (4-HNE) and (F) advanced glycation end-products (AGEs) in the liver homogenates. The indicator levels were determined using assay kits, as described in detail in the Materials and Methods section. The data are expressed as mean \pm SD and are based on six independent determinations. * $p < 0.05$, significant difference compared with the control group (0 week).

4. Discussion

It has long been recognized that NAFLD is a common liver disease in Western civilizations. The major factor that influences and alters lipid metabolism and, as a consequence, causes abnormal lipid storage, is excessive nutrition rich in fat. An enhanced supply of fatty acids causes their increased accumulation in the cytoplasm of hepatocytes, mainly as triacylglycerols. Through histological assessment, we revealed time-dependent changes in the quantity and sizes of lipid droplets formed in the liver tissue. It is still unclear whether TAG deposition is the liver's protective mechanism against lipotoxicity or is a culprit in NAFLD development [17]. We suspect that lipid accumulation to a certain point protects against the enhanced supply of fatty acids. After exceeding 5% of hepatocyte volume, the deposition of TAG in the liver possibly exhibits lipotoxic effects. Increased lipid storage in hepatocytes leads to the development of hepatic steatosis, which may be the cause of inflammation, and then contributes to progression into NASH [18]. This is in line with the time-dependent effects observed by Meli et al., who showed liver damage with inflammatory cell infiltration after 5 weeks, which was intensified after 8 weeks of a HFD [19]. In our previous study on a 5-week animal model, an increase

in the total DAG, TAG and FFA concentrations occurred that correlated with the observed changes in the liver histology. These results suggested a relationship between an excessive accumulation in the cytoplasm of hepatocytes, mainly as triacylglycerols, and the development of NAFLD [13]. The imbalance between the amount of supplied fatty acids and the ability of the liver to store them in the form of lipid droplets prompted us to verify changes in the expression of enzymes that catalyze the esterification of diacylglycerol to TAG [20]. Therefore, we focused on changes in these enzymes' expression accompanying the increased lipid accumulation observed during NAFLD progression [21]. In our study, we observed a significant increase in DGAT1 expression only in the first 3 weeks, and at the next time points (fourth and fifth weeks), these values decreased. Probably, the observed increase in DGAT1 is one of the possible protective mechanisms of the liver against increased fat bioavailability. Thus, we suspect that its elevated expression may intensify the FFAs' esterification to the TAGs, which may be stored mainly in the liver and adipose tissue, leading to increased total body weight as a symptom accompanying NAFLD. Likewise, research conducted in the same animal model showed a linear increase in the liver's TAGs [13]. In the last 2 weeks of our study, the DGAT1 expression decreased. It is possible that this may be a response to the intensified hepatic secretion of TAGs into the bloodstream that is intended to prevent the excessive accumulation of lipids in this organ. The confirmation of this hypothesis may be the fact that after HFD administration, in rat and mouse models, an increased expression of proteins involved in the transport of fatty acids out of the cells into the circulation, i.e., microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), was observed [13,22]. Moreover, visible changes in the expression of hepatocyte-specific DGAT2, an enzyme that uses *de novo*-synthesized fatty acids to form TAGs, are in line with the results obtained by Liu et al. These findings proved that in the liver, elevated DGAT2 expression occurred after each time point, indicating the hepatic ability to accumulate TAGs [23]. The greatest change in the DGAT2 expression was observed in the first week of our study, which suggested a liver response to a sudden availability of FFAs and subsequent esterification into TAGs.

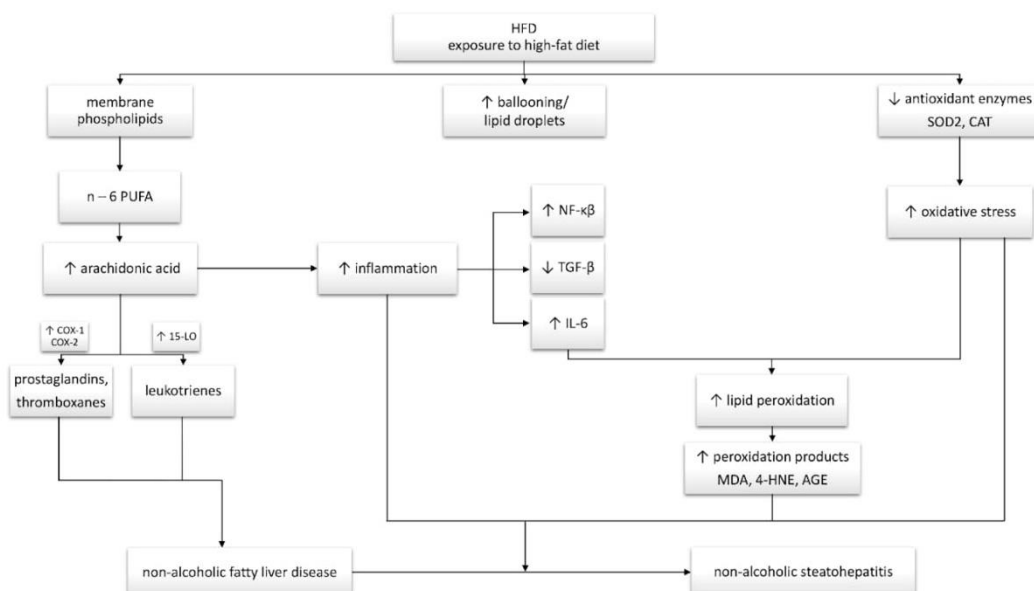
High-fat feeding, due to the higher energy availability, leads to changes in the level and composition of fatty acids. Research conducted by Liu et al. showed that after 3 weeks of a HFD, in the serum TAG and FFA fractions, there was a shift in the balance between n-6 and n-3 toward n-6 PUFAs. These results implied that after high-fat chow administration, a rise in PUFAs was largely associated with a pronounced elevation of arachidonic acid and also linoleic acid, an AA precursor [24]. Moreover, the changes in hepatic PUFA composition were the result of increased lipid oxidation and also membrane peroxidation of PUFAs [25,26]. These findings are consistent with our observations where we noticed increased AA levels in the examined hepatic lipid fractions. In line with our results, the studies conducted by Ma et al. showed a significant increase in the total AA concentration in the liver at weeks 4 and 8 of the HFD. What is more interesting is that a decrease in AA in the following weeks of the high-fat feeding model in NAFLD (12 and 16 weeks) was observed [27]. It is probable that the reduced arachidonic acid concentration at the end of study reflected the liver's adaptation to chronic inflammation, and the inflammatory changes were more severe on the 50th day than on the 30th day of the experiment [28]. However, we paid attention to the short-term feeding and focused exclusively on the changes that occurred during every week of 5-week high-fat chow administration. According to the research by Hall et al., a dietary mice model with NAFLD showed an increase in pro-inflammatory eicosanoids such as n-6 PUFA metabolites. Furthermore, they confirmed that the phospholipid membrane, as a source of substrates for free AA, contributes to the development of inflammation and finally cell destruction. A HFD resulted in the enhanced release of AA from membrane phospholipids involved in the generation of eicosanoids and positively correlated with an increase in the activity of inflammatory pathway enzymes [29]. After 1 and 16 weeks of high-fat feeding, mice exhibited an increase in hepatic arachidonic acid levels in all the lipid fractions. Interestingly, the elevation of AA in the PL fraction was already significant by the first week of the HFD and steadily increased in the following weeks of the experiment [30]. These reports are in accordance with the increase in the arachidonic acid concentration in the liver phospholipid fraction observed

herein. We suspect that elevated AA levels occurring especially in the PL, FFA and DAG fractions are the first step in the development of inflammation after the first week of our experiment and that further increased AA levels are the most important source of inflammatory precursors. Lipid droplets formed in the hepatocytes are composed of TAGs surrounded by phospholipids that are also a source of enormous levels of AA derivatives. Consistent with this notion, we also observed an increased expression of the enzymes participating in the synthesis of leukotrienes and prostaglandins [2,31]. The higher AA amounts display pro-inflammatory properties, enhancing the inflammation signaling cascade. Lipid pro-inflammatory mediators are generated in the arachidonic acid catabolism pathway catalyzed by cyclooxygenase and lipoxygenase [18,31,32]. Tsujimoto et al. reported that increased COX-1 and COX-2 gene expression in mice fed with a HFD for 12 weeks was associated with hepatic steatosis development. We suspect that the increase in the expression of these enzymes in the liver homogenates observed in our study is similar to the changes in hepatic mRNA expression observed in Tsujimoto et al.'s research [33]. Furthermore, previous research conducted on a rat model during a HFD showed an increase in NF- κ B and a decrease in Nrf-2 hepatic expression [34]. These findings are in line with our observations. The lower expression of the transcription factor Nrf-2 is probably a consequence of the disturbance of lipogenic and cholesterologenic pathways due to increased lipid accumulation and the development of oxidative stress. The altered expression of Nrf-2 resulted in disorder in important antioxidant gene expression regulation, leading to the disruption of antioxidant protective mechanisms. In the case of NF- κ B, our study reported that the consumption of the HFD promoted the activation of this factor, which stimulated the expression of matrix and chemotactic proteins' genes involved in the production of pro-inflammatory cytokines that may be the main inducer of inflammation development [34,35]. The precise role of IL-6 in NAFLD seems to be controversial. Activated cytokine production participates in a protective role in HFD-induced liver fibrosis. Increased IL-6 expression promotes hepatocyte proliferation and also protects against the redox imbalance. On the other hand, there are some studies showing that IL-6 is a potential inflammatory mediator in NAFLD development and that the hepatic expression of IL-6 positively correlates with the stage of liver inflammation [21,36,37]. In the last weeks of the experiment, we observed a trend toward to an increased expression of NF- κ B and IL-6, which could significantly increase over a prolonged period of fat feeding. Experiments conducted on the following models—rats, for NF- κ B, and mice, for IL-6, with 12 and 7 weeks of a HFD, respectively—showed that at the end of these time points of feeding, the animals showed a statistically significant increase in the expression of hepatic NF- κ B and IL-6 [34,38]. We can hypothesize that a longer period of high-fat feeding could cause visible changes in the examined parameters that may deteriorate steatosis to NASH. To definitively address the question of when NAFLD deterioration to NASH occurred, we investigated oxidative stress pathway parameters. There are studies that showed a high level of oxidative stress characterized by the depletion of antioxidants that resulted from elevated hepatic fat deposition [39]. Lipid accumulation, mainly in the FFA fraction, may contribute to the mitochondrial dysfunction that involves the impairment of β -oxidation, the TCA cycle and the respiratory chain [40]. The result of these impairments is an increased generation of reactive oxygen species (ROS), thus enhancing oxidative stress and NAFLD deterioration. Moreover, intensified lipid peroxidation, especially of membrane PUFAs, can initiate the formation of bioactive metabolites, such as MDA, which, through sustained lipotoxicity and the altered lipid signaling of membrane phospholipids, may cause NAFLD progression to NASH [4]. Our observations included elevated concentrations of lipid peroxidation by-products, such as MDA. Moreover, we observed a trend toward to an increase in the concentrations of lipid breakdown products, such as 4-HNE, and suppose that these phenomena can induce significant changes over a longer period of high-fat feeding. On the other hand, in our experiment, the rats fed the HFD showed a reduced content of antioxidant enzymes. The SOD2 level had already decreased in the first week of the experiment, which may be the liver's response against the sudden increased fat administration. Additionally, a decrease in the CAT level was most noticeable in the fifth week of our study. In the last three weeks of our experiment, we observed a slight increase in the total antioxidant capacity. Supporting these data are studies conducted

by Tao et al., where a slight rise in the TAC after 7 weeks on the HFD in a mouse model was observed. It also may be implied that such changes express the liver's defense mechanism against oxidative imbalance by increasing the antioxidant capacity [38]. Importantly, the concentration of AGEs had already increased rapidly in the first week of the HFD, which is a response to the increased availability of lipids and is reflected by the emerging lipid droplet deposition in the liver at the same time. More surprisingly, AGEs significantly decreased in the last week of the study. We suspect that the decline may be associated with the liver microvasculature dysfunction provoked by the impaired metabolism of AGEs. Hepatic impairment may cause an increased efflux of these non-enzymatic reaction products into the bloodstream, a situation that is observed in the sera of patients with NAFLD [41].

5. Conclusions

In summary, the study clearly suggests that high-fat feeding promotes the excessive accumulation of arachidonic acid as a pro-inflammatory precursor. Of particular importance is the linear increase in the concentration of AA, mainly in the PL fraction, excessively accumulated in the liver. The observed AA changes and increased expression of enzymes involved in eicosanoid and prostanoid production are consistent with the development and severity of inflammation during NAFLD development. Moreover, our results indicated a rapid development of inflammatory precursors as early as the first week of high-fat feeding. We demonstrated a significant HFD impact on the development of oxidative stress with a simultaneous impairment of the antioxidant system. This has been confirmed by the observed increase in lipid peroxidation products with a simultaneous change in the content of oxidative stress pathway enzymes and TAC. Based on the observed changes in the arachidonic acid concentration, increase in COX-1 and 15-LO expression and oxidative modifications, we may suspect that HFD-induced pro-inflammatory disorders in the liver start as early as in the first week of HFD challenge (Scheme 1). Moreover, these parameters can be potential prognostic markers of NAFLD development in the early stages of this disease.



Scheme 1. Interplay between the hepatic arachidonic acid level, inflammation and oxidative stress in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) development and progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Changes in the examined parameters are indicated on the diagram.

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

Funding: This research was funded by the Medical University of Białystok, grant number: SUB/1/NN/20/001/1118 and N/ST/MN/18/001/1118.

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

References

- Jensen, V.S.; Tveden-Nyborg, P.; Zacho-Rasmussen, C.; Quaade, M.L.; Ipsen, D.H.; Hvid, H.; Fledelius, C.; Wulff, E.M.; Lykkesfeldt, J. Variation in diagnostic NAFLD/NASH read-outs in paired liver samples from rodent models. *J. Pharm. Toxicol. Methods* **2020**, *101*, 106651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sonnweber, T.; Pizzini, A.; Nairz, M.; Weiss, G.; Tancevski, I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **2016**, *64*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Svegliati-Baroni, G.; Pierantonelli, I.; Torquato, P.; Marinelli, R.; Ferreri, C.; Chatgililoglu, C.; Bartolini, D.; Galli, F. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *144*, 293–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shi, T.; Wu, L.; Ma, W.; Ju, L.; Bai, M.; Chen, X.; Liu, S.; Yang, X.; Shi, J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Treatment in Traditional Chinese Medicine and Western Medicine. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 8749564. [[CrossRef](#)]
- Lee, Y.H.; Kim, S.U.; Song, K.; Park, J.Y.; Kim, D.Y.; Ahn, S.H.; Lee, B.W.; Kang, E.S.; Cha, B.S.; Han, K.H. Sarcopenia is associated with significant liver fibrosis independently of obesity and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Nationwide surveys (KNHANES 2008–2011). *Hepatology* **2016**, *63*, 776–786. [[CrossRef](#)]
- Ore, A.; Akinloye, O.A. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina* **2019**, *55*, 26. [[CrossRef](#)]
- Abenavoli, L.; Luigiano, C.; Guzzi, P.H.; Milic, N.; Morace, C.; Stelitano, L.; Consolo, P.; Miraglia, S.; Fagoonee, S.; Virgilio, C.; et al. Serum adipokine levels in overweight patients and their relationship with non-alcoholic fatty liver disease. *Panminerva Med.* **2014**, *56*, 189–193.
- Cusi, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 711–725.e6. [[CrossRef](#)]
- Puri, P.; Baillie, R.A.; Wiest, M.M.; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M.J.; Sanyal, A.J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2007**, *46*, 1081–1090. [[CrossRef](#)]
- Stanković, M.N.; Mladenović, D.; Ninković, M.; Duričić, I.; Šobajić, S.; Jorgačević, B.; De Luka, S.; Vukicevic, R.J.; Radosavljević, T.S. The effects of α -lipoic acid on liver oxidative stress and free fatty acid composition in methionine-choline deficient diet-induced NAFLD. *J. Med. Food* **2014**, *17*, 254–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Stanton, C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *2012*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Konstantynowicz-Nowicka, K.; Berk, K.; Chabowski, A.; Kasacka, I.; Bielawiec, P.; Łukaszuk, B.; Harasim-Symbor, E. High-fat feeding in time-dependent manner affects metabolic routes leading to nervonic acid synthesis in NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [[PubMed](#)]
- Chabowski, A.; Żendzian-Piotrowska, M.; Konstantynowicz, K.; Pankiewicz, W.; Mikłosz, A.; Łukaszuk, B.; Górski, J. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. *Acta Physiol.* **2013**, *207*, 346–357. [[CrossRef](#)]
- Konstantynowicz-Nowicka, K.; Harasim, E.; Baranowski, M.; Chabowski, A. New evidence for the role of ceramide in the development of hepatic insulin resistance. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116858. [[CrossRef](#)]

