

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU,  
SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU,  
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ  
DOKTORSKI STUDIJ MOLEKULARNE BIOZNANOSTI

Ana Petrović, dr. med.

Osobitosti učinaka semaglutida u HepG2  
eksperimentalnom modelu masne promjene jetre

Doktorski rad

Osijek, 2025.

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: temeljne medicinske znanosti, biologija

**Osobitosti učinaka semaglutida u HepG2-eksperimentalnom modelu masne**

**promjene jetre**

Ana Petrović

**Doktorski rad je izrađen u:** Laboratorij za translacijsku medicinu, Zavod za translacijsku medicinu, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Mentor/i:** Prof. dr. sc. Martina Smolić, redovita profesorica Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### Kratki sažetak doktorskog rada:

Semaglutid, odobren je za liječenje progresivnijih oblika masne promjene jetre. Cilj istraživanja bio je istražiti učinke semaglutida na masne promjene HepG2-stanica *in vitro*. Semaglutid pokazao je učinke na stanično preživljenje, nakupljanje lipida te gene i razinu proteina koji sudjeluju u steatogenim i upalnim procesima, kao i regulaciji oksidacijskog stresa u jetri.

**Broj stranica:** 94

**Broj slika:** 6

**Broj tablica:** 41

**Broj literaturnih navoda:** 111

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** MASLD, semaglutid, HepG2

**Datum javne obrane:**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

Doctoral Study of Molecular biosciences

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** basic medical sciences, biology

### **Specificity of Semaglutide Effects in HepG2 Experimental Model of Hepatic Steatosis**

Ana Petrović

**Thesis performed at:** Laboratory for Translational Medicine, Department for Translational Medicine, Faculty of Dental Medicine and Health, J. J. Strossmayer University of Osijek

**Supervisor/s:** Martina Smolić, PhD, Full professor at Faculty of dental medicine and health, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

#### **Short abstract:**

Semaglutide is approved for the treatment of more progressive forms of fatty liver disease. The aim of the study was to investigate the effects of semaglutide on fatty liver disease in HepG2 cells in vitro. Semaglutide showed effects on cell survival, lipid accumulation, and genes and protein levels involved in steatogenic and inflammatory processes, as well as the regulation of oxidative stress in the liver.

**Number of pages:** 94

**Number of figures:** 6

**Number of tables:** 41

**Number of references:** 111

**Original in:** Croatian

**Key words:** MASLD, semaglutide, HepG2

**Date of the thesis defense:**

**Reviewers:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

---

## Sadržaj

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Metabolički uzrokovana masna bolest jetre .....                                                                                                 | 1  |
| 1.1.1. Nomenklatura .....                                                                                                                            | 1  |
| 1.1.2. Epidemiologija .....                                                                                                                          | 2  |
| 1.1.3. Patofiziologija .....                                                                                                                         | 3  |
| 1.1.4. Klinička slika, dijagnostičke metode i farmakoterapija MASLD-a .....                                                                          | 8  |
| 1.2. Glukagonu sličan peptid 1 .....                                                                                                                 | 9  |
| 1.2.1. Inkretini .....                                                                                                                               | 9  |
| 1.2.2. GLP-1RA .....                                                                                                                                 | 11 |
| 1.2.3. Uloga GLP-1RA u MASLD-u .....                                                                                                                 | 11 |
| 1.3. HepG2 stanična linija .....                                                                                                                     | 14 |
| 2. Hipoteza .....                                                                                                                                    | 17 |
| 3. Ciljevi istraživanja .....                                                                                                                        | 18 |
| 4. Materijali i metode .....                                                                                                                         | 19 |
| 4.1. Kultivacija stanica i nasadivanje stanica u eksperimentalne mikropločice .....                                                                  | 19 |
| 4.2. Uspostava dva eksperimentalna modela MASLD-a .....                                                                                              | 21 |
| 4.3. Određivanje koncentracije oleinske kiseline za uspostavu optimalnog terapijskog i preventivnog staničnog modela MASLD-a u stanicama HepG2 ..... | 21 |
| 4.4. Tretman stanica semaglutidom u preventivnom i terapijskom modelu MASLD-a .....                                                                  | 22 |
| 4.5. Mjerenje staničnog preživljenja u oba modela istraživanja .....                                                                                 | 25 |
| 4.6. Mjerenje učinaka semaglutida na nakupljanje lipida .....                                                                                        | 25 |
| 4.7. Procjena učinka semaglutida na metabolizam triglicerida .....                                                                                   | 26 |
| 4.8. Mjerenje koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u stanicama .....                                                                           | 26 |
| 4.9. Određivanje razine proteina uključenih u patofiziologiju MASLD-a (PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\alpha$ , MTTP, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ): ..... | 28 |
| 4.10. Određivanje razine ekspresije gena uključenih u patofiziologiju MASLD-a ..                                                                     | 28 |
| 4.10.1. Izolacija ukupne RNA iz HepG2-stanica .....                                                                                                  | 28 |
| 4.10.2. Reverzna transkripcija .....                                                                                                                 | 29 |
| 4.10.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....                                                                          | 30 |
| STATISTIČKE METODE .....                                                                                                                             | 31 |
| 5. Rezultati .....                                                                                                                                   | 33 |
| 5.1. Terapijski model MASLD-a .....                                                                                                                  | 33 |

---

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično preživljenje MTS testom .....                    | 33 |
| 5.1.2. Procjena učinka semaglutida na stanično preživljenje.....                                                               | 34 |
| 5.1.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem.....                                                     | 36 |
| 5.1.4. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom .....                                                 | 38 |
| 5.1.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH.....                                                                   | 39 |
| 5.1.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u terapijskom modelu MASLD-a ..... | 40 |
| 5.1.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u terapijskom modelu MASLD-a.....      | 45 |
| 5.2. Preventivni model MASLD-a .....                                                                                           | 50 |
| 5.2.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično preživljenje MTS testom .....                    | 50 |
| 5.2.2. Procjena učinka semaglutida na stanično preživljenje u preventivnom modelu.....                                         | 51 |
| 5.2.3. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem u preventivnom modelu MASLD-a.....                       | 53 |
| 5.2.4. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom .....                                                 | 55 |
| 5.2.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH.....                                                                   | 56 |
| 5.2.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u preventivnom modelu MASLD-a..... | 57 |
| 5.2.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u preventivnom modelu MASLD-a.....     | 62 |
| 6. Rasprava .....                                                                                                              | 67 |
| 7. Zaključci.....                                                                                                              | 75 |
| 8. Sažetak.....                                                                                                                | 76 |
| 9. Summary .....                                                                                                               | 77 |
| 10. Literatura .....                                                                                                           | 78 |
| 11. Životopis .....                                                                                                            | 86 |

---

## 1. UVOD

### 1.1. Metabolički uzrokovana masna bolest jetre

Metabolički uzrokovana masna bolest jetre (MASLD, od eng. Metabolic Dysfunction - Associated Steatotic Liver Disease), rastući je globalni javnozdravstveni problem, a u osnovi je karakterizira prekomjerno nakupljanje masnoća u jetri, snažna povezanost s pretilošću, šećernom bolešću tipa 1 i 2 (ŠB1 i ŠB2), hiperlipidemijom i drugim kardiometaboličkim poremećajima, te mogućnost progresije u steatohepatitis (MASH, od eng. Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis), steatofibrozu, cirozu te maligna jetrena oboljenja. Unatoč globalnom opterećenju zdravstvenog sustava, patogeneza ove bolesti još nije potpuno jasna, a odobrena farmakoterapija za ovu bolest i dalje je oskudna <sup>1,2</sup>.

#### 1.1.1. Nomenklatura

Donedavno je bila poznata kao nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, od eng. Nonalcoholic Fatty Liver Disease) <sup>3,4</sup>. Potreba za promjenom nomenklature proizlazila je iz stigmatizirajućih pojmova ("nealkoholna" i "masna") ovog kliničkog entiteta te djelomično nejasnih kriterija za dijagnosticiranje NAFLD-a. Odnosno, dotadašnja nomenklatura nije u potpunosti omogućavala diferencijaciju pacijenata s NAFLD-om od pacijenata s NAFLD-om i povećanim unosom alkohola, zbog čega pacijenti nisu bili adekvatno prepoznati te su povremeno isključivani iz ispitivanja i razmatranja za farmakoterapiju <sup>4,5</sup>.

Iz navedenih razloga, Delphi konsenzusom iz 2023., prestižna društva kao što su Američko društvo za proučavanje bolesti jetre (AASLD, od eng. American Association for the Study of Liver Diseases) i Europsko društvo za proučavanje jetre (EASL, od eng. European Association for the Study of the Liver) uz brojne stručnjake u polju istraživanja te liječenju masnih bolesti jetre, stvorili su novi "kišobran" termin - steatotična bolest jetre (SLD, od eng. Steatotic liver disease) koja obuhvaća MASLD, MASLD s povećanim unosom alkohola (MetALD, od eng. MASLD and increased alcohol intake), alkoholna bolest jetre (ALD, od eng. Alcohol – associated Liver

---

Disease), kriptogeni SLD te SLD specifične etiologije (kao što su lijekovima uzrokovano oštećenje jetre, monogenske bolesti) <sup>4,5</sup>.

U kontekstu istraživanja MASLD-a, postavilo se pitanje utječe li promjena nomenklature na interpretaciju i translaciju spoznaja dosadašnjih studija o tijeku bolesti, patofiziologiji, biomarkerima i kliničkim ispitivanjima potencijalnih farmakoterapeutika na novije studije. Stoga je važno naglasiti da su robustne analize postojećih registara u Europi i Sjevernoj Americi pokazale 98-99% preklapanja između pacijenata s dijagnosticiranim NAFLD-om/MASLD-om, ali i njihovim progresivnijim oblicima <sup>4,6,7</sup>, omogućavajući tako neometan daljnji tijek studija.

I u ovoj studiji, shodno smjernicama, koristi se terminologija MASLD, kao i MASH, kao istoznačnica pojmova NAFLD i NASH. Ovo je važno naglasiti zbog velikog broja citiranih studija, koje su koristile prijašnju terminologiju.

### *1.1.2. Epidemiologija*

MASLD se smatra najčešćim uzrokom kronične bolesti jetre (CLD, od eng. Chronic Liver Disease), a najnovije meta-analize procjenjuju da globalno ~40% odraslih pacijenata boluje od MASLD-a, dok se u pedijatrijskoj populaciji prevalencija procjenjuje između 7-15% <sup>8</sup>. Zabrinjavajuć je i rastući trend prevalencije MASLD-a unazad nekoliko desetljeća, s povećanjem od 50% globalne prevalencije MASLD-a od 1990 - 2019. Najveća prevalencija zabilježena je u Latinskoj Americi (55%), dok je u zapadnoj Europi ipak nešto optimističnije (25%) <sup>9</sup>. S modernim sjedilačkim načinom života, opsežnim konzumiranjem rafiniranog šećera i zasićenih masti u "fast food" kulturi, trend porasta prevalencije MASLD-a direktno je povezan s rastom prevalencije pretilosti i ŠB <sup>10</sup>. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, trenutno vlada "epidemija" pretilosti čija se prevalencija trenutno procjenjuje na 16% svjetske populacije <sup>12</sup>, dok 43% odraslih ima prekomjernu tjelesnu težinu, a od ŠB boluje 15% svjetske odrasle populacije <sup>11,12</sup>.

Značaj porasta prevalencije ovih bolesti u kontekstu razumijevanja MASLD-a, posebno je ukazana činjenicom da je prevalencija MASLD-a značajno veća u pacijenata s ovim bolestima, sa studijama koje prijavljuju da je čak 75% pretilih pacijenata razvilo MASLD, a 34%, odnosno 20%, tih slučajeva napredovalo je u MASH, odnosno fibrozu

---

<sup>13</sup>. Među pacijentima sa ŠB2, prevalencija MASLD-a procijenjena je na 50-80%, s najvišom incidencijom u Istočnoj Europi, koja je iznosila 68%, a među biopsiranim pacijentima 66% razvilo je MASH sa značajnim ili uznapredovalim stupnjem fibroze <sup>10</sup>.

Zbog nedostatka epidemioloških studija, trenutno se smatra da prevalencija MASLD-a u Hrvatskoj odgovara prevalenciji u Zapadnoj Europi (20%-30%). U studiji iz 2018. na pacijentima u Hrvatskoj, upućenima na abdominalni ultrazvuk iz bilo kojeg razloga, u 48,5% pacijenata ultrazvučno je utvrđena masna jetra <sup>14,15</sup>.

Iz ovih podataka proizlaze dva ključna zaključka. Patofiziološki je MASLD snažno povezan sa ŠB i pretilošću, a u kontekstu liječenja postoji potreba za urgentnom farmakološkom intervencijom u blažim stadijima MASLD-a kako bi se regulirala visoka stopa progresije ove bolesti u ozbiljnije oblike.

### 1.1.3. Patofiziologija

Unatoč naporima znanstvene zajednice u istraživanju patogeneze i molekularnih mehanizama uključenih u razvoj i progresiju MASLD-a, patofiziološki procesi i dalje nisu dovoljno razjašnjeni. Razlog tome je složenost ove bolesti, odnosno multi-organska uključenost u njen razvoj, višesmjerna povezanost sa ŠB, pretilošću i drugim metaboličkim poremećajima čiji međusobno isprepleten odnos predstavlja velik izazov u razumijevanju molekularnih mehanizama, a tako i napredcima u dijagnostici i farmakoterapiji <sup>16</sup>.

Teorija višestrukih hitaca, smatra se najboljim objašnjenjem razvoja MASLD-a <sup>17</sup>. Prema ovoj hipotezi, kombinacija genetskih i epigenetskih, okolišnih čimbenika, prehrambenih i životnih navika, uzrokuju promjene u inzulinskoj rezistenciji, disregulaciju metaboličkih procesa u masnom tkivu, jetri i gušterači. Zbog neraskidive međusobne ovisnosti ovih organa i za održavanje metaboličke homeostaze nužnoj sinergiji njihovih fizioloških funkcija, dolazi do poremećaja na osima masno tkivo/gušterača/jetra. Inzulinska rezistencija smatra se ključnim čimbenikom u patofiziologiji MASLD-a.

U organizmu s inzulinskom rezistencijom dolazi do hiperinzulinemije, ovaj višak inzulina u jetri aktivacijom proteina 1c koji veže sterolni regulatorni element (SREBF-1c, od eng. sterol regulatory element-binding protein 1c) rezultira povećanjem *de novo*

lipogeneze. U masnom tkivu, neosjetljivom na inzulin, dolazi do neadekvatnog odgovora na inzulin, odnosno, izostaje inhibicija lipolize, zbog čega se iz adipocita oslobađaju masne kiseline<sup>18</sup>. Unos masnih kiselina iz prehrane, cirkulirajuće masne kiseline oslobođene lipolizom u masnom tkivu i *de novo* sinteza u hepatocitima rezultira velikom količinom slobodnih masnih kiselina u jetri, uzrokujući nakupljanje masnoća, odnosno, steatozu jetre. Nakupljene masne kiseline postaju lipotoksične, dolazi do povećanog oksidativnog stresa u jetrenim stanicama, disfunkcije mitohondrija i peroksisoma, stresa endoplazmatskog retikuluma, te apoptoze hepatocita<sup>19</sup>.

Dva ključna mehanizma uklanjanja masnih kiselina iz hepatocita su oksidacija u mitohondrijima i peroksisomima te njihovu sekreciju u krvotok u obliku lipoproteina. Navedeni procesi mogu biti ograničeni na jednostavnu steatozu, dok jetra ima kapacitete za održavanje ravnoteže povećanom oksidacijom masnih kiselina, regulacijom oksidativnog stresa i transportom triglicerida u obliku lipoproteina.

Jedna od ključnih molekula u regulaciji oksidativnog stresa je glutation (GSH). GSH predstavlja glavni tiol niske molekularne težine odgovoran za održavanje stanične redox homeostaze. Sintetiziran prvenstveno u jetri, GSH služi kao ključni antioksidans izravnom regulacijom reaktivnih vrsta kisika (ROS), stvaranjem oksidiranog glutationa (GSSG) i djelovanjem kao kosupstrat za razne antioksidativne enzime. U kontekstu MASLD-a, promjene u homeostazi GSH odražavaju oštećenje hepatocita uzrokovano oksidativnim stresom. Međutim, studije su pokazale nedosljedne spoznaje u kontekstu razina GSH u pacijenata s MASLD-om. Nekolicinom studija dokazane su povišene razine GSH u jetri i cirkulaciji kod pacijenata s MASLD/MASH, dok su druge pokazale izraženo smanjenje GSH, što je u korelaciji sa stupnjem progresije MASLD/MASH-a

20.

U regulaciji oksidativnog stresa, važnu ulogu imaju i peroksisomi, stanični organeli koji sadrže enzime ključne za metaboličke procese kao što su  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina i metabolizam reaktivnih vrsta kisika (ROS, eng. reactive oxygen species). Hepatociti sadrže izrazito velik broj peroksisoma (300-600/stanici) u usporedbi s ostalim stanicama, a disfunkcija peroksisoma povezana je s nizom bolesti, posebno jetrenim, kao što je steatoza, kolestaza, ali i insuficijencija jetre. Osim izrazito značajne uloge u lipidnom metabolizmu, ovi organeli reguliraju oksidativni stres i ROS koji nastaju tijekom metaboličkih procesa kao što su sinteza žučnih kiselina i  $\beta$ -oksidacije. Iznimno važna peroksisomska katalaza štiti hepatocite od oksidativnog stresa stoga ne čudi da

se disfunkcija peroksisoma pokazala kao važan čimbenik u oštećenju jetre te patofiziologiji MASLD-a, ŠB, pretilosti, ali i onkogenezi <sup>21</sup>. Peroksisomi su specifični organeli koji posjeduju mogućnost prilagodbe ovisno o staničnim potrebama, odnosno u odgovoru na promjene u količini metabolita, poremećajima metabolizma, izvanstanične signale, peroksisomi se mogu rapidno degradirati ili proliferirati, što rezultira povećanjem broja i volumena peroksisoma te promjenom aktivnosti peroksisomalnih enzima. U ovim procesima, ključni su peroksisomskim proliferatorima aktivirani receptori (PPAR-ovi, eng. Peroxisome proliferator-activated receptors), nuklearni transkripcijski faktori koji pripadaju skupini steroidnih hormonskih receptora, te reguliraju transkripciju brojnih gena uključenih u metaboličke i stanične procese, uključujući proliferaciju stanica, diferencijaciju te imunološke i upalne odgovore. Identificirana su tri podtipa - PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  i PPAR- $\gamma$  - koji pokazuju različitu, ali djelomično preklapajuću distribuciju i funkcije u tkivima.

PPAR- $\alpha$  se visoko eksprimira u tkivima s aktivnom oksidacijom masnih kiselina, primarno u jetri, ali i srčanom i skeletnom mišićju, a PPAR- $\gamma$  je najzastupljeniji u masnom tkivu <sup>22</sup>. Peroksisomski proliferatori mogu biti endogeni, kao što su masne kiseline, ili egzogeni, među kojima je i cijela skupina hipolipidemijskih lijekova zvana PPAR agonisti <sup>23</sup>, široko korištena u liječenju metaboličkih poremećaja kao što su dislipidemija, ŠB2, hipertenzija, pretilost, masna promjena jetre te u terapiji metaboličkog sindroma, koji predstavlja klaster svih ovih poremećaja. Ovi lijekovi aktivacijom PPAR-ova povećavaju oksidaciju masnih kiselina i smanjuju nakupljanje lipida u jetri te snižavaju plazmatske koncentracije triglicerida, reguliraju homeostazu glukoze i poboljšavaju inzulinsku rezistenciju, a utječu i na adipogenezu. U kontekstu MASLD-a, također imaju značajne učinke na smanjenje upale i fibrinogeneze <sup>24</sup>, zbog čega su se novije generacije dualnih/pan agonista posebno istaknule kao farmakoterapijska opcija za liječenje MASH-a <sup>25</sup>.

Smatra se da u MASLD-u dolazi do disfunkcije PPAR-ova. Prekomjerno nakupljanje lipida u jetri može narušiti aktivnost PPAR- $\alpha$ , a time i ravnotežu metabolizma lipida. U hepatocitima, protein-1c koji veže sterolni regulatorni element (SREBP-1c) ključni je transkripcijski faktor koji potiče de novo lipogenezu. Supresija/disfunkcija PPAR- $\alpha$  omogućuje povišenim slobodnim masnim kiselinama da pojačaju aktivnost SREBP-1c, potičući nakupljanje lipida i oksidativni stres. Produljena aktivacija PPAR- $\alpha$  također povećava transkripciju gena uključenih u  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, što dovodi do

---

povišene proizvodnje  $H_2O_2$  i proliferacije peroksisoma. Kada stvaranje  $H_2O_2$  premaši kapacitet aktivnosti peroksisomske katalaze, to može izazvati prekomjerni oksidativni stres, ističući dvostruku ulogu PPAR- $\alpha$  u katabolizmu lipida i redoks homeostazi <sup>26</sup>.

