

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK



*Aleksandra Czumaj*

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach  
indukowane zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych**

PhD THESIS

**Changes in lipid metabolism in hepatocytes and adipocytes induced  
by altered fatty acid profile**

Promotor/Supervisor

dr hab. Tomasz Śledziński

Gdańsk, 2021

*Pragnę podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

*Przede wszystkim mojemu Promotorowi, dr hab. Tomaszowi Śledzińskiemu za opiekę merytoryczną oraz okazane wsparcie*

*Dziękuję współautorom za pomoc w badaniach będących podstawą publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.*

*Dziękuję przyszłemu Mężowi za troskę, cierpliwość i motywację*

Badania wykonano w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki (OPUS 6 2013/11/B/NZ5/00118) oraz projektu POWR.03.02.00-00-I026/17-00 (POWER 2) współfinansowanego ze środków Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

The research was carried out as part of the National Science Center project (OPUS 6 2013/11 / B / NZ5 / 00118) and the POWR.03.02.00-00-I026 / 17-00 (POWER 2) project co-financed from the Operational Program Knowledge, Education and Development 2014 -2020, from the European Social Fund in the Department of Pharmaceutical Biochemistry of the Medical University of Gdansk.

## Spis treści

1. Wykaz skrótów.....	5
2. Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....	7
3. Streszczenie.....	8
4. Abstrakt.....	9
5. Wstęp.....	10
5.1. Metabolizm kwasów tłuszczowych.....	10
5.2. Przewlekła choroba nerek .....	13
6. Cel pracy .....	16
7. Najważniejsze wyniki .....	17
7.1. Zmiany ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów w hepatocytach w modelu in vitro .....	17
7.2. Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach w odpowiedzi na kwas metylenohexadecanowy .....	22
7.3. Zmieniony profil kwasów tłuszczowych a poziom ekspresji leptyny .....	26
8. Wnioski .....	29
9. Piśmiennictwo .....	30
10. Załączniki .....	38
10.1 Załącznik A .....	39
10.2 Załącznik B .....	40
10.3 Załącznik C .....	41
10.4 Załącznik D .....	42

## 1. Wykaz skrótów

AA – Kwas arachidonowy (ang. Arachidonic acid)

ACC - Karboksylaza acetylo-CoA (ang. Acetyl-CoA carboxylase)

ALA – Kwas  $\alpha$ -linolenowy (ang.  $\alpha$ -linolenic acid)

API – Białko aktywatorowe 1 (ang. Activator protein 1)

ApoA1 – Apolipoproteina A1 (ang. Apolipoproteina A- I)

ApoB – Apolipoproteina B (ang. Apolipoproteina B)

C/EBP - Białko wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. CCAAT-enhancer-binding protein)

CKD – Przewlekła choroba nerek (ang. Chronic kidney disease)

CPOA2H – Kwas metylenoheksadekanowy (ang. Cyclopropaneoctanoic acid 2-hexyl)

DAG – Diacyloglicerol (ang. Diacylglycerol)

DGAT1 – Acylotransferaza diacyloglicerolowa 1 (ang. Digacylglycerol acyltransferase)

DGLA - Kwas dihomogamma-linolenowy (ang. Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid)

DHA – Kwas dokozaheksaenowy (ang. Docosahexaenoic acid)

DPA – Kwas dokozapentaenowy (ang. Docosapentaenoic acid)

EDA – Kwas eikozadienowy (ang. Eicosadienoic acid)

ELOVL – Elongazy kwasów tłuszczowych (ang. Fatty acid elongase)

EPA – Kwas eikozapentaenowy (ang. Eicosapentaenoic acid)

ETA – Kwas eikozatetraenowy (ang. Eicosatetraenoic acid)

ETE – Kwas eikozatrienowy (ang. Eicosatrienoic acid)

FA – Kwas tłuszczowy (ang. Fatty acid)

FADS – Desaturaza nienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. Fatty acid desaturase)

FASN - Syntaza kwasów tłuszczowych (ang. Fatty acid synthase)

GLA – Kwas  $\gamma$ -linolenowy (ang.  $\gamma$ -linolenic acid)

HMGCS – Syntaza 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA (ang. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase)

HMGCR – Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (ang. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)

HNF4 $\alpha$  – Czynn timer jądrowy hepatocytów 4 $\alpha$  (ang. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha)

LA – Kwas linolowy (ang. Linoleic acid)

LXR – Receptor wątrobowy X (ang. Liver X receptor)

MUFA – Jednonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. Monounsaturated fatty acids)

MTTP - Mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole (ang. Microsomal triglyceride transfer protein)

NAD<sup>+</sup> - Forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized form)

NADH - Forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form)

NF-1 – Czynn timer jądrowy 1 (ang. Nuclear factor I)

NF $\kappa$ B – Czynn timer jądrowy  $\kappa$ B (ang. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

OA – Kwas oleinowy (ang. Oleic acid)

PA – Kwas palmitynowy (ang. Palmitic acid)

PUFA – Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. Polyunsaturated fatty acids)

PPAR - Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. Peroxisome proliferator-activated receptors)

SCD - Desaturaza stearoilo-CoA (ang. Stearoyl-CoA desaturase)

SDA – Kwas stearydynowy (ang. Stearidonic acid)

SFA – Nasycone kwasy tłuszczowe (ang. Saturated fatty acids)

SREBP – Białko wiążące element odpowiedzi na sterole (ang. Sterol regulatory element-binding proteins)

TAG – Triacyloglicerole (ang. Triacylglycerols)

VLDL – Lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. Very Low Density Lipoproteins)

## 2. Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska pt. „Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach indukowane zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych” powstała w oparciu o cykl artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie publikacji stanowiących niniejszą rozprawę doktorską. Łączna wartość IF prezentowanych prac to 15,886. Łączna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac wynosi 375.

**Tabela 1.** Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. MNiSW – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, IF – impact factor w roku publikacji, Q – kwartył czasopisma w roku publikacji (\* - dane za 2020 niedostępne).

<b>Autorzy, tytuł publikacji, czasopismo</b>	<b>Punktacja MNiSW</b>	<b>IF</b>	<b>Q</b>
Justyna Korczyńska, <b>Aleksandra Czumaj</b> , Michał Chmielewski, Maciej Śledziński, Adriana Mika, Tomasz Śledziński <i>Increased expression of the leptin gene in adipose tissue of patients with chronic kidney disease : the possible role of an abnormal serum fatty acid profile.</i> Metabolites 2020, 10 (3):98 DOI: 10.3390/metabo10030098	70.000	4,097*	Q2*
<b>Aleksandra Czumaj</b> , Tomasz Śledziński <i>Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease.</i> Nutrients 2020, 12(2):356 DOI: 10.3390/nu12020356	140.000	5.089*	Q1*
<b>Aleksandra Czumaj</b> , Tomasz Śledziński, Juan-Jesus Carrero, Piotr Stepnowski, Małgorzata Sikorska-Wiśniewska, Michał Chmielewski, Adriana Mika. <i>Alterations of fatty acid profile may contribute to dyslipidemia in chronic kidney disease by influencing hepatocyte metabolism.</i> International Journal of Molecular Science 2019, 20(10): 2470 DOI: 10.3390/ijms20102470	140.000	4.556	Q1
<b>Aleksandra Czumaj</b> , Adriana Mika, Michał Chmielewski, Tomasz Śledziński <i>Cyclopropanoic acid 2-Hexyl upregulates the expression of genes responsible for lipid synthesis and release in human hepatic HepG2 cells</i> Lipids 2018, 53(3): 345-351 DOI: 10.1002/lipd.12034	25.000	2.144	Q3

### 3. Streszczenie

Kwasy tłuszczowe (FA) są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów. Stanowią one zróżnicowaną grupę związków, które w zależności od swojej budowy mogą wywierać różny wpływ na metabolizm. Zaburzenia w składzie jakościowym i ilościowym FA w surowicy (zaburzenia profilu FA) mogą mieć znaczący wpływ na takie zjawiska metaboliczne jak: regulacja ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów, stres oksydacyjny, insulinooporność i procesy zapalne, co może prowadzić do wzrostu ryzyka wystąpienia cukrzycy, nadciśnienia tętniczego czy choroby wieńcowej. Zaburzenia profilu FA mogą współwystępować z różnymi jednostkami chorobowymi, w tym z przewlekłą chorobą nerek (CKD). Do charakterystycznych dla CKD zaburzeń metabolicznych należy dyslipidemia – głównie wzrost poziomu triacylogliceroli (TAG) i obniżony poziom cholesterolu HDL. Oprócz tego, badania naszego zespołu wykazały, że wraz z postępem choroby w surowicy pacjentów z CKD wzrasta poziom jednonienasyconych FA (MUFA), natomiast poziom wielonienasyconych FA n-3 (PUFA n-3) i wielonienasyconych FA n-6 (PUFA n-6) obniża się. Dodatkowo u pacjentów z CKD zidentyfikowano również podwyższony poziom kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H). Samo stwierdzenie nieprawidłowości w profilu FA nie może jednak stanowić dowodu na bezpośredni wpływ tych zmian na metabolizm. Dlatego celem tej pracy było zbadanie jakie konsekwencje metaboliczne niosą z sobą zmiany profilu FA obserwowane u pacjentów z CKD, w tym czy zaburzenia profilu FA są odpowiedzialne za zmianę ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lipidów i czy w ten sposób mogą przyczyniać się do progresji choroby lub/oraz zwiększać ryzyko chorób towarzyszących.

Badania prowadzono w modelu *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych hepatocytów (HepG2) i różnicujących się do adipocytów fibroblastów (3T3-L1). Hodowle suplementowane były pojedynczymi FA w zmiennym stężeniu oraz FA ekstrahowanymi z surowicy pacjentów z CKD. Do analizy wybrano geny związane z metabolizmem lipidów kodujące enzymy i czynniki transkrypcyjne zaangażowane w procesy lipogenezy, syntezy TAG, powstawania lipoprotein oraz gen kodujący leptynę. Badania prowadzono na poziomie mRNA i białka.

Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej pokazały, że zmiany profilu FA obserwowane u pacjentów z CKD, takie jak obniżenie poziomu PUFA (zarówno n-3 jak i n-6), wzrost poziomu MUFA i wzrost poziomu CPOA2H, mogą wpływać na poziomy ekspresji genów zaangażowanych w syntezę FA, syntezę TAG, uwalnianie lipoprotein z hepatocytów i syntezę leptyny w adipocytach.

Podsumowując, nasze badania pokazują, że postępujące zmiany profilu FA w surowicy pacjentów w przebiegu CKD mogą przyczynić się do hipertriglicydemii związanej z CKD poprzez wpływ na ekspresję genów syntezy i uwalniania lipidów w hepatocytach. Ponadto, zmiany profilu FA w surowicy obserwowane w przebiegu CKD mogą przyczyniać się do podwyższonego poziomu leptyny we krwi, poprzez indukcję ekspresji genu kodującego tą adipokinę w adipocytach.



## 4. Abstrakt

Fatty acids (FA) are essential for the proper functioning of all organisms. They constitute a diverse group of compounds that, depending on their structure, may have different effects on metabolism. Disturbances in the qualitative and quantitative composition of serum FA (FA profile) may have a significant impact on such metabolic phenomena as regulation of the genes expression related to lipid metabolism, oxidative stress, insulin resistance, and the inflammatory processes, which may lead to an increased risk of diabetes, arterial hypertension or coronary artery disease. FA profile abnormalities can coexist with a variety of disease entities, including chronic kidney disease (CKD). One of the characteristic metabolic disorders in the course of CKD is dyslipidemia - mainly an increased level of triacylglycerols (TAG) and a decreased level of HDL cholesterol are reported. Our team's research has shown that as the disease progresses, the level of monounsaturated FA (MUFA) increases, while the level of n-3 polyunsaturated FA (n-3 PUFA) and n-6 polyunsaturated FA (n-6 PUFA) decreases in the serum of patients with CKD. In addition, in the patient's serum an increased level of an atypical FA - cyclopropaneoctanoic acid 2-hexyl (CPOA2H) was identified.

However, the mere finding of abnormalities in the FA profile cannot provide evidence of a direct metabolic effect of these changes. Therefore, the aim of this study was to investigate the metabolic consequences of the changes in the FA profile observed in patients with CKD, including whether disturbances of the FA profile are responsible for the alteration of the expression of genes involved in lipid metabolism and thus may contribute to disease progression and/or increase the risk of comorbid diseases.

The study was carried out in *in vitro* model using hepatocyte (HepG2) and fibroblast differentiating to adipocytes (3T3-L1) cell lines. The cells were supplemented with single FA in varying concentrations or with FAs isolated from the patient's serum. The expression of the genes related to lipid metabolism, encoding enzymes, and transcription factors involved in lipogenesis, TAG synthesis, lipoprotein formation, and leptin genes was analyzed. The research was carried out on the mRNA and protein levels.

The research shows that changes in the FA profile observed in patients with CKD, such as a decrease in PUFA levels (both n-3 and n-6), an increase in MUFA content, an increase in CPOA2H, may affect the expression of genes involved in the synthesis of FA, the synthesis of TAG, the release of lipoproteins from hepatocytes, and the synthesis of leptin in adipocytes.

In conclusion, this research shows that progressive changes in the serum FA profile of CKD patients may contribute to CKD-associated hypertriglyceridemia by affecting the expression of genes for lipid synthesis and release in hepatocytes. Moreover, the changes in the serum FA profile observed in the course of CKD may contribute to the elevated level of leptin in blood by inducing gene expression of this adipokine in adipocytes.