17. Ding, C.; Zhao, Y.; Shi, X.; Zhang, N.; Zu, G.; Li, Z.; Zhou, J.; Gao, D.; Lv, L.; Tian, X.; et al. New insights into salvianolic acid A action: Regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28734. [[CrossRef](#)]
18. Banaszczak, M.; Stachowska, E. Patogeneza NAFLD w świetle wyników najnowszych badań. *Postepy Biochem.* **2017**, *63*, 190–197.
19. Meli, R.; Mattace Raso, G.; Irace, C.; Simeoli, R.; Di Pascale, A.; Paciello, O.; Pagano, T.B.; Calignano, A.; Colonna, A.; Santamaria, R. High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66570. [[CrossRef](#)]
20. Heden, T.D.; Morris, E.M.; Kearney, M.L.; Liu, T.W.; Park, Y.M.; Kanaley, J.A.; Thyfault, J.P. Differential effects of low-fat and high-fat diets on fed-state hepatic triacylglycerol secretion, hepatic fatty acid profiles, and DGAT-1 protein expression in obese-prone Sprague–Dawley rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2014**, *39*, 472–479. [[CrossRef](#)]
21. Asrih, M.; Jornayvaz, F.R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J. Endocrinol.* **2013**, *218*, 25–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yu, Z.; Wang, N.; Hu, G.; Ma, M. Comparison of long-term effects of egg yolk consumption under normal and high fat diet on lipid metabolism and fatty acids profile in mice. *Food Sci. Biotechnol.* **2019**, *28*, 1195–1206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, J.; Han, L.; Zhu, L.; Yu, Y. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, T.W.; Heden, T.D.; Morris, E.M.; Fritsche, K.L.; Vieira-Potter, V.J.; Thyfault, J.P. High-fat diet alters serum fatty acid profiles in obesity prone rats: Implications for in-vitro studies. *Lipids* **2015**, *50*, 997–1008. [[CrossRef](#)]
25. Valenzuela, R.; Espinosa, A.; González-Mañán, D.; D’Espessailles, A.; Fernández, V.; Videla, L.A.; Tapia, G. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46400. [[CrossRef](#)]
26. Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L.A.; Thielemann, L.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachnik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* **2004**, *106*, 635–643. [[CrossRef](#)]
27. Ma, K.; Chen, Y.; Liang, X.; Miao, J.; Zhao, Q. Inhibition of 5-lipoxygenase inhibitor zileuton in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease progression model. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2017**, *20*, 1207–1212.
28. Xu, Y.; Han, J.; Dong, J.; Fan, X.; Cai, Y.; Li, J.; Wang, T.; Zhou, J.; Shang, J. Metabolomics characterizes the effects and mechanisms of quercetin in nonalcoholic fatty liver disease development. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1220. [[CrossRef](#)]
29. Hall, Z.; Bond, N.J.; Ashmore, T.; Sanders, F.; Ament, Z.; Wang, X.; Murray, A.J.; Bellafante, E.; Virtue, S.; Vidal-Puig, A.; et al. Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2017**, *65*, 1165–1180. [[CrossRef](#)]
30. Scheja, L.; Toedter, K.; Mohr, R.; Niederfellner, G.; Michael, M.D.; Meissner, A.; Schoettler, A.; Pospisil, H.; Beisiegel, U.; Heeren, J. Liver TAG transiently decreases while PL n-3 and n-6 Fatty acids are persistently elevated in insulin resistant mice. *Lipids* **2008**, *43*, 1039–1051. [[CrossRef](#)]
31. Bozza, P.T.; Bakker-Abreu, I.; Navarro-Xavier, R.A.; Bandeira-Melo, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2011**, *85*, 205–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rius, B.; López-Vicario, C.; González-Pérez, A.; Morán-Salvador, E.; García-Alonso, V.; Clària, J.; Titos, E. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tsujimoto, S.; Kishina, M.; Koda, M.; Yamamoto, Y.; Tanaka, K.; Harada, Y.; Yoshida, A.; Hisatome, I. Nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective inhibitor, suppresses obesity-related non-alcoholic fatty liver disease and hepatic insulin resistance through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 721–728. [[CrossRef](#)]
34. Tuzcu, Z.; Orhan, C.; Sahin, N.; Juturu, V.; Sahin, K. Cinnamon Polyphenol Extract Inhibits Hyperlipidemia and Inflammation by Modulation of Transcription Factors in High-Fat Diet-Fed Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1583098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tuzcu, M.; Sahin, N.; Orhan, C.; Agca, C.A.; Akdemir, F.; Tuzcu, Z.; Komorowski, J.; Sahin, K. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr. Metab.* **2011**, *8*, 28. [[CrossRef](#)]
36. Kishimoto, T. IL-6: From its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* **2010**, *22*, 347–352. [[CrossRef](#)]

37. Yamaguchi, K.; Itoh, Y.; Yokomizo, C.; Nishimura, T.; Niimi, T.; Fujii, H.; Okanoue, T.; Yoshikawa, T. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Lab. Investig.* **2010**, *90*, 1169–1178. [[CrossRef](#)]
38. Tao, W.; Sun, W.; Liu, L.; Wang, G.; Xiao, Z.; Pei, X.; Wang, M. Chitosan oligosaccharide attenuates nonalcoholic fatty liver disease induced by high fat diet through reducing lipid accumulation, inflammation and oxidative stress in C57BL/6 mice. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 645. [[CrossRef](#)]
39. Xu, Z.J.; Fan, J.G.; Ding, X.D.; Qiao, L.; Wang, G.L. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Dig. Dis. Sci.* **2010**, *55*, 931–940. [[CrossRef](#)]
40. Sunny, N.E.; Bril, F.; Cusi, K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 250–260. [[CrossRef](#)]
41. da Pereira, E.N.G.S.; Silveira, R.R.; Flores, E.E.I.; Rodrigues, K.L.; Ramos, I.P.; da Silva, I.J.; Machado, M.P.; Miranda, R.A.; Pazos-Moura, C.C.; Gonçalves-De-Albuquerque, C.F.; et al. Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

9. Publikacja nr. 2

Klaudia Sztolsztener, Karolina Konstantynowicz-Nowicka, Ewa Harasim-Symbor,
Adrian Chabowski

*Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling
pathway in a rat model of NAFLD.*

International Journal of Molecular Sciences

2021, 22(22):12478

IF=5.923, MNiSW=140



Article

Time-Dependent Changes in Hepatic Sphingolipid Accumulation and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in a Rat Model of NAFLD

Klaudia Sztolsztener ^{*}, Karolina Konstantynowicz-Nowicka, 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.); eharasim@umb.edu.pl (E.H.-S.); adrian@umb.edu.pl (A.C.)
^{*} Correspondence: klaudia.sztolsztener@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-55-85

Abstract: Increased lipid bioavailability in a diet favors lipid accumulation, enhancing hepatic lipotoxicity and contributing to insulin resistance (IR) development. The aim of our study was to examine time-dependent alterations in the intrahepatic content of sphingolipids and insulin signaling pathway in rats fed a high-fat diet (HFD). The experiment was conducted on male Wistar rats receiving a standard diet or HFD for five weeks. At the end of each experimental feeding week, liver sphingolipids were determined using high-performance liquid chromatography. The expression of proteins from the sphingolipid pathway and glucose transporter expression were assessed by Western blot. The content of phosphorylated form of proteins from the insulin pathway was detected by a multiplex assay kit. Our results revealed that HFD enhanced hepatic ceramide deposition by increasing the expression of selected proteins from sphingomyelin and salvage pathways in the last two weeks. Importantly, we observed a significant inhibition of Akt phosphorylation in the first week of HFD and stimulation of PTEN and mTOR phosphorylation at the end of HFD. These changes worsened the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. We may postulate that HFD-induced reduction in the insulin action in the time-dependent matter was exerted by excessive accumulation of sphingosine and sphinganine rather than ceramide.

Keywords: insulin signaling; insulin resistance; sphingolipid; lipid accumulation; high-fat diet



Citation: Sztolsztener, K.; Konstantynowicz-Nowicka, K.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. Time-Dependent Changes in Hepatic Sphingolipid Accumulation and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in a Rat Model of NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12478. <https://doi.org/10.3390/ijms222212478>

Academic Editor: Paola Giussani

Received: 22 October 2021

Accepted: 18 November 2021

Published: 19 November 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 liver constitutes an organ that plays a pivotal role in lipid and glucose metabolism as well as in the overall regulation of the body's energy balance [1]. Several studies have demonstrated that nutrient oversupply, especially diets rich in saturated fatty acids, impairs cellular lipid homeostasis and precedes elevated free fatty acid (FFA) level in the bloodstream [1,2]. Increased FFA concentration exceeds hepatic capacity and promotes esterification to the triacylglycerols (TAGs), which are stored then as lipid droplets in the liver [1,3]. Excessive lipid deposition, more than 5% of cell volume, with the absence of profuse alcohol consumption has been defined as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [4]. NAFLD is characterized by steatosis with intracellular fat deposition, which may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [1,5,6]. NASH is a more severe form of liver disease where the inflammation process and oxidative stress coexist with excessive lipid accumulation [1,2,5,6]. The next steps of NASH progression are fibrosis and finally cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [5,6].

It is considered that hepatic steatosis development is linked with a disproportion between fatty acid (FA) supply and its expenditure [7]. During simple steatosis development, a dietary pattern is of crucial importance because it may disrupt hepatic lipid homeostasis through the loss of the ability to efficiently metabolize overabundant lipids [8–10]. In the condition of high-fat feeding, an excessive lipid provision affects the hepatic lipid metabolism and contributes to the increasing intrahepatic TAG accumulation [2,5]. Furthermore, deposited TAG may be esterified into lipotoxic intermediates from the sphingolipid

pathway, especially ceramide (CER) [11,12]. Many studies revealed that excessive ceramide production is tightly related to obesity and simple steatosis deterioration, which predispose to cell ballooning and damage [7,13,14]. Moreover, these molecules not only have proapoptotic properties but also impair the insulin signaling pathway [1,7]. A lipid overload condition ceramide exerts an inhibitory effect on activation of protein kinase B (PKB/Akt) mediating in insulin signaling disruption, which favors hyperglycemia and supports insulin resistance (IR) development. What is more, CER impairs glucose entrance into the cell by regulating the membrane translocation of special glucose transporter (GLUT). It is considered that ceramide has a strong influence on glucose metabolism and constitutes an integral factor mediating in liver IR [7]. A growing number of studies have considered that in addition to high-fat diet (HFD), obesity and insulin resistance mediate in the pathogenesis not only NAFLD development but also in its progression into NASH. Moreover, circulating FFAs strongly impair hepatic insulin signaling in response to obesity. In the duration of NAFLD, an increased lipid accumulation in hepatic parenchyma makes glucose metabolism worse and causes suppression of insulin secretion, which promotes IR; hence, the liver degeneration has a connection with changes in peripheral and hepatic insulin resistance development [7].

The interaction between sphingolipid and insulin signaling pathway, during HFD-induced NAFLD development, is to date poorly investigated. In this article, we examined how a time-dependent HFD administration affected the intrahepatic contents of sphingolipids and insulin signaling pathway proteins during NAFLD development and which change appears as first. The discovery which malfunction is the cause and which is the consequence may be clinically relevant in order to find therapeutic target that counteract NAFLD development. On the basis of observed alterations in different time points of high-fat feeding, we may elucidate the “breaking point” in IR development, which predisposes to NAFLD deterioration.

2. Results

2.1. Effects of Chronic High-Fat Chow Administration on the Hepatic Sphingolipid Concentration

In the liver homogenates, we observed that HFD administration caused a crucial rise in sphinganine (SFA) content only in the third and fifth weeks of examination (+40.9 and +54.2%, respectively; $p < 0.05$; Figure 1A) and a crucial reduction in the fourth week (−25.7%; $p < 0.05$; Figure 1A) compared to the control rats. What is more, at the beginning of HFD, sphinganine content was increased but did not achieve a significant level ($p = 0.0550$; Figure 1A, vs. control group). Chronic high-fat feeding resulted in a pronounced reduction in sphinganine-1-phosphate (SA1P) level only in the third week (−47.1%; $p < 0.05$; Figure 1B). In the case of ceramide, our study showed a notable elevation in ceramide (CER) content in the last two weeks of HFD (fourth week: +28.1%, fifth week: +30.7%; $p < 0.05$; Figure 1C, vs. control group). The high-fat diet substantially elevated the total content of sphingosine (SFO) in all the experimental time points (first week: +73.6%, second week: +41.7%, third week: +40.4%, fourth week: +24.7%, fifth week: +18.2%; $p < 0.05$; Figure 1D). In comparison with the standard chow-fed group, rats from the experimental model exhibited a significantly reduced sphingosine-1-phosphate (S1P) level in the third and fourth weeks (third week: −36.9%, fourth week: −33.3%; $p < 0.05$; Figure 1E). As expected, the value of S1P/CER ratio was diminished by high-fat feeding (second week: −43.0%, third week: −43.8%, fourth week: −48.7%; $p < 0.05$; Figure 1F) in relation to the control group. Additionally, the S1P/CER ratio revealed a trend towards a decrease in the last week of HFD ($p = 0.0841$; Figure 1F).

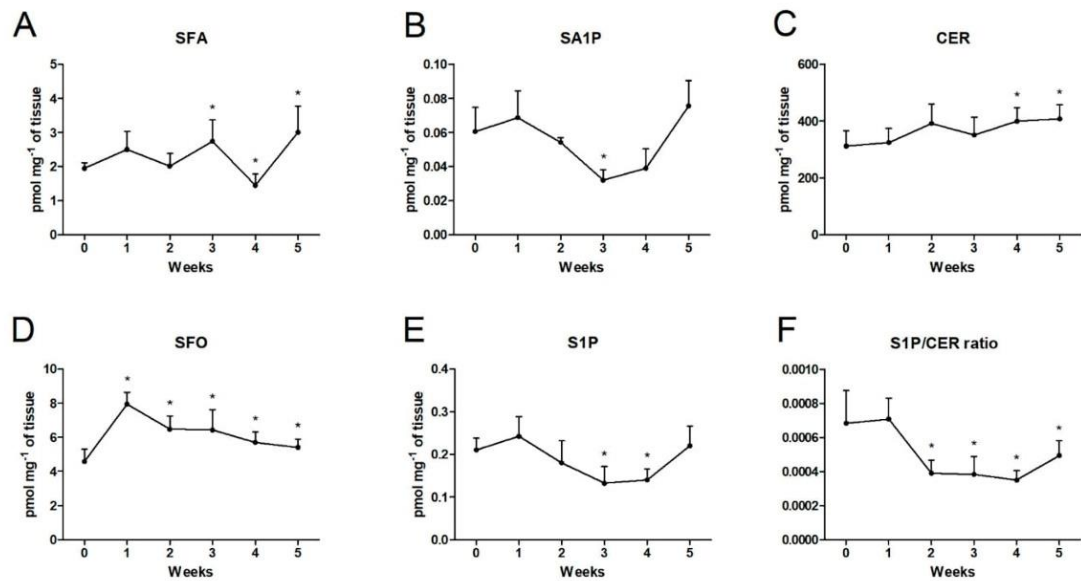


Figure 1. Liver content of sphingolipids, i.e., (A) sphinganine (SFA), (B) sphinganine-1-phosphate (SA1P), (C) ceramide (CER), (D) sphingosine (SFO), (E) sphingosine-1-phosphate (S1P), and (F) sphingosine-1-phosphate/ceramide ratio (S1P/CER ratio). The concentration of sphingolipids was determined using the high-performance liquid chromatography (HPLC). The data are presented as mean \pm SD and based on $n = 6$ rats per group in each week of the high-fat diet (HFD). * $p < 0.05$ significant difference vs. control group (0 week).

2.2. Effects of Chronic High-Fat Chow Administration on the Hepatic Expression of Proteins from Sphingolipid Pathways

In the liver homogenates, at each week of HFD administration, we observed a markedly decreased expression of proteins involved in ceramide *de novo* synthesis pathway, i.e., serine palmitoyltransferase 2 (SPTLC2; first week: -40.4% , second week: -46.1% , third week: -60.2% , fourth week: -52.8% , fifth week: -58.7% ; $p < 0.05$; Figure 2A), ceramide synthase 2 (CerS2; first week: -36.5% , second week: -74.1% , third week: -81.0% , fourth week: -69.1% , fifth week: -70.4% ; $p < 0.05$; Figure 2B), and ceramide synthase 6 (CerS6; first week: -47.1% , second week: -41.2% , third week: -68.7% , fourth week: -44.6% , fifth week: -63.1% ; $p < 0.05$; Figure 2D). By contrast, the total expression of ceramide synthase 4 (CerS4) increased significantly in the last two weeks of our experiment (fourth week: $+82.3\%$, fifth week: $+104.8\%$; $p < 0.05$; Figure 2C). Concomitantly, we showed a trend towards an increased expression of CerS4 at the beginning of the study (first week: $p = 0.0842$; Figure 2C).

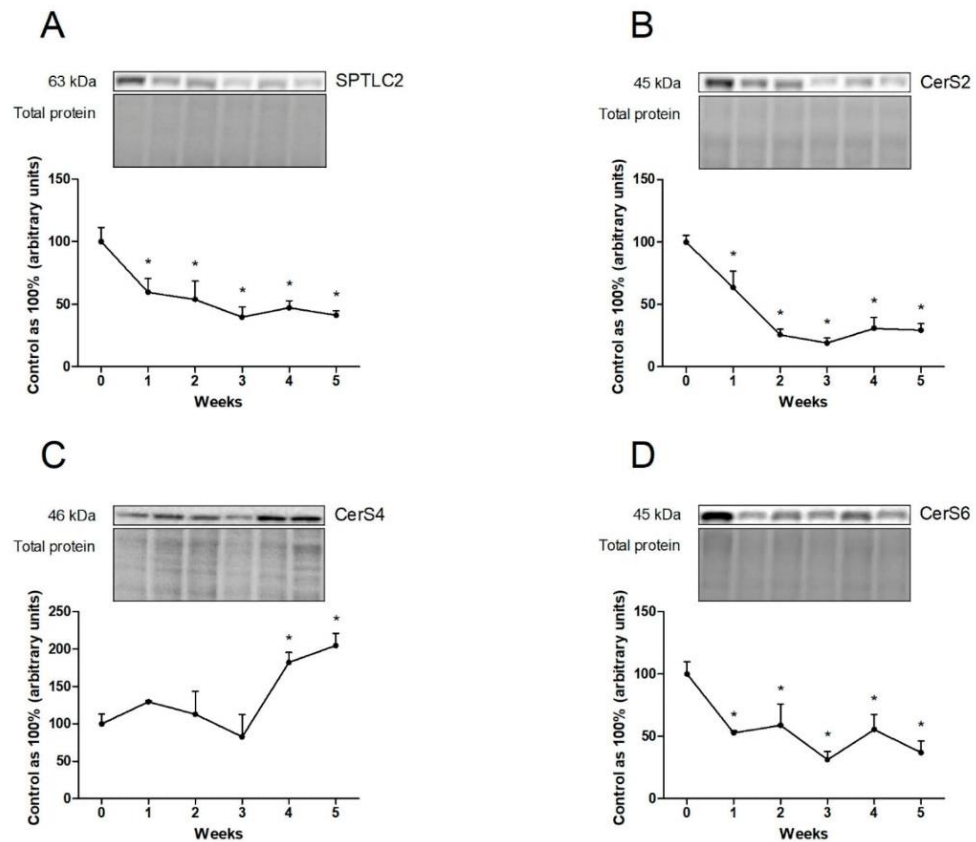


Figure 2. The expression of selected proteins from the ceramide *de novo* synthesis pathway, i.e., (A) serine palmitoyltransferase 2 (SPTLC2) and enzymes that share salvage and *de novo* synthesis pathways, i.e., (B) ceramide synthase 2 (CerS2), (C) ceramide synthase 4 (CerS4), and (D) ceramide synthase 6 (CerS6) in the liver homogenates. The protein expression was measured using the Western blot technique and presented as a percentage difference compared to the control group, which was set as 100%. The data are presented as mean \pm SD and based on $n = 6$ rats per group in each week of the high-fat diet (HFD). * $p < 0.05$ significant difference vs. control group (0 week).

