

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) affecting approximately 24% of the worldwide population is the main leading cause of chronic liver disease. The increased number of fatty liver cases considered as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome, is rising in parallel with obesity and type 2 diabetes. This is mainly associated with the sedentary habits and overconsumption of hypercaloric diets. The initial stage of NAFLD - non-alcoholic fatty liver (NAFL) is characterized by a metabolic remodelling of the liver to compensate the overload of fat accumulation. Although, this compensatory event seems to be abolished during disease progression. Along this process, mitochondrial function impairment and an exacerbation of oxidative stress have been described to trigger hepatic signalling pathways associated with the initiation of inflammation, fibrosis and cirrhosis (transition to non-alcoholic steatohepatitis (NASH)). Despite the advances in the field, the primary mechanisms underlying the development of NAFL and its progression into NASH are complex and still incomplete.

In this context, my first aim was to study the hepatic and mitochondrial redox-associated alterations in a NAFL stage. I have characterized hepatic proteome, mitochondrial structure and function, reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defences in a mouse model of early NAFLD stage. Induction of NAFL resulted from a chronic feeding (16 weeks) of mice with different diets: high-fat, high-sucrose or high-fat plus high-sucrose diets. I have shown (see Chapter 1), that no excess of mitochondrial ROS took place in NAFL. Therefore, I have suggested that other organelles as peroxisomes rather than mitochondria contribute to hepatic oxidative stress. Moreover, I established that fat and sucrose (components of Western diet) differentially impair autophagy.

In the second aim, I investigated the specific end-points for mitochondrial dysfunction that represent “a point of no return” and which drive disease progression along time. NAFL development has been studied with the use Western diet (WD) in an early NAFLD stage mice model. The combination of high-fat and high-sucrose representing Western diet good resemble human NAFLD features of the disease development. In this part of my thesis (see Chapter 2), I demonstrated for the first time

the sequential events of mitochondrial alterations during NAFL development and progression. I showed that in a more progressive NAFL stage previously observed mitochondrial adaptation in NAFL was followed by a progressive decrease of mitochondrial respiration concomitant with a higher susceptibility to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. Importantly, it was proven that mitochondrial ROS are not the first hit causing disease progression. Instead, my findings continue to support the role of peroxisomes as possible contributors to the hepatic oxidative damage in the origin of hepatic injury and progression of the disease.

The last part of my thesis was focused on the testing of a dietary-based mitochondrially-targeted antioxidant as new therapeutics for NAFLD. In this context, I aimed to validate the effectiveness of such compound in the prevention of NAFL development (see Chapter 3). I demonstrated that AntiOxClN₄ supplementation improved hepatocytes phenotype in a NAFL context. This included the stimulation of the hepatic fatty acids oxidation and the stimulation of the endogenous antioxidant defence system, as well as the prevention of autophagic flux blockage. These findings supported the idea that the AntiOxClN₄ could be a new promising NAFLD therapeutics.

The unravelling of the molecular pathways involved in early events of NAFLD pathogenesis will allow the design more effective therapeutic approaches. These strategies able to delay or even revert NAFLD are urgently needed since the available NAFLD therapies are based only on lifestyles changes by implementation of exercise activity and healthy diets.

STRESZCZENIE

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang., *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* - NAFLD) dotykająca około 24% światowej populacji, stała się główną przyczyną przewlekłej niewydolności wątroby. Wzrost liczby przypadków stłuszczenia wątroby jako jednego z objawów zespołu metabolicznego, rośnie równolegle z otyłością i cukrzycą typu 2. Jest to głównie związane z siedzącym trybem życia, brakiem aktywności fizycznej oraz spożywaniem wysokokalorycznego pokarmu. Początkowy etap NAFLD - niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFL), charakteryzuje się zmianami w metabolizmie wątroby w celu skompensowania nadmiernej akumulacji tłuszczu. Niestety tego typu mechanizmy kompensacyjne zanikają w kolejnych stadiach choroby. Uważa się, że upośledzenie funkcji mitochondriów i nasilenie stresu oksydacyjnego mogą być odpowiedzialne za inicjację stanu zapalnego i zwłóknienia, co powoduje rozwój choroby w kierunku stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH), a następnie marskości tego narządu. Pomimo postępów w badaniach nad NAFLD, złożone mechanizmy leżące u podstaw przejścia z NAFL do NASH, wciąż nie są w pełni poznane.