## 5. Wstęp

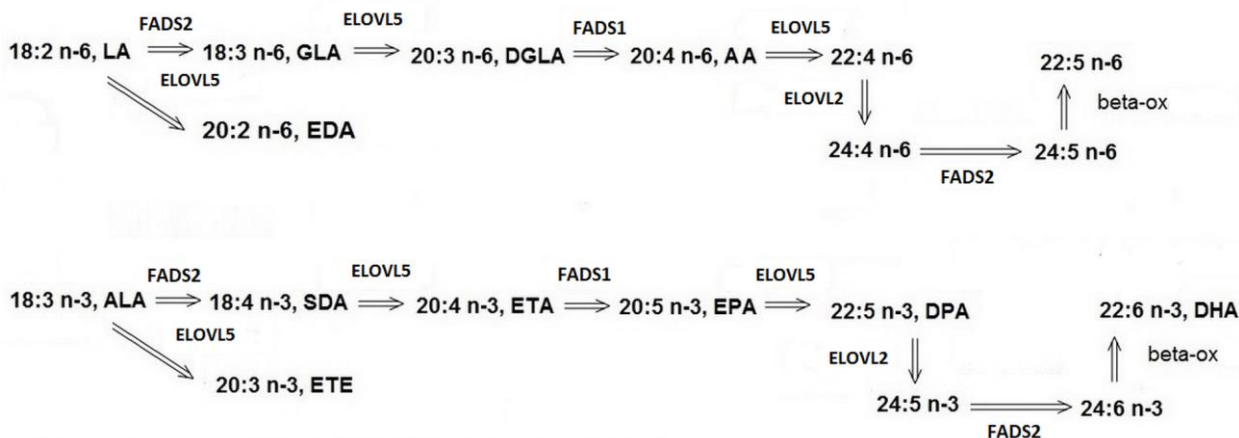
### 5.1. Metabolizm kwasów tłuszczowych

Lipidy to zróżnicowana grupa związków obejmująca ponad 1,6 miliona typów cząsteczek z czego większość zawiera kwasy tłuszczowe (FA) w swojej strukturze [1–3]. Metabolizm FA, w tym ich wchłanianie w jelicie, transport we krwi, pobieranie do komórek, synteza *de novo* oraz degradacja, zapewnia komórce przede wszystkim energię oraz materiał do budowy błon komórkowych (fosfolipidy takie jak fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina) [4,5]. Co więcej, FA mogą być przekształcane w związki sygnalizacyjne (np. eikozanoidy, kwas fosfatydowy, diacyloglicerol, kwas lizofosfatydowy) oraz mogą być używane do potranslacyjnej modyfikacji białek (np. palmitoilacja, przyłączanie glikozylofosfatydyloinozytolu) [6–8]. Można więc uznać, że FA są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów.

FA występujące we krwi człowieka to również biologicznie aktywne związki wpływające na metabolizm różnych tkanek i narządów [9,10]. Biologiczne działanie FA zależy od ich budowy, w tym od ich długości i liczby wiązań nienasyconych [11,12]. Najważniejsze w tym kontekście wydaje się być rozróżnienie na kwasy wielonienasycone n-3 (PUFA n-3) i kwasy wielonienasycone n-6 (PUFA n-6). PUFA n-3 i PUFA n-6 mogą wywoływać różne efekty biologiczne ze względu na swoją zdolność modyfikacji składu błon komórkowych, regulacji transkrypcji genów i modulowania szlaków sygnalizacji komórkowej [13,14]. PUFA są prekursorami różnych mediatorów lipidowych, w tym prozapalnych i przeciwzapalnych eikozanoidów i dokozanoidów, zaliczanych do grupy oksylipin [15,16]. Prostacykliny, prostaglandyny i leukotrieny wywodzące się z PUFA biorą udział w reakcjach zapalnych i odpowiedzi immunologicznej. Kwas arachidonowy (AA) jest prekursorem związków prozapalnych, natomiast kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dihomo- $\gamma$ -linolenowy (DGLA) są substratami do syntezy eikozanoidów przeciwzapalnych. Kwas dokozaheksaenowy (DHA) jest również prekursorem dokozanoidów o działaniu przeciwzapalnym i immunomodulującym, takich jak rezolwiny i protektyny [17,18].

Na skład ilościowy i jakościowy FA we krwi wpływa nie tylko dieta, ale również poziom ich metabolizmu w poszczególnych tkankach i narządach. Zarówno FA pochodzące z diety lub syntezowane *de novo* mogą być przekształcane przez enzymy zaangażowane w procesy elongacji i desaturacji. Za desaturację FA odpowiedzialne są desaturazy FA. Enzymy te katalizują biosyntezę jednonienasyconych FA (MUFA) i przemiany PUFA poprzez konwersję wiązań pojedynczych (C-C) w wiązania podwójne (C=C) w łańcuchu acylowym. W organizmie człowieka synteza PUFA *de novo* nie jest możliwa, dlatego 2 egzogenne FA (kwas  $\alpha$ -linolenowy i kwas linolowy) muszą pochodzić z diety [19]. Konwersja nasyconych FA (SFA) do MUFA jest katalizowana przez stearoil-CoA desaturazę-1 (SCD1), natomiast PUFA powstają w reakcjach katalizowanych przez inną grupę desaturaz: desaturazy nienasyconych FA (FADS). Elongazy (ELOVL) odpowiadają za wydłużenie łańcucha węglowego (Ryc. 1). W genomie ludzkim zidentyfikowano siedem podtypów elongaz FA (*ELOVL1-7*). Elongazy *ELOVL1*, *ELOVL3*, *ELOVL6* odpowiadają za wydłużanie SFA i MUFA, a *ELOVL2*, *ELOVL4* i *ELOVL5*

odpowiadają za wydłużanie PUFA [20–22]. Rola i specyficzność substratowa ELOVL7 nie zostały do końca zbadana. Zmiany poziomu ekspresji i aktywności wyżej wymienionych enzymów zaangażowanych w przekształcanie FA mogą wpływać na skład ilościowy i jakościowy FA we krwi.



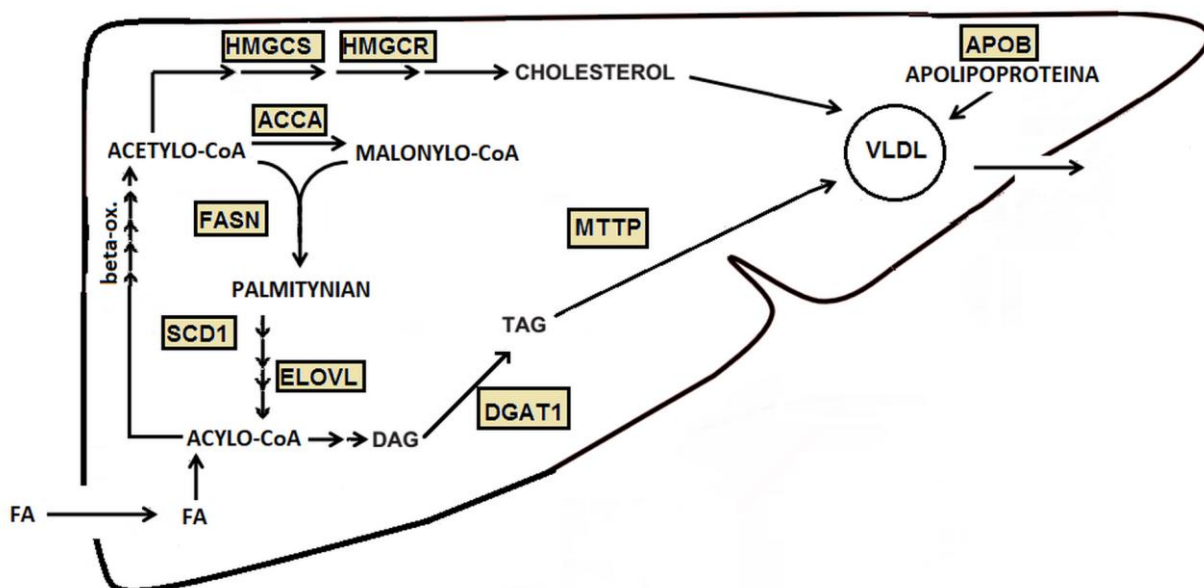
**Rycina 1.** Ogólny schemat możliwych przekształceń kwasów wielonienasyconych n-3 i n-6 u ludzi. ALA - kwas  $\alpha$ -linolenowy, 18: 3 n-3, AA - kwas arachidonowy, 20: 4 n-6, beta-ox -  $\beta$ -oksydacja, DGLA - kwas dihomo- $\gamma$ -linolenowy, 20: 3 n-6, DHA - kwas dokozaheksaenowy, 22: 6 n-3, DPA - kwas dokozapentaenowy, 22: 5 n-3, FADS1 - desaturazy delta-5, FADS2 - desaturaza delta-6, EDA - kwas eikozadienowy, 20: 2 n-6, ELOVL - elongazy, ETA - kwas eikozatetraenowy, 20: 4 n-3, ETE - kwas eikozatrienowy, 20: 3 n-3, EPA - kwas eikozapentaenowy, 20: 5 n-3, GLA - kwas  $\gamma$ -linolenowy, 18: 3 n-6, LA - kwas linolowy, 18: 2 n-6, 18: 1 n-9, SDA - kwas stearydynowy, 18: 4 n-3. [Na podstawie: załącznik B].

Z punktu widzenia metabolizmu FA najbardziej istotne wydają się być wątroba i tkanka tłuszczowa, dlatego to właśnie na komórkach tych narządów skupia się niniejsza praca. Wychwyt FA przez hepatocyty odbywa się przez specjalne transportery i translokazy (np. FATP2, FATP5, CD36/FAT) [23]. Szybkość wychwytu FA z krwi może zależeć między innymi od ogólnego poziomu krążących FA. FA pobierane przez hepatocyty mogą pochodzić z hydrolizy triacylogliceroli (TAG) lub mogą to być wolne, niezestryfikowane FA. Długołańcuchowe FA przyjęte z pokarmem są estryfikowane do TAG i pakowane w chylomikrony w enterocytach i w tej postaci trafiają do krwi, FA o krótkiej i średniej długości łańcucha mogą być wprowadzane do krwi bezpośrednio (bez inkorporowania ich do chylomikronów). Hydroliza i uwalnianie FA z TAG odbywa się w wyniku działania lipazy lipoproteinowej oraz lipazy wątrobowej.

Hepatocyty mają zdolność do syntezy FA *de novo*, a proces ten jest nazywany lipogenezą. W wątrobową lipogenezę *de novo* zaangażowane są różne czynniki transkrypcyjne i enzymy, przy czym tempo lipogenezę regulowane jest głównie na poziomie transkrypcji [24]. Synteza FA zachodzi w cytozolu jako sekwencyjne wydłużanie łańcucha węglowego przez dołączanie dwuwęglowych jednostek acetylowych. Syntaza FA (FASN) to wielofunkcyjny enzym odpowiedzialny za syntezę palmitynianu [25]. Etapem ograniczającym szybkość tego szlaku jest reakcja katalizowana przez karboksylazę acetylo-CoA (ACC). W genomie człowieka są dwa geny kodujące enzymy o aktywności karboksylazy acetylo-CoA: ACCA koduje ACC- $\alpha$  (enzym

ograniczający szybkość syntezy długołańcuchowych FA), *ACCB* koduje ACC- $\beta$  (enzym kontrolujący utlenianie FA w mitochondriach) [26–28].

FA obecne w wątrobie mogą zostać utlenione w celu wytworzenia acetylo-CoA i dostarczenia komórce energii w postaci ATP, mogą również zostać wykorzystane do syntezy TAG. Acylotransferaza diacyloglicerolowa (DGAT) to enzym, który katalizuje ostatni etap syntezy TAG z diacyloglicerolu (DAG) i acylo-CoA. *DGAT1* i *DGAT2* to dwa niespokrewnione geny, których produkty posiadają aktywność przenoszenia grupy acylowej na DAG. Powstałe TAG mogą być przechowywane w cytoplazmie jako krople lipidowe, jednak aby uniknąć namiaru lipidów w hepatocytach (przyczyna stłuszczenia wątroby), większość TAG jest wydzielana do krwi jako lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL). Wyniki badań w modelach zwierzęcych i komórkowych pokazują że DGAT2 odgrywa główną rolę w akumulacji lipidów w cytozolu (tworzenie kropli lipidowych), podczas gdy DGAT1 odgrywa rolę w składaniu VLDL [29–31]. Mechanizm syntezy i wydzielania VLDL z wątroby został dobrze opisany w literaturze naukowej. Kluczowymi elementami tego szlaku są apolipoproteina B100 (kodowana przez gen *ApoB*) i mikrosomalne białko przenoszące TAG (MTTP), (Ryc. 2).



**Rycina 2.** Uproszczony schemat możliwych losów kwasów tłuszczowych w wątrobie. Geny przedstawiono w ramkach. ACCA - karboksylaza acetylo-CoA, APOB - apolipoproteina B, Beta-ox. -  $\beta$ -oksydacja, DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, ELOVL - elongazy kwasów tłuszczowych, FA - kwasy tłuszczowe, FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, HMGCS - syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, HMGCR - reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, MTTP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, SCD1 - desaturaza stearoilo-CoA, VLDL - lipoproteiny o bardzo małej gęstości.

Od dawna w publikacjach naukowych tkanka tłuszczowa nie jest już traktowana wyłącznie jako bierny magazyn TAG, wiadomo że może ona uczestniczyć aktywnie w metabolizmie lipidów, w tym w uwalnianiu FA do krwi [32,33]. Ponadto, tkanka tłuszczowa

wydzielać może aktywne biologicznie peptydy – adipokiny, takie jak leptyna oraz adiponektyna [34,35].

Regulacja ekspresji i aktywności enzymów metabolizmu FA jest bardzo złożonym zjawiskiem. Poziom spożycia FA i regulacja transkrypcji są dobrze poznanymi determinantami aktywności enzymów metabolizmu FA. Wiele badań dowiodło, że FA przyjmowane z dietą mogą wpływać na ekspresję genów metabolizmu FA [36,37]. Przykładowo ekspresja zarówno FADS1, jak i FADS2 ulegała zmniejszeniu po suplementacji różnych PUFA, zarówno w modelach eksperymentalnych *in vitro*, jak i *in vivo* [38–41]. W rejonach promotorowych genów metabolizmu FA zidentyfikowano wiele motywów umożliwiających wiązanie różnych czynników transkrypcyjnych, w tym białka wiążącego się z sekwencją wzmacniającą CCAAT (C/EBP), białko wiążące element odpowiedzi na sterole (SREBP), czynnik jądrowy 1 (NF-1), czynnik transkrypcyjny Sp1, białko aktywatorowe 1 (AP1), czynnik jądrowy hepatocytów 4 (HNF4) i receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów (PPAR) [42–44]. Epigenetyczne modyfikacje (tj. metylacja DNA) mogą również przyczyniać się do zmian w aktywnościach tych enzymów [45,46]. Co więcej, badania prowadzone w ostatnich latach sugerują, że aktywność enzymów metabolizmu FA może zmieniać się w odpowiedzi na cytozolowy stosunek formy utlenionej dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD<sup>+</sup>) do formy zredukowanej dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Obniżony stosunek NAD<sup>+</sup>/NADH w cytozolu może zwiększać aktywność niektórych enzymów metabolizmu FA [45].