In the case of enzymes that regulate salvage pathway, we observed significant differences in their expression over the course of high-fat chow administration. There is a considerable decrement in sphingosine kinase 2 (SPHK2) expression at every week of the experiment (first week: -51.9% , second week: -72.6% , third week: -78.4% , fourth week: -72.1% , fifth week: -64.0% ; $p < 0.05$; Figure 3B). What is more, HFD provoked a rise in the expression of acid ceramidase (ASAH1) only in the second week ($+97.7\%$; $p < 0.05$; Figure 3C) and neutral ceramidase (ASAH2) expression for the whole experiment, except for the third and fifth weeks (first week: $+103.9\%$, third week: $+112.6\%$, fourth week: $+94.9\%$; $p < 0.05$; Figure 3D). Interestingly, at the end of the study, the expression of ASAH2 was significantly decreased (fifth week: -23.4% ; $p < 0.05$; Figure 3D) from that in the control group. We also observed a significant decrease in alkaline ceramidase (ASAH3) expression in the first four weeks as a consequence of high-fat feeding (first week: -59.9% , second week: -60.0% , third week: -64.3% , fourth week: -38.7% ; $p < 0.05$; Figure 3E). Moreover, the expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1) remained unchanged in all the experimental time points ($p > 0.05$; Figure 3A).

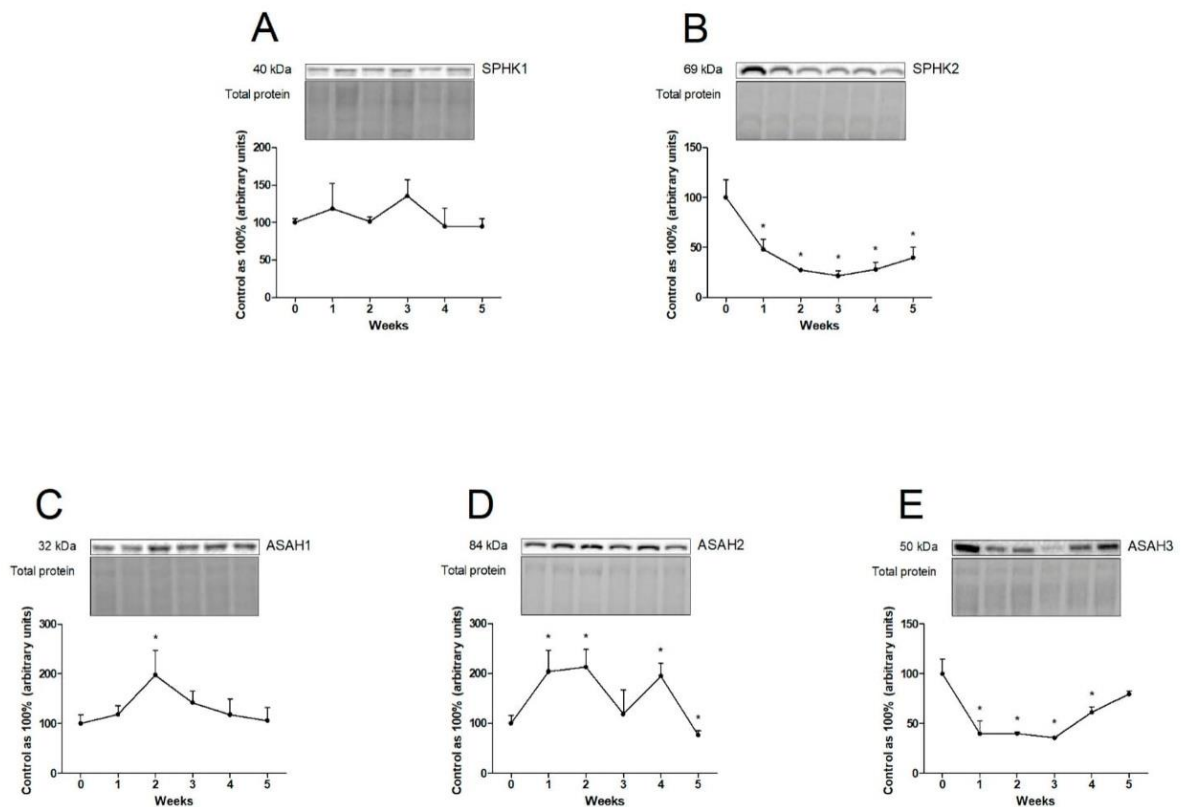


Figure 3. The expression of proteins from the sphingolipid catabolism pathway, i.e., (A) sphingosine kinase 1 (SPHK1), (B) sphingosine kinase 2 (SPHK2), (C) acid ceramidase (ASAH1), (D) neutral ceramidase (ASAH2), and (E) alkaline ceramidase (ASAH3) in the liver homogenates. The protein expression was measured using the Western blot technique and presented as a percentage difference compared to the control group, which was set as 100%. The data are presented as mean \pm SD and based on $n = 6$ rats per group in each week of the high-fat diet (HFD). * $p < 0.05$ significant difference vs. control group (0 week).

In the sphingomyelin pathway, we observed a trend towards to an increase in alkaline sphingomyelinase (Alk-SMase) expression level in the second week of HFD ($p = 0.0816$; Figure 4A). Compared to the control group, the expression of Alk-SMase significantly increased in the third week of experimental feeding (+30.1%; $p < 0.05$; Figure 4A). Additionally, at the end of the experiment only neutral sphingomyelinase (N-SMase) expression was enhanced (fifth week: +27.2%; $p < 0.05$; Figure 4B).

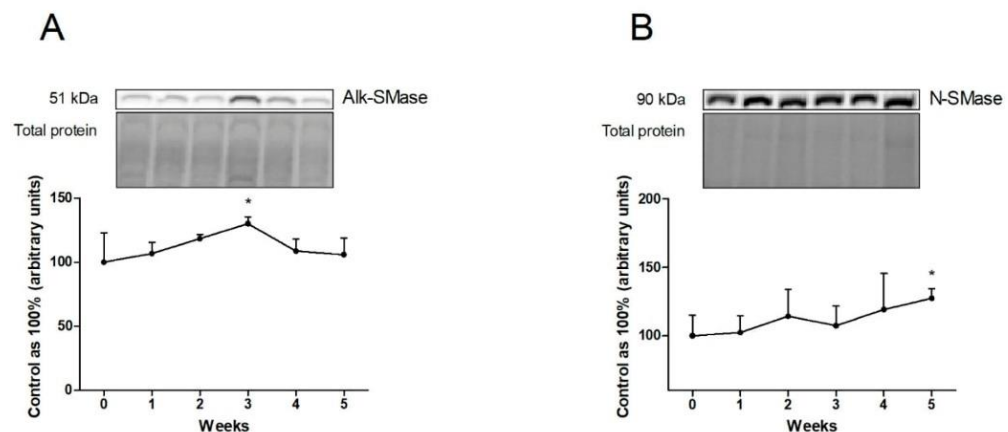


Figure 4. The expression of proteins from the sphingomyelin pathway, i.e., (A) alkaline sphingomyelinase (Alk-SMase) and (B) neutral sphingomyelinase (N-SMase) in the liver homogenates. The protein expression was measured using the Western blot technique and presented as a percentage difference compared to the control group, which was set as 100%. The data are presented as mean \pm SD and based on $n = 6$ rats per group in each week of the high-fat diet (HFD). * $p < 0.05$ significant difference vs. control group (0 week).

2.3. Effects of Chronic High-Fat Chow Administration on the Hepatic Expression or Phosphorylation State of Proteins Involved in the Insulin Signaling Pathway

In the liver homogenates, a high-fat feeding provoked a significant diminished in the level of phosphorylated phosphatase and tensin homolog (pPTEN(Ser380)) at the beginning of our study (first week: +11.3%, second week: +12.7%; $p < 0.05$; Figure 5B). Additionally, in the last week of the experimental feeding, we noticed a trend towards to an increase in pPTEN (Ser380) level (fifth week: $p = 0.0704$; Figure 5B). We also observed a decrease in phosphorylated protein kinase B (pAkt(Ser473)) content in almost all the weeks of HFD (first week: -27.3% , second week: -22.4% , third week: -38.4% , fourth week: -15.5% ; $p < 0.05$; Figure 5C) and in phosphorylated glycogen synthase 3 α/β (GSK3 α/β (Ser21/Ser9)) content in all the experimental weeks (first week: -41.4% , second week: -43.0% , third week: -40.2% , fourth week: -46.3% , fifth week: -20.2% ; $p < 0.05$; Figure 5D) in comparison with rats fed a standard chow. Moreover, level of phosphorylated mechanistic target of rapamycin (pmTOR(Ser2448)) protein was reduced at the beginning of the study (first week: -21.5% , second week: -18.2% , third week: -25.7% , fourth week: -16.8% ; $p < 0.05$; Figure 5F), and was then enhanced in the last weeks of high-fat chow administration (fifth week: $+8.5\%$; $p < 0.05$; Figure 5F). In our study, we also noted a significant increase in phosphorylated ribosomal protein S6 kinase (pP70 S6 kinase(Thr389)) level and decrease in phosphorylated S6 ribosomal protein (pS6RP(Ser235/Ser236)) level throughout the whole experiment (pP70 S6 kinase (Thr389)—first week: $+21.5\%$, second week: -22.6% , third week: $+28.8\%$, fourth week: $+17.8\%$, fifth week: -29.8% ; $p < 0.05$; Figure 5G and pS6RP (Ser235/Ser236)—first week: -78.6% , second week: -70.8% , third week: -80.7% , fourth week: -64.1% , fifth week: -35.3% ; $p < 0.05$; Figure 5H). On the other hand, we did not observe a significant change in the fluorescent intensity in the phosphorylated insulin receptor substrate (pIRS(Ser636/Ser639)) and phosphorylated Bcl-2-associated agonist of cell death (pBAD(Ser136)) ($p > 0.05$; Figure 5A,E, respectively; vs. control group).

Moreover, we noticed a diminishment in the expression of glucose transporter 2 (GLUT2) in every week of the experimental feeding (first week: -45.2% , second week: -50.3% , third week: -68.3% , fourth week: -58.2% , fifth week: -61.0% ; $p < 0.05$; Figure S1A) in comparison with rats from the control group.

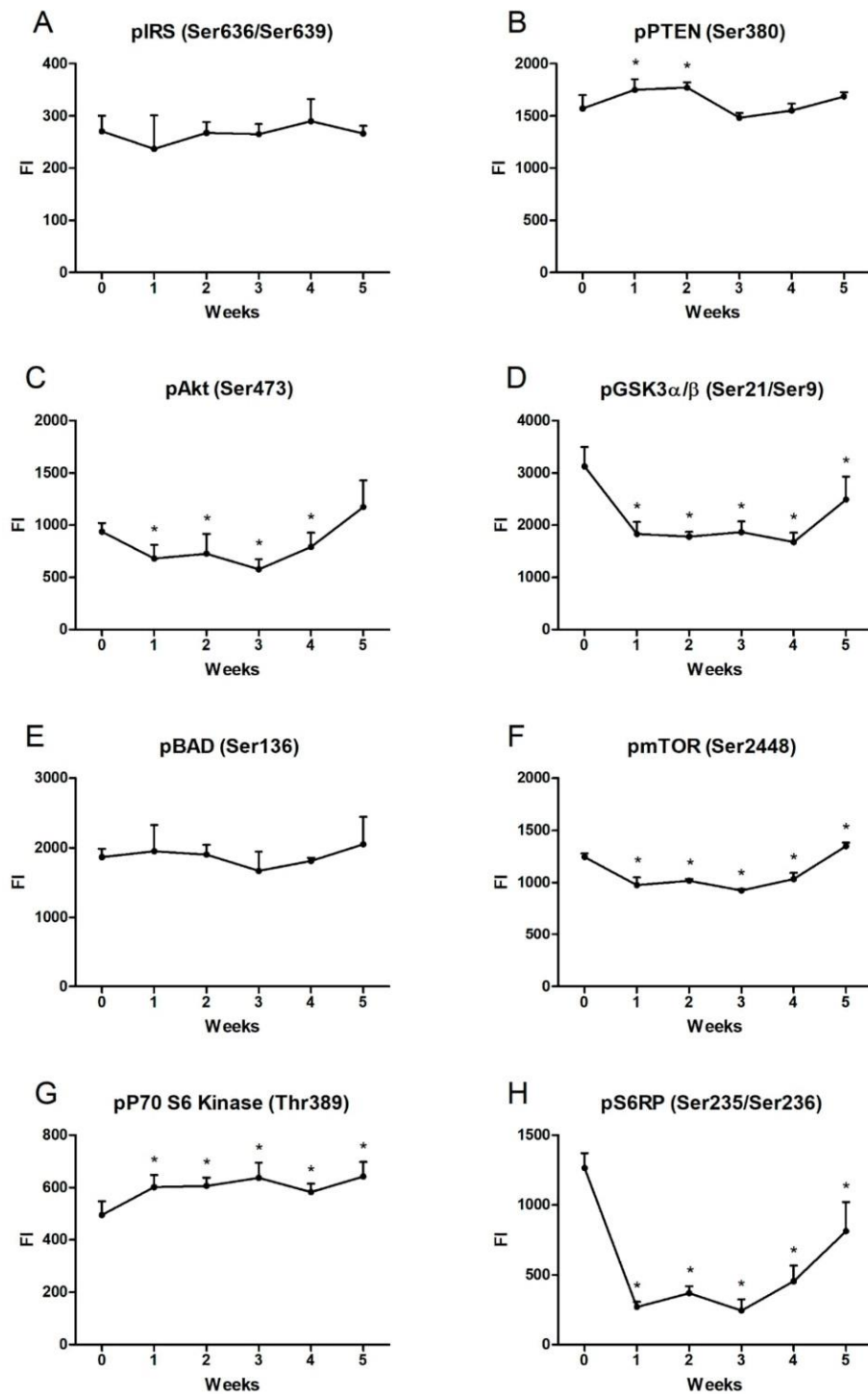


Figure 5. The level of phosphorylated proteins from insulin signaling pathway, i.e., (A) insulin receptor substrate (pIRS(Ser636/Ser639)), (B) phosphatase and tansin homolog (pPTEN(Ser380)), (C) protein kinase B (pAkt(Ser473)), (D) glycogen synthase kinase 3 α/β (pGSK3 α/β (Ser21/Ser9)), (E) Bcl-2-associated agonist of cell death (pBAD(Ser136)), (F) mechanistic

target of rapamycin (pmTOR(Ser2448)), (G) ribosomal protein S6 kinase (pP70 S6 kinase(Thr389)), and (H) S6 ribosomal protein (pS6RP(Ser235/Ser236)) in the liver homogenates. The fluorescent intensity of phosphorylated proteins was measured using the magnetic beads-based immunoassay. The data are presented as mean \pm SD and based on $n = 6$ rats per group in each week of the high-fat diet (HFD). * $p < 0.05$ significant difference vs. control group (0 week).

3. Discussion

The current study aims to elucidate the role of ceramide and its derivatives from the sphingolipid pathway in the development of insulin resistance during the time course of HFD in rats.

Studies conducted on animal models showed that an enhanced supply of FAs in the diet provoked an increase in ceramide deposition in the liver as well as other than liver peripheral tissues, e.g., cardiac and skeletal muscles [15–17]. In a study provided by Zabielski et al., already after 7 days from the beginning of the HFD treatment, rats' liver tissue was characterized by increased CER deposition [18]. Similar observations were presented by Chocian et al., where the 3 weeks of HFD induced a threefold increase in hepatic accumulation of ceramide [12]. However, in our study, we noticed a significant enhancement in CER content in the last two weeks of HFD (fourth and fifth weeks of the experiment). This slight discrepancy may arise from different hepatocytes' abilities to "buffer" FA and enhance their storage as cells' adaptation to the condition of excessive FA availability [9,10].

Ceramide is a key mediator of lipotoxicity resulting from the excessive delivery of saturated fatty acids in the diet as substrates for the rate-limiting *de novo* synthesis pathway of ceramide [19]. On the contrary, in our study, we demonstrated that enzyme from the abovementioned pathway—SPTLC2 and two enzymes that share *de novo* and salvage pathways, i.e., CerS2 and CerS6 were depressed. However, a nearly 40% increase in SFA content was noted in the third and fifth weeks of experimental feeding. These observations may be partially explained by a simultaneous decrease in the SAIP level in the third week of HFD, which might be a possible way for converting SAIP to SFA in the liver. It is possible that in such a short time of HFD feeding as we used in this study, the *de novo* pathway is not activated, and hence we observed a weakening of this pathway. On the other hand, we observed an intensification of ceramide formation mostly through the regeneration pathways (the salvage and sphingomyelin pathways), which is responsible for the synthesis of sphingolipids from 50% to 90% [20]. The significant elevation in the ceramide content may be the outcome of the increased breakdown of sphingomyelin, for which increased concentration was observed at the first two weeks of HFD feeding in our previous study [3]. This assumption was supported by the increased hepatic expression of Alk-SMase and N-SMase in the third and fifth weeks, respectively, in the results presented herein. It should be noted that ceramide formed from sphingomyelin as well as synthesized in the *de novo* pathway may be then hydrolyzed to sphingosine [20]. Importantly, lipidomic profiling showed that not only ceramide but also other sphingolipids, e.g., S1P or SFO, correlated with hepatic insulin resistance development [19,21]. In this study, we also observed an elevation in the content of SFO at every time point of experimental feeding. It is particularly important that ceramide regeneration by a breakdown of sphingosine bases may be even more destructive and more strongly inhibit insulin signaling pathway than CER formed by *de novo* pathway [22]. Increased SFO level was supported by increased expression of selected ceramidases, especially neutral. Interestingly, changes in CER and SFO concentrations with a diminishment in the expression of CerS2 and CerS6, as well as increment in the expression of hepatic-specific ASAH2 in the whole feeding period may suggest that the formation of SFO from CER was more intensified compared to the regeneration of CER from SFO. Thus, we suspect that in our research during high-fat feeding, the salvage pathway is mainly responsible for the increased ceramide accumulation. Moreover, we found the decreased S1P content in the liver of HFD-fed rats and simultaneously decreased the liver-specific SPHK2 expression. Mentioned effects in S1P level and SPHK2 expression were the most severe in the third and fourth weeks of high-fat feeding,

suggesting that in these weeks, there is a significant inhibition in the catabolism pathway, which predisposed to the development of simple hepatic steatosis [7]. A similar effect was observed in mice fed an HFD for 4 weeks, which revealed a significant downregulation in either mRNA and protein levels of SPHK2 that caused the activation of oxidative genes deteriorating hepatosteatosis and affecting associated hepatic glucose metabolism [23]. In addition, SPHK2 knockout mice characterized rapid development of steatosis after 2 weeks of HFD, pointing out that SPHK2 and also generated S1P can determine the activity of enzymes and receptors that regulate the lipid metabolism [24]. Sphingosine-1-phosphate and ceramide have an opposite influence on cells' metabolism and survival. S1P increases glucose uptake and metabolism as well as promotes cell survival and proliferation, while CER inhibits glucose metabolism, amplifies the inflammatory response, and promotes cell death [7,25]. The interaction between the content of S1P and CER should be supported by alternations in S1P/CER balance that clarify which sphingolipid, S1P or CER, plays a pivotal role in regulating cell biology related to hepatic injury induced by HFD. This assumption was confirmed by decreased the value of S1P/CER ratio in nearly every week of experimental feeding in our present study. Thus, we may suggest that a decrease in S1P and an increase in CER along with diminishment in S1P/CER ratio were partially mediated by the accumulation of bioactive lipids and associated with the occurrence of hepatic IR.