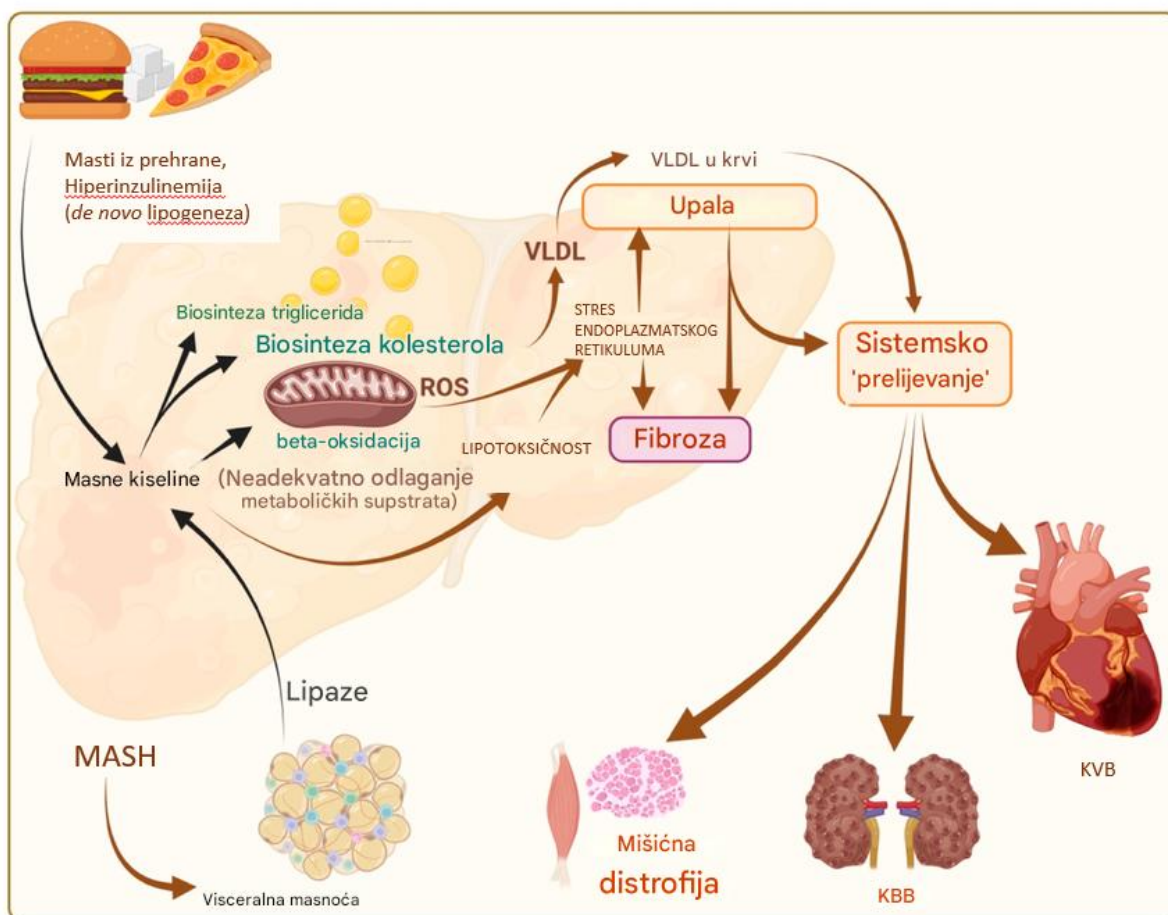
PPAR- $\gamma$  ima kompleksne i nedovoljno razjašnjene učinke u metabolizmu lipida i glukoze, pokazujući i zaštitne i steatogene efekte u jetri <sup>26,27</sup>. Visoko je eksprimirana u masnom tkivu, gdje pojačava unos masnih kiselina, poboljšava osjetljivost na inzulin i smanjuje dotok lipida u jetru, no studije su također pokazale da u hepatocitima, inhibicija PPAR- $\gamma$  dovodi do smanjenja nakupljanja masti. PPAR- $\gamma$  je također pokazala regulatornu ulogu u upali i fibrozi jetre, pokazavši da aktivacija ovih receptora promiče polarizaciju makrofaga s proinflamatornog M1 statusa u protuinflamatorni M2 status, čime se smanjuje upala. Aktivacija PPAR- $\gamma$  pokazala je regulaciju naniže TGF- $\beta$  signalnih puteva, tako inhibirajući proliferaciju HSC-a i smanjujući fibrogenezu <sup>26</sup>.

Sve je više dokaza da su razlog diskrepanciji i naizgled kontradikciji u funkcijama ovih čimbenika - epigenetske promjene PPAR- $\gamma$ , ali i ostalih izoformi ovih transkripcijskih faktora, uzrokovane pretilosti, ŠB, inzulinskom rezistencijom, nakupljanjem lipida te ostalim metaboličkim poremećajima, zbog čega dolazi do disfunkcije ovih receptora, njihovih nizvodnih produkata što dodatno pridonosi razvoju metaboličkih poremećaja, uključujući i MASLD <sup>27-29</sup>.

Sekrecija triglicerida u obliku lipoproteina ključan je čimbenik u ograničavanju masnih promjena i sprječavanja progresije bolesti. U produkciji lipoproteina, značajnu ulogu ima mikrosomalni protein za prijenos triglicerida (MTTP, eng. microsomal triglyceride transfer protein), visoko eksprimiran u enterocitima i hepatocitima. U jetri ima ključnu ulogu u sekreciji triglicerida iz jetre i održavanje lipidne homeostaze u hepatocitima. Njegova primarna funkcija je ugradnja triglicerida, fosfolipida i kolesterola u apolipoprotein B (apoB), omogućujući formiranje i izlučivanje VLDL-a i time sprječavajući nakupljanje lipida u hepatocitima.

Farmakološka inhibicija ovog proteina, pokazala je učinkovitost snižavanja serumskih razina lipida, ali također dovodi do disregulacije jetrenog lipidnog metabolizma, povišenja razine transaminaza i hepatsku steatozu zbog smanjenog izlučivanja triglicerida. Genetske varijante u MTTP-u koje smanjuju lučenje VLDL-a povezane su s razvojem MASLD-a, čak i u odsutnosti pretilosti ili inzulinske rezistencije <sup>30,31</sup>.

Prolongiranim oksidativnim stresom te zasićenjem metaboličkih puteva u regulaciji homeostaze lipida i daljnjim nakupljanjem lipida u hepatocitima, dolazi do aktivacije jetrenih sinusoidalnih endotelih stanica (LSEC, eng. Liver sinusoidal endothelial cells), Kupfferovih stanica (jetrenih makrofaga) i jetrenih zvjezdastih stanica (HSC, eng. Hepatic stellate cells), koje lučenjem proupalnih i profibrotičkih čimbenika kao što su razni citokini, te čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , engl. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) i transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. Transforming Growth Factor- $\beta$ ) te dovode do upale jetre, povećanog odlaganja kolagena u jetrenom tkivu i fibrinogeneze. Ovim patofiziološkim procesima jednostavna steatoza napreduje u MASH, fibrozu što povećava rizik i za maligna oboljenja jetre kao što je hepatocelularni karcinom <sup>18,32</sup> te dovodi do sistemskih poremećaja kardiovaskularnog, renalnog, disfunkcije adipoznog tkiva i ostalih organskih sustava <sup>33</sup>. Ovi procesi sažeto su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Patogeneza MASLD-a. Preuzeto i prilagođeno: Xiang Zhang et al.<sup>32</sup>

ROS (reaktivne kisikove vrste, eng. reactive oxygen species); KBB (kronična bubrežna bolest), KVB (kardiovaskularne bolesti), MASH (metabolički uzrokovan steatohepatitis, eng. metabolic dysfunction-associated steatohepatitis), VLDL (lipoprotein vrlo niske gustoće, eng. very-low-density lipoprotein)

---

#### 1.1.4. Klinička slika, dijagnostičke metode i farmakoterapija MASLD-a

MASLD se pretežno javlja kod odraslih s jednim ili više kardiometaboličkih čimbenika rizika (pretilost, ŠB2, dislipidemija ili hipertenzija), a često je asimptomatski ili se klinički prezentira nespecifičnim simptomima, umorom ili blagom nelagodom u gornjem desnom abdominalnom kvadrantu. Obično se otkriva kao slučajni nalaz, prilikom laboratorijskih obrada zbog drugih indikacija, radiološki na sistematskim pregledima i sl. Pri fizikalnom pregledu, ponekad se palpira hepatomegalija, ali učestaliji klinički indikator MASLD-a su povišeni jetreni enzimi. Pri sumnji na SLD, daljnje pretrage uključuju radiološke metode kao što je ultrazvučna sonografija, magnetna rezonanca (MRI) i kompjuterizirana tomografija (CT). Tranzijentna elastografija (TE) jedna je od ključnih pretraga za kvantifikaciju fibroze, ali i otkrivanja i stupnjevanja steatoze određivanjem parametara kontrolirane atenuacije (CAP), koji zbog dobre osjetljivosti i specifičnosti detektira i steatoze niskog stupnja <sup>14,34</sup>.

Pri diferencijalnoj dijagnostici, važno je isključiti ostale uzroke kao što je infekcija virusnim hepatitisom, autoimune, druge metaboličke bolesti. Kliničke smjernice objavljene 2024. od strane europskih društava za istraživanje jetre, dijabetesa i pretilosti (EASL, EASD, EASO) definirale su MASLD kao prisutnost steatoze jetre u kombinaciji s barem jednim kardiometaboličkim faktorom rizika – debljina ili pretilost utvrđena povišenim indeksom tjelesne mase (BMI, eng. body mass index) i povećanim opsegom struka; disglukemija ili ŠB2; hipertrigliceridemija; nizak HDL kolesterol; hipertenzija; korištenje lijekova s antilipidemijskim, antidijabetičkim ili antihipertenzivnim učincima. Anamnestički podaci o konzumaciji alkohola, terapiji hepatotoksičnim lijekovima, monogenskim bolestima, ključni su za diferenciranje MASLD od ostalih SLD. Konzumacija alkohola >20 g/dnevno u žena i >30 g/dnevno u muškaraca isključuje MetALD i ALD. Važno je naglasiti da se MASLD učestalo otkriva u već uznapredovalim stadijima MASH-a, za koji su tipične histološke značajke *baloniranja* hepatocita i lobularne upale <sup>34</sup>.

Farmakoterapija MASLD-a do 2024. bila je izrazito oskudna, odnosno, MASLD se konzervativno liječio promjenama životnih navika te u sklopu liječenja drugih kardiometaboličkih komorbiditeta, antilipidemicima i antidijabeticima. U Sjedinjenim Američkim Državama 2024. godine ubrzanim postupkom odobrena je klinička upotreba resmetiroma, selektivnog agonista beta receptora hormona štitnjače (THRβ),

---

kao prvog lijeka za liječenje MASH-a, a indikacija za liječenje ovim lijekom je necirotični MASH s umjerenom do uznapredovalom fibrozom jetre. Sredinom 2025. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, eng. Food and Drug Agency) za iste indikacije odobrila je semaglutid, GLP-1 <sup>35,36</sup>.

Iako ovo predstavlja napredak u liječenju pacijenata s MASH-om, i dalje je zabrinjavajuća činjenica da za manje progresivne slučajeve MASLD-a ne postoji odobrena ciljana farmakoterapija s kojom bi se omogućila potencijalna intervencija prije progresije u ozbiljnije oblike bolesti.

## 1.2. Glukagonu sličan peptid 1

Glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1, od eng. Glucagon-like-peptide-1) intestinalni je peptidni hormon koji klasificiran u skupinu hormona poznatih kao inkretini. Izlučuje se iz crijevnih enteroendokrinih L-stanica, postranslacijski je produkt proglukagona, a njegov glavni učinak je postprandijalna stimulacija lučenja inzulina iz gušterače <sup>37</sup>.

### 1.2.1. Inkretini

Bayliss i Starling 1902. označili su prekretnicu u razumijevanju ljudske fiziologije, otkrivši prvi hormon – sekretin, tako otvarajući vrata ne samo boljem razumijevanju probavnog sustava, nego i cijelom novom biomedicinskom polju – endokrinologiji. Uslijedile su hipoteze kojima su Moore i sur. predložili potencijalnu prisutnost produkata intestinalne sluznice koji stimuliraju gušteraču i njezinu endokrinu aktivnost, a LaBarre i Zunz, kroz niz eksperimenata s ekstraktima gornjeg intestinalnog sustava u animalnim modelima primijetili su hipoglikemički učinak takvih ekstrakata, te predložili pojam *inkretin* za tvari koje su smanjivale razinu šećera. Do 1920-ih, odnosno otkrića inzulina, i 1950-ih te razvoja metoda za mjerenje koncentracije inzulina i njegovih fluktuacija, inkretini su i dalje bili nedovoljno razjašnjeni. Napokon, razvojem biotehnologije, znanstvenici su jasno demonstrirali pojačanu sekreciju inzulina nakon primjene glukoze *per os*, naspram parenteralno primijenjene glukoze, iako se koristila jednako koncentrirana otopina. Ovo je kasnije prepoznato kao *inkretinski učinak*. Napokon, nakon otkrića raznih intestinalnih peptida koji su neadekvatno objašnjavali inkretinski učinak, 1986. godine iz crijeva je izoliran GLP-1 za koji je utvrđeno da stimulira lučenje inzulina i inhibira lučenje glukagona <sup>38-40</sup>.

---

U preglednim radovima Holst, kao i Drucker i sur. pružaju detaljan uvid u eksperimente koji su doveli i do otkrića, razumijevanja fiziologije GLP-1 te razvoj GLP-1 temeljenih farmakoterapeutika <sup>41,42</sup>. Dodatno su studije pokazale da su inkretini odgovorni za 25-70% postprandijalno izlučenog inzulina. Nadalje, utvrđeno je da od tri ključnih signala koji djeluju na endokrinu aktivnost gušterače - metaboličkih supstrata kao što je glukoza, inkretinskih hormona te stimulacije autonomnog živčanog sustava, inkretinski hormoni u fiziološkim uvjetima imaju najizraženiji učinak u regulaciji hipoglikemijskih funkcija gušterače <sup>43</sup>.

Studije su također demonstrirale da je inkretinski učinak neadekvatan u pacijenata s metaboličkim poremećajima, ŠB 1 i 2 <sup>44,45</sup>, pretilosti te MASLD-om <sup>46</sup>. Također, GLP-1 stimulira lučenje inzulina na način ovisan o glukozi, odnosno, inzulintropni učinci inkretinskih hormona uvijek ovise o prisutnosti određenog stupnja hiperglikemije. Uloga inkretina je pojačati odgovor na sekreciju inzulina koji je već pokrenut povišenom razinom glukoze <sup>47</sup>. Ove su spoznaje dovele do posebnog interesa za ovu skupinu hormona i njihov potencijal u liječenju ŠB te razvoj GLP-1RA.

Početni izazov u razvoju terapija temeljenih na GLP-1 bila je brza razgradnja u parenteralnoj i *per os* primjeni. Jedna od pivotalnih studija u razvoju i otkriću potencijala GLP-1RA u terapiji ŠB, ali i pretilosti te metaboličkim poremećajima, dokazala je efikasnost kontinuirane parenteralne primjene GLP-1 tijekom šest tjedana u pretilih pacijenata sa ŠB2. Ispitanici na inkretinskoj terapiji pokazali su smanjenje GUK-a natašte i 8-satne srednje vrijednosti, hemoglobin A1c smanjio se za 1,3%, a koncentracije slobodnih masnih kiselina smanjile su se za 30% i 23%. Također, uz terapiju GLP-1 pražnjenje želuca je bilo usporeno, apetit je bio smanjen, a tjelesna težina smanjila se za 1,9 kg. Osjetljivost na inzulin i funkcija  $\beta$ -stanica poboljšale su se, a nisu uočene značajne nuspojave, no brza razgradnja GLP-1 predstavljala je izazov u njenoj primjenjivosti <sup>48</sup>. Identifikacija dipeptidil peptidaze-4 (DPP-4) kao enzima odgovornog za brzu razgradnju dovela je do razvoja inhibitora DPP-4, koji su učinkovito produžili djelovanje GLP-1 i pokazali kliničku učinkovitost u ispitivanjima, no Engovo otkriće eksendina-4 iz otrova reptila, strukturno sličnog, no stabilnijeg, označilo je prekretnicu u razvoju lijekova na bazi GLP-1 s duljim djelovanjem <sup>49</sup>.

---

### 1.2.2. GLP-1RA

FDA je 2005. odobrila eksenatid, prvi agonist GLP-1RA. Naknadno razvijeni GLP-1RA poput liraglutida i semaglutida omogućili su primjenu jednom tjedno te prvotno odobreni za liječenje ŠB2, odobreni su i za liječenje pretilosti (liraglutid 2014., semaglutid 2021). Zaključno, u ovom trenutku, višestruki učinci i terapijski potencijal ove skupine lijekova dobro je poznat. Više od 100 godina istraživanja dovelo je do jasno definiranih navedenih učinaka ovog peptida i njihovog trenutnog monopola u farmaceutskoj industriji.

Metabolički, najvažniji su učinci na apetit i produljeni osjećaj sitosti, usporavanje želučanog pražnjenja koje smanjuje postprandijalni porast GUK-a te pozitivni učinci na BMI, a time i lipidni profil. S endokrinološke strane, poboljšavaju funkciju  $\beta$  stanica gušterače te inzulinsku osjetljivost u perifernim tkivima. Uz metaboličke učinke, pokazali su i smanjenje rizika od neželjenih kardiovaskularnih događaja kod osoba s dijabetesom tipa 2 i postojećim kardiovaskularnim rizikom, a djeluju i na bubrežnu funkciju i snižavanje krvnog tlaka, što dodatno proširuje njihovu kliničku primjenu izvan samog reguliranja glikemije <sup>49,50</sup>. Također, brojna istraživanja indiciraju snažnu ulogu GLP-1RA u inflamatornim stanjima brojnih organskih sustava, neurološkim poremećajima pa i infektivnim bolestima <sup>51</sup>. GLP-1R pronađeni su u  $\alpha$ -stanicama gušterače, nekoliko regija mozga (odgovornih za apetit i sitost), srčanom i krvožilnom tkivu te bubrežima, plućima i gastrointestinalnom traktu <sup>43</sup>. Međutim, ekspresija GLP-1R u tkivu jetre i dalje je kontroverzna.

### 1.2.3. Uloga GLP-1RA u MASLD-u

Nauck i sur. u preglednom radu iz 2018. izvrsno su sumirali animalne predkliničke i kliničke studije kojima su objedinili dotad poznate učinke GLP-1 na gotovo sve organske sustave. Zanimljivo je činjenica da među svim studijama, nijedna navedena nije istražila učinke ovog peptida u jetri <sup>43</sup>. Zbog neizostavne povezanosti jetre sa ŠB2, interes i istraživanje GLP-1RA u kontekstu regulacije lipidnog metabolizma bio je razumljiv. Unatoč značajnoj količini istraživanja usmjerenih na učinke GLP-1RA na gušteraču, metabolizam glukoze i lučenje inzulina, postoji relativan nedostatak studija koje se bave specifičnim učincima GLP-1RA na metabolizam lipida u jetri. S porastom

---

odobrenja ovih lijekova u liječenju pretilosti, znanstvena zajednica okrenula se njihovom potencijalu i u liječenju MASLD-a i regulaciji lipidnog metabolizma <sup>52-55</sup>.

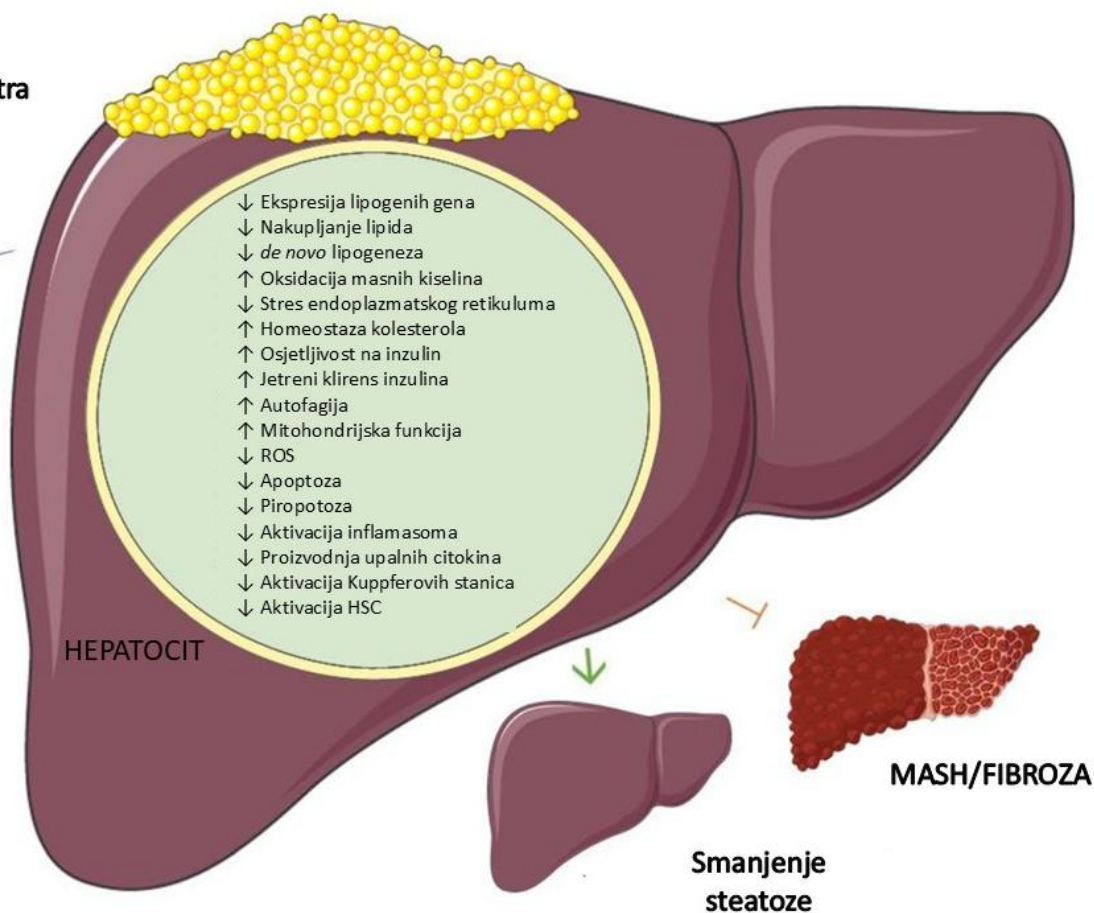
Moguće obrazloženje ovom manjku fokusa na učinke ovih peptida u MASLD-u je i dalje upitna ekspresija GLP-1 receptora u hepatocitima, zbog čega se pozitivni učinci na masnu jetru učestalo pripisuju indirektnim, pleiotrofnim učincima, odnosno poboljšanju metaboličkog profila zbog smanjenja BMI <sup>51,56</sup>. Nekolicina studija objavila je dokaze o prisutnosti GLP-1 receptora na hepatocitima <sup>57,58</sup>, no i dalje se smatra da pitanje prisutnosti ovih receptora u jetri nije razjašnjeno. Kako bismo eliminirali pleiotropne učinke i ekstrahepatičke čimbenike kojima se pripisuju pozitivni učinci GLP-1RA na masne promjene jetre u *in vivo* studijama, 2023. u preglednom radu saželi smo dotadašnje spoznaje *in vitro* studija koje su istraživale učinke GLP-1RA u modelima MASLD-a na hepatocitima. Unatoč kontroverzama oko ekspresije GLP-1 receptora u tkivu jetre, pokazalo se da agonisti GLP-1 receptora (GLP-1RA) utječu na disregulirani lipidni metabolizam <sup>59</sup>. Opisani učinci tih studija sažeti su na Slici 2.