Dlatego też, moim pierwszym celem było zbadanie zmian związanych z zaburzeniem procesów redoks w wątrobie i mitochondriach wątroby na wczesnym etapie choroby (NAFL). Scharakteryzowałam proteom wątroby, strukturę i funkcję mitochondriów, wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) i obronę antyoksydacyjną w mysim modelu wczesnego stadium NAFLD. NAFL był wynikiem przewlekłego karmienia (16 tygodni) myszy różnymi dietami: dietą wysokotłuszczową (HF), dietą wysokocukrową (HS) oraz dietą wysokotłuszczową wzbogaconą w sacharozę (HFHS). Wykazałam (patrz Rozdział 1), że w NAFL mitochondria nie przyczyniają się do zwiększonej produkcji RFT. Zasugerowałam, że to m.in. peroksysomy przyczyniają się do stresu oksydacyjnego obserwowanego w wątrobie. Dodatkowo ustaliłam, że tłuszcze i węglowodany w różny sposób zaburzają proces autofagii.

Drugim celem mojej pracy było zbadanie specyficznych punktów końcowych dysfunkcji mitochondriów, które stanowią tak zwany „punkt bez powrotu” i kierują postępem choroby w czasie. Wykorzystując dietę wysokotłuszczową, wzbogaconą w sacharozę, która najlepiej naśladuje nawyki żywieniowe naszego społeczeństwa (ang.:

Western Diet) zbadalam mechanizmy zaangażowane w rozwój NAFLD. W tej części pracy (patrz Rozdział 2), jako pierwsza pokazałam sekwencje zaburzeń mitochondrialnych podczas rozwoju i progresji NAFL. Wykazałam, że w bardziej zaawansowanym stadium NAFL, po pierwotnej adaptacji mitochondriów, następował postępujący spadek oddychania mitochondrialnego, któremu towarzyszyła większa podatność na otwarcie mitochondrialnego megakanalu. Co ważne, udowodniłam, że RFT powstające w mitochondriach nie są czynnikiem odpowiedzialnym za postęp choroby. Dodatkowo, wyniki moich badań wskazują na peroksosomy jako możliwe źródło RFT przyczyniających się do oksydacyjnych uszkodzeń wątroby, będących przyczyną narastania uszkodzenia wątroby.

Ostatnia część mojej pracy koncentrowała się na wykorzystaniu, kierowanego do mitochondriów przeciwutleniacza jako nowego środka terapeutycznego w leczeniu NAFLD. Postanowiłam sprawdzić skuteczność takiego związku w zahamowaniu rozwoju NAFL (patrz Rozdział 3). Wykazałam, że suplementacja AntiOxCIN4 poprawiła funkcjonowanie hepatocytów w kontekście rozwoju NAFL. Zjawisko to obejmowało stymulację utleniania kwasów tłuszczowych i aktywację systemu obrony antyoksydacyjnej, a także zapobieganie zahamowaniu procesu autofagii. Moje badania wydają się potwierdzać tezę, że AntiOxCIN4 może być nowym obiecującym lekiem na NAFLD.

Odkrywanie szlaków molekularnych zaangażowanych we wczesne etapy patogenezy NAFLD pozwoli na zaprojektowanie bardziej skutecznego podejścia terapeutycznego. Te strategie, mogące opóźnić lub nawet zahamować postęp NAFLD są niezwykle potrzebne, ponieważ dostępne obecnie terapie NAFLD oparte są jedynie na zaleceniach zmiany stylu życia poprzez wdrożenie aktywności fizycznej i zdrowej diety.