The mechanism of sphingolipid species inducing hepatic insulin resistance has not been completely explained. We presented that HFD directly attenuated insulin signaling transduction pathway. In skeletal muscle, increased ceramide deposition induced insulin resistance development [26]. Surprisingly, in our study, enhanced accumulation not of ceramide but of other sphingolipid species significantly reduced the level of phosphorylated Akt at Ser473 already in the first week of administration of chow rich in fat and was continued in the next weeks of our experimental feeding. Our observation in NAFLD rats is consistent with numerous studies on a rat model where different times of high-fat feeding (10, 12, and 24 weeks of HFD) caused a reduction in the hepatic level of phosphorylated Akt (Ser473) [27–29]. The most likely explanation of the abovementioned correlation is decreased expression of CerS2 (the lowest in the third week of our study) that promotes C16-ceramide generation, which strongly inhibits Akt phosphorylation (the lowest pAkt level was observed also in the third week of HFD) and aggravates insulin signaling in the liver [30,31]. In response to the diminishment in the phosphorylation of Akt (Ser473), the total expression of GLUT2 was abolished already in the first week of HFD. In this context, we supposed that decreased expression of glucose transporter in the hepatocytes altered its ability for glucose sensing due to decreased GLUT2 membrane localization, which reduced hepatic glucose uptake and may be strongly associated with development of hyperglycemia (data presented in our previous study [32]). Moreover, enhanced blood glucose concentrations may favor increased accumulation of saturated fatty acid supplied with the chow rich in fat that finally promoted development of liver steatosis and deterioration to NASH [33]. In addition, we also found that at the beginning of our study, the content of phosphorylated PTEN at residue Ser380, as a pivotal regulator of PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) degradation in the PIP3 kinase (PI3K) pathway, was enhanced upon experimental feeding. The altered phosphorylation resulted in decreased activation of PTEN, leading to inhibited Akt-signaling pathway and decreased hepatic insulin sensitivity [34]. Studies conducted on the liver samples and primary hepatocytes from rats treated with a high-caloric diet for 12 and 15 weeks, respectively, also showed the increased pPTEN levels [35,36]. Moreover, Kohil et al. reported that the short-term (18 h) hepatocytes' exposition to a high concentration of long-chain fatty acids caused inhibition of the PI3K pathway *via* maintaining a high level of pPTEN [37]. These findings are in line with our observations where rats fed a HFD showed reduced pAkt and simultaneously enlarged pPTEN levels that are responsible for impaired insulin action in the liver tissue [35]. We showed that enhanced level of SFO (not CER) already in the first week of HFD administration, continued in each experimental week is reflected by changes in insulin pathway proteins. The abovementioned development of disruption in the insulin

action induced by SFO was probably enhanced by increased SFA deposition mainly in the third week of HFD and also by increased CER accumulation at the end of study. The most important finding from our study is that in the liver excessive accumulation of other sphingolipid fractions such as SFO may induce insulin resistance development in early stages of steatosis. The main weakness of our study is that we did not use a selective inhibitor of CerSs in the *de novo* and salvage pathways such as fumonisin B1 for clear confirmation as to which pathway is mainly responsible for observed changes in sphingolipid content [20,38].

The diminishment in the level of pAkt depressed the phosphorylation of mTOR at residue Ser2448 at the beginning of our experimental feeding and was continued for four weeks of HFD. However, in the last week, we observed a significant increase in the pmTOR level in the liver from NAFLD rats. According to the research by Wang et al., a significant enhancement in the hepatic pmTOR protein expression was observed in rats after 8 and 16 weeks of HFD exposition, corresponding to the progression of simple steatosis into hepatitis. Interestingly, the expression after 16 weeks of HFD was higher than after 8 weeks of HFD, which might reveal an enhanced activity of the mTOR complex that regulates nutrition transport and may disclose insulin sensitivity deterioration and NAFLD progression into NASH [39]. A discrepancy between the results of Wang et al., those of Khamzina et al., and our own results on changes in the pmTOR level may be explained by the different duration of HFD. We paid attention to only 5 week chow administration, and we suppose that a longer time of HFD (8 or 16 weeks) may cause a significant increase in the phosphorylated mTOR level. Following a high-fat diet administration, we also noticed elevated Thr389 P70S6 kinase phosphorylation in the liver. Supporting these data is research presented by Khamzina et al., where mTOR activated P70S6 kinase isoform 1 by its phosphorylation (approximately 20-fold increase) in obese rats with IR. Moreover, an increase in the phosphorylation of mTOR (Ser2448) and P70S6 kinase (Thr389) may be a consequence of hyperinsulinemia, which exacerbates the phosphorylation state [40]. In line with the abovementioned findings, the experiment carried out on HepG2 cells revealed an increased level of pmTOR and pP70S6 kinase after short-time insulin exposition [40], which suggested the pivotal role of the mTOR complex in disrupting hepatic insulin signaling. It is worth pointing out that our dietary model already in the first week of HFD caused a dramatic (fourfold) decrease in the hepatic phosphorylation of ribosomal protein S6 (Ser235/Ser236), the protein whose phosphorylation leads to upregulated translation of proteins and is also linked with hepatocytes proliferation [41,42]. It is well known that the phosphorylation of S6RP is regulated by two isoforms of S6 kinases—P70 and P90. The observed decrease in pS6RP (Ser235/Ser236) may be a result of the decreased pP90S6 kinase level rather than increased P70S6 kinase phosphorylation, leading to the abolishment in the phosphorylation of the ribosomal protein [43]. We also suspect that the diminishment in the level of pS6RP may reflect an inhibitory effect on the cells proliferation process that subsequently may cause development of apoptotic changes in the hepatocytes at the beginning of HFD administration. However, in our study, we did not observe a significant increase in BAD phosphorylation. The most possible explanation may be the fact that protective mechanisms in the liver were activated. Thus, future studies should be focused on searching new methods or substances that would stimulate protective mechanisms of this tissue.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Model

The animal experiment was performed in accordance with the institutional ethical guidelines, Ethics Committee on Animal Care at the Medical University of Bialystok (28 May 2008; approval number: 32/2008). Male Wistar rats with initial body weight of 100–150 g were subjected to the standard facilitating conditions (on a reverse 12 h light/dark cycle, at 22 ± 2 °C and ad libitum access to water and standard rodent chow) for 7 days to adapt to the laboratory surroundings. Subsequently, rats were randomly selected into two groups according to the type of diet, namely, (1) a control group (six rats

in each group) fed with a standard rodent chow with content of a reduced fat-calorie (kcal of energy distribution: 57.1% carbohydrates, 30.5% protein, and 12.4% fat; Σ saturated: 36.0%, Σ unsaturated: 64.0%) or (2) a high-fat diet group (six rats per group in each week of the diet) fed with a chow rich in fatty acids purchased from New Brunswick (NJ, USA, cat no. D12492; kcal of energy distribution: 60% fat, 20% protein, and 20% carbohydrates; Σ saturated: 72.0%, Σ unsaturated: 28.0%). The fatty acid composition of the experimental high-fat diet was measured by gas-liquid chromatography (GLC). At the beginning of the experiment, we had two control groups: the first in the first week and the second in the fifth week, both receiving a standard diet. In the absence of significant changes between the two control groups, the results were referred to the first week control group (called 0 week). All the animals, after overnight fasting, at the end of the different feeding time points (first, second, third, fourth, and fifth weeks) were anaesthetized by the intraperitoneal pentobarbital injection (80 mg/kg of body mass). Then, rats were euthanized by bleeding, and the liver was promptly prepared and frozen by the use of pre-cooled aluminum tongs in liquid nitrogen. The tissues were harvested and stored at -80°C until measurements.

4.2. Immunoblotting

Before the Western blot procedure, all the liver tissues were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The homogenates were centrifuged at $10,000\times g$ at 4°C for 30 min, and after that, in obtained supernatants using bicinchoninic acid (BCA) with bovine serum albumin (BSA) as a standard, the total protein concentrations were determined. All the samples of the liver tissue (30 μg of proteins) were reconstituted in Laemmli Sample Buffer and separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, samples were transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) or nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in tris-buffered saline with Tween-20 (TBST) and 5% BSA or non-fat dry milk and then immunoblotted overnight with primary antibodies: serine palmitoyltransferase 2 (SPTLC2; 1:500, sc-27500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), ceramide synthase 2 (CerS2; 1:500, ab85567, Abcam, Cambridge, United Kingdom), ceramide synthase 4 (CerS4; 1:500, ab66512, Abcam, Cambridge, United Kingdom), ceramide synthase 6 (CerS6; 1:500, ab77603, Abcam, Cambridge, United Kingdom), sphingosine kinase 1 (SPHK1; 1:500, SAB2500984, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), sphingosine kinase 2 (SPHK2; 1:500, SAB4502433, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), acid ceramidase (ASA1; 1:500, sc-28486, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), neutral ceramidase (ASA2; 1:200, sc-68906, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), alkaline ceramidase (ASA3; 1:500, PA5-75603, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), alkaline sphingomyelinase (Alk-SMase; 1:500, sc-49352, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), neutral sphingomyelinase (N-SMase; 1:500, sc-26214, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), and glucose transporter 2 (GLUT2; 1:200, sc-7580, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA). The membranes were incubated with suitable secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies (1:3000, 7074S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:3000, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; 1:3000, sc-2354, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA). Next, the protein bands in the liver homogenates were visualized using the chemiluminescence substrate (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and then immunoblotting signals were quantified densitometrically and visualized by a ChemiDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The obtained proteins signals were standardized to the total expression of protein. The results are expressed in percentages of the control.

4.3. Sphingolipids Analysis

The sphinganine (SFA), sphinganine-1-phosphate (SA1P), ceramide (CER), sphingosine (SFO), and sphingosine-1-phosphate (S1P) contents were analyzed using the high-

performance liquid chromatography (HPLC) method according to the previously described protocol by Hodun et al. [44]. Briefly, the liver tissue was homogenized. Then, in the presence of internal standards (C17-sphingosine-1-phosphate and C17-sphingosine, Avanti Polar Lipids), lipids from homogenates were ultrasonicated and extracted by the addition of chloroform. The sphingoid base-1-phosphates were measured after dephosphorylation to sphinganine and sphingosine with the addition of alkaline phosphatase (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Next, a small aliquot was transferred into a fresh tube containing N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine (C17-base) as an internal standard. The samples were next subjected to convert CER into SFO by alkaline hydrolysis. Dephosphorylated sphingoid bases, free sphingosine, and sphinganine, as well as sphingosine sourced from ceramide were converted to their o-phthalaldehyde derivatives and analyzed with the use of the HPLC system (Varian ProStar, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a fluorescence detector and C18 reversed-phase column (OmniSpher 5, Varian Inc. 4.6×150 mm).

4.4. Intracellular Content of Phosphoproteins

Before the Bio-Plex Pro Cell Signaling Assay procedure, the lysates from the liver samples were prepared in adequate cell lysis buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the addition of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and cell lysis factor QG (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, the obtained lysates were centrifuged at $15,000 \times g$ at 4°C for 10 min. In these samples' supernatant, the total protein concentration was measured. The ultimate protein concentration of samples was in the range of 20–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finally, the supernatants were recollected and stored at -80°C for further analysis.

According to the protocol, the content of phosphorylated form of analytes was detected by multiplex assay kits employing covalently coupled magnetic beads. Briefly, a 96-well plate was prewashed two times with a wash buffer. Then, all the samples and blank and cell lysis controls were added to the appropriate wells and incubated in the dark overnight on a plate shaker. The second day, after three times washing with a wash buffer, detection antibodies were added to the wells for 30 min of incubation in the dark. Following the addition of streptavidin–phycoerythrin (SA-PE) conjugate, another incubation, and a series of washes, the resuspend beads were added and shook for 30 s. Finally, the plate was placed on the reader and a relative concentration of analytes was determined by the use of the Bio-Plex 200 system (Bio-Rad).

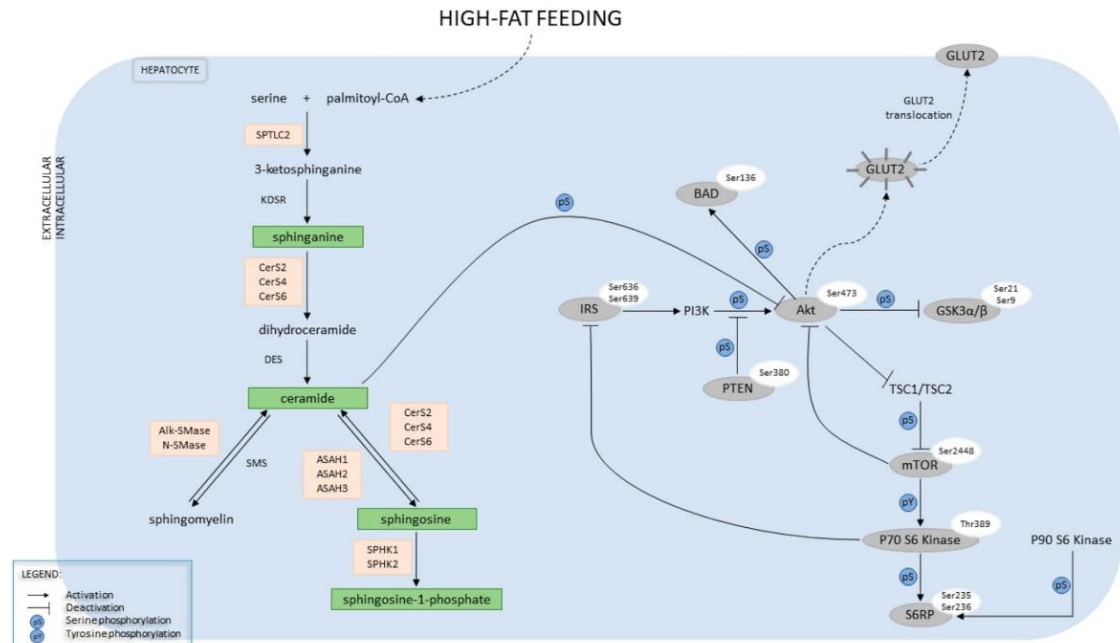
4.5. Data Analysis

The results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) on the basis of the six independent determinations in each examined group. The data were analyzed using GraphPad Prism software version 5 (La Jolla, CA, USA). Then, the Shapiro–Wilk test and Bartlett's test were applied to ensure normal distribution and uniformity of the results. Statistical differences between the study groups were analyzed by one-way test ANOVA followed by an appropriate post hoc test (Tukey's test and *t*-test). Statistically significant differences were presented as a *p*-value < 0.05 .

5. Conclusions

The present study provided a novel insight into the development of insulin resistance at the different time points of high-fat feeding during NAFLD occurrence. Most importantly, an excessive accumulation of sphingosine caused disruption in the insulin action already in the first week of experimental feeding. This effect on the insulin transduction pathway was exacerbated in the last three weeks of HFD by increased SFA and CER levels. Our findings clearly demonstrated that only at the end of feeding, increased ceramide accumulation sustained insulin resistance rather than it being an inducer of its development. We suspect that the main route through which CER was deposited was enhancing sphingomyelin and salvage pathways activity with simultaneous inhibition of CER catabolism. This study

demonstrated that the PI3K/Akt/mTOR pathway is strongly activated depending on the high-fat feeding time, particularly in the two last weeks of 5 week HFD (Scheme 1). We believe that these results indicated the precise time point when HFD caused changes in the sphingolipid metabolism that affected the insulin sensitivity disturbances. The presented findings are very important because they may allow to find a potential therapeutic target in the early stage of liver disease development.



Scheme 1. Graphical presentation of the relationship between PI3K/Akt/mTOR and sphingolipid pathways in the insulin resistance development induced by high-fat feeding.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22212478/s1>.

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

Funding: This research was funded by the Medical University of Bialystok, grant number SUB/1/DN/19/001/1118.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee on Animal Care at the Medical University of Bialystok (28 May 2008; approval number: 32/2008).