Profil FA, czyli skład ilościowy oraz jakościowy FA, ma znaczący wpływ na utrzymanie równowagi metabolicznej w organizmie. Zaburzenia profilu FA w surowicy mogą być związane ze stresem oksydacyjnym, lipotoksycznością i insulinopornością [46]. Biorąc pod uwagę złożoną rolę, jaką FA odgrywają w organizmie, zmiany profilu FA mogą nieść z sobą poważne konsekwencje dla regulacji wielu procesów zachodzących w organizmie, zarówno tych związanych z metabolizmem podstawowym jak i procesami zaangażowanymi w rozwój różnych stanów patologicznych. Przykładowo, zmiany aktywności FADS zostały powiązane z chorobą niedokrwienną serca, chorobą Leśniowskiego-Crohna, zespołem metabolicznym i otyłością [47–50]. Co więcej, zmienione poziomy FA zostały zaobserwowane m.in. przy reakcjach autoimmunologicznych, chorobach układu krążenia, nowotworach, cukrzycy oraz przewlekłej chorobie nerek [51,52]. Konsekwencje wynikające ze zmian profilu FA nie są jeszcze jednak w pełni poznane.

## 5.2. Przewlekła choroba nerek

Przewlekła choroba nerek (CKD) to wielobjawowy zespół chorobowy charakteryzujący się przewlekłym funkcjonalnym lub strukturalnym uszkodzeniem nefronów, prowadzącym do obniżenia funkcji wydalniczej nerek. Choroba ta ma tendencje do progresji i w swoim schyłkowym stadium może wymagać leczenia nerkozastępczego. W Polsce częstość jej występowania sięga prawie 6% populacji ogólnej, co przy ogólnoswiatowym poziomie 14% jest zaskakująco niskim wynikiem [53,54]. Niezależnie od częstości występowania stałym elementem klinicznym tej choroby jest kilkakrotnie wyższe obciążenie pacjentów incydentami sercowo-naczyniowymi w porównaniu do ludzi z prawidłową funkcją nerek [55]. Choroby układu

krążenia są najczęściej występującymi chorobami współistniejącymi u pacjentów z zaawansowaną CKD [56]. Śmiertelność pacjentów z CKD związana jest głównie z przyczynami sercowo-naczyniowymi [57]. W piśmiennictwie naukowym jako potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za zwiększone ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych wymienia się zmieniony poziom lipidów i adipokin w surowicy chorych na CKD [58–60].

Zaburzenia lipidowe są częstym powikłaniem CKD. Pojawiają się one już na wczesnych etapach tej choroby i narastają w miarę jej postępu. Do najczęściej opisywanych dyslipidemii towarzyszących CKD należą niski poziom cholesterolu HDL i wysoki poziom TAG [61,62], jednak ostatnio coraz szerzej w piśmiennictwie naukowym komentowane są zmiany w profilu FA w surowicy pacjentów z CKD [63]. Różne badania, w tym naszego zespołu, wykazały zmiany w proporcjach określonych grup FA w surowicy pacjentów z CKD, w tym obniżanie się poziomu PUFA n-3 i podwyższanie się poziomu MUFA wraz z postępem choroby [64–66].

Ponadto, badania naszego zespołu pokazały, że w surowicy pacjentów z CKD zwiększa się również zawartość nietypowego FA z grupą cykliczną – kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H) [67]. Tego typu FA z ugrupowaniem cyklopropanowym występują głównie w fosfolipidach i glikolipidach wchodzących w skład błon komórkowych wielu gatunków bakterii, pierwotniaków i roślin, zalewie kilka prac wspomina o ich występowaniu u zwierząt [68–72]. Bardzo mało prac opisuje FA z ugrupowaniem cyklopropanowym u ludzi, dlatego zidentyfikowanie ich w ludzkiej surowicy i tkance tłuszczowej oraz zaobserwowanie zmiany ich poziomu w stanach patologicznych jest tym bardziej niezwykle [73–75]. Biologiczne konsekwencje zwiększonego poziomu CPOA2H u ludzi nie są dobrze poznane. Z nielicznych badań wiadomo, że FA z ugrupowaniem cyklopropanowym mogą wykazywać aktywność biologiczną. Na przykład kwas 2-heksylo-cyklopropanodekanowy zwiększał aktywność ludzkiej cyklooksygenazy, kwas cis-9,10-metylenoheksadekanowy hamował aktywność ATPazy aktomiozyny w mięśniu sercowym świnek morskich, syntetyczna pochodna linolowego FA zawierająca dwa pierścienie cyklopropanowe, kwas 8-[2-(2-pentylocyklopropylometylo)-cyklopropylo]-oktanowy selektywnie aktywował kinazę białkową C [76–78].

Dyslipidemia obserwowana u pacjentów z CKD jest jednym z czynników ryzyka wystąpienia chorób współistniejących, w tym również chorób sercowo-naczyniowych [57,79,80]. Ponadto, zmiany w profilu lipidowym mogą aktywnie uczestniczyć w pogorszeniu czynności nerek, przyczyniając się w ten sposób do zaostrzenia choroby [79,81]. Pacjenci cierpiący na CKD są potencjalnie podatni na zaburzenia FA z powodu zmian metabolicznych związanych z zatrzymywaniem toksyn mocznicowych, a także z powodu ograniczeń dietetycznych i upośledzonego przyjmowania pokarmu w wyniku przewlekłego zatrucia. Jednak konsekwencje obserwowanych u pacjentów zmian w profilu FA nie są w pełni poznane. Badania spoza nefrologii pokazują, że FA mogą wpływać na liczne szlaki metaboliczne zaangażowane w przekształcanie lipidów i lipoprotein. Mogą one regulować ekspresję genów i kaskady sygnalizacyjne, np. poprzez czynniki transkrypcyjne, w tym białka SREBP, PPAR, czynnik jądrowy hepatocytów 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), wątrobowy receptor X (LXR) i czynnik jądrowy  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) [82–86]. FA przyjmowane z dietą mogą wpływać na poziomy ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lipidów, prawdopodobne wydaje się więc założenie, że zmiany profilu FA związane z przebiegiem CKD również mogą mieć wpływ na ich metabolizm [87,88], jednak by stwierdzić to z całą pewnością potrzebne są badania na poziomie molekularnym komórek dwóch

najważniejszych organów zaangażowanych w metabolizm lipidów - wątroby i tkanki tłuszczowej.

Zmiany w poziomie adipokin również rozważane były w kontekście progresji CKD i występowania chorób współistniejących [89–92]. Leptyna jest jednym z hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową i uważana jest za istotną cząsteczkę sygnałową regulującą homeostazę energetyczną organizmu [93,94]. Białko to odgrywa również ważną rolę w regulacji odporności i stanów zapalnych, które są ściśle związane ze stresem oksydacyjnym i dysfunkcją nabłonka, co może wpływać na ryzyko zaburzeń sercowo-naczyniowych [95–97]. Wcześniejsze badania, w tym również badania naszego zespołu pokazały, że w surowicy pacjentów z CKD poziom leptyny jest podwyższony w porównaniu do jego poziomu u osób zdrowych [98–100]. Mechanizm tego procesu nie jest jednak dobrze poznany. Wyższe poziomy leptyny u pacjentów z CKD mogą być związane z gorszym rokowaniem. Wiele badań wskazuje, że leptyna może być zaangażowana w progresję choroby i rozwój powikłań [97,101]. Poziom leptyny może odgrywać ważną rolę dla różnych komórek nerkowych, w tym dla komórek mezangialnych, śródbłónka naczyń i komórek podocytarnych. Przykładowo, leptyna hamuje ekspresję nefryny, podocyny, podoplaniny i podokaliksyny- cząsteczek tworzących specyficzną cytoarchitekturę podocytów, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania kłębuszkowej bariery filtracyjnej [97]. Późne stadia CKD związane są z niedożywieniem białkowo-energetycznym, a jako że leptyna hamuje poczucie apetytu, jej zwiększone stężenie może przyczyniać się do pogłębienia zaburzeń łaknienia oraz dalszego pogorszenia stanu odżywienia pacjentów [102].

Zarówno leptyna jak i FA są istotnymi elementami komunikacji tkanki tłuszczowej z innymi ważnymi metabolicznie organami, w tym z nerkami. Podwyższony poziom leptyny i zmiany profilu FA to czynniki, które mogą być zaangażowane w patogenezę i powikłania CKD, mimo to jak dotąd żadne badanie nie próbowało zgłębić relacji między nimi, dlatego w ramach badań prowadzonych w zakresie niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy zbadany został wpływ nieprawidłowego profilu FA na poziom leptyny.

## 6. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie konsekwencji zaburzeń profilu FA obserwowanych u pacjentów z CKD na metabolizm lipidów w hepatocytach i adipocytach w modelu *in vitro* oraz ocena czy obserwowane zaburzenia lipidowe mogą przyczyniać się do progresji choroby lub zwiększać ryzyko wystąpienia chorób towarzyszących. Szczegółowe cele obejmowały:

- a) zbadanie konsekwencji zmienionego profilu FA obserwowanego u pacjentów z CKD na poziom ekspresji wybranych genów zaangażowanych w metabolizm lipidów w hepatocytach,
- b) zbadanie wpływu nietypowego FA - CPOA2H - na poziom ekspresji wybranych genów zaangażowanych w metabolizm lipidów w hepatocytach i adipocytach,
- c) zbadanie konsekwencji zmienionego profilu FA obserwowanego u pacjentów z CKD na poziom ekspresji leptyny w adipocytach,
- d) zbadanie wpływu nietypowego FA - CPOA2H - na poziom ekspresji leptyny w adipocytach.



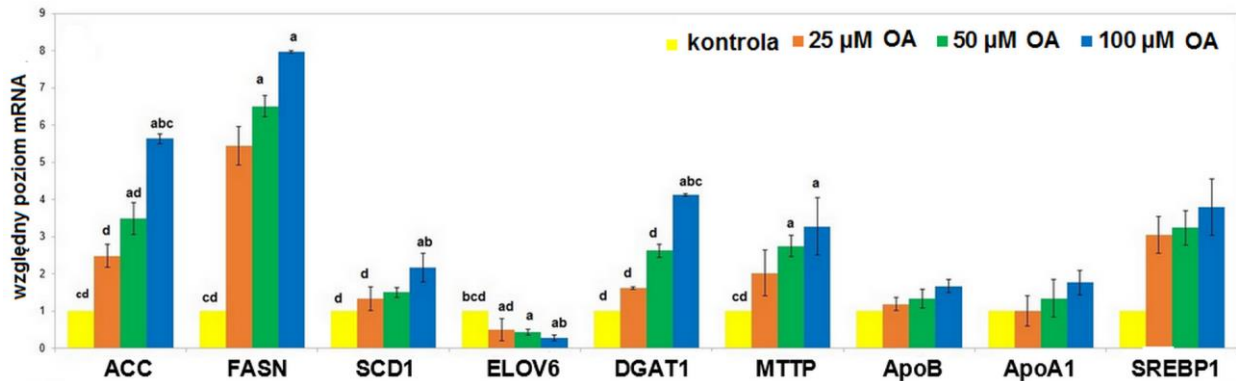
## 7. Najważniejsze wyniki

### 7.1. Zmiany ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów w hepatocytach w modelu *in vitro*

Badania naszego zespołu pokazały, że zawartość poszczególnych FA w surowicy u chorych na CKD różni się w porównaniu do profilu FA w surowicy osób zdrowych (Tabela 2 w załączniku C). Generalnie zmiany te można opisać jako zmniejszanie się zawartości PUFA n-3 i PUFA n-6 oraz zwiększaniu się zawartości MUFA wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby (Rycina 1 w załączniku C), dlatego jednym z pierwszych zadań badawczych realizowanych w ramach tej rozprawy doktorskiej była ocena konsekwencji tych zmian w modelu *in vitro*.

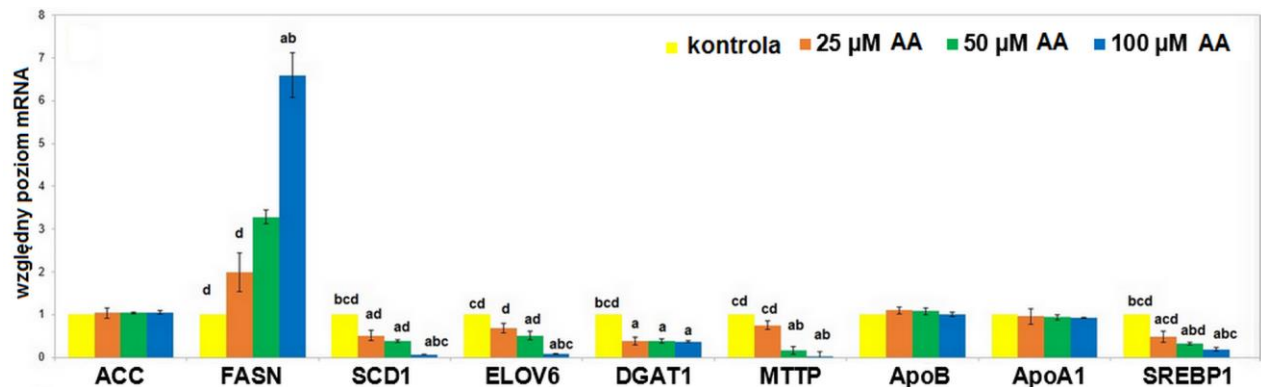
Aby sprawdzić czy zmiany profilu FA zaobserwowane w surowicy pacjentów z CKD mają wpływ na ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów w wątrobie wykorzystano linię komórkową ludzkich hepatocytów - HepG2. Jest to linia unieśmiertelniona, ale zachowująca metabolizm zbliżony do normalnych hepatocytów. Ze względu na swoją stabilność i dokładnie opisaną charakterystykę, linia ta jest powszechnie stosowana w badaniach hepatocytów w warunkach *in vitro*. Komórki HepG2 traktowane były przez okres 48h następującymi FA: kwasem oleinowym (OA), DHA i AA, reprezentującymi kolejno MUFA, PUFA n-3 i PUFA n-6. Badane FA podawane były w trzech wybranych stężeniach eksperymentalnych (25 μM, 50 μM i 100 μM). W ramach przeprowadzonych badań sprawdzono również wpływ innych FA z danych grup (tj. MUFA, n-6 PUFA i n-3 PUFA), jednak otrzymane wyniki były tożsame z wynikami otrzymanymi dla kwasów reprezentujących daną grupę (OA, DHA i AA), dlatego nie wszystkie wyniki zostały pokazane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Poziomy ekspresji genów z hodowli eksperymentalnych porównywano z hodowlami kontrolnymi, które rosły w standardowych warunkach zalecanych przez dostawcę linii komórkowej. Stwierdzono, że dodatek FA w zastosowanych stężeniach eksperymentalnych nie miał wpływu na przeżywalność komórek.