I u ovom istraživanju odlučili smo se za *in vitro* model MASLD, koji pruža uvid u molekularne mehanizme i izravnu ulogu GLP-1RA u modulaciji metabolizma lipida u hepatocitima.

## Steatotična jetra



GLP1RA



Slika 2. Učinci GLP-1RA u *in vitro* modelima MASLD-a. Preuzeto i prilagođeno: Petrović et al.

HSC (jetrene zvjezdaste stanice, eng. hepatic stellate cells); ROS (reaktivne kisikove vrste, eng. reactive oxygen species).

---

### 1.3. HepG2 stanična linija

Primjena staničnih kultura u biomedicinskim i biotehnološkim istraživanjima široko je korištena metoda <sup>11,60,61</sup> te od iznimnog značaja za znanstvenu zajednicu, primarno zbog njihove etičke prihvatljivosti. Naime, 3R princip – od *eng.* Replacement, Reduction, Refinement, odnosno Zamjena, Smanjenje, Usavršavanje, uveden je 1959. u svrhu razvoja alternativnih metoda istraživanja na životinjama, koje su se u dotadašnjim pretkliničkim studijama uvelike koristile <sup>62,63</sup>. Iako su istraživanja na životinjama i dalje uvelike prisutna u biomedicini, stanične kulture predstavljaju validnu, reproducibilnu i kontinuirano razvijanu alternativnu metodu, posebice s razvojem organoida i sferoida, odnosno trodimenzionalnih (3D) staničnih sustava koji se rapidno unapređuju i sve bolje „imitiraju“ *in vivo* procese <sup>64</sup>.

Stanične kulture primjenjuju se u istraživanjima temeljnih fizioloških i patofizioloških staničnih procesa u kontroliranim uvjetima te pružaju izolirani uvid u molekularne mehanizme, signalne puteve, metabolizam i ostale stanične funkcije bez utjecaja drugih egzogenih čimbenika. *In vitro* modeli široko se koriste u razvoju i ispitivanju citotoksičnosti te učinkovitosti lijekova i cjepiva prije testiranja *in vivo*, te za modeliranje i proučavanje brojnih patoloških stanja <sup>11,60,62</sup>.

Stanične linije klasificiraju se kao - primarne stanice, kontinuirane stanične linije i matične stanice. Primarne stanice pružaju *in vitro* model najbliži nativnom tkivu, međutim, ograničene su u kontekstu umnožavanja. Matične stanice, kao pluripotentni izvori raznih tipova stanica, tehnički su zahtjevne i skupe za održavanje i diferencijaciju. Razvoj kontinuiranih staničnih linija koje potječu većinski iz tumorskih tkiva zbog njihovog neograničenog proliferativnog kapaciteta ili iz zdravih stanica imortalizacijom virusnim onkogenima ili transdukcijom reverznom transkriptazom ljudske telomerase (hTERT) - označio je revoluciju u biomedicinskim istraživanjima, zbog jednostavnosti uzgoja, dugoročne stabilnosti i očuvanja obilježja izvorne stanice i nakon brojnih umnažanja <sup>65</sup>.

Unatoč navedenim prednostima staničnih linija, važno je naglasiti da transformirane stanične linije, zbog raznih mutacija koje ih razlikuju od izvornih zdravih stanica, ne mogu zamijeniti primarne, netransformirane stanice te se fiziološki i patofiziološki procesi u njima ne mogu u potpunosti translatirati na *in vivo* procese. Ovo ne umanjuje vrijednost transformiranih staničnih linija, koje pružaju etički vrlo prihvatljiv i održivu

---

metodu istraživanja *in vitro* studija raznih molekularnih mehanizama, no biološka relevantnost i zaključci ovakvih studija trebaju biti interpretirani u skladu s ograničenjima i razlikama transformiranih staničnih linija.

Ovo istraživanje provelo se na HepG2 stanicama koje se smatraju superiornima u kontekstu metaboličkih istraživanja, naspram ostalih jetrenih kontinuiranih linija. HepG2 stanična linija kontinuirana je stanična linija, karakterizirana kao hepatoblastom i hepatocelularni karcinom (HCC). Primarno klasificirane 1975. kao stanice derivirane iz HCC-a, naknadnom je genotipizacijom otkriveno da ove stanice imaju sličnije karakteristike hepatoblastomu nego HCC-u <sup>66</sup>. Trenutno je na raspolaganju preko 40 raznovrsnih kontinuiranih jetrenih staničnih linija, među kojima je uvjerljivo najučestalije korištena HepG2 stanična linija. HepG2 stanice smatraju se pogodnima za eksperimentalna istraživanja *in vitro*; primarno u istraživanju molekularnih mehanizama jetrenog metabolizma te u eksperimentalnoj farmakologiji za ispitivanje citotoksičnih svojstava i farmakološke učinkovitosti lijekova. Prema podacima iz 2021., preko 75% *in vitro* studija na jetrenim staničnim linijama, provedeno je na HepG2 stanicama <sup>67</sup>.

Razlog širokoj uporabi HepG2 stanica je značajan broj studija koje su pokazale da HepG2 stanice zadržavaju brojne funkcije primarnih hepatocita, kao što je ekspresija jetreno specifičnih proteina, albumina i transferina. Značajne razlike između HepG2 stanica i hepatocita na subcelularnoj razini su slabo razvijen glatki endoplazmatski retikulum te smanjen broj mitohondrija u HepG2 stanicama, nasuprot hepatocitima, koji su izrazito bogati ovim komponentama. Na genomskoj razini, tumorski fenotip ovih stanica vidljiv je kroz mutaciju CTNNB1 gena, točnije deleciju trećeg egzona ovog gena. Ovaj gen kodira  $\beta$ -katenin, važan za Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put, koji regulira staničnu proliferaciju, održavanje zonacije i jetrenog metabolizma te regeneracije. U kontekstu ove studije, slabija razvijenost te "bazalno" pojačana aktivnost Wnt/ $\beta$ -katenin signalizacije predstavljaju ograničenje tumačenja metaboličkih procesa u HepG2 s obzirom na *in vivo* procese.

Na proteomskoj razini, što je posebno značajno za ovu i ostale eksperimentalne farmakološke studije, unatoč očuvanoj ekspresiji jetreno specifičnih proteina kao što je albumin, ekspresija citokrom P450 gena je izrazito niska, odnosno aktivnost citokrom P450 enzima ključnih za metabolizam lijekova u jetri, izrazito je slaba. Izrazito je važno napomenuti da u ovoj studiji, ova karakteristika HepG2 stanica, nije značajna, zbog

---

farmakokinetičkih svojstava semaglutida čiji se učinak ispitivao. Ovaj peptidni hormon i njegovi sintetski analozi razgrađuju se proteolitičkim enzimima u plazmi, dok citokrom p450 enzimi i njihova smanjena ekspresija u različitim staničnim linijama može biti značajna za lijekove koji se opsežno ili gotovo u potpunosti metaboliziraju u jetri.

Oleinska kiselina odabrana je kao poticatelj masnih promjena u ovom eksperimentalnom modelu jer je u dosadašnjim istraživanjima pokazala sposobnost izazivanja hepatotoksičnosti, nakupljanja lipida u hepatocitima te modulacije ekspresije lipogenih, proupalnih i profibrotičnih gena. Iako korištenje samo oleinske kiseline predstavlja metodološko ograničenje u odnosu na mješavinu oleinske i palmitinske kiseline, brojna istraživanja potvrđuju da je jednako učinkovita u uspostavi *in vitro* modela masne jetre. Dodatno, varijacije u omjerima različitih masnih kiselina mogu mijenjati ravnotežu između protektivnih i toksičnih učinaka, što može smanjiti pouzdanost i reproducibilnost modela te otežati interpretaciju rezultata <sup>68,69</sup>.

S obzirom na opterećenje zdravstvenog sustava MASLD-om i progresivnim oblicima bolesti, potrebno je intenzivirati istraživanja koja za cilj imaju pronalaženje odgovarajućih farmakoterapijskih opcija za liječenje, ali i za prevenciju ove bolesti. Ovim istraživanjem proučit će se izravna uloga i preventivni i terapijski potencijal semaglutida u modelu MASLD-a u kulturi stanica HepG2, u svrhu razumijevanja molekularnih mehanizama kojima bi semaglutid eventualno ostvario učinak u prevenciji i sprečavanju napredovanja MASLD-a.

---

## 2. Hipoteza

Semaglutid smanjuje akumulaciju lipida, oksidacijski stres i oštećenje stanica HepG2 djelujući na izražaj gena i proteina uključenih u procese lipogeneze, homeostaze lipida, disfunkcije mitohondrija, profibrotičkih i proupalnih procesa u staničnom modelu MASLD-a.

---

### 3. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je istražiti učinak semaglutida u prevenciji nastanka steatoze i eksperimentalnoj farmakoterapiji blažih oblika steatoze na staničnom modelu masne jetre.

Specifični ciljevi:

1. Uspostaviti model steatoze u kulturi zloćudno promijenjenih hepatocita čovjeka, HepG2, inkubiranjem stanica oleinskom kiselinom.
2. Izmjeriti učinak oleinske kiseline te preventivni i terapijski učinak tretmana semaglutidom u modelu masne jetre određivanjem preživljavanja HepG2 stanica.
3. Izmjeriti učinak oleinske kiseline te preventivni i terapijski učinak tretmana semaglutidom u modelu masne jetre na smanjenje opsega steatoze.
4. Mjerenjem razine triglicerida procijeniti učinke semaglutida na nakupljanje masti u HepG2 stanicama.
5. Odrediti preventivni i terapijski učinak tretmana semaglutidom na razinu gena (PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\alpha$ , MTTP, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) i istoimenih proteina uključenih u lipogenezu, homeostazu lipida, mitohondrijsku disfunkciju, profibrotičke i proupalne procese u modelu masne jetre.

#### 4. Materijali i metode

##### 4.1. Kultivacija stanica i nasađivanje stanica u eksperimentalne mikropločice

HepG2 stanice (ATCC, USA) komercijalno su pribavljene te nakon odmrzavanja primarno nasađene u petrijeve zdjelice promjera 100 mm, u mediju s niskom koncentracijom glukoze (DMEM, od eng. Low Glucose Dulbecco Modified Eagle Medium), (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka). DMEM je obogaćen s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. Fetal Bovine Serum), (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) i 1% otopine antibiotika penicilin/streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka). Zatim su održavane u logaritamskoj fazi rasta do dostizanja 70-80% konfluencije u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Ostale komponente medija za uzgajanje dostupne su u Tablici 1.

Tablica 1. Komponente medija za uzgoj HepG2 stanica.

| Komponenta                      | Koncentracija (mg/L) | Kategorija    |
|---------------------------------|----------------------|---------------|
| Glicin                          | 30,0                 | Aminokiseline |
| L-Arginin HCl                   | 84,0                 | Aminokiseline |
| L-Cistin 2HCl                   | 62,57                | Aminokiseline |
| L-Glutamin                      | 584,0                | Aminokiseline |
| L-Histidin HCl H <sub>2</sub> O | 42,0                 | Aminokiseline |
| L-Izoleucin                     | 105,0                | Aminokiseline |
| L-Leucin                        | 105,0                | Aminokiseline |
| L-Lizin HCl                     | 146,0                | Aminokiseline |
| L-Metionin                      | 30,0                 | Aminokiseline |
| L-Fenilalanin                   | 66,0                 | Aminokiseline |
| L-Serin                         | 42,0                 | Aminokiseline |
| L-Treonin                       | 95,0                 | Aminokiseline |
| L-Triptofan                     | 16,0                 | Aminokiseline |

|                                                       |        |                   |
|-------------------------------------------------------|--------|-------------------|
| <b>L-Tirozin 2Na 2H<sub>2</sub>O</b>                  | 103,79 | Aminokiseline     |
| <b>L-Valin</b>                                        | 94,0   | Aminokiseline     |
| <b>Kolinklorid</b>                                    | 4,0    | Vitamini          |
| <b>D-Kalcijev pantotenat</b>                          | 4,0    | Vitamini          |
| <b>Folna kiselina</b>                                 | 4,0    | Vitamini          |
| <b>Mio-inozitol</b>                                   | 7,2    | Vitamini          |
| <b>Nikotinamid</b>                                    | 4,0    | Vitamini          |
| <b>Piridoksal HCl</b>                                 | 4,0    | Vitamini          |
| <b>Riboflavin</b>                                     | 0,4    | Vitamini          |
| <b>Tiamin HCl</b>                                     | 4,0    | Vitamini          |
| <b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>               | 265,0  | Anorganske soli   |
| <b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 9H<sub>2</sub>O</b> | 0,1    | Anorganske soli   |
| <b>KCl</b>                                            | 400,0  | Anorganske soli   |
| <b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>               | 200,0  | Anorganske soli   |
| <b>NaCl</b>                                           | 6400,0 | Anorganske soli   |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>                              | 3700,0 | Anorganske soli   |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>  | 141,73 | Anorganske soli   |
| <b>D-Glukoza</b>                                      | 1000,0 | Ostale komponente |
| <b>Fenol crvena natrijeva sol</b>                     | 15,9   | Ostale komponente |
| <b>Natrijev piruvat</b>                               | 110,0  | Ostale komponente |

Nakon dostizanja konfluencije od 70-80%, u petrijeve zdjelice je dodano 2 mL tripsina (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) te nakon 4 minute u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>, HepG2-stanice odlijepljene su koristeći 0,25% Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, SAD) i centrifugirane 5 minuta na 1000 RPM. Zatim su stanice resuspendirane u DMEM-u bez FBS-a, prebrojane Neubauerovom komoricom i nasađene u gustoći  $\sim 1.56 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup> u mikrotitarske pločice s 96, 24 i 6 jažica, ovisno o eksperimentu. Kako bi se postigla jednaka konfluencija stanica u svim mikrotitarskim pločicama, korišten je Thermo Fischerov protokol <sup>70</sup>, a izračun je vidljiv u Tablici 2. Svi eksperimenti provedeni su u triplikatima.

Tablica 2. Gustoća nasađivanja HepG2 stanica u mikropločice.

| <b>Mikrotitarska pločica</b> | <b>Površina<br/>a jažice<br/>(cm<sup>2</sup>)</b> | <b>Volumen<br/>suspenzije<br/>u jažici<br/>(mL)</b> | <b>Broj<br/>stanica/<br/>cm<sup>2</sup></b> | <b>Broj<br/>stanica/<br/>jažici</b> | <b>Broj<br/>stanica/m<br/>L</b> |
|------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 96 jažica                    | 0,32                                              | 0,1                                                 | $1,56 \times 10^5$                          | $5,00 \times 10^4$                  | $5,00 \times 10^5$              |
| 24 jažice                    | 1,9                                               | 0,5                                                 | $1,56 \times 10^5$                          | $2,97 \times 10^5$                  | $5,94 \times 10^5$              |
| 6 jažice                     | 9,6                                               | 2,0                                                 | $1,56 \times 10^5$                          | $1,50 \times 10^6$                  | $7,50 \times 10^5$              |

#### 4.2. Uspostava dva eksperimentalna modela MASLD-a

U ovoj studiji uspostavljena su dva modela MASLD-a: terapijski i preventivni model. U oba modela stanice su nasađene na eksperimentalne mikropločice na 24 sata. U svrhu uspostave terapijskog modela, nakon 24 sata u inkubatoru, u logaritamskoj fazi rasta, istovremeno su tretirane patološkim induktorom (oleinskom kiselinom) i farmakoterapeutikom (semaglutidom) te ponovno inkubirane u periodu od 24 sata, nakon čega su se proveli eksperimenti. U svrhu uspostave preventivnog modela, nakon 24 sata u inkubatoru, u logaritamskoj fazi rasta, stanice su tretirane farmakoterapeutikom (semaglutidom), inkubirane 24 sata, a nakon toga tretirane su patološkim induktorom (oleinskom kiselinom) te ponovno inkubirane u periodu od 24 sata, nakon čega su se proveli eksperimenti.

#### 4.3. Određivanje koncentracije oleinske kiseline za uspostavu optimalnog terapijskog i preventivnog staničnog modela MASLD-a u stanicama HepG2

Pregledom literature <sup>68,69</sup> među uobičajenim koncentracijama oleinske kiseline koje se koriste na HepG2 stanicama u istraživanju MASDL-a i postižu steatogene učinke, odabrane su tri koncentracije za testiranje – 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM, kako bi se postigao održiv model MASLD-a.

Nakon subkultiviranja HepG2-stanica u mikropločice, testirane su tri koncentracije oleinske kiseline za uspostavu MASLD modela inkubacijom HepG2-stanica oleinskom kiselinom tijekom 24 sata. Stock otopina 100 mM oleinske kiseline pripravljena je u

koristeći 0,06 mg natrijevog oleata (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) u 1200  $\mu$ L 70%-etanola i 800  $\mu$ L FBS-a. Radna otopina od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM pripravljena je razjeđivanjem osnovne otopine 10  $\mu$ L, odnosno 20  $\mu$ L i 30  $\mu$ L s 1990  $\mu$ L, odnosno 1980  $\mu$ L i 1970  $\mu$ L DMEM-a koji sadrži 1% otopinu penicilina/streptomicina. U svrhu ovog preliminarnog eksperimenta za terapijski model, HepG2 stanice nasađene su u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica u gustoći  $1,56 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup>. Nakon uklanjanja medija, stanice su tretirane radnim otopinama oleinske kiseline u koncentracijama od 0.5 mM, 1 mM i 1.5 mM, te odgovarajućim radnim otopinama otapala (0,5%, 1% i 1,5% otapala u DMEM-u; etanol:FBS = 3:2), koje su služile kao negativna kontrola. Nakon 24 sata u inkubatoru, provedeni su eksperimenti. Postupak za preventivni model razlikuje se samo u tome što je stanicama 24 sata nakon nasađivanja promijenjen samo medij, a nakon još 24 sata u inkubatoru dodana je oleinska kiselina, odnosno, otapalo.

Optimalna koncentracija oleinske kiseline koja se koristila u daljnjim eksperimentima odredila se procjenom učinka oleinske kiseline kako bi se, postizanjem ravnoteže između citotoksičnosti i staničnog preživljenja, uspostavio održiv model istraživanja za daljnje eksperimente. U svrhu odabira optimalne koncentracije koristio se MTS test.

#### 4.4. Tretman stanica semaglutidom u preventivnom i terapijskom modelu MASLD-a

Nulti dan eksperimenta stanice su nasađene u opisanoj gustoći u pločice sa 96 ili 6 jažica (ovisno o eksperimentu), u DMEM-u s 1%-tnom otopinom penicilina i streptomicina. Nakon 24 sata inkubacije, u logaritamskoj fazi rasta HepG2 stanica, mikroskopski je utvrđena konfluencija od ~70% te provedena indukcija steatoze i/ili tretman semaglutidom, ovisno o modelu. Za pripremu stock otopine semaglutida korišten je komercijalni pripravak semaglutida Ozempic® (Novo Nordisk) od 1 mg u obliku bistre i bezbojne, izotonične otopine (pH = 7,4). Jedna napunjena brizgalica sadrži 4 doze od 1 mg semaglutida otopljenih u 0,74 mL otopine po dozi, što odgovara koncentraciji od 1,351 mg/mL. Na temelju poznate molekularne mase semaglutida (4113,58 g/mol) izračunata je masa potrebna za pripremu stock otopine od 10 000 nM semaglutida. Za pripremu 1 mL stock otopine semaglutida, izmjereno je 30,45  $\mu$ L Ozempica i razrijeđeno s 969,55  $\mu$ L DMEM-a do konačnog volumena od 1 mL, što je dalje razrijeđeno DMEM-om do radnih otopina od 2, 5, 10 i 20 nM. S obzirom na manjak *in vitro* studija koje su istraživale učinke semaglutida, fiziološke i farmakološke

koncentracije semaglutida u *in vitro* modelima nisu dovoljno potkrepljene. Stoga su koncentracije semaglutida prilagođene i odabrane prema koncentracijama liraglutida u *in vitro* modelu masne jetre <sup>71</sup>. Stock i radna otopina oleinske kiseline od 1 mM pripravljena je kako je opisano.