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Abbreviations

Alk-SMase	alkaline sphingomyelinase
ASAH1	acid ceramidase
ASAH2	neutral ceramidase
ASAH3	alkaline ceramidase
BAD	Bcl-2-associated agonist of cell death
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
CER	ceramide
CerS2, 4, 6	ceramide synthase 2, 4, 6
FA	fatty acid
FFA	free fatty acid
GLC	gas-liquid chromatography
GLUT	glucose transporter
GSK3 α/β	glycogen synthase 3 α/β
HCC	hepatocellular carcinoma
HFD	high-fat diet
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IR	insulin resistance
IRS	insulin receptor substrate
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
N-SMase	neutral sphingomyelinase
P70 S6 Kinase	P70 ribosomal protein S6 kinase
P90 S6 Kinase	P90 ribosomal protein S6 kinase
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI3K	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate kinase
PKB/Akt	protein kinase B
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	polyvinylidene fluoride
S6RP	S6 ribosomal protein
S1P	sphingosine-1-phosphate
SA1P	sphinganine-1-phosphate
SA-PE	streptavidin-phycoerythrin
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFA	sphinganine
SFO	sphingosine
SPHK1, 2	sphingosine kinase 1, 2
SPTLC2	serine palmitoyltransferase 2
TAG	triacylglycerol
TBST	tris-buffered saline with Tween-20

References

1. Park, W.-J.; Song, J.-H.; Kim, G.-T.; Park, T.-S. Ceramide and Sphingosine 1-Phosphate in Liver Diseases. *Mol. Cells* **2020**, *43*, 419–430.
2. Choi, S.; Snider, A.J. Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 520618. [[CrossRef](#)]
3. Konstantynowicz-Nowicka, K.; Berk, K.; Chabowski, A.; Kasacka, I.; Bielawiec, P.; Łukaszuk, B.; Harasim-Symbor, E. High-Fat Feeding in Time-Dependent Manner Affects Metabolic Routes Leading to Nervonic Acid Synthesis in NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3829. [[CrossRef](#)]
4. Presa, N.; Clugston, R.D.; Lingrell, S.; Kelly, S.E.; Merrill, A.H.; Jana, S.; Kassiri, Z.; Gómez-Muñoz, A.; Vance, D.E.; Jacobs, R.L.; et al. Vitamin E alleviates non-alcoholic fatty liver disease in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 14–25. [[CrossRef](#)]

5. Svegliati-Baroni, G.; Pierantonelli, I.; Torquato, P.; Marinelli, R.; Ferreri, C.; Chatgialiloglu, C.; Bartolini, D.; Galli, F. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *144*, 293–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pei, K.; Gui, T.; Kan, D.; Feng, H.; Jin, Y.; Yang, Y.; Zhang, Q.; Du, Z.; Gai, Z.; Wu, J.; et al. An Overview of Lipid Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 4020249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Régnier, M.; Polizzi, A.; Guillou, H.; Loiseau, N. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie* **2019**, *159*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gruben, N.; Shiri-Sverdlow, R.; Koonen, D.P.; Hofker, M.H. Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 2329–2343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Patterson, R.E.; Kalavalapalli, S.; Williams, C.M.; Nautiyal, M.; Mathew, J.T.; Martinez, J.; Reinhard, M.K.; McDougall, D.J.; Rocca, J.R.; Yost, R.A.; et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am. J. Physiol. Metab.* **2016**, *310*, E484–E494. [[CrossRef](#)]
10. Gai, Z.; Gui, T.; Alecu, I.; Lone, M.; Hornemann, T.; Chen, Q.; Visentin, M.; Hiller, C.; Hausler, S.; Kullak-Ublick, G.A. Farnesoid X receptor activation induces the degradation of hepatotoxic 1-deoxysphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **2019**, *40*, 844–859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zabielski, P.; Hady, H.R.; Chacinska, M.; Roszczyc, K.; Górski, J.; Błachnio-Zabielska, A.U. The effect of high fat diet and metformin treatment on liver lipids accumulation and their impact on insulin action. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7249. [[CrossRef](#)]
12. Chocian, G.; Chabowski, A.; Żendzian-Piotrowska, M.; Harasim, E.; Łukaszuk, B.; Górski, J. High fat diet induces ceramide and sphingomyelin formation in rat's liver nuclei. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *340*, 125–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Puri, P.; Baillie, R.A.; Wiest, M.M.; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M.J.; Sanyal, A.J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2007**, *46*, 1081–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Utzschneider, K.M.; Kahn, S.E. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 4753–4761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tardif, N.; Salles, J.; Guillet, C.; Tordjman, J.; Reggion, S.; Landrier, J.; Giraudet, C.; Patrac, V.; Bertrand-Michel, J.; Migne, C.; et al. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through e IF 2 α activation. *Aging Cell* **2014**, *13*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
16. Aurich, A.-C.; Niemann, B.; Pan, R.; Gruenler, S.; Issa, H.; Silber, R.-E.; Rohrbach, S. Age-dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: Role of palmitate. *Basic Res. Cardiol.* **2013**, *108*, 369. [[CrossRef](#)]
17. Kurek, K.; Piotrowska, D.M.; Wiesiolek-Kurek, P.; Łukaszuk, B.; Chabowski, A.; Górski, J.; Żendzian-Piotrowska, M. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **2013**, *34*, 1074–1083. [[CrossRef](#)]
18. Zabielski, P.; Baranowski, M.; Błachnio-Zabielska, A.; Żendzian-Piotrowska, M.; Górski, J. The effect of high-fat diet on the sphingolipid pathway of signal transduction in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2010**, *93*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Musso, G.; Cassader, M.; Paschetta, E.; Gambino, R. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 282–302.e8. [[CrossRef](#)]
20. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1010–1018. [[CrossRef](#)]
21. Rodriguez-Cuenca, S.; Pellegrinelli, V.; Campbell, M.; Oresic, M.; Vidal-Puig, A. Sphingolipids and glycerophospholipids—The “ying and yang” of lipotoxicity in metabolic diseases. *Prog. Lipid Res.* **2017**, *66*, 14–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lawton, M.; Tong, M.; Silbermann, E.; Longato, L.; Jiao, P.; Mark, P.; Wands, J.R.; Xu, H.; de la Monte, S.M. Hepatic Ceramide May Mediate Brain Insulin Resistance and Neurodegeneration in Type 2 Diabetes and Non-alcoholic Steatohepatitis. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 715–729. [[CrossRef](#)]
23. Lee, S.; Hong, I.; Kim, B.; Shim, S.; Lee, J.S.; Lee, H.; Choi, C.S.; Park, T. Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology* **2015**, *62*, 135–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nagahashi, M.; Takabe, K.; Liu, R.; Peng, K.; Wang, X.; Wang, Y.; Hait, N.C.; Wang, X.; Allegood, J.C.; Yamada, A.; et al. Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. *Hepatology* **2015**, *61*, 1216–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ma, M.M.; Chen, J.L.; Wang, G.G.; Wang, H.; Lu, Y.; Li, J.F.; Yi, J.; Yuan, Y.J.; Zhang, Q.W.; Mi, J.; et al. Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia* **2007**, *50*, 891–900. [[CrossRef](#)]
26. Hsieh, C.-T.; Chuang, J.-H.; Yang, W.-C.; Yin, Y.; Lin, Y. Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 1400–1408. [[CrossRef](#)]
27. Wang, X.-X.; Ye, T.; Li, M.; Li, X.; Qiang, O.; Tang, C.-W.; Liu, R. Effects of octreotide on hepatic glycogenesis in rats with high fat diet-induced obesity. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 109–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Heydemann, A.; González-Vega, M.; Berhanu, T.K.; Mull, A.J.; Sharma, R.; Holley-Cuthrell, J. Hepatic Adaptations to a High Fat Diet in the MRL Mouse Strain are Associated with an Inefficient Oxidative Phosphorylation System. *Jacobs J. Diabetes Endocrinol.* **2016**, *2*, 13.

29. Ma, Z.; Chu, L.; Liu, H.; Wang, W.; Li, J.; Yao, W.; Yi, J.; Gao, Y. Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep44819. [[CrossRef](#)]
30. Hajduch, E.; Lachkar, F.; Ferré, P.; Foufelle, F. Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 792. [[CrossRef](#)]
31. Park, J.-W.; Park, W.-J.; Kuperman, Y.; Boura-Halfon, S.; Pewzner-Jung, Y.; Futerman, A.H. Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes. *Hepatology* **2013**, *57*, 525–532. [[CrossRef](#)]
32. Harasim, E.; Stepek, T.; Konstantynowicz-Nowicka, K.; Baranowski, M.; Górski, J.; Chabowski, A. Myocardial Lipid Profiling During Time Course of High Fat Diet and its Relationship to the Expression of Fatty Acid Transporters. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 1147–1158. [[CrossRef](#)]
33. Chadt, A.; Al-Hasani, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv.—Eur. J. Physiol.* **2020**, *472*, 1273–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yang, Z.; Xie, C.; Xu, W.; Liu, G.; Cao, X.; Li, W.; Chen, J.; Zhu, Y.; Luo, S.; Luo, Z.; et al. Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by *Helicobacter pylori* promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway. *Oncotarget* **2015**, *6*, 31916–31926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhen, Y.-F.; Zhang, Y.-J.; Zhao, H.; Ma, H.-J.; Song, G.-Y. MicroRNA-802 regulates hepatic insulin sensitivity and glucose metabolism. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 2440–2449. [[PubMed](#)]
36. Alisi, A.; Pastore, A.; Ceccarelli, S.; Panera, N.; Gnani, D.; Bruscalupi, G.; Massimi, M.; Tozzi, G.; Piemonte, F.; Nobili, V. Emodin Prevents Intrahepatic Fat Accumulation, Inflammation and Redox Status Imbalance During Diet-Induced Hepatosteatosis in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2276–2289. [[CrossRef](#)]
37. Kohli, R.; Pan, X.; Malladi, P.; Wainwright, M.S.; Whittington, P.F. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Signal Hepatocyte Steatosis by Regulating the Phosphatidylinositol 3-Kinase Cell Survival Pathway. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21327–21336. [[CrossRef](#)]
38. Merrill, A.; van Echten, G.; Wang, E.; Sandhoff, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27299–27306. [[CrossRef](#)]
39. Wang, X.; Wang, Y.; Shi, M.; Fu, H.; Xu, H.; Wei, J.; Wang, T. Mammalian target of the rapamycin pathway is involved in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Med. Rep.* **2010**, *3*, 909–915. [[CrossRef](#)]
40. Khamzina, L.; Veilleux, A.; Bergeron, S.; Marette, A. Increased Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver and Skeletal Muscle of Obese Rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1473–1481. [[CrossRef](#)]
41. Volarević, S.; Stewart, M.J.; Ledermann, B.; Zilberman, F.; Terracciano, L.; Montini, E.; Grompe, M.; Kozma, S.C.; Thomas, G. Proliferation, But Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40 S Ribosomal Protein S6. *Science* **2000**, *288*, 2045–2047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mok, K.W.; Mruk, D.D.; Cheng, C.Y. Regulation of Blood–Testis Barrier (BTB) Dynamics during Spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” Effects of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) and mTORC2. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2013**, *301*, 291–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ruvinsky, I.; Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: From protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 342–348. [[CrossRef](#)]
44. Hodun, K.; Sztolsztener, K.; Chabowski, A. Antioxidants Supplementation Reduces Ceramide Synthesis Improving the Cardiac Insulin Transduction Pathway in a Rodent Model of Obesity. *Nutrients* **2021**, *13*, 3413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Publikacja nr. 3

Klaudia Sztolsztener, Ewa Harasim-Symbor, Adrian Chabowski,
Karolina Konstantynowicz-Nowicka

*The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human
steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.*

Biochemical and Biophysical Research Communications

2021, 585:132-138

IF=3.575, MNiSW=100



The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate

Klaudia Sztolsztener^{*}, Ewa Harasim-Symbor, Adrian Chabowski, Karolina Konstanynowicz-Nowicka

Department of Physiology, Medical University of Białystok, Mickiewicz Str. 2C, 15-222, Białystok, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2021
Received in revised form 8 November 2021
Accepted 11 November 2021
Available online 13 November 2021

Keywords:

Dexamethasone
Lipid metabolism
Fatty acid
Lipid transporter
Glucocorticoid

ABSTRACT

Dexamethasone (DEX) is a synthetic glucocorticoid with anti-inflammatory properties. We evaluated a potentially protective dexamethasone influence on hepatocellular lipid metabolism and fatty acid (FA) transporters expression. The HepG2 cells were incubated with palmitic acid (PA) and/or dexamethasone in two different time exposures (16 h and 40 h). Intracellular and extracellular lipid and sphingolipid concentrations were estimated by the gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography, respectively. The protein expression involved in FA uptake and lipid metabolism was determined by immunoblotting. The treatment of HepG2 with dexamethasone and palmitate enhanced lipid transport to the cell *via* increased especially FABPpm expression and resulted in the increased triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG) and ceramide deposition. Dexamethasone with palmitate treatment altered FA composition resulting in the elevated n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) activity in DAG and TAG and the diminished n-6 PUFA activity in DAG after prolonged exposure. We may speculate that although protective lipid secretion into media and decrease in inflammatory FA precursors dexamethasone treatment exacerbated lipotoxicity in HepG2 cells.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is described as excessive intracellular triacylglycerols (TAGs) accumulation [1]. Steatosis with concomitant metabolic dysregulation and liver function abnormality during NAFLD development is related to factors and comorbidities such as obesity and type 2 diabetes [1,2]. While the liver's metabolic capacity is exceeded, inflammation occurrence accompanying steatosis leads to the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [1,2]. Hepatic steatosis may also progress to irreversible hepatic fibrosis and cirrhosis and may ultimately lead to hepatocellular carcinoma (HCC) [3].

Dexamethasone (DEX) is a pharmacological synthetic glucocorticoid (GC) with anti-inflammatory properties. DEX has also a regulatory effect on many metabolic pathways that affect the energy balance of the organism [2,4]. Given the complexity of

dexamethasone action mechanisms, its effects on the hepatic lipid metabolism are of a broad range and may intensify liver damage [2,4]. The key role of GC activity is the fact that GCs activate hepatic lipogenesis which promotes lipid accumulation contributing to steatosis [2]. In turn, a direct effect on the liver is that GCs regulate cholesterol and fatty acid synthesis through increase the gene and proteins expression stimulating the hepatic *de novo* lipogenesis (DNL) pathway [2].

The precise influence of DEX on lipid metabolism in an over-nutrition state still remains unclear. Thus, the current study sought to determine the influence of dexamethasone in the presence of excessive palmitate bioavailability on hepatic lipid and sphingolipid concentration, which plays a crucial role in NAFLD development and progression. We will also examine the expression of proteins involved in fatty acid uptake and secretion, which mainly regulates lipid transport, metabolism and deposition.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The experiment was conducted on the human hepatoma cell

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: klaudia.sztolsztener@umb.edu.pl (K. Sztolsztener), ewa.harasim-symbor@umb.edu.pl (E. Harasim-Symbor), adrian.chabowski@umb.edu.pl (A. Chabowski), karolina.konstanynowicz-nowicka@umb.edu.pl (K. Konstanynowicz-Nowicka).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.044>

0006-291X/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

line (HepG2/C3A) purchased from ATCC (American Type Culture Collection). The HepG2 cells were cultured in high-glucose (4.5 g/l) DMEM medium (Dulbecco Modified Eagle Medium) with 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS (fetal bovine serum) at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. Over the incubation periods, cells' morphology and viability were evaluated in the Bürker chamber with the use of Trypan blue staining. The experiment was conducted on 85% confluent cells where viability was above 85%.

2.2. Experimental treatment

All the HepG2 cells were cultured in DMEM media complemented with fatty acid-free 2% BSA (bovine serum albumin) without or with the addition of 0.5 mM palmitic acid (PA) and/or 1 μM dexamethasone. Cells were incubated for 16 h and 40 h in order to assess time-dependent alterations in FAs metabolism and transport. At the end of both incubations, media samples were taken and promptly frozen in the liquid nitrogen temperature. Subsequently, cells were washed twice with ice-cold PBS, homogenized by ultrasonication in ice-cold RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer with protease and phosphatase inhibitors and frozen. Before analysis, the protein concentration was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method with fatty acid-free BSA as a standard.

2.3. Intracellular and extracellular lipid assay

We analyzed the content and individual FA composition of lipid fractions in HepG2 cells and media at the end of each type of incubation period. Lipids from HepG2 cells and media were extracted using chloroform-methanol solution according to the Folch method [5]. Then, we separated lipids into diacylglycerol (DAG) and triacylglycerol. Obtained individual FAs were methylated. Methylated esters were quantitatively determined in relation to corresponding retention times of standards using the GLC (gas-liquid chromatography) method (Agilent Technologies). The concentrations of DAG and TAG were assessed as the sum of the individual FAs. Based on determined FA composition, we ascertained the desaturation index and the activities of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) pathways in the investigated lipid fractions.

2.4. Intracellular and extracellular sphingolipid assay

In HepG2 cells and post-incubation media, we determined sphingosine (SFO), sphinganine (SFA) and ceramide (CER) concentrations using the HPLC (high-performance liquid chromatography; ProStar, Varian Inc.) according to the method Min et al. [6]. In the presence of C17-sphingosine as an internal standard, lipids were extracted. Then, an aliquot phase was transferred to a fresh reaction tube with a pre-included internal standard (N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine). Samples were alkaline hydrolyzed to deacetylate ceramide to sphingosine. The released from CER free SFO and SFA were converted to suitable o-phthalaldehyde derivatives and determined using the HPLC system.

2.5. Immunoblotting

Briefly, lysates from HepG2 cells in RIPA lysis buffer were separated using 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated overnight with primary antibodies: from Thermo Fisher Scientific - ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1); from Abcam - fatty acid translocase (FAT/CD36), fatty acid binding protein (FABPpm) and from Santa Cruz Biotechnology - fatty acid transport proteins 2 (FATP2), microsomal triacylglycerol transport protein (MTP).

Subsequently, nitrocellulose membranes were incubated with appropriate secondary antibodies conjugated with HRP (horseradish peroxidase). Equal loading of protein was controlled by Ponceau S staining. The obtained protein signals were visualized densitometrically using a ChemiDoc system (Bio-Rad). The expression of examined proteins was normalized to the intracellular GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) expression and the control was established as 100%.

2.6. Statistical analysis

All the results are presented as mean values ± SD based on six (n = 6) independent determinations in each group. Statistical comparisons for all determinations in the experiment were tested by analysis of variance (ANOVA) and appropriate post-hoc tests or with a student t-test using Statistica 10 (StatSoft). $P < 0.05$ was regarded statistically significant. * $p < 0.05$ significant differences compared with the control group, # $p < 0.05$ significant differences compared with the PA group.

3. Results

3.1. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the intracellular and extracellular TAG and DAG concentrations

In HepG2 cells, we noticed an increase in intracellular TAG content in PA and/or DEX groups (16 h – PA: +83.7%, DEX: +18.1%, DEX + PA: +80.6%; 40 h – PA: +91.7%, DEX: +17.2%, DEX + PA: +133.3%, $p < 0.05$, Fig. 1A) compared to an appropriate control groups. Prolonged incubation with DEX + PA induced a rise in intracellular TAG and DAG levels (+21.7%, $p < 0.05$, Fig. 1A; +52.0%, $p < 0.05$, Fig. 1C, respectively) in comparison with a corresponding PA groups. Compared to the control group, prolonged exposure to DEX + PA resulted in increase in DAG content (+63.3%, $p < 0.05$, Fig. 1C).

After 16 h incubation the extracellular TAG level was elevated in PA (+34.1%, $p < 0.05$, Fig. 1B, vs. control group) and reduced in DEX + PA (–37.8%, $p < 0.05$, Fig. 1B, vs. PA group) groups. Prolonged treatment provoked extracellular TAG secretion in all the examined groups compared to the control (PA: +25.1%, DEX: +176.1%, DEX + PA: +272.4%, $p < 0.05$, Fig. 1B) and PA (DEX + PA: +197.7%, $p < 0.05$, Fig. 1B) groups. Whereas, we observed changes in DAG secretion into incubation media in DEX + PA groups compared to the control (16 h – DEX + PA: –27.1%; 40 h – DEX + PA: +146.4%, $p < 0.05$, Fig. 1D) and PA (16 h – DEX + PA: –30.9%; 40 h – DEX + PA: +154.0%, $p < 0.05$, Fig. 1D) groups. Moreover, after 40 h incubation with DEX the extracellular DAG content was increased (+87.8%, $p < 0.05$, Fig. 1D, vs. control group).