Hodowla komórek HepG2 z kwasem OA spowodowała znaczący wzrost poziomu mRNA genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę i desaturację FA - *ACC*, *FASN*, *SCD1*, syntezę TAG - *DGATI*, a także w tworzenie VLDL - *MTTP*. Zaobserwowano również trend w kierunku podwyższonego poziomu mRNA dla *SREBP1* - czynnika transkrypcyjnego promującego syntezę lipidów oraz apolipoproteiny A1 (*ApoA1*) i apolipoproteiny B (*ApoB*). Jedyńm genem dla którego zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA była elongaza 6 (*ELOVL6*). W przypadku każdego z analizowanych genów obserwowane efekty zależne były od dawki FA (Ryc. 3).



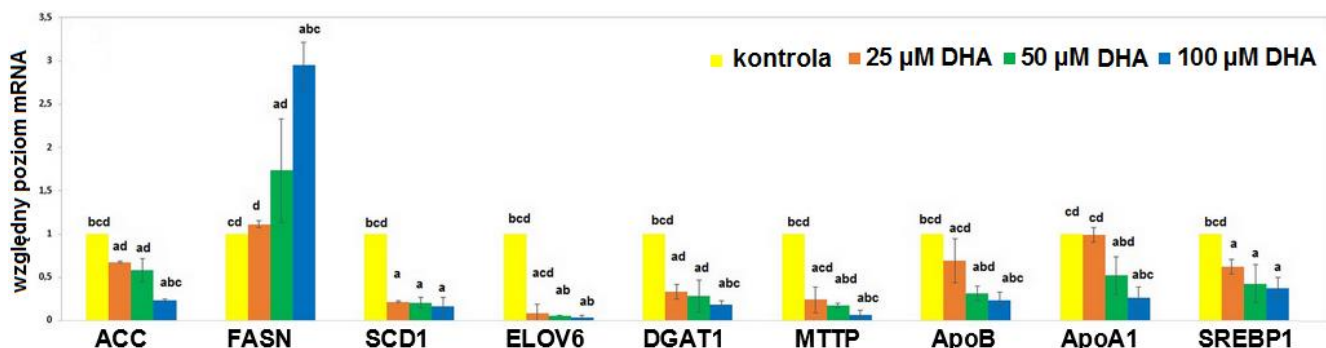
**Rycina 3.** Poziomy mRNA dla wybranych genów w komórkach HepG2 suplementowanych różnymi stężeniami kwasu oleinowego (OA). Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SEM, a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M OA; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M OA i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M OA. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearoil-CoA, ELOVL6 - elongaza kwasów tłuszczowych 6, DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, MTPP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, ApoB - apolipoproteina B, ApoA1 - apolipoproteina A1, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole [Na podstawie: załącznik C].

Dodatek AA do komórek HepG2 spowodował wzrost ekspresji *FASN*, natomiast poziomy mRNA genów odpowiedzialnych za przekształcanie FA (desaturację i elongację) były obniżone. Obniżenie się poziomu mRNA zaobserwowano również dla genów syntezy triacylogliceroli – *DGAT1* i tworzenia VLDL – *MTPP*. Zaobserwowane zmiany były zależne od dawki FA (Ryc. 4).



**Rycina 4.** Poziomy mRNA dla wybranych genów w komórkach HepG2 suplementowanych różnymi stężeniami kwasu arachidowego (AA). Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SEM. a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M AA; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M AA i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M AA. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearoil-CoA, ELOVL6 - elongaza kwasów tłuszczowych 6, DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, MTPP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, ApoB - apolipoproteina B, ApoA1 - apolipoproteina A1, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole [Na podstawie: załącznik C].

Hodowla komórek HepG2 w środowisku zawierającym DHA spowodowała zmiany ekspresji podobne do tych zaobserwowanych przy AA, a więc tu również nastąpił wzrost ekspresji *FASN*, zmniejszenie poziomu ekspresji *SCD1*, *ELOV6*, *DGAT1*, *MTTP*, *SREBP1*. Dodatkowo zaobserwowano obniżenie się poziomu mRNA *ACC*, *ApoB* i *ApoA1*. Wszystkie zaobserwowane zmiany były zależne od dawki FA (Ryc. 5).



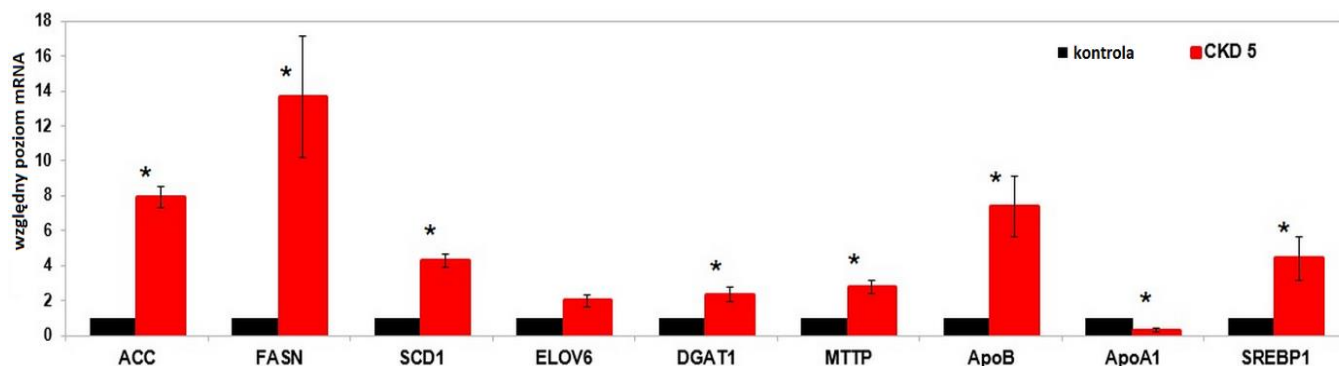
**Rycina 5.** Poziomy mRNA dla wybranych genów w komórkach HepG2 suplementowanych różnymi stężeniami kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SEM. a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M DHA; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M DHA i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M DHA. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearoil-CoA, ELOVL6 - elongaza kwasów tłuszczowych 6, DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, MTTP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, ApoB - apolipoproteina B, ApoA1 - apolipoproteina A1, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole [Na podstawie: załącznik C].

Podsumowując, OA (przedstawiciel MUFA), którego zawartość w surowicy pacjentów z CKD wzrasta, w hepatocytach w modelu *in vitro* powodował podwyższenie ekspresji większości genów zaangażowanych w syntezę FA i TAG (*ACC*, *FASN*, *SCD1*, *DGAT1*) oraz uwalnianie VLDL (*ApoB*, *MTTP*). Za wzrost ekspresji tych genów może odpowiadać wyższy poziom czynnika transkrypcyjnego SREBP1. Wzrost ekspresji *SREBP1*, *ACC* i *FASN* w hepatocytach w odpowiedzi na suplementację OA został już wcześniej zaobserwowany w badaniach, ale przy znacznie wyższych stężeniach tego FA [103]. Ekspresja *ELOVL6* również może być regulowana przez SREBP1 jednak w przeciwieństwie do innych genów ekspresja genu tego enzymu obniżyła się. Możliwym wyjaśnieniem może być regulacja ekspresji *ELOVL6* przez wiele innych czynników oprócz SREBP1 oraz wąska specyficzność substratowa tej elongazy (tj. wydłużanie FA o 12-14 atomów węgla i brak zdolności wydłużania powyżej 18 atomów węgla) [21,104]. W przeciwieństwie do OA, podanie do hodowli AA i DHA (przedstawicieli odpowiednio n-6 PUFA i n-3 PUFA), których zawartość w surowicy pacjentów z CKD obniża się wraz z postępem choroby, nie zmieniało istotnie poziomu tych genów lub wywierało efekt przeciwny. Zaobserwowane obniżenie poziomu wątrobowej lipogenezy w odpowiedzi na suplementację n-6 PUFA jest zgodne w doniesieniami dostępnymi w innych publikacjach naukowych [105,106]. Zaobserwowany podwyższony poziom mRNA *FASN* wydaje się zaskakujący biorąc pod uwagę zmiany innych genów związanych z syntezą lipidów, jednak badania pokazują że choć SREBP1 jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym poziom ekspresji genów lipogenezy

wątrobowej, w tym *FASN*, to możliwy jest wzrost ekspresji *FASN* z pominięciem SREBP1 jako czynnika aktywującego [107].

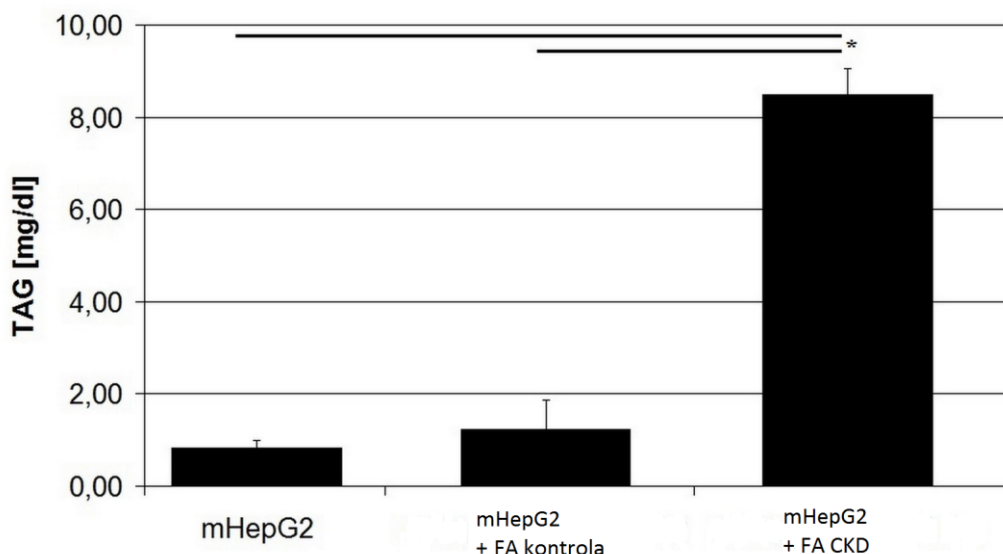
W warunkach *in vivo* hepatocyty wystawione są na działanie wielu różnych FA jednocześnie, w związku z tym kolejnym krokiem po zbadaniu wpływu pojedynczych FA było zbadanie jak na ekspresje genów metabolizmu lipidów wpłynie ekspozycja na pełen profil FA krążących we krwi. W tym celu z surowicy 12 losowo wybranych pacjentów z ostatnim stadium CKD i 12 osób z grupy kontrolnej wyekstrahowano FA i podano je do hodowli komórek HepG2. Przed suplementacją hodowli komórkowej FA pochodzącymi od ludzi potwierdzono, że w preparacie izolowanym od pacjentów z CKD i od zdrowych ochotników zachowano proporcje poszczególnych grup FA charakterystyczne dla pacjentów z zaawansowanym stadium CKD i osób zdrowych (Tabela 3 w załączniku C). Podanie preparatu zawierającego pełen profil FA wyizolowanych z surowicy nie spowodowało zmian w morfologii czy żywotności komórek.

Po okresie 48h inkubacji zaobserwowano, że w komórkach hodowanych w dodatkiem FA pochodzących od pacjentów z CKD poziom mRNA genów odpowiedzialnych za syntezę FA oraz ich desaturację i elongację (*ACC*, *FASN*, *SCD1*, *ELOV6*), jak również genów zaangażowanych w syntezę TAG (*DGAT1*) oraz powstawanie VLDL (*MTTP*) uległ zwiększeniu. Zmniejszenie poziomu mRNA zaobserwowano jedynie dla *ApoA1* (Ryc. 6).



**Rycina 6.** Poziom mRNA dla wybranych genów w komórkach HepG2 suplementowanych pełnym profilem kwasów tłuszczowych z surowicy osób z grupy kontrolnej kontrolnych (kontrola) i pacjentów z CKD w stadium 5 (CKD 5). \*  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą. Dane są prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, FASN – syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearoilo-CoA, ELOVL6 - elongaza kwasów tłuszczowych 6, DGAT1 – acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, MTTP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, ApoB - apolipoproteina B, ApoA1 - apolipoproteina A1, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole. [Na podstawie: załącznik C].

W pożywkach pochodzących oznaczono oprócz tego również zawartość TAG, by potwierdzić ich wzmożoną syntezę i uwalnianie. Wyniki pokazały, że w medium w którym rosły komórki suplementowane pełnym profilem FA pochodzącym od pacjentów z CKD zawartość TAG była ponad 6-krotnie wyższa niż w medium w którym hodowane były hepatocyty z dodatkiem FA pochodzących od osób z grupy kontrolnej (Ryc. 7).