Terapijski model uspostavio se istovremenim tretiranjem stanica oleinskom kiselinom u koncentraciji 1 mM i semaglutidom u koncentracijama od 2, 5, 10 i 20 nM u periodu od 24 sata. Preventivni model uspostavio se 24-satnim izlaganjem stanica semaglutidu u koncentraciji od 2, 5, 10 i 20 nM, a zatim tretiranjem oleinskom kiselinom u koncentraciji 1 mM. Stanice su inkubirane otopinama u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Postavke eksperimenta za terapijski i preventivni model detaljno su opisane u Tablici 3 i Tablici 4.

Tablica 3. Uspostava terapijskog modela MASLD-a.

| DAN 0 | DAN 1                                            | DAN 2       |
|-------|--------------------------------------------------|-------------|
| DMEM  | DMEM                                             | EKSPERIMENT |
| DMEM  | DMEM + OTAPALO*                                  |             |
| DMEM  | DMEM + SEMAGLUTID (20 nM)                        |             |
| DMEM  | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA**                  |             |
| DMEM  | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA + 2 nM SEMAGLUTID  |             |
| DMEM  | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA + 5 nM SEMAGLUTID  |             |
| DMEM  | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA + 10 nM SEMAGLUTID |             |
| DMEM  | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA + 20 nM SEMAGLUTID |             |

\*negativna kontrola, \*\*pozitivna kontrola

Tablica 4. Uspostava preventivnog modela MASLD-a.

| DAN 0 | DAN 1                     | DAN 2                          | DAN 3       |
|-------|---------------------------|--------------------------------|-------------|
| DMEM  | PROMJENA DMEM-a           | PROMJENA DMEM-a                | EKSPERIMENT |
| DMEM  | PROMJENA DMEM-a           | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA* |             |
| DMEM  | DMEM + SEMAGLUTID (20 nM) | DMEM**                         |             |
| DMEM  | PROMJENA DMEM-a           | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA  |             |
| DMEM  | DMEM + 2 nM SEMAGLUTID    | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA  |             |
| DMEM  | DMEM + 5 nM SEMAGLUTID    | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA  |             |
| DMEM  | DMEM + 10 nM SEMAGLUTID   | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA  |             |
| DMEM  | DMEM + 20 nM SEMAGLUTID   | DMEM + 1 mM OLEINSKA KISELINA  |             |

\*negativna kontrola, \*\*pozitivna kontrola

---

#### 4.5. Mjerenje staničnog preživljenja u oba modela istraživanja

##### MTS test

Učinak semaglutida na stanično preživljenje odredio se komercijalno dostupnim MTS reagensom CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, USA) koji sadrži tetrazolijev spoj MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij]. Nakon dodavanja 20 µL MTS reagensa u eksperimentalne jažice, u prisutnosti NADH ili NADPH metabolički aktivnih stanica, MTS se reducira u ljubičasti formazan, čiji se intenzitet zatim mjeri na 490 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (iMark™ Microplate Absorbance Reader; Bio-Rad, SAD). Vrijednosti apsorbancije proporcionalne su količini proizvedenog formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti HepG2 stanica.

##### Vizualizacija DNA stanica Hoechst bojom

Stanično preživljenje također je vizualizirano bojenjem Hoechst 33342 bojom (Thermo Fisher Scientific), nuklearnim markerom živih stanica koji se veže na DNA, specifično adenin/timin regije, zbog čega boja lako prodire u DNA te se na UV svjetlu vizualizira kao plava boja. Radna otopina pripremljena je razrjeđivanjem 10 mg/mL Hoechst 33342 otopine 1:2000 u PBS-u kako bi se dobila konačna koncentracija od 5 µg/mL. Nakon tretmana u mikropločicama s 96 jažica, prema instrukcijama proizvođača, stanice su prekrivene otopinom i inkubirane 5 – 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti te su odmah bile vizualizirane pomoću fluorescentnog mikroskopa EvosM3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) s DAPI setom filtera. Važno je naglasiti da Hoechst boja DNA i zdrave i apoptotične stanice. Zdrave stanice pokazuju ravnomjerno raspoređenu plavu boju unutar okrugle jezgre. U apoptotičnim stanicama kondenzacija kromatina i morfološke promjene jezgre pokazuju veće koncentracije boje na manjem području, što rezultira znatno svjetlijom, jače plavom fluorescencijom obično u obliku intenzivnih nakupina boje.

#### 4.6. Mjerenje učinaka semaglutida na nakupljanje lipida

Kvalitativna analiza i kvantifikacija akumulacije lipida u HepG2 stanicama provedena je bojenjem Oil Red O bojom <sup>72</sup>. Stock otopina pripremljena je otapanjem 0,5 g boje Oil Red O (Sigma Aldrich, SAD) u 200 mL izopropilnog alkohola i inkubacijom na 56 °C tijekom 1 sata, nakon čega je slijedilo hlađenje na sobnu temperaturu. Radna

---

otopina svježe je pripremljena na dan upotrebe miješanjem stock otopine s destiliranom vodom u omjeru 6:4, ostavljajući otopinu da odstoji najmanje 15 minuta kako bi se neotopljena boja precipitirala. Otopina je zatim filtrirana kroz filter papir i držana na sobnoj temperaturi do bojenja.

Nakon provedenog tretmana, stanice su isprane natrijevim fosfatnim puferom (PBS, eng. Phosphate sodium buffer, Sigma Aldrich, SAD), fiksirane 10%-tnim formalinom u pločici s 24 jažice te nakon fiksacije još jednom isprane PBS-om kako bi se uklonila eventualna fenol crvena boja medija. Zatim su pažljivo isprane sa 60%-tnim izopropilnim alkoholom te je dodan 1 mL radne otopine Oil Red O po jažici. Stanice su inkubirane u otopini 15 minuta na sobnoj temperaturi, uz mikroskopsko promatranje kako bi se spriječilo taloženje boje. Nakon bojenja, stanice su isprane sa 60%-tnim izopropilnim alkoholom, a zatim s PBS-om kako bi se uklonio eventualni višak boje. Obojene stanice su uslikane koristeći fluorescentni mikroskop EvosM3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) na 10× povećanju.

Za kvantifikaciju, Oil Red O boja ekstrahirana je iz stanica inkubacijom stanica s 1 mL izopropilnog alkohola tijekom 5 minuta. Sadržaj je otpipetiran i centrifugiran na 2300 × g tijekom 1 minute, a zatim se 100 µL supernatanta otpipetiralo u pločice s 96 jažica za kolorimetrijsko očitavanje na čitaču mikropločica na 490 nm.

#### 4.7. Procjena učinka semaglutida na metabolizam triglicerida

Učinak semaglutida na metabolizam triglicerida procijenjen je mjerenjem razine triglicerida korištenjem komercijalno dostupnog kompleta Triglyceride GPO-PAP (Greiner, Njemačka) prema instrukcijama proizvođača. Nakon tretmana, reagens je dodan uzorcima, nakon čega je slijedila inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je promjena boje očitana na mikropločicama s 96 jažica pomoću čitača mikropločica na 490 nm. Enzimska reakcija rezultira stvaranjem crvene kinoniminske boje. Intenzitet razvijene boje izravno je proporcionalan koncentraciji triglicerida.

#### 4.8. Mjerenje koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u stanicama.

Koncentracija GSH u lizatima stanične kulture će se odrediti se korištenjem Glutathione Assay Kit (Sigma-Aldrich, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon tretmana u mikropločicama sa 96 jažica, uklonio se medij, stanice su isprane PBS-om, pažljivo odljepljene strugačem stanica, a suspenzija je otpipetirana u tubice od 2 mL te

centrifugirana na  $600 \times g$ . Supernatant je otpipetiran, a iz tubica je otpipetirano 40  $\mu\text{L}$  staničnog taloga koji je prebačen u mikrotubicu. Staničnom talogu dodano je 5%-tne otopine 5-sulfosalicilne kiseline (SSA) u omjeru 3:1 (SSA:talog stanica). Stanična suspenzija je zatim podvrgnuta dvama ciklusima smrzavanja i odmrzavanja pomoću tekućeg dušika i termalnog *shakera* na  $37^\circ\text{C}$ , nakon čega je slijedila 5-minutna inkubacija na  $2 - 8^\circ\text{C}$ . Ekstrakt je centrifugiran na  $10000 \times g$  tijekom 10 minuta kako bi se uklonili istaloženi proteini. Dobiveni supernatant korišten je kao uzorak staničnog lizata za ispitivanje koncentracije glutaciona. Stock i radne otopine reagensa, pripremljene su prema uputama proizvođača te se dobila reakcijska otopina opisana u Tablici 5.

Tablica 5. Reakcijska otopina za određivanje koncentracije glutaciona.

| Komponenta                     | Konačna koncentracija           |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 | 95 mM                           |
| EDTA                           | 0,95 mM                         |
| NADPH                          | 0,038 mg/mL (48 $\mu\text{M}$ ) |
| DTNB                           | 0,031 mg/mL                     |
| Glutation reduktaza            | 0,115 U/mL                      |
| 5-sulfosalicilna kiselina      | 0,24 %                          |

U mikropločicama s 96 jažica, multikanalnom pipetom dodano je 20  $\mu\text{L}$  supernatanta i 150  $\mu\text{L}$  reakcijske otopine. 5 % otopina 5-sulfosalicilne kiseline služila je kao *blank*, a pripremljena GSH standard otopina kao standard. Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodano 50  $\mu\text{L}$  razrijeđene NADPH otopine te ponovno izmiješano pipetiranjem. Apsorbancija je zatim očitana spektrofotometrijski pomoću čitača mikropločica pri 415 nm. Iz vrijednosti dobivenih čitačem izračunate su koncentracije glutaciona u nmol/mL koristeći formulu:  $\text{nmol/mL (GSH)} = \Delta A (\text{uzorak}) / (\Delta A / (\text{standard}) \times \text{volumen})$ .

---

#### 4.9. Određivanje razine proteina uključenih u patofiziologiju MASLD-a (PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\alpha$ , MTTP, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ):

Razina proteina odredila se koristeći enzimsko-imunokemijsku metodu (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA), komercijalno dostupnim setovima: Human PPAR-alpha ELISA Kit, Human PPAR-gamma ELISA Kit, Human MTTP ELISA Kit, Human TGF-beta, Human TNF-alpha (ELK Biotechnology, SAD). Stanični lizati pripremili su se prema uputama proizvođača, metodom zamrzavanja i otapanja. Apsorbancija se mjerila korištenjem čitača mikropločica, a koncentracije (u ng/mL ili pg/mL) su izračunate pomoću standardnu krivulje.

#### 4.10. Određivanje razine ekspresije gena uključenih u patofiziologiju MASLD-a

##### 4.10.1. Izolacija ukupne RNA iz HepG2 stanica

U svrhu određivanja razine ekspresije gena, stanice su nasađene u mikropločice sa 6 jažica. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Za izolaciju RNA, koristio se NucleoZOL reagens (Macherey-Nagel, Njemačka). Prema uputama proizvođača, nakon tretmana, uklonio se medij iz svih jažica te je dodan 1 mL NucleoZOL-a. Stanice su se pažljivo odlijepile strugačem stanica te prikupile u mikrotubicu od 2 mL. Dodano je 400  $\mu$ L vode bez RNaza (Thermo Fisher Scientific, SAD). Mikrotubice su promućkane 10-15 sekundi te inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta, a zatim su centrifugirane 15 minuta na 12000 x g na 4 °C. 1 mL supernatanta koji sadrži RNA pipetom je odvojen u novu mikrotubicu od 2 mL te je dodano 1 mL izopropanola. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, otopina je centrifugirana 10 minuta na 12000 x g. Dobiveni precipitat RNA dva puta je ispran sa 75%-tnim etanolom te je RNA otopljena i vorteksirana u 400  $\mu$ L vode bez RNaza (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon završenog protokola izolacije, izmjerena je koncentracija RNA i čistoća uzoraka pomoću nanofotometra (Implen, Njemačka).

Za dodatno pročišćavanje RNA uzorka od kontaminirajuće DNA, uzorci su tretirani DNaza enzimom koristeći komercijalno dostupan set RQ1 RNase-Free DNase (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Potom je osigurana jednaka koncentracija RNA u svim uzorcima. Na prethodno ohlađenom stalku za PCR tubice, u PCR tubici pripljemljena je otopina koja je sadržavala 8  $\mu$ L RNA uzorka, 1  $\mu$ L 10X DNaza reakcijskog pufera i 1  $\mu$ L DNaza enzima. Zatim je reakcijska otopina inkubirana

30 minuta na 37°C. Nakon toga, dodano je 1 µl RQ1 DNase Stop Solution otopine te je otopina inkubirana 10 minuta na 65°C. Nakon provedenog protokola konačni volumen svakog uzorka je iznosio 11 µl.

#### 4.10.2. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju izolirane RNA u cDNA, koristio se komercijalno dostupan set High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific, SAD). Prema uputama proizvođača i izračunu potrebnih reakcija pripravljena je reakcijska smjesa opisana u Tablici 6.

Tablica 6. Sastav reakcijske otopine po uzorku za reverznu transkripciju.

| Reagensi                            | Volumen |
|-------------------------------------|---------|
| 10X RT pufer                        | 2 µL    |
| 25X dNTP smjesa (100 mM)            | 0,8 µL  |
| 10X RT smjesa početnica             | 2 µL    |
| MultiScribe™ reverzna transkriptaza | 1 µL    |
| Inhibitor RNaza                     | 1 µL    |
| Voda bez RNaza                      | 2,2 µL  |
| Ukupni volumen otopine              | 9 uL    |

Zatim je 9 µL reakcijske otopine pipetirano u PCR tubice, promješano pipetiranjem te lagano centrifugirano. Postavke za reverznu transkriptazu opisane su u Tablici 7, prema instrukcijama proizvođača. Reakcijska otopina i pipetiranje otopine je rađeno koristeći prethodno ohlađeni (-20 stupnjeva) stalak za PCR tubice.

Tablica 7. Postavka ciklusa reverzne transkripcije.

| Postavka           | Ciklus 1 | Ciklus 2 | Ciklus 3 | Ciklus 4 |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| Temperatura        | 25°C     | 37°C     | 85°C     | 4°C      |
| Vrijeme u minutama | 10       | 120      | 5        | ∞        |

#### 4.10.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) provela se korištenjem uređaja QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, Inc., SAD) i fluorescentnom bojom ORA™ qPCR Green ROX L Mix (highQu GmbH, Germany) koja se očitava na SYBR Green. Sastav reakcijske otopine i postavke uređaja opisane su u Tablici 9 i Tablici 10, a korištene početnice i njihov izvor navedene su u Tablici 8. Pripremljena reakcijska otopina volumena 20 uL pipetirana je u PCR mikrotitarske pločice s 96 jažica, minimalno u triplikatima.

Tablica 8. Početnice za qPCR analizu.

| Gen                 | Skraćenica | Forward (F) primer      | Reverse (R) primer     |
|---------------------|------------|-------------------------|------------------------|
| <i>Beta - Actin</i> | ACTB       | CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC | AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT |
| <i>PPAR gama</i>    | PPARG      | CCAGAAGCCTGCATTTCTGC    | CACGGAGCTGATCCCAAAGT   |
| <i>PPAR alfa</i>    | PPARA      | AACCCATGACACCCTCGTCTA   | CAAGCTACTGTCTGGGCTT    |
| <i>MTTP</i>         | MTTP       | TTGTTCTGAAGAGGGTCACTCC  | ACAGTGGCTCTGGAAGACCT   |
| <i>TNF alfa</i>     | TNF        | CACAGTGAAGTGCTGGCAAC    | ACATTGGGTCCCCCAGGATA   |
| <i>TGF beta 1</i>   | TGFB1      | TGGTGGAACCCACAACGAA     | AGAAGTTGGCATGGTAGCCC   |

Tablica 9. Sastav reakcijske otopine za qRT-PCR (ukupni volumen 10 µL)

|                                | Koncentracija / opis             | Volumen po reakciji (µL) |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| ORA™ qPCR Green ROX L Mix (2×) | ORA™ qPCR Mix, 2X                | 5                        |
| Forward početnica              | Konačna koncentracija 300–400 nM | 0,3-0,4                  |
| Reverse početnica              | Konačna koncentracija 300–400 nM | 0,3-0,4                  |
| cDNA UZORAK                    | < 100 ng                         | 2,5                      |
| Voda bez RNAza                 | Do konačnog volumena             | do 10,0                  |
| UKUPNO                         |                                  | 10,0                     |

Tablica 10. Program qRT-PCR reakcije.

|                               | Temperatura (°C) | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-------------------------------|------------------|---------|--------------|
| Početna aktivacija            | 95               | 2 min   | 1            |
| Denaturacija DNA              | 95               | 5 s     | 40           |
| Nalijeganje početnica/sinteza | 60–65            | 30 s    | 40           |

Podaci dobiveni korištenjem računalnog programa QuantStudio Real-Time PCR (verzija 2.1; Thermo Fisher Scientific, Inc.), dobiveni su u obliku Ct vrijednosti (engl. cycle threshold). Ct vrijednost je ključna za izračunavanje relativne promjene ekspresije gena korištenjem metode  $\Delta\Delta Ct$ . Za ovu metodu potreban je i housekeeping gen kao referentni gen, a u ovom eksperimentu korišten je  $\beta$ -aktin. Relativna promjena ekspresije gena ovom metodom računa se prema vrijednostima i primjeru u Tablici 11.

Tablica 11. Izračunavanje relativne promjene ekspresije gena korištenjem  $\Delta\Delta Ct$  metode.

|                          |                                                                                          |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta Ct$              | $Ct^{GOI} - Ct^{HKG}$                                                                    |
| $\Delta\Delta Ct$        | $\Delta Ct^{TRET} - \Delta Ct^{KNTRL}$                                                   |
| $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ | relativna promjena ekspresije gena u tretiranim skupinama s obzirom na kontrolnu skupinu |

\*GOI = gen od interesa, HKG = housekeeping gen, TRET = tretirana skupina, KNTRL = kontrolna, netretirana skupina

---

Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirali su se Shapiro-Wilkovim testom. Kontinuirani podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom i granicama interkvartilnog raspona, ovisno o normalnosti raspodjele. Razlike kontinuiranih varijabli između dvije nezavisne skupine testirale su se Studentovim t-testom, ukoliko varijable slijede normalnu razdiobu, a u ostalim slučajevima Mann Whitney U-testom, uz iskazanu razliku i 95% raspon pouzdanosti. Razlike kontinuiranih varijabli između tri i više nezavisnih skupina testirale su se jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallisovim-testom, u ovisnosti o normalnosti raspodjele (uz *post hoc* test Tukey-Kramer) <sup>73</sup>. Sve P-vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavila se na  $\alpha$  (alpha) = 0.05. Za statističku analizu koristio se statistički paket MedCalc® Statistical Software version 23.1.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2025). Izvješće o provedenom istraživanju načinilo se prema smjernicama za izvještavanje rezultata istraživanja u biomedicini i zdravstvu <sup>74</sup>.

## 5. Rezultati

### 5.1. Terapijski model MASLD-a

#### 5.1.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično preživljenje MTS testom

Statistički značajne razlike MTS testom uočene su između odgovarajućih negativnih kontrola i oleinske kiseline u koncentracijama od 1 mM (Studentov t test,  $P = 0,017$ ) i 1,5 mM (Studentov t test,  $P = 0,004$ ), dok pri 0,5 mM razlike nisu bile statistički značajne (Tablica 12).

Oleinska kiselina u koncentraciji 0,5 mM nije postigla značajnu citotoksičnost, dok je oleinska kiselina u koncentraciji 1,5 mM postigla izrazito snažnu citotoksičnost. Odabrana je oleinska kiselina u koncentraciji 1 mM za daljnje istraživanje.

Tablica 12. Učinak različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično preživljenje u terapijskom modelu.

|                          | Aritmetička sredina (SD) | †Razlika | 95 % raspon pouzdanosti | $P^*$        |
|--------------------------|--------------------------|----------|-------------------------|--------------|
| 0,5 mM                   |                          |          |                         |              |
| DMEM + otapalo 0,5%      | 1,874 (0,302)            | -0,215   | -0,792 do 0,362         | 0,360        |
| oleinska kiselina 0,5 mM | 1,659 (0,195)            |          |                         |              |
| 1 mM                     |                          |          |                         |              |
| DMEM + otapalo 1%        | 1,647 (0,178)            | -0,460   | -0,782 do -0,138        | <b>0,017</b> |
| oleinska kiselina 1%     | 1,187 (0,094)            |          |                         |              |
| 1,5 mM                   |                          |          |                         |              |
| DMEM + otapalo 1,5%      | 1,843 (0,314)            | -1,180   | -1,726 do -0,634        | <b>0,004</b> |
| oleinska kiselina 1,5 mM | 0,663 (0,133)            |          |                         |              |

SD - standardna devijacija; \*Studentov t test; Podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne razlike. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD).

### 5.1.2. Procjena učinka semaglutida na stanično preživljenje

#### Procjena staničnog preživljenja MTS testom

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i svih ostalih skupina (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina smanjila je stanično preživljenje u odnosu na negativnu kontrolu (1,000 vs. 0,557), a semaglutid u svim koncentracijama povećao je stanično preživljenje u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 13).