3.2. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the TAG' and DAG' intracellular and extracellular FA composition

In both incubation periods, the C16:0, C16:1 and C18:0 levels in intracellular TAG fraction were increased in groups treated with PA and DEX + PA ($p < 0.05$, Fig. 2A, vs. corresponding control groups). In the case of intracellular TAG' C18:1 content, PA or/with DEX provoked a rise after 16 h and 40 h incubation ($p < 0.05$, Fig. 2A) compared to a respective control groups. Prolonged exposure of DEX + PA revealed an increase in C16:0, C16:1 and C18:1 ($p < 0.05$, Fig. 2A) in relation to the corresponding PA-treated groups. We noticed an increase in intracellular unsaturated fatty acids (USFA) content after short exposure to PA and DEX + PA ($p < 0.05$, Fig. 2C, vs. respective control groups). Whereas, intracellular DAG'

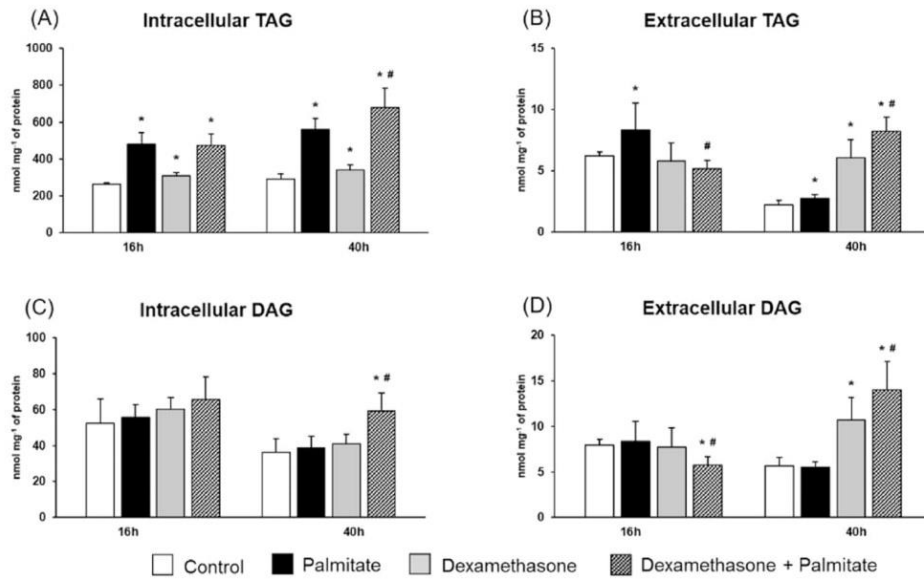


Fig. 1. Intracellular and extracellular TAG (A, B) and DAG (C, D) concentrations, respectively.

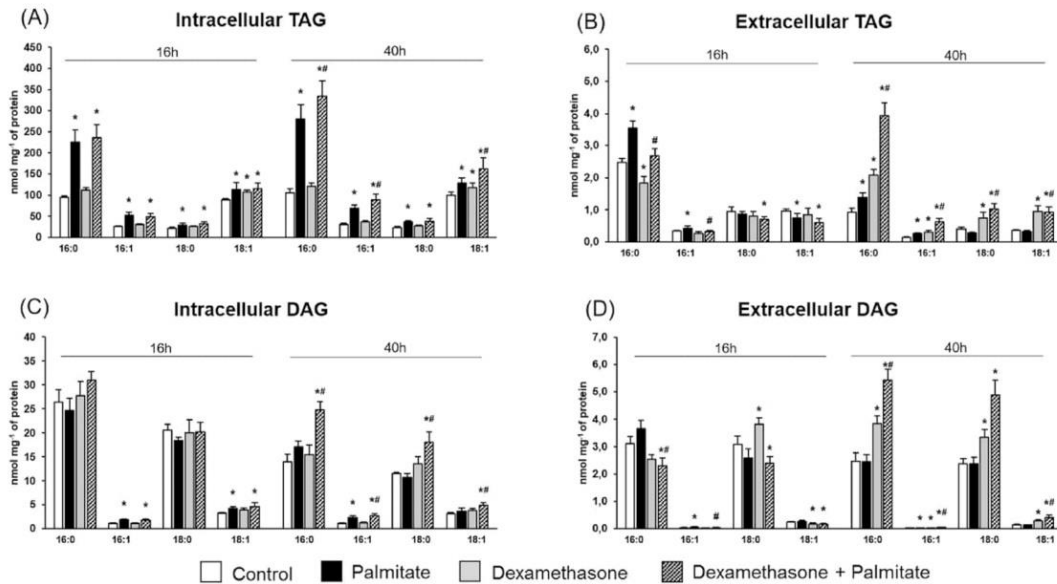


Fig. 2. Intracellular and extracellular TAG (A, B) and DAG (C, D) fatty acid composition, respectively.

accumulation of all examined saturated fatty acids (SFA) and USFA were elevated in DEX + PA groups ($p < 0.05$, Fig. 2C, vs. control and PA groups). Moreover, an increase in C16:1 content in DAG fraction was observed in PA-treated group for 40 h ($p < 0.05$, Fig. 2C).

The short treatment with PA resulted in C16:0 and C16:1 increased and C18:1 decreased secretion into media in TAG fraction ($p < 0.05$, Fig. 2B, vs. control groups). In the case of 16 h incubation with DEX, diminished level of C16:0 in extracellular triacylglycerol in relation to the control group was observed ($p < 0.05$, Fig. 2B). DEX + PA enhanced secretion of C16:0 and reduced secretion of

C16:1 (16 h – $p < 0.05$, Fig. 2B, vs. PA group). What is more, a decrement in TAG' C18:0 and C18:1 in the DEX + PA group was noticed (16 h – $p < 0.05$, Fig. 2B, vs. appropriate control groups). 40 h incubation with PA alone increased only the extracellular content of C16:0 and C16:1 ($p < 0.05$, Fig. 2B). C16:0, C16:1, C18:0 and C18:1 were elevated by DEX alone ($p < 0.05$, Fig. 2B, vs. control groups) and DEX + PA ($p < 0.05$, Fig. 2B, vs. corresponding control and PA groups). After 16 h incubation, we observed changes in extracellular DAG' FA composition. There was an increase in PA-treated C16:1 and DEX-treated C18:0 and a decrease in C18:1

concentrations after DEX ($p < 0.05$, Fig. 2B, vs. proper control groups). Moreover, 16 h incubation with DEX + PA reduced SFA and USFA contents in extracellular DAG fraction ($p < 0.05$, Fig. 2D, vs. respective control or PA groups). 40 h incubation with DEX and DEX + PA provoked elevation in all examined FAs ($p < 0.05$, Fig. 2D, vs. control and/or PA-treated groups). What is more, PA incubation for 40 h induced an increase in C16:1 content ($p < 0.05$, Fig. 2D, vs. control group).

3.3. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the activities of n-3 and n-6 pathways in the intracellular TAG and DAG fractions

After short exposure to PA and DEX + PA reduced the n-3 pathway activity in intracellular TAG fraction (PA: -29.3% , DEX + PA: -30.8% , $p < 0.05$, Fig. 3A, vs. control group) was observed. In the same groups, prolonged incubation induced an increase in activity of this pathway (PA: $+61.6\%$, DEX + PA: $+40.4\%$, $p < 0.05$, Fig. 3A, vs. control group). The 16 h treatment with DEX and/or DEX + PA provoked a decline in the activity of n-3 pathway in intracellular DAG compared to the control (DEX: -44.9% , DEX + PA: -44.0% , $p < 0.05$, Fig. 3C) and palmitate (DEX + PA: -40.0% , $p < 0.05$, Fig. 3C) groups. After 40 h incubation, PA reduced and DEX + PA elevated DAG' activity of n-3 pathway (PA: -48.8% , $p < 0.05$, Fig. 3C, vs. control group; DEX + PA: $+55.6\%$, $p < 0.05$, Fig. 3C, vs. PA group). The activity of n-6 pathway in intracellular DAG fraction was decreased after 16 h incubation (PA: -19.4% , DEX: -32.6% , DEX + PA: -32.5% , $p < 0.05$, Fig. 3D, vs. control group; DEX + PA: -16.3% , $p < 0.05$, Fig. 3D, vs. PA group), whereas prolonged treatment caused severe alterations (PA: -15.3% , DEX: -43.9% , DEX + PA: -36.5% , $p < 0.05$, Fig. 3D, vs. control group; DEX + PA: -25.0% , $p < 0.05$, Fig. 3D, vs. PA group).

3.4. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the expression of proteins from lipid metabolism pathway

The FAT/CD36 expression decreased after treatment with DEX + PA (16 h -25.5% , $p < 0.05$, Fig. 4A, vs. control group). 16 h and 40 h exposure to PA and/or DEX increased FABPpm expression (16 h - PA: $+29.2\%$, DEX: $+38.2\%$, DEX + PA: $+50.0\%$; 40 h - DEX: $+54.5\%$, DEX + PA: $+75.8\%$, $p < 0.05$, Fig. 4B, vs. proper control group). We showed a rise in the expression of MTP after short (DEX: $+22.3\%$, $p < 0.05$, Fig. 4D) and long (DEX: $+22.7\%$, DEX + PA: $+39.8\%$, $p < 0.05$, Fig. 4D) periods of incubation in comparison with an appropriate control cells. At the end of 16 h exposure to DEX and DEX + PA an increase in ABCA1 expression (DEX: $+24.8\%$, DEX + PA: $+24.5\%$, $p < 0.05$, Fig. 4E, vs. control group) was observed. Prolonged incubation intensified this effect and caused an elevation in the PA group in ABCA1 expression in comparison with a corresponding control (PA: $+29.6\%$, DEX: $+72.5\%$, DEX + PA: $+60.7\%$, $p < 0.05$, Fig. 4E) and PA-treated (DEX + PA: $+31.1\%$, $p < 0.05$, Fig. 4E) groups.

3.5. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the TAG' and DAG' saturation status (Supplementary material)

The short-term treatment with DEX + PA induced a reduction in 16:1/16:0 ratio in TAG and DAG fractions (TAG: -24.6% , $p < 0.05$, Fig. 5A; DAG: -26.7% , $p < 0.05$, Fig. 5C) in comparison with the control or palmitate groups, respectively. After 40 h treatment with DEX + PA DAG desaturation index (16:1/16:0) rise ($+34.4\%$, $p < 0.05$, Fig. 5C, vs. control group). In each PA-treated time, we noticed an elevated DAG' 16:1/16:0 ratio (16 h $+52.6\%$; 40 h $+59.6\%$, $p < 0.05$, Fig. 5C) compared to respective control groups. After 16 h treatment with DEX the 16:1/16:0 ratio in DAG was reduced (-25.3% , $p < 0.05$, Fig. 5C, vs. control group). Moreover, 16 h and 40 h exposure to PA or DEX + PA disclosed a rise in DAG' 18:1/18:0 ratio compared to the corresponding control groups (16 h -

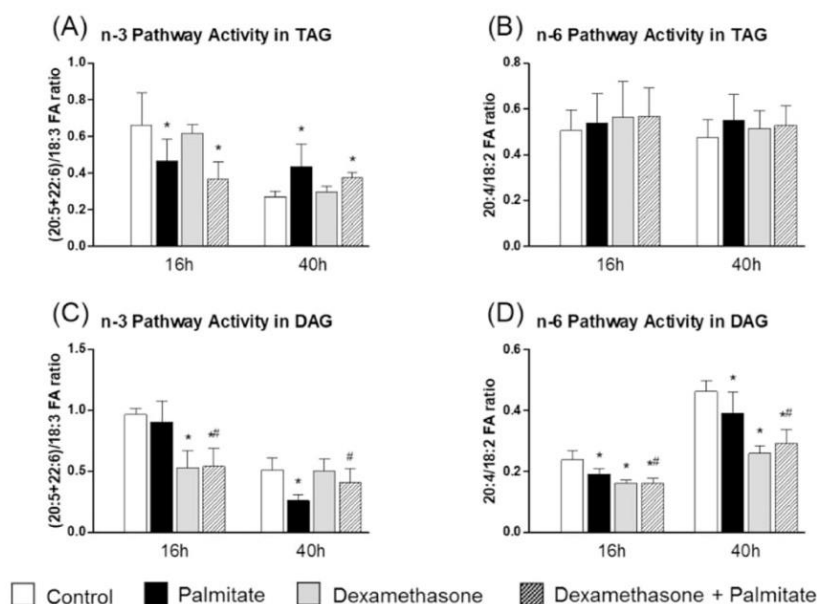


Fig. 3. The n-3 pathway ((20:5 + 22:6)/18:3) and n-6 pathway (20:4/18:2) activities in intracellular TAG (A, B) and DAG (C, D) fractions, respectively.

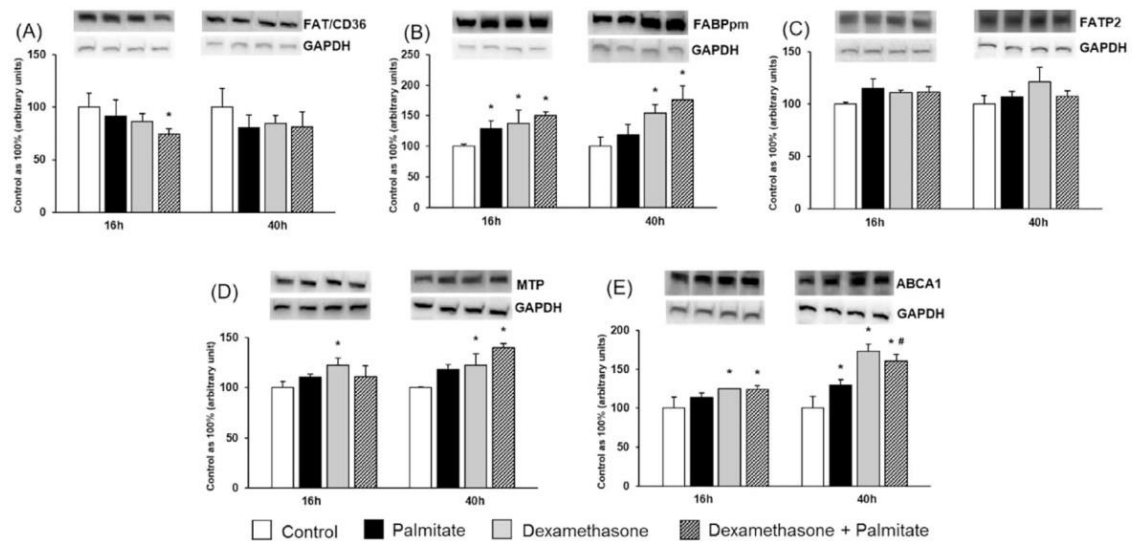


Fig. 4. The expression of proteins involved in fatty acid uptake: FAT/CD36 (A), FABPpm (B), FATP2 (C) and secretion: MTP (D), ABCA1 (E) in HepG2 cells.

PA: +28.5%, DEX + PA: +23.9%; 40 h – PA: +25.5%, $p < 0.05$, Fig. 5D) and simultaneously reduced by DEX + PA from that in the PA group (40 h – DEX + PA: –20.7%, $p < 0.05$, Fig. 5D).

3.6. Effects of 16 h and 40 h exposure of HepG2 cells to PA and/or DEX on the intracellular and extracellular sphingolipid content (Supplementary material)

In HepG2 cells exposure to PA alone or DEX + PA increased intracellular ceramide concentration compared to according control (16 h – DEX + PA: +38.7%; 40 h – PA: +24.3%, DEX + PA: +80.6%, $p < 0.05$, Fig. 6A) or PA (40 h – DEX + PA: +45.3%, $p < 0.05$, Fig. 6A) groups. Sphinganine levels were elevated by PA with/or DEX in relation to the respective control groups (16 h – PA: +22.7%; 40 h – PA: +41.4%, DEX: +27.7%, DEX + PA: +43.0%, $p < 0.05$, Fig. 6B) but compared to the PA group SFA was reduced (16 h – –26.2%, $p < 0.05$, Fig. 6B). Only dexamethasone group achieved significant level in intracellular sphingosine content after 16 h incubation (+33.7%, $p < 0.05$, Fig. 6C, vs. control group). Whereas, in all groups prolonged exposure resulted in a rise in SFO content (PA: +25.6%, DEX: +33.0%, DEX + PA: +45.3%, $p < 0.05$, Fig. 6C, vs. corresponding control groups).

The short exposure to DEX and DEX + PA resulted in a rise in extracellular ceramide content (DEX: +64.1%, DEX + PA: +49.6%, $p < 0.05$, Fig. 6D, vs. control group; DEX + PA: +41.0%, $p < 0.05$, Fig. 6D, vs. palmitate group). Opposite effects after PA, DEX and DEX + PA treatment were shown in extracellular SFO content (16 h – PA: –40.9%, DEX: –45.4%, DEX + PA: –33.8%; 40 h – DEX + PA: –25.9%, $p < 0.05$, Fig. 6E) compared to the respective control groups.

4. Discussion

Among plasma FAs, especially increased concentration of SFAs in the circulatory system correlates with obesity and NAFLD deterioration [7]. NAFLD is associated with altered lipid metabolism, elevated triglyceride content and storage in the form of excessive hepatic lipid droplets [8]. Studies conducted by Zhao et al. and also

Yan et al. reported that increased exposure to palmitate stimulated intracellular lipid deposition in HepG2 cells with lipolysis impairment, which disrupted lipid metabolic balance and induced excessive intracellular TAG accumulation [7,9]. In our study, treatment with PA alone, DEX alone and simultaneously with DEX + PA for 16 h induced a rise in intracellular TAG content, which was amplified after prolonged incubation. Similarly, intracellular DAG deposition revealed a trend towards to increase after short exposition in all the HepG2 cell groups and extension of the treatment significantly elevated DAG accumulation only in the DEX + PA group. These results clearly show that especially longer exposition for DEX in steatotic hepatocytes enhanced excessive lipid storage. Lipid homeostasis is regulated by FA transport proteins which are involved in selective exogenous FAs transport [10]. The data from Koorneef et al. reported that in mice liver corticosterone up-regulated genes encoding proteins involved in FA uptake and transport, i.e. FAT/CD36 [11]. Interestingly, a high-fat diet (HFD) induced an increase in hepatic lipid accumulation and contributed to increased FAT/CD36 expression without changes in expression of other transporters, i.e., liver fatty acid-binding protein (L-FABP) in mice. Corticosterone treatment intensified HFD effects mentioned above and a particularly spectacular change was observed in enormous plasmalemmal FA transport [12]. However, we observed increased expression of FABPpm, not FAT/CD36, in the DEX + PA group. A way to clarify the discrepancy among our and Koorneef's results in FA transporters expression may be explained by a distinct experimental model which exerts different expression proteins level [13].

We also investigated changes in the activity of distinct FA metabolism pathways as a consequence of dexamethasone exposure. In HepG2 cells, 16 h exposition of DEX + PA inhibited TAG' and DAG' n-3 pathway activity, which may be explained as inhibited anti-inflammatory features. A recent study conducted by Li et al. showed that GC increased n-3 PUFAs level in the sera of mice with systemic lupus erythematosus. Thus, the elevated n-3 FAs content can promote activation of anti-inflammatory properties indicating a strong protective effect of dexamethasone on the inflammation development [14]. In our study the prolonged treatment of DEX + PA caused similar effects in TAG and DAG to those described

above. We observed diminished activity of the DAG' n-6 pathway irrespective of the incubation period in HepG2 cells with no changes in the TAG fraction. These results suggest that DEX abolished the accumulation of n-6 pro-inflammatory FAs, which together with changes in n-3 FAs level may possibly exert an inhibitory effect on inflammatory response [15].