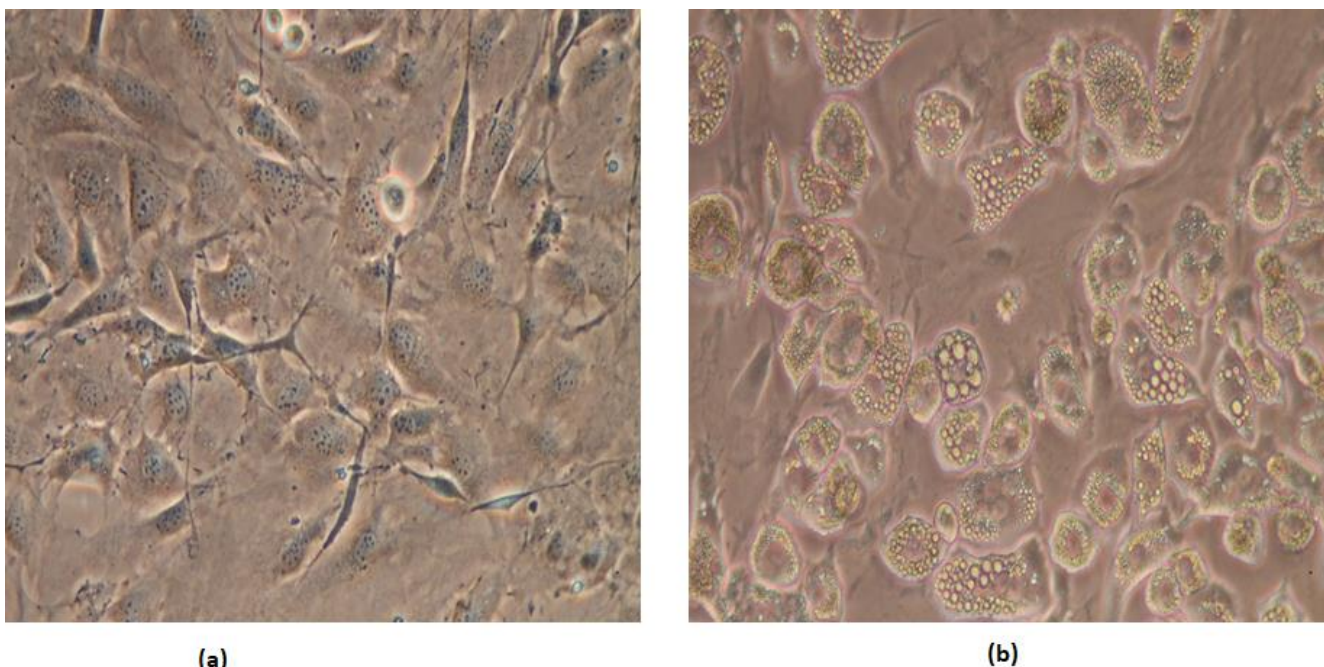


**Rycina 7.** Poziom triacylogliceroli (TAG) w medium hodowlanym po 48h hodowli hepatocytów z dodatkiem pełnego profilu kwasów tłuszczowych pochodzących z surowicy chorych na przewlekłą chorobę nerek i z surowicy grupy kontrolnej. mHepG2 - medium hodowlane podstawowe, mHepG2 + FA kontrola - medium hodowlane po hodowli HepG2 z FA pochodzących z surowicy osób z grupy kontrolnej, mHepG2 + FA CKD - medium hodowlane po hodowli HepG2 z dodatkiem FA pochodzących z surowicy pacjentów z CKD. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  [Na podstawie: załącznik C].

Powyższe wyniki wskazują, że zmieniony profil FA u pacjentów z CKD może prowadzić do zwiększonej syntezy TAG i ich uwalniania w postaci VLDL z wątroby. Biorąc pod uwagę, iż MUFA są głównymi FA w TAG [108,109], można spekulować że powstaje tu samonapędzający się mechanizm, w którym im wyższy jest poziom MUFA w surowicy chorych na CKD tym większa zachodzi produkcja TAG w wątrobie, a im wyższe są produkcja i uwalnianie lipidów z wątroby tym bardziej pogłębiają się zmiany profilu FA w surowicy chorych. Możliwe, że jest to jeden z mechanizmów przyczyniających się do hipertriglicydemii obserwowanej u pacjentów cierpiących na CKD. Zwiększony poziom TAG w surowicy to jeden z czynników ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, tak więc zmieniony profil FA u pacjentów poprzez wpływ na aktywności enzymów szlaku metabolizmu lipidów może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u chorych z CKD, natomiast zaobserwowane obniżenie się ekspresji genu *ApoA1*, którego produkt stanowi białkową część HDL, może być jednym z mechanizmów przyczyniających się do obniżonego poziomu HDL obserwowanego u pacjentów z CKD. Co więcej obniżony poziom ApoA1 w surowicy pacjentów z CKD może narażać ich na rozwój innych chorób, badania naukowe powiązały bowiem poziom ApoA1 z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 i niektórymi typami raka [110–112]. Pozostaje do ustalenia czy modyfikacje diety oparte na aktualnym profilu FA pacjentów z CKD mogłyby pomóc w normalizacji zmienionych szlaków metabolicznych.

## 7.2. Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach w odpowiedzi na kwas metylenoheksadekanowy

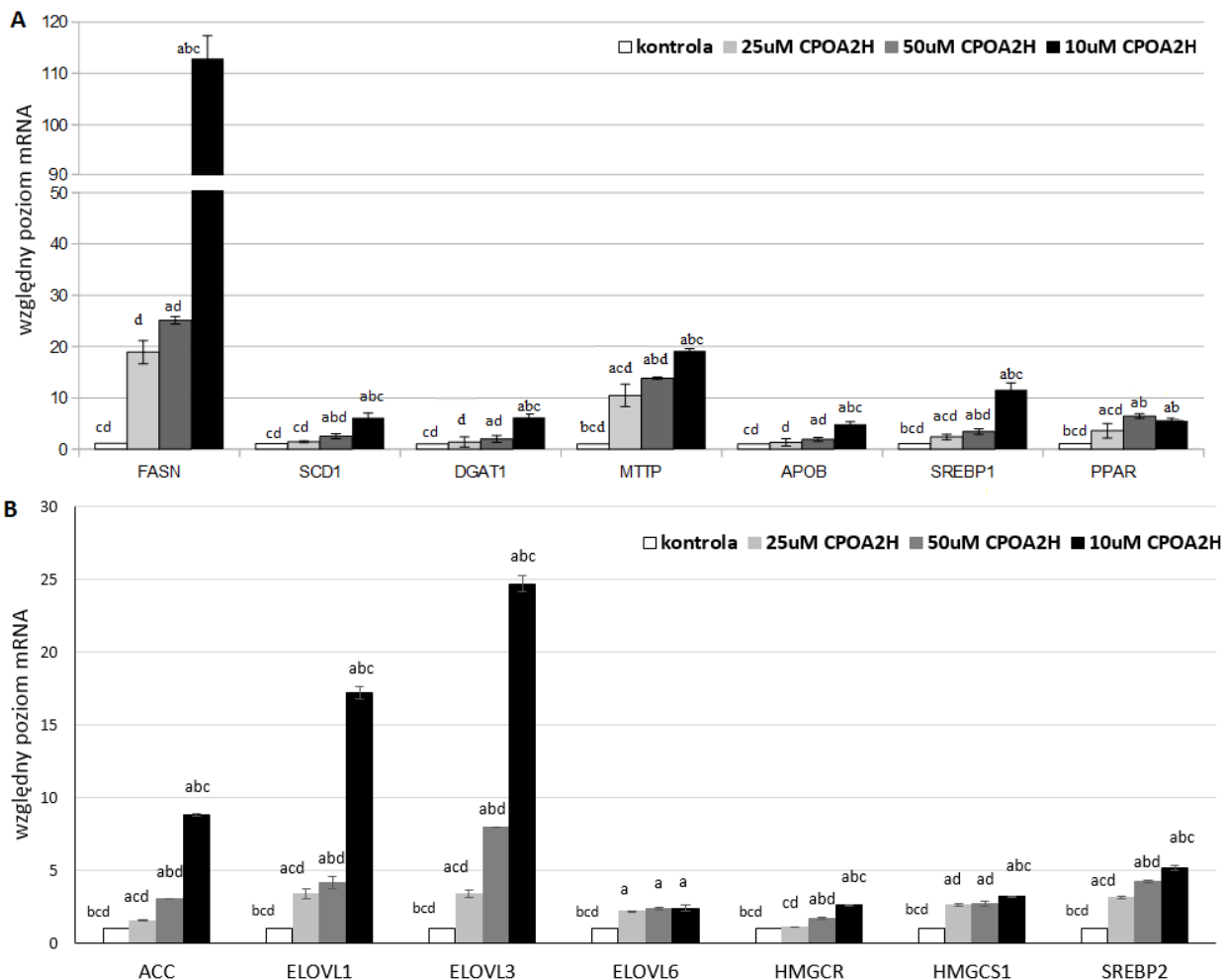
Kolejnym etapem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie jakie konsekwencje dla metabolizmu lipidów niesie z sobą podwyższone stężenie CPOA2H. Jest to 17-węglowy FA zawierający ugrupowanie cyklopropanowe. Wcześniejsze badania naszego zespołu dowiodły, że ten nietypowy FA występuje w zwiększonej ilości w surowicy pacjentów z CKD, a jego ilość koreluje ze stężeniem TAG we krwi pacjentów, jednak konsekwencje metaboliczne i molekularny mechanizm tych obserwacji nadal pozostawały nieznane [67]. Działanie CPOA2H zostało przetestowane zarówno na linii ludzkich hepatocytów (HepG2) jak i na mysim modelu adipocytów (3T3-L1). 3T3-L1 to linia fibroblastów które w odpowiednich warunkach hodowli zdolne są do różnicowania się w adipocyty (Rys. 8). Linia ta została wybrana, ponieważ jest najczęściej opisywaną i wykorzystywaną linią adipocytów w badaniach molekularnych i metabolicznych w modelach *in vitro* [113].



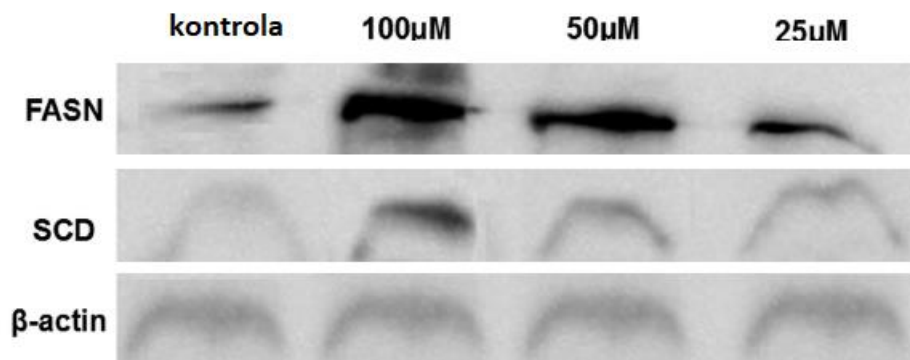
**Rycina 8.** Zdjęcia spod mikroskopu optycznego komórek linii 3T3-L1 przed różnicowaniem (a) i po różnicowaniu (b) (źródło: materiały własne).

Hodowla hepatocytów przez okres 48 godzin w medium z dodatkiem różnych stężeń (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M) CPOA2H spowodowała zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w syntezę FA (*FASN*, *SCD1*, *ACC* i *ELOVL1*, *ELOVL3*, *ELOVL6*), syntezę TAG (*DGAT1*), tworzenie VLDL (*MTP* i *ApoB*), a także genów odpowiedzialnych za syntezę cholesterolu – syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (*HMGCS*) i reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (*HMGCR*). Poziomy mRNA *SREBP1* i *PPAR $\gamma$* , czynników transkrypcyjnych odpowiadających za regulację lipogenezy oraz *SREBP2*, czynnika

transkrypcyjnego odpowiadającego za regulację metabolizmu cholesterolu, również były podwyższone (Ryc. 9a, b). Podwyższone poziomy ekspresji *FASN* i *SCD1* potwierdzone zostały również na poziomie białka (Ryc. 10). Obserwowane efekty działania CPOA2H zależne był od dawki FA.



**Rycina 9A, B.** Poziom mRNA wybranych genów w komórkach HepG2 hodowanych z dodatkiem kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H). Dane przedstawione są jako średnia  $\pm$  SEM. a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M CPOA2H; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M CPOA2H i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M CPOA2H. FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearoilo-CoA DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, MTTP - mikrosomalne białko przenoszące triacyloglicerole, ApoB - apolipoproteina B, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole 1, PPAR -receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów, ACC - karboksylaza acetylo-CoA, ELOVL6 - elongaza kwasów tłuszczowych 6, HMGCR – reduktaza HMG-CoA, HMGCS1 - syntaza HMGCoA, SREBP2 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole [Na podstawie: załącznik D].

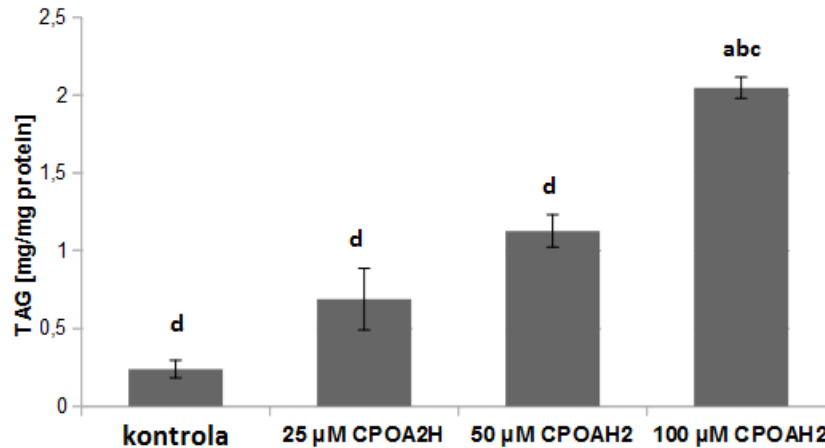


**Rysunek 10.** Analiza western-blot poziomu białka syntazy kwasów tłuszczowych (*FASN*) i desaturazy stearoilo-CoA (*SCD1*) w komórkach HepG2 hodowanych w obecności kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H) [Na podstawie: załącznik D].

Szczególnie warto tu podkreślić znaczący wzrost poziomu mRNA dla *FASN*, co może tłumaczyć podwyższony poziom TAG obserwowany u pacjentów z podwyższonym poziomem CPOA2H. Wystawienie hepatocytów na działanie nawet najmniejszego stężenia eksperymentalnego tj. 25μM – stężenia CPOA2H które zwykle obserwuje się w surowicy pacjentów z hipertriglicydemią – przyczynia się do 19-krotnego wzrostu poziomu ekspresji *FASN*. Ponadto, ponieważ OA (produkt reakcji katalizowanej przez *SCD1*) jest jednym z głównych składników TAG [108], wzrost poziomu ekspresji *SCD1* indukowany CPOA2H może również stanowić wyjaśnienie dla podwyższonego poziomu TAG w surowicy pacjentów z CKD. Z kolei podwyższone poziomy mRNA czynników transkrypcyjnych (*SREBP1* i *PPARγ*) sugerują mechanizm sygnalizacyjny za pomocą którego CPOA2H działa na szlaki syntezy lipidów. W piśmiennictwie naukowym znaleźć można doniesienia o modulacji aktywności *SREBP1* i *PPAR* w wątrobie przez różne FA [114,115], ale jak dotąd wpływ FA z grupą cykliczną nie był dyskutowany.