Tablica 13. Učinak različitih koncentracija semaglutida na stanično preživljenje u terapijskom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                         |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| DMEM              | 0,909 (0,038)            | $F_{(7, 16)} = 11,0$       | <b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 1,000 (0,041)            |                            |                               |
| DMEM + semaglutid | 0,993 (0,087)            |                            |                               |
| Oleinska kiselina | 0,557 (0,162)            |                            |                               |
| 2 nM semaglutid   | 0,977 (0,086)            |                            |                               |
| 5 nM semaglutid   | 0,971 (0,092)            |                            |                               |
| 10 nM semaglutid  | 0,958 (0,085)            |                            |                               |
| 20 nM semaglutid  | 0,672 (0,047)            |                            |                               |

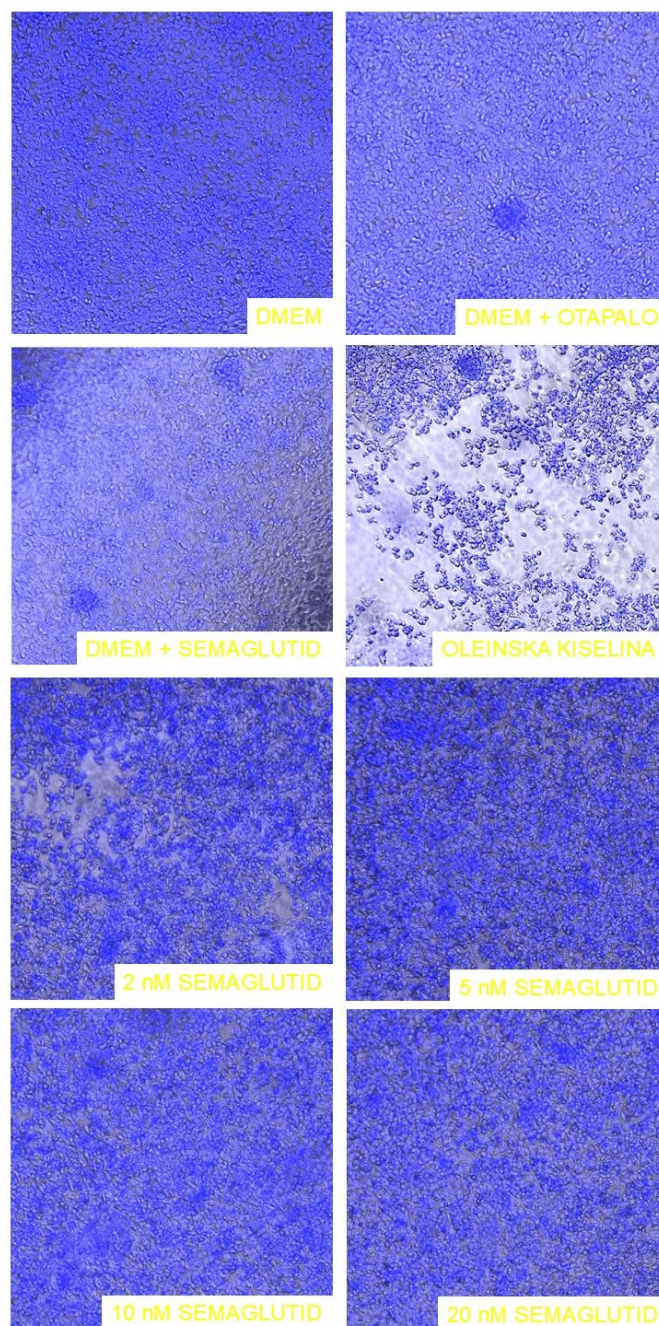
SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene staničnog preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (Oleinska) vs. (svi ostali); (20 nM semaglutid) vs. (svi ostali)

---

### *Procjena staničnog preživljenja Hoechst bojenjem*

Zdrave stanice pokazuju ravnomjerno raspoređenu boju u skupinama DMEM, DMEM + otapalo i DMEM + semaglutid. U oleinskoj kiselini značajno je manje HepG2 stanica u odnosu na negativnu kontrolu, dok je u skupinama 2, 5, 10 i 20 nM semaglutida značajno više stanica, no vidljive su intenzivne nakupine boje karakteristične za apoptotične stanice i kondenzaciju kromatina (Slika 3).



Slika 3. Flourescentna mikroskopija Hoechst bojenja HepG2 stanica u terapijskom modelu.

#### 5.1.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem

##### Procjena nakupljanja lipida kvantifikacijom ORO boje

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole, te oleinske kiseline i 5 nM, 10 nM, 20 nM semaglutida (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina povećala je količinu lipida u HepG2 stanicama u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentracijama 5 nM, 10 nM i 20 nM statistički značajno smanjio je nakupljanje lipida u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 14).

Tablica 14. Učinak semaglutida na nakupljanje lipida u terapijskom modelu.

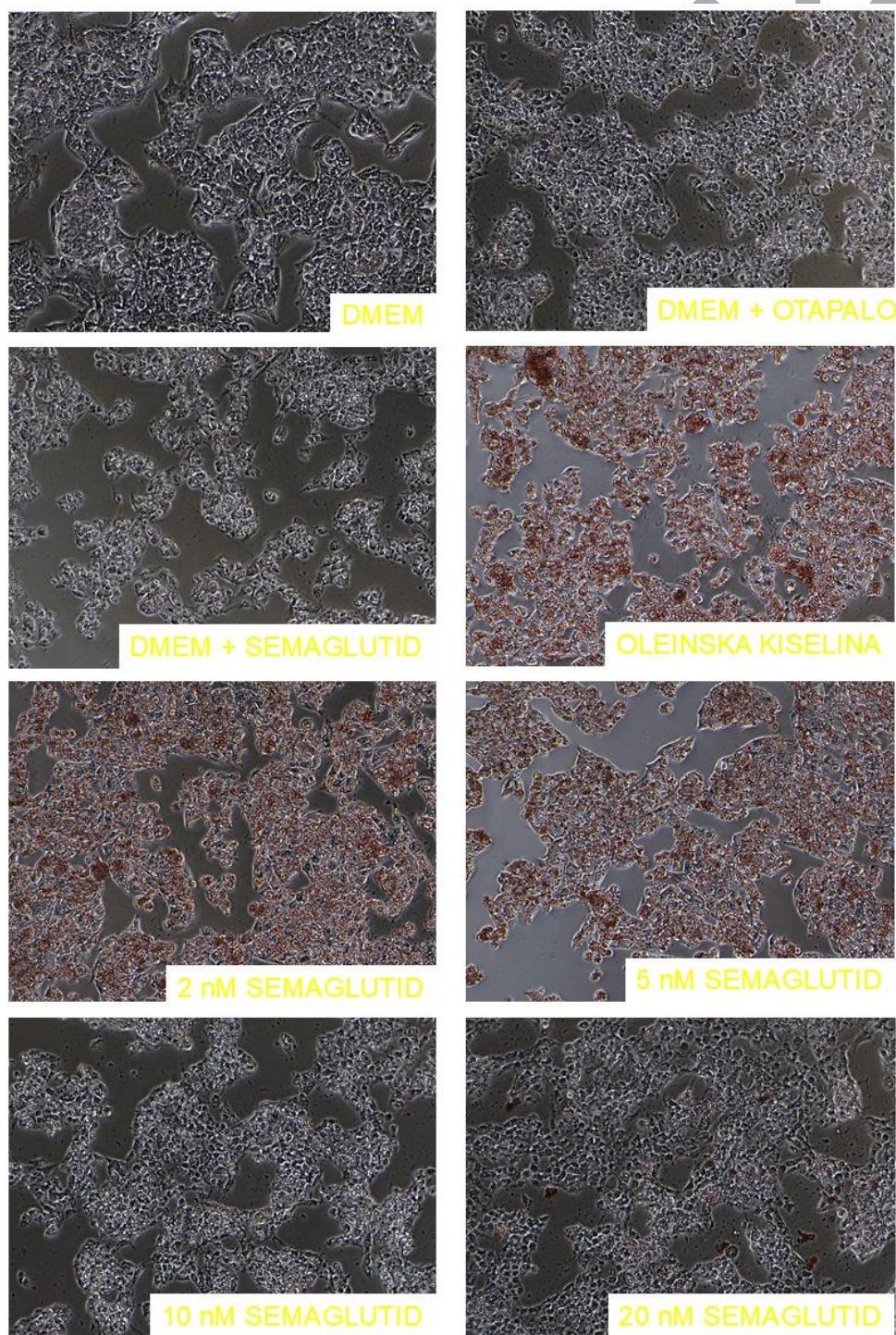
|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 0,867 (0,035)               | $F_{(7, 16)} = 219,7$      | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 1,009 (0,034)               |                            |                   |
| Semaglutid        | 0,916 (0,043)               |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 1,720 (0,046)               |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 1,795 (0,056)               |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 1,640 (0,053)               |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 1,360 (0,048)               |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 1,080 (0,035)               |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene nakupljanja lipida u odnosu na negativnu kontrolu.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (5 nM, 10 nM semaglutid) vs. (svi ostali); (DMEM, DMEM+semaglutid) vs. (DMEM +otapalo, oleinska kiselina, 2nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutid); (oleinska kiselina, 2nM semaglutid) vs. (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutid)

### *Mikroskopska analiza nakupljanja lipida ORO bojenjem*

U oleinskom kiselinom i semaglutidom u koncentraciji 2 nM, 5 nM tretiranim stanicama uočene su značajno intenzivnije nakupine crveno obojanih lipida u odnosu na ostale grupe (Slika 4).



Slika 4. Svjetlosna mikroskopija HepG2 stanica obojenih ORO bojom u terapijskom modelu.

#### 5.1.4. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i svih ostalih skupina (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina povećala je razinu triglicerida u stanicama u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama smanjio je razinu triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu na način ovisan o dozi (Tablica 15).

Tablica 15. Učinak semaglutida na razinu triglicerida u terapijskom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 0,852 (0,128)            | $F_{(7, 16)} = 48,1$       | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 1,000 (0,111)            |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 0,889 (0,294)            |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 6,926 (0,449)            |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 5,704 (0,612)            |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 5,148 (1,326)            |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 4,815 (0,670)            |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 4,222 (0,222)            |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene razine triglicerida u odnosu na negativnu kontrolu.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid) vs. (Oleinska kiselina, 2nM, 5nM, 10 nM i 20 nM semaglutid); (oleinska kiselina) vs. (svi ostali); (2 nM semaglutid) vs. (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid, oleinska kiselina, 20 nM semaglutid)

### 5.1.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i 5 nM semaglutida (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ), a nije uočena statistički značajna razlika između oleinske kiseline i negativne kontrole. Oleinska kiselina smanjila je koncentraciju GSH bez statističke značajnosti, a semaglutid u svim koncentracijama povećao je razinu GSH u odnosu na oleinsku, bez statističke značajnosti izuzev 5 nM semaglutida (Tablica 16).

Tablica 16. Učinak semaglutida na koncentraciju GSH u terapijskom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                         |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| DMEM              | 196,21 (6,1)             | $F_{(7, 16)} = 13,19$      | <b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 141,93 (13,6)            |                            |                               |
| DMEM + semaglutid | 163,05 (8,3)             |                            |                               |
| Oleinska kiselina | 130,66 (11,4)            |                            |                               |
| 2 nM semaglutid   | 140,40 (8,7)             |                            |                               |
| 5 nM semaglutid   | 175,81 (4,04)            |                            |                               |
| 10nM semaglutid   | 148,52 (3,3)             |                            |                               |
| 20 nM semaglutid  | 155,57 (17,5)            |                            |                               |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracija GSH u nmol/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (sve ostalo osim 5 nM semaglutid); (DMEM + otapalo, (2 nM semaglutid) vs. (5 nM semaglutid); (DMEM + semaglutid, 5 nM semaglutid) vs. (Oleinska kiselina)

### 5.1.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u terapijskom modelu MASLD-a

#### Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\alpha$

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole, te oleinske kiseline i 10 nM, 20 nM semaglutida (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina povećala je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama smanjio je koncentraciju proteina u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 17).

Tablica 17. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\alpha$  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 3,627 (0,661)            | $F_{(7, 16)} = 11,5$       | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 2,164 (0,239)            |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 2,605 (0,232)            |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 3,165 (0,083)            |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 2,214 (0,169)            |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 2,735 (0,558)            |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 1,619 (0,090)            |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 1,950 (0,061)            |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid, 2 nM, 10nM i 20 nM semaglutid)); (DMEM+semaglutid) vs. (10 nM semaglutid); (oleinska kiselina) vs. (DMEM+otapalo, 10 nM i 20 nM semaglutid); (5 nM semaglutid ) vs. (20 nM semaglutid)

### *Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\gamma$*

Oleinska kiselina povećala je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama, izuzev 5 nM, smanjio je koncentraciju proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, ali bez statističke značajnosti (Tablica 18).

Tablica 18. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\gamma$  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 4,555 (0,575)               | <i>F</i> (7, 16) = 2,4          | 0,072      |
| DMEM + otapalo    | 4,005 (0,229)               |                                 |            |
| DMEM + semaglutid | 5,748 (0,485)               |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 4,808 (1,177)               |                                 |            |
| 2 nM semaglutid   | 4,029 (1,275)               |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 5,214 (1,911)               |                                 |            |
| 10nM semaglutid   | 2,913 (0,659)               |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 3,025 (1,533)               |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

### *Učinci semaglutida na razine proteina MTTP*

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole, te oleinske kiseline i 10 nM semaglutida (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Semaglutid u koncentracijama 5 nM, 10 nM i 20 nM, smanjio je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, statistički značajno u koncentraciji 10 nM (Tablica 19).

Tablica 19. Učinci semaglutida na razine proteina MTTP u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                    |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| DMEM              | 8,655 (0,536)               | $F_{(7, 16)} = 4,3$        | <b>0,008<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 6,743 (0,339)               |                            |                          |
| DMEM + semaglutid | 8,708 (1,038)               |                            |                          |
| Oleinska kiselina | 8,825 (1,678)               |                            |                          |
| 2 nM semaglutid   | 9,508 (3,534)               |                            |                          |
| 5 nM semaglutid   | 7,483 (0,994)               |                            |                          |
| 10nM semaglutid   | 4,044 (1,500)               |                            |                          |
| 20 nM semaglutid  | 5,463 (0,360)               |                            |                          |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (10 nM semaglutid) vs. (DMEM, DMEM+semaglutid, oleinska kiselina, 2 nM semaglutid)

### Učinci semaglutida na razine proteina TNF- $\alpha$

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole, te oleinske kiseline i semaglutida u svim koncentracijama (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina značajno je povećala razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama značajno je smanjio razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 20).

Tablica 20. Učinci semaglutida na razine proteina TNF- $\alpha$  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 1237,282 (34,787)           |                            |                   |
| DMEM + otapalo    | 1000,069 (38,393)           |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 1324,71 (186,107)           |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 1595,406<br>(36,454)        | $F_{(7, 16)} = 34,0$       | $< 0,001^\dagger$ |
| 2 nM semaglutid   | 1140,49 (43,043)            |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 1336,063<br>(28,391)        |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 775,927 (44,104)            |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 968,905 (58,067)            |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u pg/mL.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (oleinska kiselina) vs. (svi ostali); (DMEM, DMEM+semaglutid, 5 nM semaglutid) vs. (DMEM+otapalo, oleinska kiselina, 10 nM i 20 nM semaglutid); (DMEM+semaglutid) vs. (DMEM+otapalo, oleinska kiselina, 10 nM i 20 nM semaglutida); (2 nM semaglutid) vs. (5 nM semaglutid)

### *Učinci semaglutida na razine proteina TGF- $\beta$*

Oleinska kiselina smanjila je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama smanjio je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, ali bez statističke značajnosti. Statistički značajna razlika u razini proteina uočeno je između skupine DMEM + semaglutid i DMEM (post hoc test Tukey-Kramer) (Tablica 21).

Tablica 21. Učinci semaglutida na razine proteina TGF- $\beta$  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *           |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------|
| DMEM              | 859,669<br>(149,854)     |                                 |                      |
| DMEM + otapalo    | 518,033 (18,334)         |                                 |                      |
| DMEM + semaglutid | 758,961<br>(124,276)     |                                 |                      |
| Oleinska kiselina | 425,151 (80,567)         | <i>F</i> (7, 16) = 20,8         | < 0,001 <sup>†</sup> |
| 2 nM semaglutid   | 312,603 (40,154)         |                                 |                      |
| 5 nM semaglutid   | 333,384 (56,181)         |                                 |                      |
| 10nM semaglutid   | 227,121 (96,682)         |                                 |                      |
| 20 nM semaglutid  | 330,248 (27,547)         |                                 |                      |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u pg/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (DMEM+otapalo, oleinska kiselina, 2nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutida); (DMEM+otapalo) vs. (DMEM, 10 nM semaglutid); (DMEM+semaglutid) vs. (oleinska kiselina, 2 nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutid)

### 5.1.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u terapijskom modelu MASLD-a

#### Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$

Oleinska kiselina povećala je gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$  u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama smanjio je koncentraciju proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 22).

Tablica 22. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *               |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| DMEM              | 0,341 (0,128)            | <i>F</i> (7, 31) = 3,8          | <b>0,004<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 1,251 (0,984)            |                                 |                          |
| DMEM + semaglutid | 0,309 (0,066)            |                                 |                          |
| Oleinska kiselina | 1,959 (1,228)            |                                 |                          |
| 2 nM semaglutid   | 1,011 (0,187)            |                                 |                          |
| 5 nM semaglutid   | 1,680 (0,799)            |                                 |                          |
| 10 nM semaglutid  | 1,205 (0,653)            |                                 |                          |
| 20 nM semaglutid  | 0,525 (0,432)            |                                 |                          |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu (2- $\Delta\Delta C_t$ ).

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (Oleinska kiselina) vs. (DMEM, DMEM + semaglutid)

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR $\gamma$*

Semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno je smanjio gensku ekspresiju *PPAR- $\gamma$*  u odnosu na oleinsku kiselinu (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina smanjila je gensku ekspresiju *PPAR- $\gamma$*  u odnosu na negativnu kontrolu, no bez statističke značajnosti (Tablica 23).

Tablica 23. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju *PPAR- $\gamma$*  u terapijskom modelu

|                   | Aritmetička sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *                    |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| DMEM              | 0,903 (0,081)            | $F_{(7, 32)} = 35,5$            | <b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b> |
| DMEM + semaglutid | 0,657 (0,061)            |                                 |                               |
| DMEM + otapalo    | 1,002 (0,072)            |                                 |                               |
| Oleinska kiselina | 0,816 (0,072)            |                                 |                               |
| 2 nM semaglutid   | 0,457 (0,096)            |                                 |                               |
| 5 nM semaglutid   | 0,502 (0,097)            |                                 |                               |
| 10 nM semaglutid  | 0,569 (0,048)            |                                 |                               |
| 20 nM semaglutid  | 0,246 (0,172)            |                                 |                               |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM, DMEM+otapalo) vs. (2nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM, DMEM + semaglutid); (oleinska kiselina) vs. (2nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutida); (2 nM semaglutid) vs. (20 nM semaglutida, DMEM + semaglutid); (20 nM semaglutida) vs. (DMEM + semaglutid)

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju MTTP*

U odnosu na negativnu kontrolu, oleinska kiselina smanjila je gensku ekspresiju *MTTP*, no bez statističke značajnosti. Semaglutid u koncentracijama 5 i 10 nM povećao je, a u koncentraciji 2 nM i 20 nM smanjio je razinu gena, no bez statističke značajnosti (Tablica 24).

Tablica 24. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju MTTP u terapijskom modelu

|                   | Medijan<br>(interkvartilni raspon) | K-W test<br>(stupnjevi slobode) | P*   |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------|------|
| DMEM              | 1,166 (0,154 - 2,706)              | K-W (7, 27) = 5,12              | 0,65 |
| DMEM + otapalo    | 0,634 (0,281 - 1,379)              |                                 |      |
| DMEM + semaglutid | 0,839 (0,216 - 2,072)              |                                 |      |
| Oleinska kiselina | 0,312 (0,275 - 0,604)              |                                 |      |
| 2 nM semaglutid   | 0,435 (0,082 - 1,630)              |                                 |      |
| 5 nM semaglutid   | 0,200 (0,114 - 0,401)              |                                 |      |
| 10 nM semaglutid  | 0,110 (0,105 - 0,571)              |                                 |      |
| 20 nM semaglutid  | 1,524 (0,255 - 2,792)              |                                 |      |

\*Kruskal Wallisov test. Povećana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju $TNF-\alpha$*

Oleinska kiselina statistički značajno je povećala gensku ekspresiju  $TNF-\alpha$  u odnosu na negativnu kontrolu. Semaglutid u koncentraciji 20 nM statistički značajno je povećao gensku ekspresiju  $TNF-\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu, a semaglutid u koncentraciji 5 nM i 10 nM statistički značajno smanjio je ekspresiju (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ) (Tablica 25).

Tablica 25. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju  $TNF-\alpha$

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                        |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| DMEM              | 0,724 (0,19)                | $F_{(7, 24)} = 50,2$       | <b>&lt;0,001<sup>†</sup></b> |
| DMEM + semaglutid | 0,296 (0,04)                |                            |                              |
| DMEM + otapalo    | 1,016 (0,21)                |                            |                              |
| Oleinska kiselina | 1,880 (0,20)                |                            |                              |
| 2 nM semaglutid   | 1,084 (0,69)                |                            |                              |
| 5 nM semaglutid   | 0,875 (0,13)                |                            |                              |
| 10 nM semaglutid  | 0,951 (0,11)                |                            |                              |
| 20 nM semaglutid  | 4,422 (0,67)                |                            |                              |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (20 nM semaglutid) vs. (sve ostale vrijednosti); (Oleinska kiselina) vs. (DMEM, DMEM+otapalo, 5 nM, 10 nM semaglutid, DMEM + semaglutid)

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TGF- $\beta$ 1*

Oleinska kiselina smanjila je ekspresiju u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama, izuzev 10 nM, povećao je gensku ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u odnosu na oleinsku kiselinu, statistički značajno u koncentraciji 20 nM (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ) (Tablica 26).

