



## Antioxidant Therapy Ameliorates Hepatotoxicity Induced by Microcystin-LR in an Oleic acid-induced Model of Hep3B Cells Mimicking the Diet-induced Mouse Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Apurva LAD<sup>1</sup>, Jason BREULER<sup>1</sup>, Prajwal HEGDE<sup>1</sup>, Fatimah KHALAF<sup>1,2</sup>, Andrew L. KLEINHENZ<sup>1</sup>, Terry HINDS<sup>3</sup>, Deepak MALHOTRA<sup>1</sup>, Steven T. HALLER<sup>1,\*</sup> & David J. KENNEDY<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, University of Toledo, Toledo, OH 43614, USA

<sup>2</sup> University of Alkafel College of Medicine, Najaf 54001, Iraq

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Nutritional Sciences, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, KY 40506, USA

**SUMMARY.** Microcystin-LR (MC-LR) is a potent hepatotoxin that has been evidenced to cause significant liver damage even at doses lower than the formerly specified No Observable Adverse Effect Level (NOAEL). We have previously observed that low dose exposure to MC-LR in animals with diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and their subsequent treatment with antioxidants like N-acetyl cystine (NAC) and the Na/K ATPase-*Src* kinase inhibitor pNaKtide significantly alleviated hepatic infiltration of immune cells, down regulated markers of inflammation and hepatotoxicity, increased the breakdown of the toxin molecule and restored phase I and phase II metabolism pathways of the drug including the glutathione pathway. Since the liver is composed of heterogeneous cell types, this study aimed to determine the specific role of hepatocytes in the uptake and metabolism of MC-LR, especially in the setting of NAFLD. To address this, we used two well-established hepatocyte cell lines-AML12 murine hepatocytes and human Hep3B hepatocytes. The cells were exposed to 10  $\mu$ M of MC-LR in the presence and absence of pNaKtide (1  $\mu$ M) and NAC (10 mM). We observed that exposure to MC-LR significantly increased markers of inflammation and hepatotoxicity, which were significantly attenuated with antioxidant treatment. To model steatosis hepatocytes characteristic of the NAFLD phenotype, cells were first treated with 500  $\mu$ M of oleic acid (OA) before exposing them to the toxin in the presence and absence of antioxidants. MC-LR exposure induced markers of inflammation and hepatotoxicity that were significantly increased in the presence of OA as compared to MC-LR exposure alone. These were significantly attenuated with both pNaKtide (1  $\mu$ M) and NAC (10 mM). These observations support the central role that hepatocytes play in the uptake and metabolism of MC-LR, which is convoluted by the presence of NAFLD-like conditions.

**RESUMEN.** Microcystin-LR (MC-LR) es una hepatotoxina potente que se ha demostrado que causa un daño hepático significativo incluso en dosis más bajas que el nivel sin efectos adversos observables (NOAEL) especificado anteriormente. Hemos observado previamente que la exposición a dosis bajas de MC-LR en animales con enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) inducida por la dieta y su posterior tratamiento con antioxidantes como la N-acetilcistina (NAC) y la Na/K ATPasa-*Src* quinasa El inhibidor pNaKtide alivió significativamente la infiltración hepática de células inmunitarias, redujo los marcadores de inflamación y hepatotoxicidad, aumentó la descomposición de la molécula de toxina y restauró las vías metabólicas de fase I y fase II del fármaco, incluida la vía del glutatión. Dado que el hígado se compone de tipos de células heterogéneas, este estudio tuvo como objetivo determinar el papel específico de los hepatocitos en la captación y el metabolismo de MC-LR, especialmente en el contexto de NAFLD. Para abordar esto, utilizamos dos líneas celulares de hepatocitos bien establecidas: hepatocitos murinos AML12 y hepatocitos humanos Hep3B. Las células se expusieron a 10  $\mu$ M de MC-LR en presencia y ausencia de pNaKtide (1  $\mu$ M) y NAC (10 mM). Observamos que la exposición a MC-LR aumentó significativamente los marcadores de inflamación y hepatotoxicidad, que se atenuaron significativamente con el tratamiento antioxidante. Para modelar los hepatocitos de esteatosis característicos del fenotipo NAFLD, las células se trataron primero con 500  $\mu$ M de ácido oleico (OA) antes de exponerlas a la toxina en presencia y ausencia de antioxidantes. La exposición a MC-LR indujo marcadores de inflamación y hepatotoxicidad que aumentaron significativamente en presencia de OA en comparación con la exposición a MC-LR sola. Estos se atenuaron significativamente tanto con pNaKtide (1  $\mu$ M) como con NAC (10 mM). Estas observaciones respaldan el papel central que desempeñan los hepatocitos en la captación y el metabolismo de MC-LR, que se complica por la presencia de condiciones similares a NAFLD.

**KEY WORDS:** antioxidant therapy, Hep3B Cells, microcystin-LR, oleic acid-induced model.

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* David.Kennedy@utoledo.edu, Steven.Haller@utoledo.edu