Aby ostatecznie potwierdzić, że obserwowane zmiany na poziomie ekspresji genów mogą przyczynić się do hipertriglicydemii obserwowanej pacjentów z CKD, w komórkach HepG2 zmierzono poziom TAG. Stwierdzono, że w komórkach HepG2 hodowanych przez okres 48h w medium z dodatkiem CPOA2H poziom TAG wzrastał w zależności od podanej dawki (Ryc. 11).

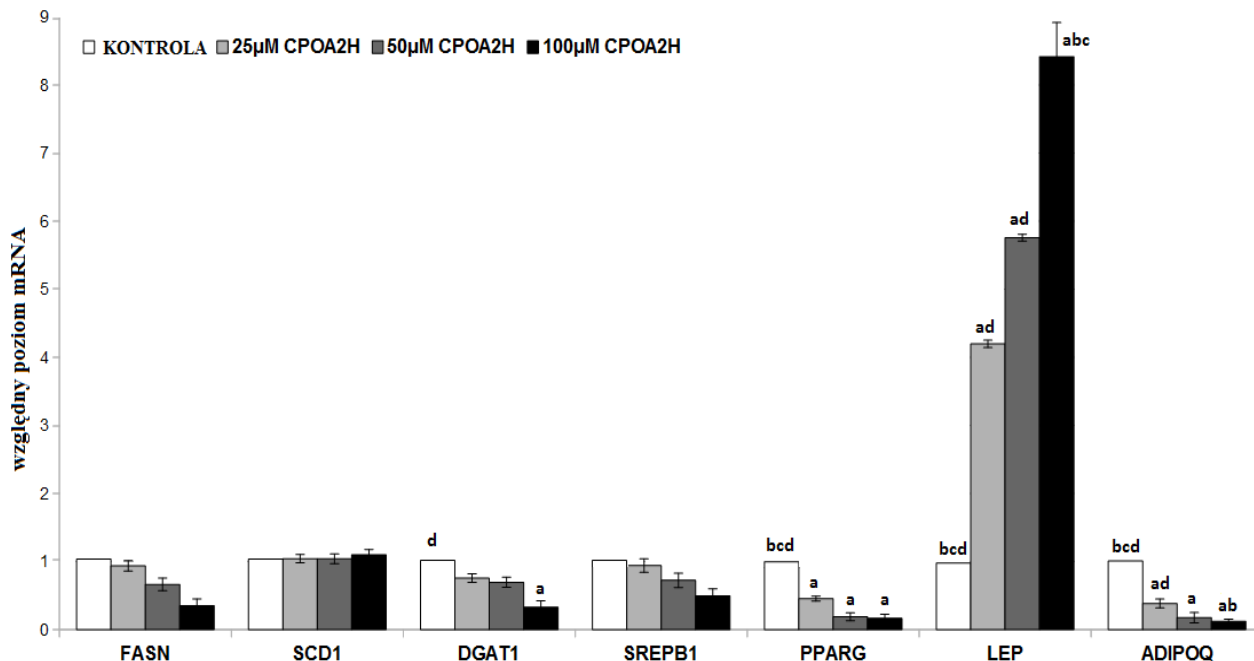




**Rycina 11.** Zawartość triacylogliceroli (TAG) w komórkach HepG2 po suplementacji hodowli różnymi stężeniami kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H). Dane przedstawione są jako średnia  $\pm$  SEM. a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M CPOA2H; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M CPOA2H i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M CPOA2H [Na podstawie: załącznik D].

W ramach prowadzonych badań sprawdzony został również wpływ CPOA2H na metabolizm lipidów w adipocytach. Jako model wybrana została linia komórkowa 3T3-L1. W eksperymencie badany FA podawany był do dojrzałych (zróżnicowanych) adipocytów 3T3-L1, a następnie po upływie 48h oceniony został poziom ekspresji wybranych genów. Okazało się, że poziom mRNA większość genów związanych z syntezą lipidów w adipocytach traktowanych CPOA2H jest obniżony lub pozostał bez zmian (Ryc. 12). Sugeruje to zatem, że ewentualny wpływ CPOA2H na stężenie lipidów w surowicy pacjentów z CKD wynika ze zwiększonej ich syntezy w wątrobie a nie w tkance tłuszczowej. Biorąc jednak pod uwagę, że to właśnie wątroba jest głównym miejscem syntezy FA i TAG u ludzi, obniżenie się ekspresji genów związanych z lipogenezą w adipocytach może odgrywać drugorzędny wpływ na ilość lipidów w surowicy pacjentów z CKD [116].

Jedynym genem, którego ekspresja była stymulowana przez CPOA2H w adipocytach była leptyna (*LEP*). Natomiast poziom mRNA innej adipokiny – adiponektyny (*ADIPOQ*) był obniżony (Rys. 12). Może to oznaczać że podwyższony poziom CPOA2H w surowicy pacjentów z CKD nie tylko przyczynia się do zwiększania stężenia TAG, ale również do zwiększenia się stężenia leptyny. Należy tu wspomnieć, że u pacjentów z otyłością stwierdza się podwyższony poziom leptyny w surowicy oraz podwyższone ilości CPOA2H [73,117–119].



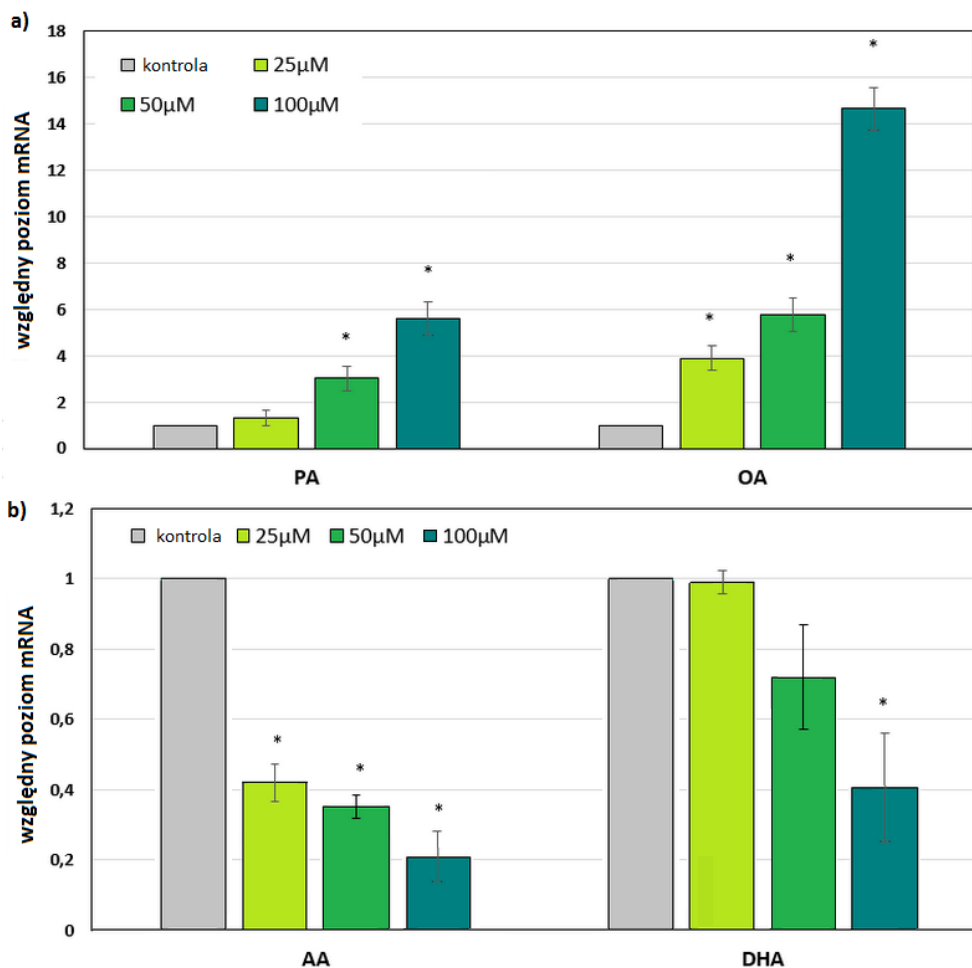
**Rycina 12.** Poziom ekspresji genów w adipocytach 3T3-L1 traktowanych różnymi stężeniami kwasu metylenohexadecanowego (CPOA2H). Dane przedstawione są jako średnia  $\pm$  SEM. a -  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; b -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 25  $\mu$ M CPOA2H; c -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 50  $\mu$ M CPOA2H i d -  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych 100  $\mu$ M CPOA2H. FASN - syntaza kwasów tłuszczowych, SCD1 - desaturaza stearioilo-CoA, DGAT1 - acylotransferaza diacyloglicerolowa 1, SREBP1 - białko wiążące element odpowiedzi na sterole, PPARG - receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów, LEP - leptyna, ADIPOQ - adiponektyna [Na podstawie: załącznik D].

### 7.3. Zmieniony profil kwasów tłuszczowych a poziom ekspresji leptyny

Badania naszego zespołu wskazują, że jednym z możliwych mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększony poziom leptyny obserwowany u pacjentów z CKD jest jej zwiększona produkcja w tkance tłuszczowej, zaobserwowaliśmy bowiem nie tylko zwiększony poziom leptyny w surowicy pacjentów z zaawansowaną CKD, ale również zwiększoną ekspresję tego genu w podskórnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaawansowaną CKD (Rycina 1 w załączniku A), dlatego w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano czy istnieje związek między zmienionym profilem FA u pacjentów z CKD a poziomem leptyny.

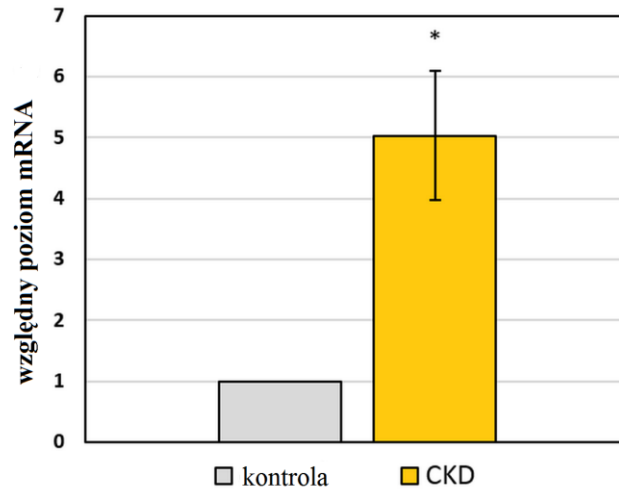
Aby zbadać czy zmiany w profilu FA zaobserwowane u pacjentów z CKD mogły mieć wpływ na poziom ekspresji leptyny w tkance tłuszczowej, w pierwszej części eksperymentu adipocyty 3T3-L1 hodowane były z wybranym FA przez okres 48h. Badane FA obejmowały: kwas palmitynowy (PA), OA, DHA i AA – będące reprezentantami odpowiednio SFA, MUFA, PUFA n-3 i PUFA n-6. Wszystkie FA zbadano w trzech różnych stężeniach - 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, i 100  $\mu$ M. Po 48h inkubacji z poszczególnymi FA zauważono, że PA oraz OA, którego poziom jest podwyższony u pacjentów z CKD, zwiększały poziom mRNA *LEP*, a obserwowany efekt

zależny był od dawki kwasu (Ryc. 13a). Natomiast DHA i AA, kwasy których zawartość w surowicy pacjentów z CKD obniża się, zmniejszają poziom ekspresji *LEP* w sposób również zależny od dawki (Ryc. 13b).



**Rycina 13.** Względny poziom mRNA leptyny w komórkach 3T3-L1 inkubowanych przez 48h z dodatkiem różnych stężeń kwasu palmitynowego (PA) i oleinowego (OA) (a) oraz kwasu arachidonowego (AA) i kwasu dokozaheksaenowego (DHA) (b). \* - istotnie różne w porównaniu z kontrolą ( $p < 0.05$ ), dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SD. [Na podstawie: załącznik A]

We krwi pacjentów z CKD dochodzi jednocześnie do zmian poziomu wielu FA, dlatego kolejnym etapem badań była ocena jaki jest łączny wpływ wszystkich zaburzeń składu FA w surowicy na poziom ekspresji leptyny. Z tego powodu od losowo wybranych 10 pacjentów z zaawansowaną CKD i od losowo wybranych 10 osób z grupy kontrolnej wyizolowano wszystkie FA z surowicy. Inkubacja adipocytów z preparatem zawierającym pełny profil FA pochodzący od pacjentów z zaawansowaną CKD skutkowało istotnie zwiększonym poziomem mRNA *LEP* w porównaniu z poziomem ekspresji zaobserwowanym w adipocytach hodowanych z dodatkiem pełnego profilu FA pochodzącego od osób zdrowych (Ryc. 14).



**Rycina 14.** Względny poziom mRNA leptyny (*LEP*) w adipocytach 3T3-L1 hodowanych przez 48h z pełnym profilem kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z surowicy zdrowych ochotników (kontrola) i pacjentów z zaawansowaną chorobą nerek (CKD). \* - istotnie różne w porównaniu z kontrolą ( $p < 0.05$ ), dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SD [Na podstawie: załącznik A].

Powyższe wyniki po raz pierwszy pokazują, że zmieniony profil FA w surowicy obserwowany u pacjentów z CKD zwiększa ekspresję leptyny w adipocytach. Może być to zatem kolejny z mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększoną ekspresję tej adipokiny w tkance tłuszczowej u pacjentów i jej podwyższone stężenie w surowicy.

## 8. Wnioski

Najważniejsze wnioski, wynikające z badań wchodzących w skład publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, są następujące:

- a) Zaburzenia profilu FA, takie jak wzrost poziomu MUFA i obniżenie poziomu PUFA obserwowane u pacjentów z CKD pociągają za sobą poważne zaburzenia metabolizmu lipidów w hepatocytach, w tym zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i uwalnianie lipidów z wątroby przez co mogą się przyczyniać do związanej z tą jednostką chorobową hipertriglicydemii.
- b) Wzrost poziomu CPOA2H obserwowany u pacjentów z CKD pociągają za sobą poważne zaburzenia metabolizmu lipidów w hepatocytach, w tym zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i uwalnianie lipidów z wątroby przez co może się przyczyniać do pogłębiania związanej z tą jednostką chorobową hipertriglicydemii.
- c) Zaburzenia profilu FA, takie jak wzrost poziomu MUFA i obniżenie poziomu PUFA obserwowane u pacjentów z CKD prowadzą do zwiększenia poziomu ekspresji leptyny w adipocytach, przez co mogą się przyczyniać do zmian poziomu leptyny we krwi.
- d) Wzrost poziomu CPOA2H obserwowany u pacjentów z CKD prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji leptyny w adipocytach, przez co może się przyczyniać do zmian poziomu leptyny we krwi.