Tablica 26. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TGF- $\beta$ 1

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *          |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------|
| DMEM              | 0,555 (0,05)                | <i>F</i> (7, 24) = 173,6        | <0,001 <sup>†</sup> |
| DMEM + otapalo    | 1,002 (0,08)                |                                 |                     |
| DMEM + semaglutid | 0,389 (0,08)                |                                 |                     |
| Oleinska kiselina | 0,697 (0,05)                |                                 |                     |
| 2 nM semaglutid   | 0,802 (0,04)                |                                 |                     |
| 5 nM semaglutid   | 1,318 (0,45)                |                                 |                     |
| 10 nM semaglutid  | 0,599 (0,07)                |                                 |                     |
| 20 nM semaglutid  | 5,884 (0,62)                |                                 |                     |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu (2- $\Delta\Delta$ Ct).

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (20 nM semaglutid) vs. (sve ostale vrijednosti); (DMEM) vs. (5 nM semaglutid); (5 nM semaglutid) vs. (10 nM, 20 nM semaglutid, Semaglutid)

## 5.2. Preventivni model MASLD-a

### 5.2.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično stanično preživljenje MTS testom

Statistički značajne razlike uočene su između svih odgovarajućih negativnih kontrola i oleinske kiseline u koncentracijama od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM (Studentov t test,  $p < 0,001$ ).

Oleinska kiselina u koncentraciji 0,5 mM nije postigla značajnu citotoksičnost, dok je oleinska kiselina u koncentraciji 1,5 mM postigla izrazito snažnu citotoksičnost (Tablica 27). Odabrana je oleinska kiselina u koncentraciji 1 mM za daljnje istraživanje.

Tablica 27. Učinak različitih koncentracija oleinske kiseline na stanično preživljenje u preventivnom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | †Razlika | 95 % raspon pouzdanosti | $P^*$            |
|-------------------|--------------------------|----------|-------------------------|------------------|
| 0,5 mM            |                          |          |                         |                  |
| DMEM + otapalo    | 2,263 (0,069)            |          |                         |                  |
| oleinska kiselina | 1,692 (0,059)            | -0,571   | -0,717 do -0,426        | <b>&lt;0,001</b> |
| 1 mM              |                          |          |                         |                  |
| DMEM + otapalo    | 2,125 (0,061)            |          |                         |                  |
| oleinska kiselina | 1,171 (0,047)            | -0,955   | -1,078 do -0,832        | <b>&lt;0,001</b> |
| 1,5 mM            |                          |          |                         |                  |
| DMEM + otapalo    | 2,480 (0,085)            |          |                         |                  |
| oleinska kiselina | 0,958 (0,182)            | -1,521   | -1,844 do -1,199        | <b>&lt;0,001</b> |

SD - standardna devijacija; \*Studentov t test; Podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne razlike. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD).

### 5.2.2. Procjena učinka semaglutida na stanično preživljenje u preventivnom modelu

#### Procjena staničnog preživljenja MTS testom

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina smanjila je stanično preživljenje u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama povećao je stanično preživljenje u odnosu na oleinsku kiselinu, ali bez statističke značajnosti (Tablica 28).

Tablica 28. Učinak različitih koncentracija semaglutida na stanično preživljenje u preventivnom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 1,008 (0,034)            | $F_{(7, 16)} = 256,1$      | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 1,000 (0,024)            |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 0,985 (0,049)            |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 0,258 (0,034)            |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 0,270 (0,056)            |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 0,290 (0,054)            |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 0,323 (0,033)            |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 0,262 (0,023)            |                            |                   |

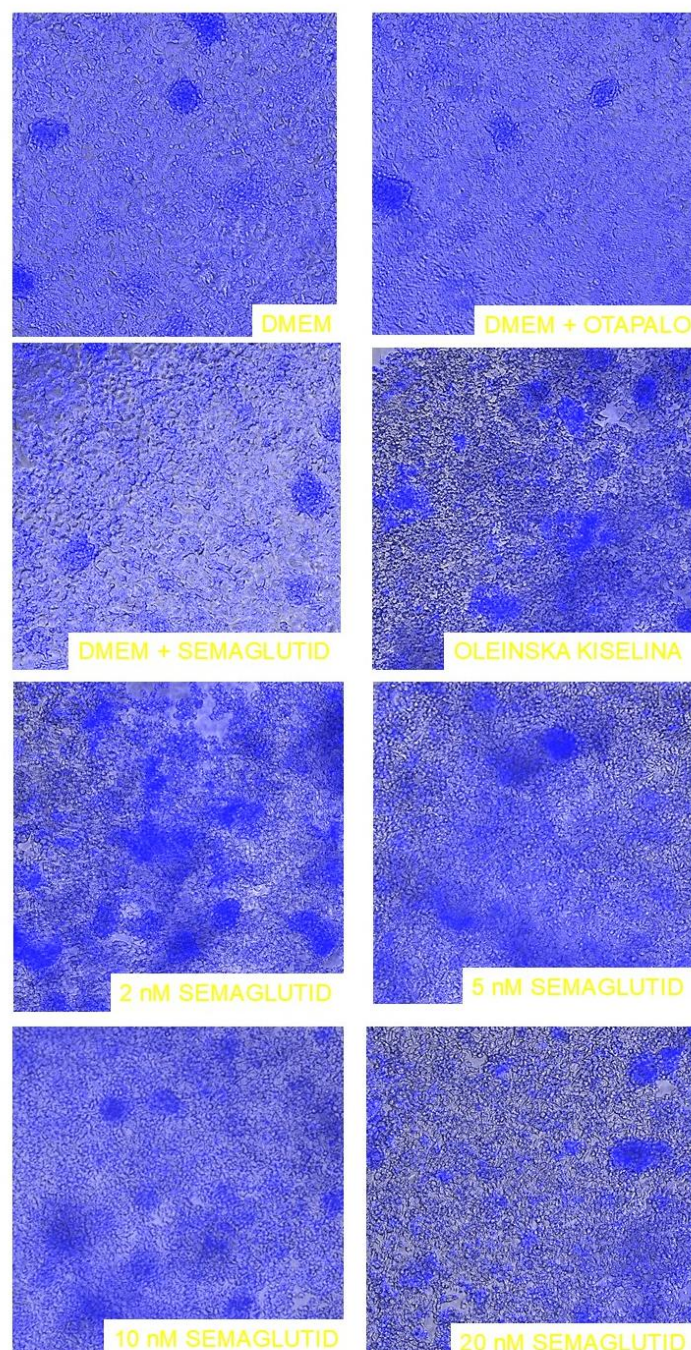
SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označavaju statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene staničnog preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid) vs. (oleinska kiselina, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM semaglutid)

---

### *Procjena stanično preživljenje Hoechst bojenjem*

Ravnomjerno raspoređena boja uočena je u skupinama DMEM, DMEM + otapalo i DMEM + semaglutid. Dok su u skupinama oleinska kiselina, 2, 5, 10 i 20 nM semaglutida uočene intenzivne nakupine boje karakteristične za apoptotične stanice i kondenzaciju kromatina (Slika 5).



Slika 5. Flourescentna mikroskopija Hoechst bojenja HepG2 stanica u preventivnom modelu.

### 5.2.3. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem u preventivnom modelu MASLD-a

#### Procjena nakupljanja lipida kvantifikacijom ORO boje

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i svih ostalih skupina (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ), izuzev 2 nM semaglutida. Oleinska kiselina statistički značajno povećala je količinu lipida u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentracijama 5 nM i 20 nM statistički značajno smanjio je nakupljanje lipida u stanicama u odnosu na oleinsku kiselinu, dok je u koncentraciji 10 nM semaglutid statistički značajno povećao nakupljanje lipida (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ) (Tablica 29).

Tablica 29. Učinak semaglutida na nakupljanje lipida u preventivnom modelu MASLD-a.

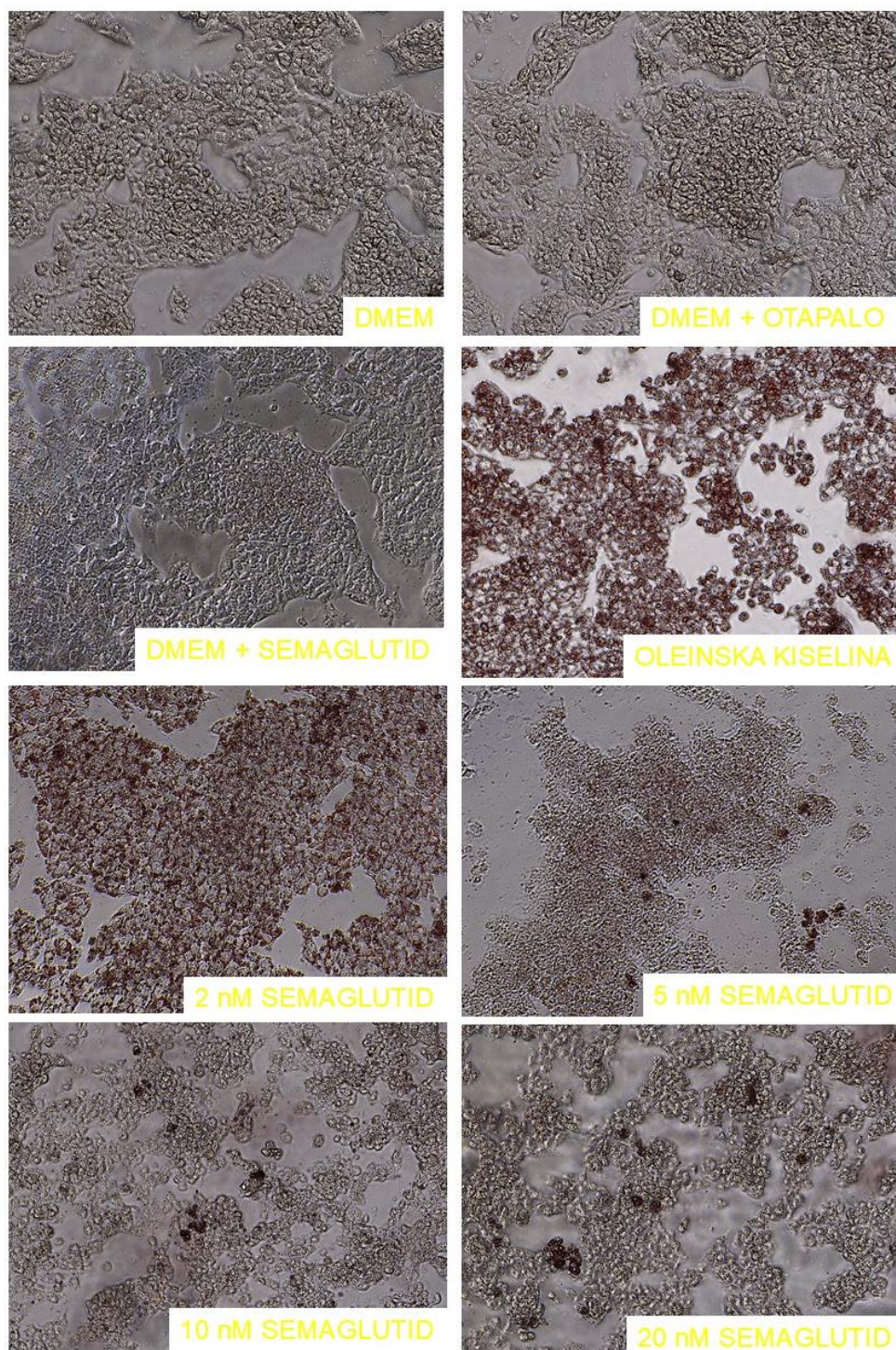
|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                         |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| DMEM              | 1,027 (0,02)             |                            |                               |
| DMEM + otapalo    | 1,002 (0,01)             |                            |                               |
| DMEM + semaglutid | 0,991 (0,02)             |                            |                               |
| Oleinska kiselina | 1,106 (0,04)             | $F_{(7, 16)} = 13,3$       | <b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b> |
| 2 nM semaglutid   | 1,171 (0,03)             |                            |                               |
| 5 nM semaglutid   | 0,913 (0,05)             |                            |                               |
| 10nM semaglutid   | 1,025 (0,03)             |                            |                               |
| 20 nM semaglutid  | 0,991 (0,06)             |                            |                               |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene nakupljanja lipida u odnosu na negativnu kontrolu.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (oleinska kiselina, 2 nM semaglutid) vs. (svi ostali); (5 nM semaglutid) vs. (DMEM, DMEM+otapalo, Semaglutid, 10 nM i 20 nM semaglutid)

### *Mikroskopska analiza nakupljanja lipida ORO bojenjem*

U oleinskom kiselinom i semaglutidom u koncentraciji 2 nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM tretiranim stanicama uočene su značajno intenzivnije nakupine crveno obojanih lipida u odnosu na ostale grupe (Slika 6).



Slika 6. Svjetlosna mikroskopija HepG2 stanica obojenih ORO bojom u preventivnom modelu.

#### 5.2.4. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom

Oleinska kiselina statistički značajno povećala je razinu triglicerida u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid koncentracijama 10 i 20 nM statistički značajno povećao je razinu triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Semaglutid u koncentraciji 2 nM i 5 nM povećao je razinu triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu bez statističke značajnosti (Tablica 30).

Tablica 30. Učinak semaglutida na razinu triglicerida u preventivnom modelu MASLD-a.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 0,958 (0,159)            | $F_{(7, 16)} = 45,6$       | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 0,998 (0,092)            |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 1,078 (0,120)            |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 1,557 (0,159)            |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 1,657 (0,124)            |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 1,678 (0,158)            |                            |                   |
| 10nM semaglutid   | 2,255 (0,034)            |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 1,976 (0,060)            |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označavaju statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) promjene razine triglicerida u odnosu na negativnu kontrolu.

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid) vs. (oleinska kiselina, 2 nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM semaglutid); (oleinska kiselina) vs. (10 nM i 20 nM semaglutid); (2 nM i 5 nM semaglutid) vs. (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid, 10 nM semaglutid)

### 5.2.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH

Oleinska kiselina povećala je koncentraciju GSH u odnosu na negativnu kontrolu bez statističke značajnosti. Semaglutid u svim koncentracijama bez statističke značajnosti povećao je razinu GSH u odnosu na oleinsku kiselinu, izuzev semaglutida u koncentraciji 20 nM koji je smanjio koncentraciju GSH u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 31).

Tablica 31. Učinak semaglutida na koncentraciju GSH u preventivnom modelu.

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                         |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| DMEM              | 140,23 (5,6)                | $F_{(7, 16)} = 10,02$      | <b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 169,68 (8,8)                |                            |                               |
| DMEM + semaglutid | 152,98 (4,8)                |                            |                               |
| Oleinska kiselina | 206,62 (32,7)               |                            |                               |
| 2 nM semaglutid   | 216,87 (16,9)               |                            |                               |
| 5 nM semaglutid   | 250,99 (13,7)               |                            |                               |
| 10nM semaglutid   | 219,50 (10,4)               |                            |                               |
| 20 nM semaglutid  | 195,10 (39,4)               |                            |                               |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracija GSH u nmol/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (Oleinska kiselina, 2 nM, 5 nM i 10 nM semaglutid); (DMEM + semaglutid) vs. (2 nM, 5 nM i 10 nM semaglutid); (DMEM+otapalo) vs. (5 nM semaglutid)

## 5.2.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u preventivnom modelu MASLD-a

### Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\alpha$

Oleinska kiselina statistički značajno smanjila je koncentraciju proteina PPAR- $\alpha$  u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentraciji 20 nM statistički značajno povećao je koncentraciju proteina PPAR- $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Bez statističke značajnosti, semaglutid u koncentracijama 5 nM i 10 nM povećao je koncentraciju proteina PPAR- $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu, a semaglutid u koncentraciji 2 nM smanjio je koncentraciju PPAR- $\alpha$  (Tablica 32).

Tablica 32. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- $\alpha$  u preventivnom modelu MASLD-a

|                   | Aritmetička sredina (SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$                    |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| DMEM              | 2,018 (0,655)            | $F_{(7, 16)} = 17,1$       | <b>0,031<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 1,877 (0,486)            |                            |                          |
| DMEM + semaglutid | 1,794 (0,101)            |                            |                          |
| Oleinska kiselina | 1,277 (0,123)            |                            |                          |
| 2 nM semaglutid   | 1,268 (0,124)            |                            |                          |
| 5 nM semaglutid   | 1,321 (0,162)            |                            |                          |
| 10nM semaglutid   | 1,326 (0,041)            |                            |                          |
| 20 nM semaglutid  | 1,711 (0,120)            |                            |                          |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM, DMEM+otapalo, DMEM+semaglutid, 20 nM semaglutid) vs. (oleinska kiselina, 2 nM, 5 nM i 10 nM semaglutida)

### *Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ u preventivnom modelu MASLD-a*

Oleinska kiselina povećala je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu bez statističke značajnosti. Semaglutid u koncentracijama 2 nM i 5 nM smanjio je, a u koncentracijama 10 nM i 20 nM povećao koncentraciju proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, ali bez statističke značajnosti. Visoka koncentracija proteina PPAR-γ uočena je u skupini DMEM + semaglutid, sa statistički značajno povišenom razinom proteina PPAR-γ u odnosu na skupinu DMEM (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ) (Tablica 33).

Tablica 33. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ u preventivnom modelu MASLD-a

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *               |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| DMEM              | 1,984 (0,398)               | <i>F</i> (7, 16) = 5,0          | <b>0,004<sup>†</sup></b> |
| DMEM + otapalo    | 2,640 (0,724)               |                                 |                          |
| DMEM + semaglutid | 4,385 (1,392)               |                                 |                          |
| Oleinska kiselina | 3,575 (0,615)               |                                 |                          |
| 2 nM semaglutid   | 3,551 (0,361)               |                                 |                          |
| 5 nM semaglutid   | 3,564 (0,755)               |                                 |                          |
| 10 nM semaglutid  | 3,587 (0,325)               |                                 |                          |
| 20 nM semaglutid  | 5,232 (0,918)               |                                 |                          |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (DMEM+semaglutid, 20 nM semaglutid); (DMEM+otapalo) vs. (20 nM semaglutid)

### *Učinci semaglutida na razine proteina MTTP u preventivnom modelu MASLD-a*

Oleinska kiselina smanjila je razine proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama, povećao je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 36).

Tablica 34. Učinci semaglutida na razine proteina MTTP u preventivnom modelu

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 7,965 (2,208)               | <i>F</i> (7, 16) = 2,3          | 0,084      |
| DMEM + otapalo    | 6,816 (0,176)               |                                 |            |
| DMEM + semaglutid | 6,410 (1,437)               |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 4,702 (1,142)               |                                 |            |
| 2 nM semaglutid   | 6,353 (0,172)               |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 5,466 (0,186)               |                                 |            |
| 10nM semaglutid   | 5,466 (1,130)               |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 6,644 (1,060)               |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u ng/mL.

### *Učinci semaglutida na razine proteina TNF- $\alpha$ u preventivnom modelu MASLD-a*

Oleinska kiselina povećala je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama statistički smanjio je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 35).

Tablica 35. Učinci semaglutida na razinu proteina TNF- $\alpha$  u preventivnom modelu MASLD-a

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 950,764 (26,275)            | <i>F</i> (7, 16) = 0,97         | 0,485      |
| DMEM + otapalo    | 903,681 (51,745)            |                                 |            |
| DMEM + semaglutid | 916,180 (58,132)            |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 1040,417<br>(251,673)       |                                 |            |
| 2 nM semaglutid   | 869,236 (14,412)            |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 868,125 (74,810)            |                                 |            |
| 10nM semaglutid   | 868,403 (69,704)            |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 896,458 (62,709)            |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u pg/mL.

### *Učinci semaglutida na razine proteina TGF- $\beta$*

Oleinska kiselina smanjila je razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentraciji u svim koncentracijama statistički, izuzev 10 nM, povećao je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 36).

Tablica 36. Učinci semaglutida na razine proteina TGF- $\beta$  u preventivnom modelu MASLD-a.

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 272,144<br>(204,615)        |                                 |            |
| DMEM + otapalo    | 303,256 (87,260)            |                                 |            |
| DMEM + semaglutid | 496,367 (57,969)            |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 257,478<br>(114,561)        | <i>F</i> (7, 16) = 2,6          | 0,051      |
| 2 nM semaglutid   | 287,033 (27,721)            |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 279,922<br>(113,344)        |                                 |            |
| 10nM semaglutid   | 203,922 (88,339)            |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 479,034<br>(123,294)        |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao apsolutne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom (SD) koncentracije proteina u pg/mL.

### 5.2.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u preventivnom modelu MASLD-a

#### Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$

Oleinska kiselina smanjila je gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$  u odnosu na negativnu kontrolu, semaglutid u koncentracijama 2 nM i 20 nM smanjio je, a u koncentracijama 5 nM i 10 nM povećao je gensku ekspresiju u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 37).

