

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 peroksosomach, 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. Nasilona akumulacja 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 przekazywaniu 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.