## 9. Piśmiennictwo

1. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Alex Brown, H.; Glass, C.K.; Merrill, A.H.; Murphy, R.C.; H Raetz, C.R.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A comprehensive classification system for lipids 1. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839–861.
2. Fahy, E.; Cotter, D.; Sud, M.; Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811*, 637–647.
3. Li, L.; Han, J.; Wang, Z.; Liu, J.; Wei, J.; Xiong, S.; Zhao, Z. Mass Spectrometry Methodology in Lipid Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 10492–10507.
4. Das, U.N. Biological significance of essential fatty acids. *J. Assoc. Physicians India* **2006**, *54*, 309–19.
5. Calder, P.C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2015**, *39*, 18S-32S.
6. Bijlmakers, M.J.; Marsh, M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 32–42.
7. Resh, M.D. Covalent lipid modifications of proteins. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, R431–R435.
8. Hentschel, A.; Zahedi, R.P.; Ahrends, R. Protein lipid modifications-More than just a greasy ballast. *Proteomics* **2016**, *16*, 759–782.
9. Buckley, J.D.; Howe, P.R.C. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. *Nutrients* **2010**, *2*, 1212–1230.
10. Hennessy, A.A.; Ross, R.P.; Devery, R.; Stanton, C. The health promoting properties of the conjugated isomers of  $\alpha$ -linolenic acid. *Lipids* **2011**, *46*, 105–119.
11. Zárate, R.; El Jaber-Vazdekis, N.; Tejera, N.; Pérez, J.A.; Rodríguez, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Transl. Med.* **2017**, *6*, 25.
12. Nagy, K.; Tiuca, I.-D. Importance of Fatty Acids in Physiopathology of Human Body. In *Fatty Acids*; InTech, 2017.
13. Massey, K.A.; Nicolaou, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 1240–1246.
14. Burdge, G.C. Is essential fatty acid interconversion an important source of PUFA in humans? *Br. J. Nutr.* **2019**, *121*, 615–624.
15. Tourdot, B.E.; Ahmed, I.; Holinstat, M. The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes. *Front. Pharmacol.* **2014**, *4*, 176.
16. Gabbs, M.; Leng, S.; Devassy, J.G.; Monirujjaman, M.; Aukema, H.M. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs 1,2. *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 513–540.
17. Davidson, J.; Rotondo, D.; Rizzo, M.; Leaver, H. Therapeutic implications of disorders of cell death signalling: membranes, micro-environment, and eicosanoid and docosanoid metabolism. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 1193–1210.
18. de Bus, I.; Witkamp, R.; Zuilhof, H.; Albada, B.; Balvers, M. The role of n-3 PUFA-derived fatty

- acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2019**, *144*, 106351.
19. Das, U.N. Essential Fatty Acids-A Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2006**, *7*, 0–000, doi:10.2174/138920106779116856.
  20. Jump, D.B. Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *579*, 375–389.
  21. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237–249.
  22. Leonard, A.E.; Pereira, S.L.; Sprecher, H.; Huang, Y.S. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 36–54.
  23. Hajri, T.; Abumrad, N.A. Fatty acid transport across membranes: Relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 383–415.
  24. Nguyen, P.; Leray, V.; Diez, M.; Serisier, S.; Bloc'h, J. Le; Siliart, B.; Dumon, H. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **2008**, *92*, 272–283.
  25. Smith, S.; Witkowski, A.; Joshi, A.K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 289–317.
  26. Brownsey, R.W.; Zhande, R.; Boone, A.N. Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: Structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 1232–1238.
  27. Sul, H.S.; Smith, S. Fatty acid synthesis in eukaryotes. *Biochem. Lipids, Lipoproteins Membr.* **2008**, 155–190.
  28. Kim, K.-H. REGULATION OF MAMMALIAN ACETYL-COENZYME A CARBOXYLASE. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17*, 77–99.
  29. Yamazaki, T.; Miura, S.; Ezaki, O. Increased Very Low Density Lipoprotein Secretion and Gonadal Fat Mass in Mice Overexpressing Liver DGAT1. *Artic. J. Biol. Chem.* **2005**.
  30. Chitraju, C.; Walther, T.C.; Farese, R. V. The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes. *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 1112–1120.
  31. Liang, J.J.; Oelkers, P.; Guo, C.; Chu, P.C.; Dixon, J.L.; Ginsberg, H.N.; Sturley, S.L. Overexpression of human diacylglycerol acyltransferase 1, acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase 1, or acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase 2 stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44938–44944.
  32. Frayn, K.N.; Arner, P.; Yki-Järvinen, H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem.* **2006**, *42*, 89–103.
  33. Samra, J.S. Regulation of lipid metabolism in adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **2000**, *59*, 441–446.
  34. Klein, S.; Coppack, S.W.; Mohamed-Ali, V.; Landt, M. Adipose Tissue Leptin Production and Plasma Leptin Kinetics in Humans. *Diabetes* **1996**, *45*, 984–7.
  35. Hoffstedt, J.; Arvidsson, E.; Sjölin, E.; Wåhlén, K.; Arner, P. Adipose Tissue Adiponectin Production and Adiponectin Serum Concentration in Human Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 1391–1396.
  36. Vessby, B.; Gustafsson, I.-B.; Tengblad, S.; Berglund, L. Indices of fatty acid desaturase activity in healthy human subjects: effects of different types of dietary fat. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 871–879.

37. Joshi, K.; Gadgil, M.; Pandit, A.; Oti, S.; Kothapalli, K.S.D.; Brenna, J.T. Dietary pattern regulates fatty acid desaturase 1 gene expression in Indian pregnant women to spare overall long chain polyunsaturated fatty acids levels. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 687–693.
38. Ralston, J.C.; Matravadia, S.; Gaudio, N.; Holloway, G.P.; Mutch, D.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function. *Obesity* **2015**, *23*, 725–728.
39. Li, S.; Mai, K.; Xu, W.; Yuan, Y.; Zhang, Y.; Ai, Q. Characterization, mRNA expression and regulation of  $\delta 6$  fatty acyl desaturase (FADS2) by dietary n-3 long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) levels in grouper larvae (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* **2014**, *434*, 212–219.
40. Wijendran, V.; Downs, I.; Srigley, C.T.; Kothapalli, K.S.D.; Park, W.J.; Blank, B.S.; Zimmer, J.P.; Butt, C.M.; Salem, N.; Brenna, J.T. Dietary arachidonic acid and docosahexaenoic acid regulate liver fatty acid desaturase (FADS) alternative transcript expression in suckling piglets. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2013**, *89*, 345–350.
41. Geay, F.; Santigosa I Culi, E.; Corporeau, C.; Boudry, P.; Dreano, Y.; Corcos, L.; Bodin, N.; Vandeputte, M.; Zambonino-Infante, J.L.; Mazurais, D.; et al. Regulation of FADS2 expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *156*, 237–243.
42. Dong, Y.; Wang, S.; You, C.; Xie, D.; Jiang, Q.; Li, Y. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (Hnf4 $\alpha$ ) is involved in transcriptional regulation of  $\Delta 6/\Delta 5$  fatty acyl desaturase (fad) gene expression in marine teleost *Siganus canaliculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2019**, 110353.
43. Xie, D.; Fu, Z.; Wang, S.; You, C.; Monroig, Ó.; Tocher, D.R.; Li, Y. Characteristics of the fads2 gene promoter in marine teleost *Epinephelus coioides* and role of Sp1-binding site in determining promoter activity. *Sci. Rep.* **2018**, *8*.
44. Dong, Y.; Zhao, J.; Chen, J.; Wang, S.; Liu, Y.; Zhang, Q.; You, C.; Monroig, Ó.; Tocher, D.R.; Li, Y. Cloning and characterization of  $\Delta 6/\Delta 5$  fatty acyl desaturase (Fad) gene promoter in the marine teleost *Siganus canaliculatus*. *Gene* **2018**, *647*, 174–180.
45. Kim, W.; Deik, A.; Gonzalez, C.; Gonzalez, M.E.; Fu, F.; Ferrari, M.; Churchhouse, C.L.; Florez, J.C.; Jacobs, S.B.R.; Clish, C.B.; et al. Polyunsaturated Fatty Acid Desaturation Is a Mechanism for Glycolytic NAD<sup>+</sup> Recycling. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 856-870.e7.
46. Boden, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2011**, *18*, 139–143.
47. Li, S.W.; Lin, K.; Ma, P.; Zhang, Z.L.; Zhou, Y.D.; Lu, S.Y.; Zhou, X.; Liu, S.M. FADS Gene Polymorphisms Confer the Risk of Coronary Artery Disease in a Chinese Han Population through the Altered Desaturase Activities: Based on High-Resolution Melting Analysis. *PLoS One* **2013**, *8*.
48. Ito, Z.; Uchiyama, K.; Odahara, S.; Takami, S.; Saito, K.; Kobayashi, H.; Koido, S.; Kubota, T.; Ohkusa, T.; Saruta, M. Fatty Acids as Useful Serological Markers for Crohn's Disease. **2017**.
49. Yary, T.; Voutilainen, S.; Tuomainen, T.-P.; Ruusunen, A.; Nurmi, T.; Virtanen, J.K. Omega-6 polyunsaturated fatty acids, serum zinc, delta-5- and delta-6-desaturase activities and incident metabolic syndrome. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2017**, *30*, 506–514.
50. Warensjö, E.; Rosell, M.; Hellenius, M.-L.; Vessby, B.; De Faire, U.; Risérus, U. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis.* **2009**, *8*, 37.



51. Sijben, J.W.C.; Calder, P.C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc. Nutr. Soc.* **2007**, *66*, 237–259.
52. Marventano, S.; Galvano, F.; Buscemi, S.; Mistretta, A. A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: Does the ratio really matter? *Artic. Int. J. Food Sci. Nutr.* **2015**.
53. Hill, N.R.; Fatoba, S.T.; Oke, J.L.; Hirst, J.A.; O’Callaghan, C.A.; Lasserson, D.S.; Hobbs, F.D.R. Global prevalence of chronic kidney disease - A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2016**, *11*.
54. Zdrojewski, Ł.; Zdrojewski, T.; Rutkowski, M.; Bandosz, P.; Król, E.; Wyrzykowski, B.; Rutkowski, B. Prevalence of chronic kidney disease in a representative sample of the Polish population: results of the NATPOL 2011 survey. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, *31*, 433–439.
55. Foley, R.N.; Parfrey, P.S.; Sarnak, M.J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, *32*.
56. Agnieszka Kalinowska; dr Marta Kowalczyk; Cezary Pruszek; dr Tomasz Prystacki *DOSTĘP DO ŚWIADCZEŃ NEFROLOGICZNYCH W POLSCE RAPORT 2019*; 2019;
57. Hager, M.R.; Narla, A.D.; Tannock, L.R. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2017**, *18*, 29–40.
58. Chang, Y.; Zhang, Y.; Youl Hyun, Y.; Ryu, S.; Choi, Y.; Cho, J.; Kwon, M.-J.; Lee, K.-B.; Kim, H.; Jung, H.-S.; et al. Metabolically Healthy Obesity and Development of Chronic Kidney Disease A Cohort Study. **2016**.
59. Spoto, B.; Pisano, A.; Zoccali, C. Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2016**, *311*, F1087–F1108.
60. Kovesdy, C.P.; Furth, S.L.; Zoccali, C. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. *Am. J. Hypertens.* **2017**, *30*, 328–336.
61. Chmielewski, M.; Carrero, J.J.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B. Metabolic abnormalities in chronic kidney disease that contribute to cardiovascular disease, and nutritional initiatives that may diminish the risk. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20*, 3–9.
62. Bulbul, M.C.; Dagel, T.; Afsar, B.; Ulusu, N.N.; Kuwabara, M.; Covic, A.; Kanbay, M. Disorders of Lipid Metabolism in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* **2018**, *46*, 144–152.
63. Huang, X.; Sjögren, P.; Ärnlov, J.; Cederholm, T.; Lind, L.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B.; Risérus, U.; Carrero, J.J. Serum fatty acid patterns, insulin sensitivity and the metabolic syndrome in individuals with chronic kidney disease. *J. Intern. Med.* **2014**, *275*, 71–83.
64. Sikorska-Wiśniewska, M.; Mika, A.; Śledziński, T.; Małgorzewicz, S.; Stepnowski, P.; Rutkowski, B.; Chmielewski, M. Disorders of serum omega-3 fatty acid composition in dialyzed patients, and their associations with fat mass. *Ren. Fail.* **2017**, *39*, 406–412.
65. Madsen, T.; Christensen, J.H.; Svensson, M.; Witt, P.M.; Toft, E.; Schmidt, E.B. Marine n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Patients With End-stage Renal Failure and in Subjects Without Kidney Disease: A Comparative Study. *J. Ren. Nutr.* **2011**, *21*, 169–175.
66. Mika, A.; Sikorska-Wiśniewska Małgorzata; Małgorzewicz, S.; Stepnowski, P.; Alicja, D.; Tomasz, Ś.; Chmielewski, M.; Sikorska-Wiśniewska, M.; Małgorzewicz, S.; Stepnowski, P.; et al. Potential contribution of monounsaturated fatty acids to cardiovascular risk in chronic kidney

disease. **2018**, *128*, 755–763.