Tablica 37. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR- $\alpha$  u preventivnom modelu.

|                   | Aritmetička sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 0,582 (0,425)            | <i>F</i> (7, 33) = 2,2          | 0,06       |
| DMEM + otapalo    | 0,353 (0,039)            |                                 |            |
| Dmem + Semaglutid | 0,195 (0,050)            |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 0,305 (0,082)            |                                 |            |
| 2 nM semaglutid   | 0,251 (0,096)            |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 0,331 (0,109)            |                                 |            |
| 10 nM semaglutid  | 0,318 (0,103)            |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 0,255 (0,103)            |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu (2- $\Delta\Delta C_t$ ).

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju PPAR-γ*

Statistički značajne razlike uočene su između oleinske kiseline i negativne kontrole, te oleinske kiseline i semaglutida u koncentraciji 10 nM (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Oleinska kiselina statistički značajno smanjila je gensku ekspresiju u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentraciji 10 nM statistički značajno smanjio je gensku ekspresiju *PPAR-γ* u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 38).

Tablica 38. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju *PPAR-γ* u preventivnom modelu MASLD-a.

|                   | Aritmetička<br>sredina (SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> *        |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------|
| DMEM              | 0,535 (0,033)               | $F_{(7, 32)} = 35,3$            | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 1,003 (0,091)               |                                 |                   |
| DMEM + semaglutid | 0,701 (0,064)               |                                 |                   |
| Oleinska kiselina | 0,587 (0,063)               |                                 |                   |
| 2 nM semaglutid   | 0,614 (0,045)               |                                 |                   |
| 5 nM semaglutid   | 0,488 (0,150)               |                                 |                   |
| 10 nM semaglutid  | 0,289 (0,052)               |                                 |                   |
| 20 nM semaglutid  | 0,546 (0,047)               |                                 |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2-\Delta\Delta Ct$ ).

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (DMEM) vs. (DMEM+otapalo, 10 nM semaglutid, Semaglutid); (DMEM+otapalo, 10 nM semaglutid) vs. (svi ostali); (Oleinska kiselina, 2nM semaglutid, 20 nM semaglutid) vs. (10 nM semaglutid); (10 nM semaglutid) vs. (20 nM semaglutida, Semaglutid)

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju MTTP*

Oleinska kiselina povećala je gensku ekspresiju *MTTP* u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u svim koncentracijama smanjio je gensku ekspresiju *MTTP* u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 39).

Tablica 39. *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju MTTP*

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | <i>F</i><br>(stupnjevi slobode) | <i>P</i> * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| DMEM              | 1,165 (0,171)               | <i>F</i> (7, 27) = 2,2          | 0,07       |
| DMEM + otapalo    | 1,065 (0,428)               |                                 |            |
| DMEM + semaglutid | 1,325 (0,374)               |                                 |            |
| Oleinska kiselina | 2,290 (0,716)               |                                 |            |
| 2 nM semaglutid   | 1,344 (0,951)               |                                 |            |
| 5 nM semaglutid   | 0,996 (0,683)               |                                 |            |
| 10 nM semaglutid  | 1,623 (0,790)               |                                 |            |
| 20 nM semaglutid  | 1,104 (0,478)               |                                 |            |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA. Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TNF- $\alpha$*

Oleinska kiselina smanjila je gensku ekspresiju TNF- $\alpha$  u odnosu na negativnu kontrolu, bez statističke značajnosti, a semaglutid u koncentraciji 10 nM statistički značajno povećao je gensku ekspresiju u odnosu na oleinsku kiselinu (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ). Ostale koncentracije semaglutida smanjile su gensku ekspresiju, no bez statističke značajnosti (Tablica 40).

Tablica 40. Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TNF- $\alpha$  u preventivnom modelu MASLD-a.

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | $F$<br>(stupnjevi slobode) | $P^*$             |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|
| DMEM              | 2,187 (0,30)                | $F_{(7, 27)} = 6,4$        | $< 0,001^\dagger$ |
| DMEM + otapalo    | 1,662 (2,14)                |                            |                   |
| DMEM + semaglutid | 0,475 (0,09)                |                            |                   |
| Oleinska kiselina | 1,382 (0,22)                |                            |                   |
| 2 nM semaglutid   | 0,639 (0,11)                |                            |                   |
| 5 nM semaglutid   | 0,928 (0,16)                |                            |                   |
| 10 nM semaglutid  | 3,628 (0,74)                |                            |                   |
| 20 nM semaglutid  | 0,888 (0,18)                |                            |                   |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplicatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

$^\dagger$ na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (10 nM semaglutid) vs. (DMEM+otapalo, Oleinska kiselina, 2nM, 5 nM, 20 nM semaglutid, DMEM + semaglutid).

### *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TGF- $\beta$ 1*

Oleinska kiselina statistički značajno smanjila je gensku ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u odnosu na negativnu kontrolu, semaglutid u koncentraciji 10 nM povećao je, a u koncentraciji 2 i 20 nM smanjio je gensku ekspresiju u odnosu na oleinsku kiselinu (post hoc test Tukey-Kramer,  $P < 0,05$ ) (Tablica 41).

Tablica 41. *Učinci semaglutida na gensku ekspresiju TGF- $\beta$  u preventivnom modelu MASLD-a.*

|                   | Aritmetička sredina<br>(SD) | F<br>(stupnjevi slobode) | P*                   |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------|
| DMEM              | 2,164 (0,14)                | F (7, 27) = 243,6        | < 0,001 <sup>†</sup> |
| DMEM + otapalo    | 1,001 (0,06)                |                          |                      |
| DMEM + semaglutid | 0,274 (0,03)                |                          |                      |
| Oleinska kiselina | 1,681 (0,19)                |                          |                      |
| 2 nM semaglutid   | 1,051 (0,06)                |                          |                      |
| 5 nM semaglutid   | 1,955 (0,08)                |                          |                      |
| 10 nM semaglutid  | 6,119 (0,58)                |                          |                      |
| 20 nM semaglutid  | 0,938 (0,14)                |                          |                      |

SD - standardna devijacija; \*ANOVA (post hoc test Tukey-Kramer); Podebljana vrijednost označava statistički značajnu razliku. Eksperimenti su provedeni u triplikatima. Podaci su prikazani kao relativne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom relativne promjene ekspresije u odnosu na negativnu kontrolu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju: (10 nM semaglutid, DMEM + semaglutid) vs. (sve ostale vrijednosti); (DMEM, Oleinska kiselina, 5 nM semaglutid) vs. (DMEM+otapalo, 2nM, 10 nM, 20 nM semaglutid, Semaglutid).

---

## 6. Rasprava

MASLD, jedan od najznačajnijih globalnih javnozdravstvenih problema, zbog svoje kompleksne patogeneze te snažne povezanosti s pretilošću, ŠB2 i kardiometaboličkim bolestima, intenzivno se istražuje radi razjašnjavanja molekularnih mehanizama nastanka i progresije ove bolesti, razvoja boljih neinvazivnih biomarkera i farmakoterapije. *In vitro* studije MASLD-a iznimno su važna komponenta u razumijevanju ove bolesti, pružajući uvid u molekularne biljege i potencijalne ciljne molekule za razvoj lijekova, a najučestaliji način uspostave ovih modela je korištenje slobodnih masnih kiselina kao što su oleinska i palmitinska kiselina ili njihove mješavine u kontinuiranim staničnim linijama hepatocita kao što su HepG2, Huh7, HepRG<sup>59,69,75</sup>.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinak semaglutida u prevenciji nastanka steatoze i eksperimentalnoj farmakoterapiji blažih oblika steatoze na staničnom modelu masne jetre. Ricchi i sur., pokazali su da oleinska kiselina ima izraženije steatogene, a palmitinska apoptogene učinke, a pri indukciji masnih promjena mješavinom dviju kiselina, oleinska kiselina pokazuje i protektivne učinke te smanjuje lipotoksičnost induciranu palmitinskom kiselinom<sup>76</sup>. Brojne studije istražile su razne mehanizme kojima oleinska kiselina u mješavini s palmitinskom pokazuje protektivna svojstva<sup>77</sup>. Nadalje, palmitinska kiselina ima puno izraženije proinflamatorne učinke što je korisno pri uspostavljanju modela MASH-a, dok je za ovu studiju bilo potrebno uspostaviti blagi oblik MASLD-a, te istražiti izravnu ulogu hepatocita u razvoju i progresiji MASLD-a. Također, dualni učinci oleinske kiseline u prisutnosti palmitinske utjecali bi na točnost i pouzdanost interpretacije rezultata.

Oleinska kiselina, bez palmitinske, pokazala se učinkovitom za uspostavu ovakvog modela u HepG2 stanicama, u brojnim studijama<sup>78-80</sup>. Bao i sur., 2024. ispitali su učinke različitih koncentracija oleinske kiseline na HepG2 stanicama korištenim u ovoj studiji, te pokazali da u koncentracijama 0,25 mM, 0,5 mM i 1 mM oleinska kiselina inducira citotoksičnost, smanjuje stanično preživljenje uspješno postiže nakupljanje lipida u HepG2 stanicama te povećava koncentraciju triglicerida<sup>69</sup>. Po uzoru na ovu studiju te dodatnim MTS testiranjem učinka oleinske kiseline u koncentracijama 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM na stanično preživljenje (Tablica 12 i Tablica 27), odabrala se optimalna koncentracija oleinske kiseline, dostatna za poticanje citotoksičnosti, a

---

održiva za daljnje eksperimente. Uspostavljena su dva modela MASLD-a, terapijski i preventivni, koristeći oleinsku kiselinu u koncentraciji 1 mM.

U kontekstu uspješnosti uspostave MASLD-a, pokazalo se da su parametri staničnog preživljenja, nakupljanja lipida u stanicama te razine triglicerida u skladu sa sličnim studijama na HepG2 stanicama. U oba modela MASLD-a, oleinska kiselina statistički značajno smanjila je stanično preživljenje (Tablica 13 i Tablica 28), povećala nakupljanje lipida u stanicama (Tablica 14 i Tablica 29) i razinu triglicerida (Tablica 15 i Tablica 30) u odnosu na negativnu kontrolu. Isti učinci primijećeni su u brojnim studijama, specifično koristeći HepG2 stanice i oleinsku kiselinu već spomenutoj studiji koju su proveli Bao i sur.<sup>69</sup>, Liu i Park<sup>81</sup>, te brojne druge<sup>82,83</sup>.

U trenutku ovog istraživanja, nisu dostupne *in vitro* studije koje su ispitivale učinak semaglutida u modelu MASLD-a, no učinci brojnih GLP-1RA ispitani su u sličnim modelima na HepG2, Huh7 i primarnim jetrenim stanicama. U terapijskom modelu, semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno povećao je stanično preživljenje u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 13), dok je u preventivnom modelu semaglutid u svim koncentracijama povećao stanično preživljenje HepG2 stanica u odnosu na oleinsku kiselinu, no bez statističke značajnosti (Tablica 29).

U terapijskom modelu, semaglutid je u koncentracijama 5, 10 nM i 20 nM, statistički značajno smanjio nakupljanje lipida u HepG2 stanicama u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 14). U preventivnom modelu, semaglutid je statistički značajno smanjio nakupljanje lipida u koncentracijama 5 i 20 nM, dok je u koncentraciji 10 nM povećao nakupljanje lipida u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 29).

Učinci semaglutida na razinu triglicerida razlikovali su se između dva modela. U terapijskom modelu, razina triglicerida statistički značajno se smanjila tretmanom semaglutidom u svim koncentracijama u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 15). U preventivnom modelu MASLD-a, semaglutid statistički značajno je povećao razine triglicerida u koncentracijama 10 i 20 nM (Tablica 31).

Rezultati dobiveni u terapijskom modelu u skladu su s dokazima *in vitro* studija provedenih koristeći liraglutid u *in vitro* modelima MASLD-a<sup>71,84-86</sup>, kao i druge GLP-1RA<sup>59,78,87</sup>, u kojima su ORO bojenjem i mjerenjem razine triglicerida opisani pozitivni učinci ovih peptida na smanjenje nakupljanja lipida u stanicama te smanjenje koncentracije triglicerida.

Zbunjujući su učinci semaglutida na razine triglicerida u preventivnom modelu, koji pokazuju povećanje triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu, no pri interpretaciji ovih rezultata treba uzeti u obzir kompleksnost lipotoksičnosti i uloge sinteze triglicerida. U steatotičnoj jetri, nakupljanje triglicerida indikator je MASLD-a, no nekolicina studija pokazala je da stvaranje triglicerida potencijalno služi kao kompenzatorni mehanizam protiv oksidativnog stresa izazvanog slobodnim masnim kiselinama i drugim lipidima<sup>88</sup>. Ovim mehanizmom pretretman semaglutidom potencijalno pokazuje protektivni učinak na lipotoksičnost izazvanu masnim kiselinama u hepatocitima.

U patofiziologiji MASLD-a, nakupljanje lipida i povećana oksidacija masnih kiselina dovodi do disregulacije oksidativnog stresa što igra ključnu ulogu u daljnjem razvoju i progresiji MASLD-a u MASH. GSH ključna je molekula za regulaciju reaktivnih kisikovih vrsta, a studije o promjenama u razinama GSH u MASLD-u pokazale su nejasne zaključke. U našem modelu, učinci oleinske kiseline i semaglutida na razine GSH u HepG2 stanicama također su varijabilni, bez statističke značajnosti uspoređivanjem oleinske kiseline i negativne kontrole u terapijskom i preventivnom modelu. U terapijskom modelu, oleinska kiselina smanjila je, a u preventivnom povećala razine GSH u odnosu na negativnu kontrolu, no bez statističke značajnosti. U oba modela, semaglutid pretežno je povećao razine GSH u odnosu na oleinsku kiselinu, statistički značajno samo u terapijskom modelu u koncentraciji 5 nM. U preventivnom modelu u najvišoj koncentraciji semaglutid smanjio je razine GSH, no bez statističke značajnosti (Tablica 16 i Tablica 31).

U sličnoj studiji na HepG2 stanicama, oleinska kiselina u koncentraciji 1,5 mM povećala je razine GSH u odnosu na netretirane stanice<sup>89</sup>, što je u skladu s preventivnim modelom u ovoj studiji. Začudujuće, malo je studija ispitalo učinke GLP-1RA na razine GSH u modelima MASLD-a. Studije na animalnim modelima steatoze pokazale su smanjenje GSH u masnoj jetri te povećanje razine GSH tretmanom GLP-1RA<sup>90,91</sup>, što je u skladu s učincima opisanim u terapijskom modelu. Specifične mehanizme promjene i funkcije GSH u razvoju MASLD-a, potrebno je razjasniti daljnjim studijama, a razlog za diskrepancije u zaključcima studija može biti varijabilnost u metodologiji među studijama<sup>20</sup>.

PPAR- $\alpha$ , u jetri najprisutniji izotip PPAR-ova, jedan je od najvažnijih regulatora lipidnog metabolizma koji sudjeluje u mikrosomalnoj, peroksisomalnoj i mitohondrijskoj

---

oksidaciji masnih kiselina, homeostazi lipoproteina, regulaciji slobodnih radikala te smanjenju upalnog odgovora u hepatocitima <sup>92,93</sup>.

U terapijskom modelu, oleinska kiselina u odnosu na negativnu kontrolu statistički značajno je povećala, a semaglutid u koncentracijama 10 nM i 20 nM smanjio je razinu proteina PPAR- $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 18), dok je u preventivnom modelu oleinska kiselina statistički značajno smanjila razinu proteina u odnosu na negativnu kontrolu, a semaglutid u koncentraciji 20 nM povećao je razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 32). Na razini genske ekspresije, u oba modela učinci su bili u skladu s promjenama proteina, no bez statističke značajnosti (Tablica 22 i Tablica 37).

Slične *in vitro* studije na PHH i kontinuiranim staničnim linijama hepatocita, pokazale su povećane razine proteina PPAR- $\alpha$  nakon aktivacije slobodnim masnim kiselinama <sup>94,95</sup>, dok je smanjena ekspresija PPAR- $\alpha$  prisutna u biopsijama jetre pacijenata s MASH-om <sup>96</sup>. Slična studija na HepG2 stanicama inkubiranim oleinskom kiselinom pokazala je smanjenje genske ekspresije PPAR- $\alpha$  uz paralelno povećanje ekspresije TNF- $\alpha$  <sup>82</sup>. Pretpostavka je da aktivacija, tj. povećanje koncentracije PPAR- $\alpha$ , odnosno povećana ekspresija PPAR- $\alpha$  gena, služi kao protektivni mehanizam u odgovoru na lipidno opterećenje hepatocita <sup>92,97</sup>. Smanjenje PPAR- $\alpha$  u preventivnom modelu moguće je pripisati supresiji PPAR- $\alpha$  proupalnim TNF- $\alpha$  <sup>98</sup>. Nasuprot rezultatima ove studije, u kontekstu učinka GLP-1RA na ovaj transkripcijski čimbenik, *in vitro* studije pokazale su povećanje i na proteinskoj i genskoj razini u odgovoru na GLP-1RA tretman <sup>99</sup>, kao i u animalnim modelima <sup>100</sup>.

PPAR- $\gamma$  eksprimiran je primarno u adipocitima, a manje u jetri, no također ključan u regulaciji lipidnog metabolizma. U ovoj studiji, u terapijskom modelu ni oleinska kiselina ni semaglutid nisu statistički značajno utjecali na ovaj protein (Tablica 19), dok je na genskoj razini semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno smanjio gensku ekspresiju PPAR- $\gamma$  u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 23). U preventivnom modelu, također, samo na genskoj razini uočene su statistički značajne razlike, u kojem je semaglutid u koncentraciji 10 nM statistički značajno smanjio ekspresiju ovog gena (Tablica 38). Ovi su rezultati u skladu s dosadašnjim studijama na HepG2 stanicama u kojima je GLP-1RA exendin-4 također smanjio gensku ekspresiju PPAR- $\gamma$ , kao i liraglutid u Huh7 modelu MASLD-a <sup>71,79</sup>.

TNF- $\alpha$ , proupalni čimbenik i TGF- $\beta$ , profibrotički čimbenik, ključni su u progresiji MASLD-a u MASH i fibrozu. U ovoj studiji, u terapijskom modelu, oleinska kiselina statistički značajno je povećala razinu proteina i gensku ekspresiju *TNF- $\alpha$* , a semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno je smanjio razinu proteina u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 21 i Tablica 25). U preventivnom modelu, na proteinskoj razini učinci su bili slični, no bez statističke značajnosti, izuzev na genskoj razini u kojoj je semaglutid u koncentraciji 10 nM povećao ekspresiju ovog gena (Tablica 25 i Tablica 39).

Zanimljiva studija ispitala je učinak mješavine slobodnih masnih kiselina (palmitinske i oleinske) na kinetiku ekspresije citokina IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u jetrenim staničnim linijama (IHH i HuH7). Stanice su bile izložene masnim kiselinama tijekom 3, 6, 12 i 24 sata, a primjećeno je da se *TNF- $\alpha$*  rapidno i intenzivno pojačano eksprimira nakon 3 sata, a zatim se ekspresija smanjuje, dok ostali interleukini imaju sporiji odgovor i dosežu maksimum nakon 24 sata<sup>101</sup>.

Kwon i sur., *in vitro* 3D kulturom primarnih hepatocita (PHH) izloženih mješavini oleinske i palmitinske kiseline, u sofisticiranoj studiji pokazali su povećanje ekspresije TNF- $\alpha$ , ali i TGF- $\beta$ , ključnog profibrotičnog faktora u progresiji<sup>102</sup>. Značajno je što su ovi upalni i profibrotički signali odgovor PHH-a na steatozu, bez prisustva Kupfferovih ili HSC stanica, što zaista naglašava lipidnu akumulaciju kao iznimno važan hitac u patofiziologiji MASLD-a.

U ovoj studiji, oleinska kiselina ni u terapijskom ni preventivnom modelu MASLD-a nije imala statistički značajan učinak na protein (Tablica 22 i Tablica 36) dok je na genskoj razini oleinska kiselina statistički značajno smanjila ekspresiju *TGF- $\beta$ 1* u preventivnom modelu (Tablica 26 i Tablica 41). Jednostavno objašnjenje jest da ove neznatne promjene u ekspresiji ovog gena i razinama proteina potvrđuju da u našem MASLD modelu nismo postigli značajnu aktivaciju signalnih puteva uključenih u fibrinogenezu. Ovo ide u prilog validiranosti našeg modela MASLD-a s blagim upalnim promjenama za ispitivanje semaglutida u neprogresivnim stadijima. Također, većinu TGF- $\beta$  u jetrenoj fibrinogenezi luče LSEC ili Kupfferove stanice, a ne hepatociti<sup>103</sup>.

U kontekstu učinaka semaglutida na ove proinflammatorne čimbenike, rezultati su slični *in vitro* studijama na ostalim GLP-1RA.

U terapijskom modelu, semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno je smanjio razinu proteina  $TNF-\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 21). Ekspresija  $TNF-\alpha$ , u terapijskom modelu, također je statistički značajno smanjena u skupinama tretiranim semaglutidom u koncentraciji 5 nM i 10 nM, dok je u skupini 20 nM semaglutid statistički značajno povećao ekspresiju  $TNF-\alpha$  (Tablica 25). U preventivnom modelu, statistički značajno bilo je samo povećanje ekspresije ovog gena u skupini 10 nM semaglutida u odnosu na oleinsku kiselinu, dok su ostale koncentracije smanjile ekspresiju, ali bez statističke značajnosti.