Intrahepatocellular lipid metabolism is also regulated by the rate of FA efflux in which are involved FA transport proteins – MTP and ABCA1 [16]. We observed an increase in MTP and ABCA1 expression, which was shown in DEX and DEX + PA groups after 40 h incubation. Similarly to our 16 h incubation, the increased availability of PA did not significantly affect the mRNA expression of ABCA1 in HepG2 cells in research from Uehara et al. [17]. In turn, in studies conducted on *in vivo* model, HFD promoted the assembly of very-low density lipoprotein (VLDL) from the liver regulated by MTP [18]. According to Bruder et al. glucocorticoid treatment modulated hepatic lipid metabolism and promoted the secretion of VLDL rich in triacylglycerol into the plasma [19]. However, some studies indicated a negative effect of dexamethasone on the level of mRNA ABCA1 expression in HepG2 at least in short-term studies, which weakened the secretion of lipids from the cells which may be caused by different levels of GC receptor expression and various exposition time [20]. The research conducted by Yang et al. demonstrated that 48 h stimulation with GC effected only in little increase in MTP expression at the mRNA level in HepG2 cells [21]. The similar experimental results on the liver tissue showed that HFD induced the up-regulation of mRNA and protein MTP expression. Moreover, exposure to chronic stress in the presence of HFD showed an additive effect on increased TAG and cholesterol ester secretion in the form of VLDL [18]. Similarly, the changes in the expression of transporters in our studies are consistent with increased TAG and DAG contents observed in post-incubation media, mainly after prolonged exposure to dexamethasone. Consequently, a coordinated up-regulation of ABCA1 and MTP by DEX is probably an important factor facilitating the protective export of excessively accumulated lipids [16,18]. Additionally, the DEX injected also stimulated excessive secretion of TAG into serum destabilizing lipid homeostasis in mice and rats [4,22]. We suspect that such a defense mechanism occurs only after prolonged exposition to DEX. However, despite an increase expression of ABCA1 and MTP observed in our study, the increase of lipid secretion was relatively low in relation to intracellular TAG and DAG deposition, which may favor the lipid accumulation in HepG2 cells. Excessively accumulated lipids, except for increased efflux, may also undergo esterification to other lipid fractions such as sphingolipids. It has been shown that increased deposition of ceramide is correlated with NAFLD development and deterioration [23]. In our results, DEX induced excessive intracellular deposition of not only CER but also other active molecules being ceramide derivatives, i.e., sphinganine and sphingosine. Our studies clearly showed that DEX under high availability of FAs enhanced the deposition of TAG, DAG and CER after a sufficiently long exposition time. We also investigated ceramide and sphingosine concentration in the post-incubation media. Surprisingly, we did not observe any changes in extracellular CER after 40 h incubation with DEX + PA what is contradictory to TAG and DAG levels in media. These results are even more surprising when taking into account a fact that MTP also takes part in CER transport into media [16]. The only possible explanation may be a possibility of ceramide metabolism to other sphingolipid fractions instead of its transport out of the cell. Supporting this notion, we observed increased accumulation of SFO in HepG2 cells and simultaneously its decreased level in the media after 40 h incubation with both DEX and PA.

5. Conclusions

The results presented that possibly lipotoxicity has been exacerbated by GCs treatment through increased lipid transport into the cell along with the enhanced intracellular TAG, DAG and CER accumulation. On the other hand, prolonged exposure to DEX augmented the secretion of TAG and DAG into the medium, which may be DEX protective mechanism against NAFLD deterioration. After prolonged incubation with DEX + PA, we also observed increase in DAG' and TAG' n-3 PUFA and the decrease in DAG' n-6 PUFA activity what may be extremely important in the development of inflammation and progression of NAFLD to NASH.

Funding

This work was supported by the Medical University of Bialystok, Poland [grant number: SUB/1/NN/21/002/1118].

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Klaudia Sztolszterer: Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Ewa Harasim-Symbor:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Writing – review & editing. **Adrian Chabowski:** Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Karolina Konstantynowicz-Nowicka:** Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Append. ix ASupplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.044>.

References

- [1] M. Parafati, R.J. Kirby, S. Khorasanizadeh, F. Rastinejad, S. Malany, A nonalcoholic fatty liver disease model in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, created by endoplasmic reticulum stress-induced steatosis, *DMM Dis. Model. Mech.* 11 (2018), <https://doi.org/10.1242/dmm.033530>.
- [2] C.P. Woods, J.M. Hazlehurst, J.W. Tomlinson, Glucocorticoids and non-alcoholic fatty liver disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154 (2015) 94–103, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.020>.
- [3] W.W. Du, F. Liu, S.W. Shan, X.C. Ma, S. Gupta, T. Jin, D. Spaner, S.N. Krylov, Y. Zhang, W. Ling, B.B. Yang, Inhibition of dexamethasone-induced fatty liver development by reducing miR-17-5p levels, *Mol. Ther.* 23 (2015) 1222–1233, <https://doi.org/10.1038/mt.2015.64>.
- [4] A.K. Malkawi, K.H. Alzoubi, M. Jacob, G. Matic, A. Ali, A. Al Faraj, F. Almuhanna, M. Dasouki, A.M.A. Rahman, Metabolomics based profiling of Dexamethasone side effects in rats, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00046>.
- [5] J. Folch, M. Lees, G. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [6] J.-K. Min, H.-S. Yoo, E.-Y. Lee, W.-J. Lee, Y.-M. Lee, Simultaneous quantitative analysis of sphingoid base 1-phosphates in biological samples by o-phthalaldehyde precolumn derivatization after dephosphorylation with alkaline phosphatase, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 167–175, <https://doi.org/10.1006/ABIO.2002.5579>.
- [7] N. Zhao, X. Li, Y. Feng, J. Han, Z. Feng, X. Li, Y. Wen, The nuclear orphan receptor Nur77 alleviates palmitate-induced fat accumulation by down-regulating G0S2 in HepG2 cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23141-8>.

- [8] R.C. Su, A. Lad, J.D. Breidenbach, T.M. Blomquist, W.T. Gunning, P. Dube, A.L. Kleinhenz, D. Malhotra, S.T. Haller, D.J. Kennedy, Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the *Lepr^{db/j}* mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *PLoS One* 14 (2019) 1–17, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225604>.
- [9] C. Yan, J. Chen, N. Chen, Long noncoding RNA MALAT1 promotes hepatic steatosis and insulin resistance by increasing nuclear SREBP-1c protein stability, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1038/srep22640>.
- [10] P.N. Black, C. Ahowesso, D. Montefusco, N. Saini, C.C. DiRusso, Fatty acid transport proteins: targeting FATP2 as a Ga, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [11] L.L. Koornneef, J.K. Van Den Heuvel, J. Kroon, M.R. Boon, P.A.C. Hoen, K.M. Hettne, N.M. Van De Velde, K.B. Kolenbrander, T.C.M. Streefland, I.M. Mol, H.C.M. Sips, S.M. Kielbasa, H. Mei, J.K. Belanoff, A.M. Pereira, M.H. Oosterveer, H. Hunt, P.C.N. Rensen, O.C. Meijer, Selective glucocorticoid receptor modulation prevents and reverses nonalcoholic fatty liver disease in male mice, *Endocrinology* 159 (2018) 3925–3936, <https://doi.org/10.1210/en.2018-00671>.
- [12] A.M. D'Souza, J.L. Beaudry, A.A. Szigiato, S.J. Trumble, L.A. Snook, A. Bonen, A. Giacca, M.C. Riddell, Consumption of a high-fat diet rapidly exacerbates the development of fatty liver disease that occurs with chronically elevated glucocorticoids, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) 850–863, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00378.2011>.
- [13] A. Chabowski, M. Zendzian-Piotrowska, K. Konstantynowicz, W. Pankiewicz, A. Miklosz, B. Lukaszuk, J. Gorski, Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes, *Acta Physiol.* 207 (2013) 346–357, <https://doi.org/10.1111/apha.12022>.
- [14] Q. Li, J. Zhou, D. Zhang, X. Zhang, Z. Xu, D. Wu, Metabolic profiling reveals an abnormal pattern of serum fatty acids in MRL/lpr mice under treatment with prednisone, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00115>.
- [15] E. Patterson, R. Wall, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross, C. Stanton, Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids, *J. Nutr. Metab.* 2012 (2012) 539426, <https://doi.org/10.1155/2012/539426>.
- [16] G. Musso, R. Gambino, M. Cassader, Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 1–26, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.08.001>.
- [17] Y. Uehara, T. Engel, Z. Li, C. Goepfert, S. Rust, X. Zhou, C. Langer, C. Schachtrup, J. Wiekowski, S. Lorkowski, G. Assmann, A. Von Eckardstein, Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1, *Diabetes* 51 (2002) 2922–2928, <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2922>.
- [18] Y. Han, M. Lin, X. Wang, K. Guo, S. Wang, M. Sun, J. Wang, X. Han, T. Fu, Y. Hu, J. Fu, Basis of aggravated hepatic lipid metabolism by chronic stress in high-fat diet-fed rat, *Endocrine* 48 (2015) 483–492, <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0307-x>.
- [19] E.D. Bruder, P.C. Lee, H. Raff, Metabolic consequences of hypoxia from birth and dexamethasone treatment in the neonatal rat: comprehensive hepatic lipid and fatty acid profiling, *Endocrinology* 145 (2004) 5364–5372, <https://doi.org/10.1210/en.2004-0582>.
- [20] M. Sporstøl, S.A. Mousavi, W. Eskild, N. Roos, T. Berg, ABCA1, ABCG1 and SR-BI: hormonal regulation in primary rat hepatocytes and human cell lines, *BMC Mol. Biol.* 8 (2007), <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-5>.
- [21] F. Yang, Y. Dai, C. Min, X. Li, Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats, *Nutr. Metab.* 15 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0272-0>.
- [22] V.W. Dolinsky, D.N. Douglas, R. Lehner, D.E. Vance, Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone, *Biochem. J.* 378 (2004) 967–974, <https://doi.org/10.1042/BJ20031320>.
- [23] T.C. Chen, R.A. Lee, S.L. Tsai, D. Kanamaluru, N.E. Gray, N. Yiv, R.T. Cheang, J.H. Tan, J.Y. Lee, M.D. Fitch, M.K. Hellerstein, J.C. Wang, An ANGPTL4 – ceramide–protein kinase C axis mediates chronic glucocorticoid exposure–induced hepatic steatosis and hypertriglyceridemia in mice, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 9213–9224, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006259>.

11. Streszczenie w języku polskim

Wątroba jest głównym narządem regulującym procesy metaboliczne całego organizmu, dla której podstawowym substratem energetycznym są kwasy tłuszczowe. Ich prawidłowy poziom w komórkach wątroby warunkowany jest przez następujące procesy: 1) napływ, 2) utylizacja, 3) eksport, 4) lipogeneza oraz 5) β -oksydacja. W prawidłowych warunkach, transportowane do wnętrza komórek kwasy tłuszczowe podlegają w znacznym stopniu reakcjom β -oksydacji w mitochondriach i peroksysomach, bądź reakcjom estryfikacji i zostają zmagazynowane wewnątrz komórek wątroby. Zwiększone i powtarzające się w czasie spożycie kwasów tłuszczowych i nasilony ich dokomórkowy transport, przewyższający zapotrzebowanie energetyczne organizmu, sprzyjają ich nadmiernej akumulacji w postaci kropli lipidowych. Nasiloną akumulacją lipidów w wątrobie jest głównym czynnikiem rozwoju zmian stłuszczeniowych w NAFLD. W odpowiedzi na długotrwałą i zwiększoną podaż tłuszczów w diecie, jako kluczowego źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, dochodzi do aktywacji szlaków zapalnych w wątrobie i wzmożonej syntezy prozapalnych związków lipidowych, których bezpośrednim prekursorem jest kwas arachidonowy. To właśnie pochodne kwasu arachidonowego nasilają szlak sygnalizacji prozapalnej w komórkach wątroby sprzyjając progresji NAFLD do NASH. Jednym z celów przeprowadzonych badań było więc określenie punktów czasowych podczas karmienia wysokotłuszczowego, w których dochodzi do rozwoju zapalenia w wątrobie szczurów z wyindukowaną NAFLD.

W wyniku zwiększonej biodostępności kwasów tłuszczowych, nagromadzone w wątrobie znaczne ilości lipidów mogą ulegać także procesom estryfikacji, w wyniku których powstają lipotoksyczne mediatory, tj. ceramid czy sfingozyna. Związki te regulują nie tylko procesy metaboliczne, ale odgrywają istotną rolę w przekaźnictwie sygnałów wewnątrzkomórkowych, a zwiększona akumulacja wybranych frakcji sfingolipidów zakłóca metabolizm glukozy i osłabia działanie insuliny, prowadząc do rozwoju insulinooporności. Kolejnym celem badań było określenie zmian zawartości sfingolipidów i stopnia fosforylacji białek szlaku insulinowego w trakcie rozwoju NAFLD indukowanej dietą bogatotłuszczową. W świetle powyższych doniesień zasadne jest znalezienie i sprecyzowanie dokładnych punktów czasowych, w których dochodzi do rozwoju zaburzeń współwystępujących z prostym stłuszczeniem wątroby (np. insulinooporności), co ma na celu zapobieganie pogorszeniu łagodnego stłuszczenia do nieodwracalnych zmian w komórkach wątroby.

Istotą prowadzonych badań naukowych jest konieczność znalezienia czynnika farmakologicznego, który ograniczyłby powstawanie zmian towarzyszących NAFLD i jednocześnie progresji do NASH. Lekiem, który potencjalnie mógłby mieć zastosowanie

w leczeniu NAFLD jest deksametazon (DEX). Związek ten jest syntetycznym glikokortykosteroidem regulującym metabolizm kwasów tłuszczowych w komórkach wątroby. Hormon ten jest powszechnie stosowany w leczeniu wielu chorób o podłożu zapalnym. Efekt przeciwzapalny wynika ze zmniejszenia aktywności mikrosomalnych desaturaz ograniczających tempo syntezy kwasu arachidonowego, czyli bezpośredniego prekursora mediatorów zapalnych. Wiadomo także, że deksametazon nie promuje bezpośrednio syntezy triacylogliceroli (TAG) i lipogenezy *de novo* (DNL) w hepatocytach, a obserwowany efekt nasilenia wątrobowej syntezy TAG i DNL wynika z aktywacji procesów lipolizy tkanki tłuszczowej. Pomimo tego, brak jest doniesień precyzyjnie opisujących wpływ DEX na transport i metabolizm kwasów tłuszczowych w komórkach HepG2 (komórki nowotworu wątrobowokomórkowego). Następnym celem przeprowadzonych badań była ocena ekspresji białkowych transporterów kwasów tłuszczowych w komórkach HepG2 poddanych ekspozycji na deksametazon, co pozwoli jednoznacznie wskazać potencjalny wpływ na metabolizm lipidów w wątrobie.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelu *in vivo* (wątroba szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową przez okres 1, 2, 3, 4 i 5 tygodni) oraz modelu *in vitro* (ludzkie komórki nowotworu wątrobowokomórkowego poddane ekspozycji na deksametazon i lub/palmitynian w dwóch punktach czasowych – 16 h i 40 h). W modelu *in vivo* oznaczono zawartość kwasu arachidonowego w wybranych frakcjach lipidowych oraz zawartość poszczególnych sfingolipidów za pomocą odpowiednio chromatografii gazowo-cieczowej (GLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dodatkowo, wykonano oznaczenia ekspresji białek ze szlaku zapalnego oraz sfingolipidowego metodą Western Blot. Parametry stresu oksydacyjnego oraz poziom fosforylowanych białek ze szlaku insulinowego oznaczono wykorzystując komercyjnie dostępne kity kolorymetryczne, kity typu ELISA oraz zestaw do testów multipleksowych. W modelu *in vitro* całkowitą zawartość lipidów oraz sfingolipidów oznaczono metodami GLC i HPLC. Z kolei, ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych wykonano metodą Western Blot.

Z przeprowadzonych badań wynika, że indukowane dietą bogatotłuszczową stłuszczenie wątroby prowadzi do akumulacji kwasu arachidonowego w wątrobie już w pierwszym tygodniu od zastosowania karmienia doświadczalnego, a zmiany te współwystępują ze zwiększoną ekspresją cyklooksygenazy i lipooksygenazy. Procesowi powstawania stanu zapalnego w wątrobie towarzyszył również rozwój stresu oksydacyjnego, poprzez zmniejszenie zawartości enzymów antyoksydacyjnych z jednoczesnym zwiększeniem stężenia produktów peroksydacji lipidów. Ponadto, odnotowano nasilenie akumulacji

sfingozyny, sfinganiny i ceramidu, co pośredniczyło w rozwoju i podtrzymaniu insulinooporności w wątrobie szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową. W modelu *in vitro* zaobserwowano istotną zależność między czasem ekspozycji a efektem wywoływanym przez deksametazon. Krótkotrwała (16 h) inkubacja zwiększyła ekspresję dokomórkowych transporterów dla kwasów tłuszczowych (tj. FABPpm). Wykazano również, że przedłużona (40 h) inkubacja komórek HepG2 z deksametazonem zwiększyła aktywność antyzapalnego szlaku n-3 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz nasiliła sekrecję kwasów tłuszczowych do medium hodowlanego z jednoczesnym obniżeniem wewnątrzkomórkowej zawartości diacylogliceroli i triacylogliceroli.

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można stwierdzić, że dieta bogatotłuszczowa aktywuje powstawanie zmian zapalnych w komórkach wątroby już w pierwszym tygodniu, prowadząc do zwiększonej akumulacji prekursora zapalnego, jakim jest kwas arachidonowy. Karmienie wysokotłuszczowe powoduje również rozwój insulinooporności w wątrobie, poprzez nasilenie akumulacji sfingozyny, a efekt ten jest podtrzymywany przez zwiększenie stężenia sfinganiny i ceramidu. Co więcej, ekspozycja komórek HepG2 na deksametazon wykazuje działanie ochronne dopiero w przedłużonym czasie inkubacji poprzez nasilenie sekrecji kwasów tłuszczowych do medium i aktywację kwasów tłuszczowych ze szlaku antyzapalnego.

12. Streszczenie w języku angielskim

The liver is the main organ regulating the metabolic processes, for which fatty acids are the fundamental energy substrate. Their normal level in hepatic cells is regulated by the following processes: 1) influx, 2) utilization, 3) export, 4) lipogenesis, and 5) β -oxidation. In the standard conditions, fatty acids transported into the cells are oxidized in the mitochondria and peroxisomes or esterified and then stored inside the cells. The enhanced and repeated fatty acid uptake and intracellular transport, which exceeds the body's energy requirements, promotes excessive lipid accumulation in lipid droplets. The increased accumulation of lipids is a major factor in the development of simple steatosis during NAFLD. In response to long-term and increased supply of fat in the diet, as a key source of polyunsaturated fatty acids, inflammatory pathways are activated, and the synthesis of pro-inflammatory lipid compounds is elevated. The arachidonic acid derivatives that intensify the pro-inflammatory signaling pathway promote the NAFLD progression to NASH. One of the objectives of this study was to determine the time points of high-fat feeding, in which inflammation occurs in a rat model of NAFLD.