67. Mika, A.; Stepnowski, P.; Chmielewski, M.; Malgorzewicz, S.; Kaska, L.; Proczko, M.; Ratnicki-Sklucki, K.; Sledzinski, M.; Sledzinski, T. Increased Serum Level of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Patients with Hypertriglyceridemia-Related Disorders; Increased Serum Level of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Patients with Hypertriglyceridemia-Related Disorders. *Lipids* **2016**, *51*, 867–873.
68. Grogan, D.W.; Cronan, J.E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 429–441.
69. Yu, X.H.; Prakash, R.R.; Sweet, M.; Shanklin, J. Coexpressing escherichia coli cyclopropane synthase with Sterculia foetida lysophosphatidic acid acyltransferase enhances cyclopropane fatty acid accumulation. *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 455–465.
70. Yu, X.H.; Rawat, R.; Shanklin, J. Characterization and analysis of the cotton cyclopropane fatty acid synthase family and their contribution to cyclopropane fatty acid synthesis. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 97.
71. Carballeira, N.M.; Montano, N.; Vicente, J.; Rodriguez, A.D. Novel cyclopropane fatty acids from the phospholipids of the Caribbean sponge Pseudospongosorites suberitoides. *Lipids* **2007**, *42*, 519–524.
72. Rob, T.; Ogi, T.; Maarisit, W.; Taira, J.; Ueda, K. Isolation of C11 Compounds and a Cyclopropane Fatty Acid from an Okinawan Ascidian, Diplosoma sp. *Molecules* **2011**, *16*, 9972–9982.
73. Mika, A.; Stepnowski, P.; Chmielewski, M.; Malgorzewicz, S.; Kaska, L.; Proczko, M.; Ratnicki-Sklucki, K.; Sledzinski, M.; Sledzinski, T. Increased Serum Level of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Patients with Hypertriglyceridemia-Related Disorders. *Lipids* **2016**, *51*, 867–873.
74. Sledzinski, T.; Mika, A.; Stepnowski, P.; Proczko-Markuszczyńska, M.; Kaska, L.; Stefaniak, T.; Swierczyński, J. Identification of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Human Adipose Tissue and Serum. *Lipids* **2013**, *48*, 839–848.
75. Sedger, L.M.; Tull, D.L.; McConville, M.J.; De Souza, D.P.; Rupasinghe, T.W.T.; Williams, S.J.; Dayalan, S.; Lanzer, D.; Mackie, H.; Lam, T.C.; et al. Lipidomic Profiling of Adipose Tissue Reveals an Inflammatory Signature in Cancer-Related and Primary Lymphedema. *PLoS One* **2016**, *11*, e0154650.
76. Dong, L.; Vecchio, A.J.; Sharma, N.P.; Jurban, B.J.; Malkowski, M.G.; Smith, W.L. Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19035–19046.
77. Kanno, T.; Yamamoto, H.; Yaguchi, T.; Hi, R.; Mukasa, T.; Fujikawa, H.; Nagata, T.; Yamamoto, S.; Tanaka, A.; Nishizaki, T. The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC- $\epsilon$ , possibly binding to the phosphatidylserine binding site. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1146–1156.
78. Sakurada, K.; Iwase, H.; Kobayashi, M.; Uemura, H.; Nakaya, H.; Ikegaya, H.; Yoshida, K. *ichi* Cis-9,10-methylenehexadecanoic acid inhibits contractility and actomyosin ATPase activity of guinea pig myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 533–536.
79. Mikolasevic, I.; Žutelija, M.; Mavrinac, V.; Orlic, L. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* **2017**, *10*, 35–45.
80. Moradi, H.; Vaziri, N.D. Molecular mechanisms of disorders of lipid metabolism in chronic kidney

disease Publication Date. *Front. Biosci.* **2018**, *23*, 146–161.

81. Tsimihodimos, V.; Dounousi, E.; Siamopoulos, K.C. Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease: An Approach to Pathogenesis and Treatment. *Am. J. Nephrol.* **2008**, *28*, 958–973.
82. Desvergne, B.; Wahli, W. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism\**; 1999;
83. Ou, J.; Tu, H.; Shan, B.; Luk, A.; Debose-Boyd, R.A.; Bashmakov, Y.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *PNAS* **2001**, *98*, 6027–6032.
84. Pawar, A.; Xu, J.; Jerks, E.; Mangelsdorf, D.J.; Jump, D.B. Fatty Acid Regulation of Liver X Receptors (LXR) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) in HEK293 Cells\* Downloaded from. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39243–39250.
85. Hertz, R.; Magenheim, J.; Berman, I.; Bar-Tana, J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 $\alpha$ . *Nature* **1998**, *392*, 512–516.
86. Wisely, G.B.; Miller, A.B.; Davis, R.G.; Thornquest, A.D.; Johnson, R.; Spitzer, T.; Seffler, A.; Shearer, B.; Moore, J.T.; Miller, A.B.; et al. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* **2002**, *10*, 1225–34.
87. Clarke, S.D.; Armstrong, M.K.; Jump, D.B. Dietary Polyunsaturated Fats Uniquely Suppress Rat Liver Fatty Acid Synthase and S14 mRNA Content. *J. Nutr.* **1990**, *120*, 225–231.
88. Landschulz, K.T.; Jump, D.B.; MacDougald, O.A.; Lane, M.D. Transcriptional control of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 763–8.
89. Yu, J.Z.; Kalantar-Zadeh, K.; Rhee, C.M. Adiponectin and Leptin in Kidney Disease Patients. In *Endocrine Disorders in Kidney Disease*; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp. 277–290.
90. Marchelek-Mysliwiec, M.; Wisniewska, M.; Nowosiad-Magda, M.; Safranow, K.; Kwiatkowska, E.; Banach, B.; Dołęgowska, B.; Dołęgowska, K.; Stepniewska, J.; Domanski, L.; et al. Association Between Plasma Concentration of Klotho Protein, Osteocalcin, Leptin, Adiponectin, and Bone Mineral Density in Patients with Chronic Kidney Disease. *Horm. Metab. Res.* **2018**, *50*, 816–821.
91. Canpolat, N.; Sever, L.; Agbas, A.; Tasdemir, M.; Oruc, C.; Ekmekci, O.B.; Caliskan, S. Leptin and ghrelin in chronic kidney disease: their associations with protein-energy wasting. *Pediatr. Nephrol.* **2018**, *33*, 2113–2122.
92. Noor, S.; Alam, F.; Fatima, S.S.; Khan, M.; Rehman, R. Role of Leptin and dyslipidemia in chronic kidney disease. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2018**, *31*, 893–897.
93. Abella, V.; Scotece, M.; Conde, J.; Pino, J.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gómez-Reino, J.J.; Mera, A.; Lago, F.; Gómez, R.; Gualillo, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 100–109.
94. Friedman, J. The long road to leptin. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 4727–4734.
95. Akchurin, O.M.; Kaskel, F. Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* **2015**, *39*, 84–92.

96. Ding, N.; Liu, B.; Song, J.; Bao, S.; Zhen, J.; Lv, Z.; Wang, R. Leptin promotes endothelial dysfunction in chronic kidney disease through AKT/GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *480*, 544–551.
97. Mao, S.; Fang, L.; Liu, F.; Jiang, S.; Wu, L.; Zhang, J. Leptin and chronic kidney diseases. *J. Recept. Signal Transduct.* 2018, *38*, 89–94.
98. Lim, C.C.; Teo, B.W.; Tai, E.S.; Lim, S.C.; Chan, C.M.; Sethi, S.; Wong, T.Y.; Sabanayagam, C. Elevated Serum Leptin, Adiponectin and Leptin to Adiponectin Ratio Is Associated with Chronic Kidney Disease in Asian Adults. *PLoS One* **2015**, *10*, e0122009.
99. Jiang, Y.; Zhang, J.; Yuan, Y.; Zha, X.; Xing, C.; Shen, C.; Shen, Z.; Qin, C.; Zeng, M.; Yang, G.; et al. Association of Increased Serum Leptin with Ameliorated Anemia and Malnutrition in Stage 5 Chronic Kidney Disease Patients after Parathyroidectomy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27918.
100. Korczyńska, J.; Czumaj, A.; Chmielewski, M.; Śledziński, M.; Mika, A.; Śledziński, T. Increased expression of the leptin gene in adipose tissue of patients with chronic kidney disease—the possible role of an abnormal serum fatty acid profile. *Metabolites* **2020**, *10*.
101. Frühbeck, G.; Catalán, V.; Rodríguez, A.; Ramírez, B.; Becerril, S.; Salvador, J.; Portincasa, P.; Colina, I.; Gómez-Ambrosi, J. Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
102. Yadav, V.K.; Oury, F.; Suda, N.; Liu, Z.W.; Gao, X.B.; Confavreux, C.; Klemenhagen, K.C.; Tanaka, K.F.; Gingrich, J.A.; Guo, X.E.; et al. A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell* **2009**, *138*, 976–989.
103. Patel, T.P.; Rawal, K.; Soni, S.; Gupta, S. Swertiamarin ameliorates oleic acid induced lipid accumulation and oxidative stress by attenuating gluconeogenesis and lipogenesis in hepatic steatosis. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 785–791.
104. Wang, Y.; Botolin, D.; Xu, J.; Christian, B.; Mitchell, E.; Jayaprakasam, B.; Nair, M.; Peters, J.M.; Busik, J.; Olson, L.K.; et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 2028–2041.
105. Caputo, M.; De Rosa, M.C.; Rescigno, T.; Zirpoli, H.; Vassallo, A.; De Tommasi, N.; Torino, G.; Tecce, M.F. Binding of polyunsaturated fatty acids to LXR  $\alpha$  and modulation of SREBP-1 interaction with a specific SCD1 promoter element. *Cell Biochem. Funct.* **2014**, *32*, 637–646.
106. Mater, M.K.; Thelen, A.P.; Jump, D.B. Arachidonic acid and PGE2 regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1045–52.
107. Joseph, S.B.; Laffitte, B.A.; Patel, P.H.; Watson, M.A.; Matsukuma, K.E.; Walczak, R.; Collins, J.L.; Osborne, T.F.; Tontonoz, P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11019–11025.
108. Ntambi, J.M.; Miyazaki, M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 91–104.
109. Liu, X.; Strable, M.S.; Ntambi, J.M. Stearoyl CoA Desaturase 1: Role in Cellular Inflammation and Stress. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 15–22.
110. Swanson, C.R.; Li, K.; Unger, T.L.; Gallagher, M.D.; Van Deerlin, V.M.; Agarwal, P.; Leverenz, J.; Roberts, J.; Samii, A.; Gross, R.G.; et al. Lower plasma apolipoprotein A1 levels are found in Parkinson's disease and associate with apolipoprotein A1 genotype. *Mov. Disord.* **2015**, *30*, 805–812.

111. Wu, X.; Yu, Z.; Su, W.; Isquith, D.A.; Neradilek, M.B.; Lu, N.; Gu, F.; Li, H.; Zhao, X.Q. Low levels of ApoA1 improve risk prediction of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 362–368.
112. Li, B.; Liu, Y.; Yuan, Q.; Lin, Q.; Shi, W.-Q.; Zhu, P.-W.; Min, Y.-L.; Ge, Q.-M.; Shao, Y. Apolipoprotein A1 and Low-Density Lipoprotein as Risk Factors for Intraocular Metastases in Postmenopausal Breast Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2021**, *20*.
113. Ruiz-Ojeda, F.J.; Rupérez, A.I.; Gomez-Llorente, C.; Gil, A.; Aguilera, C.M. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*.
114. Worgall, T.S.; Sturley, S.L.; Seo, T.; Osborne, T.F.; Deckelbaum, R.J. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25537–40.
115. Joon, N.L.; Zhang, X.; Feramisco, J.D.; Gong, Y.; Ye, J. Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of insig-1 at a postubiquitination step. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33772–33783.
116. Lodhi, I.J.; Wei, X.; Semenkovich, C.F. Lipoexpediency: De novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 1–8.
117. Silha, J. V; Krsek, M.; Skrha, J. V; Sucharda, P.; Nyomba, L.G.; Murphy, L.J. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur. J. Endocrinol.* **2003**, *149*, 331–335.
118. Al Maskari, M.Y.; Alnaqdy, A.A. Correlation between serum leptin levels, body mass index and obesity in Omanis. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **2006**, *6*, 27–31.
119. Diwan, A.G.; Kuvalekar, A.A.; Dharamsi, S.; Vora, A.M.; Nikam, V.A.; Ghadge, A.A. Correlation of serum adiponectin and leptin levels in obesity and Type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2018**, *22*, 93–99.

## 10. Załączniki

- Załącznik A: Increased expression of the leptin gene in adipose tissue of patients with chronic kidney disease : the possible role of an abnormal serum fatty acid profile. Justyna Korczyńska, **Aleksandra Czumaj**, Michał Chmielewski, Maciej Śledziński, Adriana Mika, Tomasz Śledziński. *Metabolites* 2020, 10 (3)
- Załącznik B: Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease. **Aleksandra Czumaj**, Tomasz Śledziński. *Nutrients* 2020, 12(2)
- Załącznik C: Alterations of fatty acid profile may contribute to dyslipidemia in chronic kidney disease by influencing hepatocyte metabolism. **Aleksandra Czumaj**, Tomasz Śledziński, Juan-Jesus Carrero, Piotr Stepnowski, Małgorzata Sikorska-Wiśniewska, Michał Chmielewski, Adriana Mika. *International Journal of Molecular Science* 2019, 20(10)
- Załącznik D: Cyclopropanoic acid 2-Hexyl upregulates the expression of genes responsible for lipid synthesis and release in human hepatic HepG2 cells. **Aleksandra Czumaj**, Adriana Mika, Michał Chmielewski, Tomasz Śledziński. *Lipids* 2018, 53(3)

## 10.1 Załącznik A

[Increased expression of the leptin gene in adipose tissue of patients with chronic kidney disease : the possible role of an abnormal serum fatty acid profile.](#)

Justyna Korczynska, Aleksandra Czumaj, Michał Chmielewski, Maciej Sledzinski, Adriana Mika, Tomasz Sledzinski.

Metabolites 2020, 10 (3)

## **10.2 Załącznik B**

[Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease.](#)

Aleksandra Czumaj, Tomasz Śledziński.

Nutrients 2020, 12(2)



### 10.3 Załącznik C

[Alterations of fatty acid profile may contribute to dyslipidemia in chronic kidney disease by influencing hepatocyte metabolism.](#)

Aleksandra Czumaj, Tomasz Śledziński, Juan-Jesus Carrero, Piotr Stepnowski, Malgorzata Sikorska-Wisniewska, Michal Chmielewski, Adriana Mika.

International Journal of Molecular Science 2019, 20(10)

## 10.4 Załącznik D

[Cyclopropanoic acid 2-Hexyl upregulates the expression of genes responsible for lipid synthesis and release in human hepatic HepG2 cells.](#)

Aleksandra Czumaj, Adrana Mika, Michał Chmielewski, Tomasz Śledziński.

Lipids 2018, 53(3)