Moreover, as a result of the increased bioavailability of fatty acids, accumulated lipids may be also esterified into lipotoxic intermediates, such as ceramide or sphingosine. These compounds play a vital role in intracellular signal transduction pathway. The increased accumulation of selected sphingolipid fractions disrupts glucose metabolism and weakens insulin action, leading to the development of insulin resistance. The another aim of this study was to define changes in sphingolipids content and phosphorylation state of the proteins from the insulin signaling pathway during the development of NAFLD induced by a high-fat diet. Based on the above findings, determining the time point when alterations coexist with fatty liver development is important in preventing steatosis from deterioration into irreversible changes.

The study is a necessity to find a pharmacological factor that restrict the formation of changes in NAFLD and the progression to NASH. A pharmacological factor that could potentially be used in the treatment of NAFLD is dexamethasone (DEX). This compound is a synthetic glucocorticoid that regulates the hepatic metabolism of fatty acids. DEX is commonly used in the treatment of many inflammatory diseases. Anti-inflammatory effect has resulted from a reduction in the activity of microsomal desaturases that rate-limit the synthesis of arachidonic acid, as a direct precursor of inflammatory mediators. It is also known that dexamethasone does not directly promote the synthesis of triacylglycerols (TAG) and *de novo* lipogenesis (DNL) in hepatocytes. Above mentioned effect results from the activation

of lipolysis processes in adipose tissue. Despite numerous studies, there are no reports precisely describing the influence of DEX on fatty acids transport and metabolism in HepG2 (hepatocellular carcinoma cells). The assessment of the total expression of fatty acid transporters in HepG2 exposed to dexamethasone will indicate the potential protective effect on lipid metabolism.

The studies were carried out using an *in vivo* model (the liver of rats fed a high-fat diet for 1, 2, 3, 4, and 5 weeks) and an *in vitro* model (human hepatocellular carcinoma cells exposed to dexamethasone and/or palmitate at two different time points – 16 h and 40 h). In the *in vivo* model, the content of arachidonic acid in selected lipid fractions and the content of sphingolipids were measured using the gas-liquid chromatography (GLC) and the high-performance liquid chromatography (HPLC), respectively. Additionally, the expression of proteins involved in the regulation of inflammation and sphingolipid pathways was performed using the Western Blot method. The oxidative and antioxidative parameters as well as the level of phosphorylated proteins from the insulin signaling pathway were determined using commercially available colorimetric kits, ELISA, and multiplex kits. In the *in vitro* model, the total content of lipid and sphingolipid fractions was determined by the GLC and HPLC methods, respectively. The expression of fatty acid transporters was evaluated by the Western Blot method.

The studies showed that hepatic steatosis induced by high-fat diet increased the accumulation of arachidonic acid in the liver tissue already in the first week of experimental feeding. This observation coexists with the increased expression of cyclooxygenase and lipoxygenase. Due to a decrease in the content of antioxidant enzymes and a concomitant increase in the level of lipid peroxidation products, hepatic inflammation was followed by the development of oxidative stress. Moreover, in the liver of rats fed a high-fat diet an increase in the accumulation of sphingosine, sphinganine, and ceramide was noted. Thus, it mediated the development of insulin resistance. In the *in vitro* model, there was a significant association between the exposure period and the dexamethasone-induced impact. Short-term (16 h) incubation increased the expression of intracellular fatty acid transporters (i.e. FABPpm). It was also revealed that prolonged (40 h) incubation of HepG2 cells with dexamethasone increased the activity of the anti-inflammatory n-3 polyunsaturated fatty acids pathway and increased the secretion of fatty acids into the medium while simultaneously lowering the intracellular content of diacylglycerol and triacylglycerol.

In conclusion, the high-fat diet activated the formation of inflammatory changes in the liver already in the first week, leading to an increased accumulation of the inflammatory

precursor – arachidonic acid. A high-fat feeding also caused the development of insulin resistance by increasing the accumulation of sphingosine, and this effect is sustained by increasing the concentration of sphinganine and ceramide. Moreover, exposure of HepG2 cells to dexamethasone showed a protective effect only after a prolonged incubation time by enhancing the secretion of fatty acids into the medium and activating fatty acids from the anti-inflammatory pathway.

13. Oświadczenia współautorów

<i>Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.</i>		
Autorzy	Udział w przygotowaniu publikacji	Procentowy udział
doktorant – mgr Klaudia Sztolsztener	Wykonywanie analiz i interpretacji wyników, przygotowanie rycin, zebranie piśmiennictwa, napisanie manuskryptu.	70%
prof. dr hab. Adrian Chabowski	Opracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna, korekta manuskryptu.	10%
dr n. med. Ewa Harasim-Symbor	Stworzenie koncepcji badań, uczestnictwo w wykonywaniu doświadczenia.	5%
mgr Patrycja Bielawiec	Współuczestnictwo w wykonywaniu analiz.	5%
dr n. med. Karolina Konstanynowicz-Nowicka	Opracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	10%

<i>Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.</i>		
Autorzy	Udział w przygotowaniu publikacji	Procentowy udział
doktorant – mgr Klaudia Sztolsztener	Opracowanie koncepcji pracy, wykonywanie oznaczeń, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie rycin, zebranie piśmiennictwa i napisanie manuskryptu.	75%
dr n. med. Karolina Konstanynowicz-Nowicka	Opracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	10%
dr n. med. Ewa Harasim-Symbor	Stworzenie koncepcji badań, uczestnictwo w wykonywaniu doświadczenia.	5%
prof. dr hab. Adrian Chabowski	Ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	10%

<i>The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.</i>		
Autorzy	Udział w przygotowaniu publikacji	Procentowy udział
doktorant – mgr Klaudia Sztolsztener	Zebranie piśmiennictwa, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu.	70%
dr n. med. Ewa Harasim-Symbor	Stworzenie koncepcji badań, wykonanie doświadczeń i analiza wyników.	10%
prof. dr hab. Adrian Chabowski	Ocena merytoryczna i korekta manuskryptu.	10%
dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka	Stworzenie koncepcji badań, wykonanie doświadczeń, analiza wyników.	10%

Białystok, 20.12.2021 rok

mgr Klaudia Sztolsztener
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Adriana Chabowskiego, Ewy Harasim-Symbor, Patrycji Bielawiec, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w *Biomolecules*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 70%, polegał na wykonaniu analiz i interpretacji wyników, przygotowaniu rycin, zebraniu piśmiennictwa i napisaniu manuskryptu.

Klaudia Sztolsztener

Białystok, 20.12.2021 rok

prof. dr hab. Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Adriana Chabowskiego, Ewy Harasim-Symbor, Patrycji Bielawiec, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w *Biomolecules*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Klaudię Sztolsztener 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

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Ewa Harasim-Symbor
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Adriana Chabowskiego, Ewy Harasim-Symbor, Patrycji Bielawiec, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w *Biomolecules*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 5%, polegał na stworzeniu koncepcji badań, uczestnictwie w wykonywaniu doświadczenia.

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

Harasim - Symbor Ewa

Białystok, 20.12.2021 rok

mgr Patrycja Bielawiec
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Adriana Chabowskiego, Ewy Harasim-Symbor, Patrycji Bielawiec, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w *Biomolecules*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 5%, polegał na współuczestniczeniu w wykonywaniu analiz.

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

Patrycja Bielawiec

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Adriana Chabowskiego, Ewy Harasim-Symbor, Patrycji Bielawiec, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w *Biomolecules*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

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

Konstantynowicz-Nowicka Karoline

Białystok, 20.12.2021 rok

mgr Klaudia Sztolsztener
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 75%, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu oznaczeń, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu rycin, zebraniu piśmiennictwa i napisaniu manuskryptu.

Klaudia Sztolsztener

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i korekcie manuskryptu.

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

Konstantynowicz-Nowicka
Karoline

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Ewa Harasim-Symbor
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 5%, polegał na stworzeniu koncepcji badań, uczestnictwie w wykonywaniu doświadczenia.

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

Harasim-Symbor Ewa.

Białystok, 20.12.2021 rok

prof. dr hab. Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD.*” autorów: Klaudii Sztolszterer, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na ocenie merytorycznej oraz korekcie manuskryptu.

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

KLEKOWNIA
Zakładu Fizjologii
prof. dr hab. Adrian Chabowski

Białystok, 20.12.2021 rok

mgr Klaudia Sztolsztener
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w Biochemical and Biophysical Research Communications, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 70%, polegał na zebraniu piśmiennictwa, analizie i interpretacji wyników oraz napisaniu manuskryptu.

Klaudia Sztolsztener

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Ewa Harasim-Symbor
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w Biochemical and Biophysical Research Communications, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na stworzeniu koncepcji badań, wykonaniu doświadczeń oraz analizie wyników.

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

Harasim-Symbor Ewa

Białystok, 20.12.2021 rok

prof. dr hab. Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w Biochemical and Biophysical Research Communications, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na ocenie merytorycznej oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Klaudię Sztolsztener 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

Białystok, 20.12.2021 rok

dr n. med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka
Zakład Fizjologii

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

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate.*” autorów: Klaudii Sztolsztener, Ewy Harasim-Symbor, Adriana Chabowskiego, Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, opublikowanej w Biochemical and Biophysical Research Communications, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*”, wynoszący 10%, polegał na stworzeniu koncepcji badań, wykonaniu doświadczeń oraz analizie wyników.

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

Konstantynowicz-Nowicka
Karolina

14. Bibliografía

- [1] E. Juárez-Hernández, N.C. Chávez-Tapia, M. Uribe, V.J. Barbero-Becerra, Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease, *Nutrition Journal*. 15 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12937-016-0191-8/FIGURES/3>.
- [2] P. Nguyen, V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'H, B. Siliart, H. Dumon, Liver lipid metabolism, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92 (2008) 272–283. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0396.2007.00752.X>.
- [3] Z. Hall, N.J. Bond, T. Ashmore, F. Sanders, Z. Ament, X. Wang, A.J. Murray, E. Bellafante, S. Virtue, A. Vidal-Puig, M. Allison, S.E. Davies, A. Koulman, M. Vacca, J.L. Griffin, Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology*. 65 (2017) 1165–1180. <https://doi.org/10.1002/hep.28953>.
- [4] M. Régnier, A. Polizzi, H. Guillou, N. Loiseau, Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases, *Biochimie*. 159 (2019) 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.021>.
- [5] D.H. Fernando, J.M. Forbes, P.W. Angus, C.B. Herath, Development and Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Advanced Glycation End Products, *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/IJMS20205037>.
- [6] I. Pierantonelli, G. Svegliati-Baroni, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression from NAFLD to NASH, *Transplantation*. 103 (2019) E1–E13. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002480>.
- [7] A.K. Leamy, R.A. Egnatchik, J.D. Young, Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease, *Progress in Lipid Research*. 52 (2013) 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.004>.
- [8] G. Musso, M. Cassader, E. Paschetta, R. Gambino, Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis, *Gastroenterology*. 155 (2018) 282-302.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.031>.
- [9] T.D. Heden, E.M. Morris, M.L. Kearney, T.W. Liu, Y.M. Park, J.A. Kanaley, J.P. Thyfault, Differential effects of low-fat and high-fat diets on fed-state hepatic triacylglycerol secretion, hepatic fatty acid profiles, and DGAT-1 protein expression in obese-prone Sprague–Dawley rats, *Appl Physiol Nutr Metab*. 39 (2014) 472–479. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0410>.
- [10] J. Liu, L. Han, L. Zhu, Y. Yu, Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-

- alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats, *Lipids in Health and Disease*. 15 (2016) 27. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0194-7>.
- [11] S. Choi, A.J. Snider, Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases, *Mediators of Inflammation*. 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/520618>.
- [12] S.W. Park, M. Kim, S.W.C. Chen, K.M. Brown, V.D. D'Agati, H.T. Lee, Sphinganine-1-phosphate protects kidney and liver after hepatic ischemia and reperfusion in mice through S1P1 receptor activation, *Laboratory Investigation* 2010 90:8. 90 (2010) 1209–1224. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.102>.
- [13] K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, Y.A. Hannun, The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling, *Cellular Signalling*. 20 (2008) 1010. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2007.12.006>.
- [14] A. Alisi, A. Pastore, S. Ceccarelli, N. Panera, D. Gnani, G. Bruscalupi, M. Massimi, G. Tozzi, F. Piemonte, V. Nobili, Emodin prevents intrahepatic fat accumulation, inflammation and redox status imbalance during diet-induced hepatosteatosis in rats, *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2012) 2276–2289. <https://doi.org/10.3390/IJMS13022276>.
- [15] S. Matsuda, M. Kobayashi, Y. Kitagishi, Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *ISRN Endocrinology*. 2013 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/472432>.
- [16] R. Kohli, X. Pan, P. Malladi, M.S. Wainwright, P.F. Whittington, Mitochondrial reactive oxygen species signal hepatocyte steatosis by regulating the phosphatidylinositol 3-kinase cell survival pathway, *Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 21327–21336. <https://doi.org/10.1074/JBC.M701759200>.
- [17] Z. Yang, C. Xie, W. Xu, G. Liu, X. Cao, W. Li, J. Chen, Y. Zhu, S. Luo, Z. Luo, N. Lu, Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by *Helicobacter pylori* promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway, *Oncotarget*. 6 (2015) 31916. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5577>.
- [18] S. Li, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis, (2009). <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>.
- [19] R. Meli, G. Mattace Raso, C. Irace, R. Simeoli, A. Di Pascale, O. Paciello, T.B. Pagano, A. Calignano, A. Colonna, R. Santamaria, High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats, *PLoS ONE*. 8 (2013) e66570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066570>.

- [20] D. Maciejewska, P. Ossowski, A. Drozd, K. Ryterska, D. Jamioł-Milc, M. Banaszczak, M. Kaczorowska, A. Sabinicz, J. Raszeja-Wyszomirska, E. Stachowska, Metabolites of arachidonic acid and linoleic acid in early stages of non-alcoholic fatty liver disease—A pilot study, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 121 (2015) 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2015.09.003>.
- [21] J.Z. Nowak, Przeciwwzapalne “prowygaszeniowe” pochodne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega 3 i omega 6* Anti-inflammatory pro-resolving derivatives of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids, (n.d.). www.phmd.pl (accessed December 4, 2021).
- [22] L. Niederreiter, H. Tilg, Cytokines and fatty liver diseases, *Liver Research*. 2 (2018) 14–20. <https://doi.org/10.1016/J.LIVRES.2018.03.003>.
- [23] Z. Yesilova, H. Yaman, C. Oktenli, A. Ozcan, A. Uygun, E. Cakir, S.Y. Sanisoglu, A. Erdil, Y. Ates, M. Aslan, U. Musabak, M.K. Erbil, N. Karaeren, K. Dagalp, Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease, *The American Journal of Gastroenterology*. 100 (2005) 850–855. <https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2005.41500.X>.
- [24] A. Galli, G. Svegliati-Baroni, E. Ceni, S. Milani, F. Ridolfi, R. Salzano, M. Tarocchi, C. Grappone, G. Pellegrini, A. Benedetti, C. Surrenti, A. Casini, Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism, *Hepatology*. 41 (2005) 1074–1084. <https://doi.org/10.1002/HEP.20683>.
- [25] G. Svegliati-Baroni, I. Pierantonelli, P. Torquato, R. Marinelli, C. Ferreri, C. Chatgialloglu, D. Bartolini, F. Galli, Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease, *Free Radical Biology and Medicine*. 144 (2019) 293–309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029>.
- [26] B. Zhao, G.J. Xie, R.F. Li, Q. Chen, X.Q. Zhang, Dexamethasone protects normal human liver cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by upregulating the expression of P-glycoproteins, *Molecular Medicine Reports*. 12 (2015) 8093–8100. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4458>.
- [27] V.W. Dolinsky, D.N. Douglas, R. Lehner, D.E. Vance, Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone, *Biochemical Journal*. 378 (2004) 967–974. <https://doi.org/10.1042/BJ20031320>.
- [28] C.D. Berdanier, Role of glucocorticoids in the regulation of lipogenesis, *The FASEB Journal*. 3 (1989) 2179–2183. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.3.10.2666232>.

- [29] T.C. Chen, R.A. Lee, S.L. Tsai, D. Kanamaluru, N.E. Gray, N. Yiv, R.T. Cheang, J.H. Tan, J.Y. Lee, M.D. Fitch, M.K. Hellerstein, J.C. Wang, An ANGPTL4 – ceramide–protein kinase C axis mediates chronic glucocorticoid exposure–induced hepatic steatosis and hypertriglyceridemia in mice, *Journal of Biological Chemistry*. 294 (2019) 9213–9224. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006259>.
- [30] R.A. Pittner, R. Fears, D.N. Brindley, Interactions of insulin, glucagon and dexamethasone in controlling the activity of glycerol phosphate acyltransferase and the activity and subcellular distribution of phosphatidate phosphohydrolase in cultured rat hepatocytes, *The Biochemical Journal*. 230 (1985) 525–534. <https://doi.org/10.1042/BJ2300525>.
- [31] E. Heidarian, M. Rafieian-Kopaei, A. Khoshdel, M. Bakhshesh, Metabolic effects of berberine on liver phosphatidate phosphohydrolase in rats fed on high lipogenic diet: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4 (2014) S429. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C474>.
- [32] K. Minehira, S.G. Young, C.J. Villanueva, L. Yetukuri, M. Oresic, M.K. Hellerstein, R. V. Farese, J.D. Horton, F. Preitner, B. Thorens, L. Tappy, Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice, *Journal of Lipid Research*. 49 (2008) 2038–2044. <https://doi.org/10.1194/JLR.M800248-JLR200>.
- [33] T. Jiao, X. Yao, Y. Zhao, Y. Zhou, Y. Gao, S. Fan, P. Chen, X. Li, Y. Jiang, X. Yang, F.J. Gonzalez, M. Huang, H. Bi, Dexamethasone-Induced Liver Enlargement Is Related to PXR/YAP Activation and Lipid Accumulation but Not Hepatocyte Proliferation, *Drug Metabolism and Disposition*. 48 (2020) 830–839. <https://doi.org/10.1124/DMD.120.000061/-/DC1>.
- [34] E.D. Bruder, P.C. Lee, H. Raff, Metabolic consequences of hypoxia from birth and dexamethasone treatment in the neonatal rat: Comprehensive hepatic lipid and fatty acid profiling, *Endocrinology*. 145 (2004) 5364–5372. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0582>.
- [35] I.N.T. De Gómez Dumm, M.J.T. De Alaniz, R.R. Brenner, Effect of dietary fatty acids on $\Delta 5$ desaturase activity and biosynthesis of arachidonic acid in rat liver microsomes, *Lipids*. 18 (1983) 781–788. <https://doi.org/10.1007/BF02534636>.