Rezultati terapijskog modela sugeriraju da semaglutid pretežno smanjuje ekspresiju i produkciju  $TNF-\alpha$ , smanjujući proupalnu progresiju. Wong i Drucker u svom preglednom radu o učincima GLP-1RA na upalu i  $TNF-\alpha$  naveli su značajan broj relevantnih studija koje ukazuju na protuupalne učinke ovih lijekova, u različitim organskim sustavima i staničnim tipovima. Prema prikazanim studijama, GLP-1 i GLP-1RA moduliraju upalne procese osobito kroz smanjenje ekspresije  $TNF-\alpha$ , u adipocitima, perifernim mononuklearnim stanicama, upalnim procesima jetre, neurološkog, kardiovaskularnog, respiratornog sustava, a utječu i na smanjenje cirkulirajućih razina u serumu <sup>51</sup>. Također navode da predkliničke i kliničke studije o semaglutidu, sugeriraju da je značajan dio protuupalnih učinaka GLP-1 lijekova posredovan mehanizmima neovisnim o smanjenju tjelesne mase <sup>104-106</sup>.

U predkliničkim animalnim modelima exendin, liraglutid i semaglutid pokazali su hepatoprotektivne i antiinflamatorne učinke kod miševa s aterosklerozom, smanjujući proupalne citokine i razine  $TNF-\alpha$  u jetri, kao i  $TGF-\beta 1$ , uz smanjenje ekspresije gena povezanih s produkcijom kolagena <sup>51,107</sup>.

U kontekstu učinka GLP-1RA na  $TGF-\beta$ , i u terapijskom i preventivnom modelu učinci su bili varijabilni i pretežno bez statističke značajnosti na proteinskoj i genskoj razini. U terapijskom modelu, statistički značajno povećanje primijećeno je samo na genskoj razini, u kojem je semaglutid u koncentraciji 20 nM povećao ekspresiju ovog gena, a u preventivnom modelu, semaglutid u koncentraciji 10 nM povećao je, a u koncentraciji 2 i 20 nM smanjio je gensku ekspresiju u odnosu na oleinsku kiselinu (Tablica 36 i Tablica 41).

Navedeni nejasni učinci oleinske kiseline i semaglutida na razine  $TGF-\beta$ , mogu se objasniti još uvijek nedovoljno istraženom funkcijom i učincima ovog čimbenika. U

---

MASLD-u i MASH-u, TGF- $\beta$  signalizacija doprinosi nakupljanju lipida u hepatocitima i progresiji fibroze, dok u HCC-u, TGF- $\beta$  ima dualnu ulogu, djelujući kao tumorski supresor ili promotor u različitim fazama progresije tumora. U ovom kontekstu, važno je naglasiti da je istraživanje provedeno na HepG2 stanicama, koje dijele brojne genomske i proteomske karakteristike s onima HCC-a i hepatoblastoma što utječe na interpretaciju učinaka oleinske kiseline i semaglutida u ovom modelu MASLD-a<sup>108</sup>.

U eksperimentalnoj studiji, semaglutid je poboljšao fibrozu u animalnom modelu masne jetre, smanjenjem TGF- $\beta$ /Smad signalizacije<sup>109</sup>, ključne u fibrogenezi. Brojne kliničke studije dokazale su poboljšanje fibroze u pacijenata s MASLD-om kao odgovor na terapiju GLP-1RA<sup>110 111</sup>. *In vitro* studije MASLD-a koje su ispitale utjecaj GLP-1RA na razine TGF- $\beta$  izravno u hepatocitima trenutno još nisu dostupne, što sugerira potrebu za daljnim istraživanjem direktnih učinaka semaglutida i ostalih GLP-1RA na razvoj i progresiju MASLD-a u hepatocitima.

Zaključno, u terapijskom modelu semaglutid pokazao je značajan učinak na poboljšanje staničnog preživljenja, smanjenje nakupljanja lipida u HepG2 stanicama te razine triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu. U preventivnom modelu, učinci semaglutida na ove parametre bili su manje izraženi i varijabilni. Inzulinska rezistencija, koja dovodi do nakupljanja lipida i povećane oksidacije masnih kiselina u mitohondrijima i peroksisomima uzrokuje povećan oksidativni stres koji je ključni čimbenik u daljnjem razvoju MASLD-a. Mjerenjem koncentracija GSH, semaglutid pretežno nije imao značajan učinak na GSH, no izraziti učinci semaglutida primijećeni su u promjenama genske ekspresije *PPAR* transkripcijskih faktora, koji osim u lipidnom metabolizmu imaju značajnu ulogu i u regulaciji oksidativnog stresa te se smatraju ključnima u razvoju MASLD-a. Značajan učinak semaglutid je postigao i smanjenjem *TNF- $\alpha$* , na genskoj i proteinskoj razini, što ukazuje da ovaj peptid ima potencijal i u farmakološkoj intervenciji u pacijenata s blažim oblicima MASLD-a, i prevenciji MASH-a.

---

## Ograničenja studije

Sama *in vitro* priroda studije, unatoč tome što pruža izolirani uvid u molekularne mehanizme učinka semaglutida na hepatocyte, isključujući pleiotropne mehanizme djelovanja, kojim se učinci GLP-1RA učestalo pripisuju, jedan je od glavnih ograničavajućih čimbenika ove studije jer nijedan *in vitro* model ne može odražavati složenost *in vivo* interakcija hepatocita s ostalim stanicama jetre kao što su jetrene zvjezdaste i Kupfferove stanice. Ograničenje ove studije također je korištenje imortalizirane stanične linije HepG2, koja unatoč navedenim prednostima kao što su reproducibilnost, etička prihvatljivost te pogodnosti za studije lipidnog metabolizma te eksperimentalne farmakološke studije kao što je ova, ipak ima brojne manjkavosti naspram primarnih ljudskih hepatocita (PHH). Mutacijski status HepG2, kao i svih ostalih kontinuiranih staničnih linija, ne može se isključiti kao čimbenik koji utječe na metabolizam, oksidacijski stres te izražaj specifičnih gena te shodno tome i rezultate dobivene na ovakvim staničnim linijama. Daljnja istraživanja koristeći PHH, posebno u ko-kulturama i *state-of-the-art* trodimenzionalnim organoidima i sferoidima, uvelike bi poboljšale mogućnost translacije na *in vivo* studije te fiziološku točnost i relevantnost zaključaka ove studije. Konačno, MASLD je iznimno kompleksan klinički entitet s još nedovoljno razjašnjenim molekularnim mehanizmima te su potrebne daljnje *in vitro* i *in vivo* studije kako bi se definirali biomarkeri ove bolesti, a time unaprijedio i razvoj farmakoloških opcija.

---

## 7. Zaključci

U ovom istraživanju uspostavila su se dva eksperimentalna modela MASLD-a, terapijski i preventivni, izlaganjem HepG2 stanica oleinskoj kiselini u koncentraciji 1 mM.

Oleinska kiselina u terapijskom i preventivnom modelu statistički značajno je smanjila stanično preživljenje, a semaglutid statistički značajno povećao je stanično preživljenje u terapijskom modelu svim koncentracijama. U preventivnom modelu semaglutid u svim koncentracijama povećao je stanično preživljenje, ali bez statističke značajnosti.

Oleinska kiselina statistički značajno povećala je nakupljanje lipida u stanicama u oba modela. U terapijskom modelu semaglutid u koncentracijama 5, 10 i 20 nM, a u preventivnom u koncentracijama 5 i 20 nM statistički značajno smanjio je nakupljanje lipida u stanicama.

U terapijskom modelu semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno smanjio je razinu triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu, a u preventivnom modelu semaglutid u koncentracijama 10 i 20 nM statistički značajno povećao je razinu triglicerida u odnosu na oleinsku kiselinu.

U terapijskom modelu semaglutid u koncentraciji 10 i 20 nM na proteinskoj razini statistički značajno smanjio je koncentraciju PPAR- $\alpha$  proteina, a u svim koncentracijama statistički značajno je smanjio koncentraciju TNF  $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu. Na genskoj razini, semaglutid u svim koncentracijama statistički značajno smanjio je ekspresiju PPAR- $\gamma$ , a u koncentraciji 5 i 10 nM smanjio je gensku ekspresiju TNF- $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu.

U preventivnom modelu, semaglutid u koncentraciji 20 nM statistički značajno povećao je koncentraciju PPAR- $\alpha$  proteina. Na genskoj razini, semaglutid u koncentraciji 10 nM statistički značajno smanjio je ekspresiju PPAR- $\gamma$ , a povećao ekspresiju TNF- $\alpha$  u odnosu na oleinsku kiselinu. U koncentracijama 10 nM povećao je, a u koncentraciji 2 i 20 nM smanjio je gensku ekspresiju TGF- $\beta$  u odnosu na oleinsku kiselinu.

---

## 8. Sažetak

U ovom istraživanju uspostavila su se dva eksperimentalna modela MASLD-a, terapijski i preventivni, izlaganjem HepG2 stanica oleinskoj kiselini u koncentraciji 1 mM. Oleinska kiselina u oba je modela statistički značajno smanjila stanično preživljenje, povećala nakupljanje lipida u stanicama, kao i razinu triglicerida. U terapijskom modelu semaglutid statistički značajno je povećao stanično preživljenje, smanjio stanično nakupljanje lipida i triglicerida u većini koncentracija te statistički značajno utjecao na steatogene, upalne i profibrotičke gene i proteine. U preventivnom modelu, učinak semaglutida na stanično preživljenje nije bio statistički značajan, djelomično je statistički značajno smanjio nakupljanje lipida, a povećao razinu triglicerida. Učinak na ekspresiju steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena bio je nešto slabiji i nejasan.

---

## 9. Summary

In this study, two experimental models of MASLD were established, therapeutic and preventive, by exposing HepG2 cells to oleic acid at a concentration of 1 mM. In both models, oleic acid statistically significantly reduced cell viability, increased lipid accumulation in cells and triglyceride levels. In the therapeutic model, semaglutide statistically significantly increased cell viability, reduced cellular lipid and triglyceride accumulation at the majority of tested concentrations, and statistically significantly affected steatogenic, inflammatory, and profibrotic genes and proteins. In the preventive model, the effect of semaglutide on cell viability was not statistically significant. It partially reduced lipid accumulation, and increased triglyceride levels. The effect on the expression of steatogenic, inflammatory, and profibrotic genes was somewhat weaker and unclear.

---

## 10. Literatura

1. Portincasa P, Khalil M, Mahdi L, et al. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: From Pathogenesis to Current Therapeutic Options. *Int J Mol Sci* 2024;25(11), doi:10.3390/ijms25115640
2. Mohamed and Daniel F. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: An Overview of Pharmacotherapy. *The Journal for Nurse Practitioners* 2025;21(2):105273, doi:<https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2024.105273>
3. Zhang GY, Brandman D. A Clinical Update on MASLD. *JAMA Internal Medicine* 2025;185(1):105-107, doi:10.1001/jamainternmed.2024.6431
4. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology* 2023;78(6):1966-1986, doi:10.1097/HEP.0000000000000520
5. Eslam M, Sanyal AJ, George J. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2020;158(7):1999-2014.e1, doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312
6. Hagström H, Vessby J, Ekstedt M, et al. 99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria and natural history is therefore identical. *J Hepatol* 2024;80(2):e76-e77, doi:10.1016/j.jhep.2023.08.026
7. Lee BP, Dodge JL, Terrault NA. National prevalence estimates for steatotic liver disease and subclassifications using consensus nomenclature. *Hepatology* 2024;79(3):
8. Younossi ZM, Kalligeros M, Henry L. Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Clin Mol Hepatol* 2025;31(Suppl):S32-S50, doi:10.3350/cmh.2024.0431
9. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology* 2023;77(4):1335-1347, doi:10.1097/hep.0000000000000004
10. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64(1):73-84, doi:10.1002/hep.28431
11. Global burden and strength of evidence for 88 risk factors in 204 countries and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet* 2024;403(10440):2162-2203, doi:10.1016/s0140-6736(24)00933-4
12. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. *Lancet* 2024;404(10467):2077-2093, doi:10.1016/s0140-6736(24)02317-1
13. Quek J, Chan KE, Wong ZY, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023;8(1):20-30, doi:10.1016/s2468-1253(22)00317-x
14. Virović Jukić L. Croatian guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Clinica Croatica* 2021;60(doi:10.20471/acc.2021.60.s1.03
15. Mustapic S, Ziga S, Matic V, et al. Ultrasound Grade of Liver Steatosis Is Independently Associated with the Risk of Metabolic Syndrome. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018;2018(8490242), doi:10.1155/2018/8490242

- 
16. Xiang Zhang and Harry Cheuk-Hay Lau and Jun Y. Pharmacological treatment for metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease and related disorders: Current and emerging therapeutic options. *Pharmacological Reviews* 2025;77(2):100018, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmr.2024.100018>
  17. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65(8):1038-48, doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
  18. Prasun P, Ginevic I, Oishi K. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2021;6(4), doi:10.21037/tgh-20-125
  19. Feng X, Zhang R, Yang Z, et al. Mechanism of Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease: Important role of lipid metabolism. *J Clin Transl Hepatol* 2024;12(9):815-826, doi:10.14218/jcth.2024.00019
  20. Cesarini L, Grignaffini F, Alisi A, et al. Alterations in Glutathione Redox Homeostasis in Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)* 2024;13(12), doi:10.3390/antiox13121461
  21. Vinoy N, Huang G, Wallace DF, et al. Peroxisome Dysfunction and Steatotic Liver Disease. 2025.
  22. Qiu YY, Zhang J, Zeng FY, et al. Roles of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Pharmacol Res* 2023;192(106786, doi:10.1016/j.phrs.2023.106786
  23. Delille HK, Bonekamp NA, Schrader M. Peroxisomes and disease - an overview. *Int J Biomed Sci* 2006;2(4):308-14
  24. Madariaga Traconis AP, Uribe-Esquivel M, Barbero Becerra VJ. Exploring the Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Endothelial Dysfunction in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. 2024.
  25. Xie Z, Xin J, Huang C, et al. Drugs targeting peroxisome proliferator-activated receptors. *Drug Discovery Today* 2025;30(3):104318, doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104318>
  26. Pan J, Zhou W, Xu R, et al. Natural PPARs agonists for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022;151(113127, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113127>
  27. Małodobra-Mazur M, Oldakowska M, Dobosz T. Exploring PPAR Gamma and PPAR Alpha's Regulation Role in Metabolism via Epigenetics Mechanism. *Biomolecules* 2024;14(11), doi:10.3390/biom14111445
  28. Theys C, Vanderhaeghen T, Van Dijck E, et al. Loss of PPAR $\alpha$  function promotes epigenetic dysregulation of lipid homeostasis driving ferroptosis and pyroptosis lipotoxicity in metabolic dysfunction associated Steatotic liver disease (MASLD). *Front Mol Med* 2023;3(1283170, doi:10.3389/fmmed.2023.1283170
  29. Hajri T, Zaiou M, Fungwe TV, et al. Epigenetic Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Mediates High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* 2021;10(6), doi:10.3390/cells10061355
  30. Marigorta UM, Millet O, Lu SC, et al. Dysfunctional VLDL metabolism in MASLD.
  31. Hussain MM, Rava P, Walsh M, et al. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutrition & Metabolism* 2012;9(1):14, doi:10.1186/1743-7075-9-14
  32. Zhang X, Lau HC-H, Yu J. Pharmacological treatment for metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease and related disorders: Current and

---

emerging therapeutic options. *Pharmacological Reviews* 2025;77(2):100018, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmr.2024.100018>

33. Sandireddy R, Sakthivel S, Gupta P, et al. Systemic impacts of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) on heart, muscle, and kidney related diseases. *Front Cell Dev Biol* 2024;12(1433857, doi:10.3389/fcell.2024.1433857
34. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol* 2024;81(3):492-542, doi:10.1016/j.jhep.2024.04.031
35. Patel RH, Parikh C, Upadhyay H, et al. Resmetirom in the Management of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis (MASH): A Comprehensive Review of Current Evidence and Therapeutic Potential. *Cureus* 2024;16(11):e74772, doi:10.7759/cureus.74772
36. Petta S, Kim K, Targher G, et al. Focus on Semaglutide 2.4 mg/week for the Treatment of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *Liver Int* 2025;45(11):e70407, doi:10.1111/liv.70407
37. Paternoster S, Falasca M. Dissecting the Physiology and Pathophysiology of Glucagon-Like Peptide-1. *Frontiers in Endocrinology* 2018;Volume 9 - 2018(doi:10.3389/fendo.2018.00584
38. Holst JJ, Schwartz TW, Lovgreen NA, et al. Diurnal profile of pancreatic polypeptide, pancreatic glucagon, gut glucagon and insulin in human morbid obesity. *Int J Obes* 1983;7(6):529-38
39. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007;87(4):1409-39, doi:10.1152/physrev.00034.2006
40. Holst JJ. The incretin system in healthy humans: The role of GIP and GLP-1. *Metabolism* 2019;96(46-55, doi:10.1016/j.metabol.2019.04.014
41. Holst JJ. From the Incretin Concept and the Discovery of GLP-1 to Today's Diabetes Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10(260, doi:10.3389/fendo.2019.00260
42. Drucker DJ, Habener JF, Holst JJ. Discovery, characterization, and clinical development of the glucagon-like peptides. *J Clin Invest* 2017;127(12):4217-4227, doi:10.1172/jci97233
43. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2018;20 Suppl 1(5-21, doi:10.1111/dom.13129
44. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91(1):301-7, doi:10.1172/jci116186
45. Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4(6):525-36, doi:10.1016/S2213-8587(15)00482-9
46. Junker AE. The role of incretin hormones and glucagon in patients with liver disease. *Dan Med J* 2017;64(5):
47. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1239-46, doi:10.1210/jcem.87.3.8355

- 
48. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, et al. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *The Lancet* 2002;359(9309):824-830, doi:10.1016/S0140-6736(02)07952-7
  49. Zheng Z, Zong Y, Ma Y, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024;9(1):234, doi:10.1038/s41392-024-01931-z
  50. Drucker DJ. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab* 2018;27(4):740-756, doi:10.1016/j.cmet.2018.03.001
  51. Wong CK, Drucker DJ. Antiinflammatory actions of glucagon-like peptide-1-based therapies beyond metabolic benefits. *J Clin Invest* 2025;135(21), doi:10.1172/jci194751
  52. Jianping W, Xuelian Z, Anjiang W, et al. Efficacy and Safety of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists in the Treatment of Metabolic Associated Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 2021;55(7):586-593, doi:10.1097/MCG.0000000000001556
  53. Barritt AS, Marshman E, Nouredin M. Review article: role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in non-alcoholic steatohepatitis, obesity and diabetes-what hepatologists need to know. *Aliment Pharmacol Ther* 2022;55(8):944-959, doi:10.1111/apt.16794
  54. Yaribeygi H, Maleki M, Butler AE, et al. The Impact of Incretin-Based Medications on Lipid Metabolism. *J Diabetes Res* 2021;2021(1815178), doi:10.1155/2021/1815178
  55. Farr S, Taher J, Adeli K. Glucagon-like peptide-1 as a key regulator of lipid and lipoprotein metabolism in fasting and postprandial states. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2014;14(2):126-36, doi:10.2174/1871529x14666140505125300
  56. Havranek B, Loh R, Torre B, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists improve metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease outcomes. *Scientific Reports* 2025;15(1):4947, doi:10.1038/s41598-025-89408-z
  57. Gupta NA, Mells J, Dunham RM, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology* 2010;51(5):1584-92, doi:10.1002/hep.23569
  58. Yokomori H, Ando W. Spatial expression of glucagon-like peptide 1 receptor and caveolin-1 in hepatocytes with macrovesicular steatosis in non-alcoholic steatohepatitis. *BMJ Open Gastroenterol* 2020;7(1), doi:10.1136/bmjgast-2019-000370
  59. Petrovic A, Igrec D, Rozac K, et al. The Role of GLP-1-RAs in Direct Modulation of Lipid Metabolism in Hepatic Tissue as Determined Using In Vitro Models of NAFLD. *Curr Issues Mol Biol* 2023;45(6):4544-4556, doi:10.3390/cimb45060288
  60. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Copyright © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.: 2017; pp. 151-72.
  61. Stacey G. Current developments in cell culture technology. *Adv Exp Med Biol* 2012;745(1-13, doi:10.1007/978-1-4614-3055-1\_1
  62. Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, et al. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells* 2023;12(5), doi:10.3390/cells12050682

- 
63. Roy S, Parveen M, Bala A, et al. The 3C (Cell Culture, Computer Simulation, Clinical Trial) Solution for Optimizing the 3R (Replace, Reduction, Refine) Framework during Preclinical Research Involving Laboratory Animals. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2025;8(5):1188-1204, doi:10.1021/acspsci.4c00661
64. Lee S-Y, Koo I-S, Hwang HJ, et al. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery* 2023;28(4):119-137, doi:<https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.03.006>
65. Hayden PJ. Chapter 2 - Cell sources and methods for producing organotypic in vitro human tissue models. In: Organ-on-a-chip. (Hoeng J, Bovard D, Peitsch MC. eds.) Academic Press: 2020; pp. 13-45.
66. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, et al. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. In: *Hum Pathol*. United States; 2009; pp. 1512-5.
67. Arzumanyan VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. 2021.
68. Campos-Espinosa A, Guzmán C. A Model of Experimental Steatosis In Vitro: Hepatocyte Cell Culture in Lipid Overload-Conditioned Medium. *J Vis Exp* 2021;171), doi:10.3791/62543
69. Bao Q, Zhang X, Chen Y, et al. In Vitro Modeling of Fat Deposition in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *J Vis Exp* 2024;209), doi:10.3791/66810
70. Thermo\_Fischer\_Scientific. Useful cell culture numbers for various sizes of dishes and flasks. 2025. Available from: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>.
71. Omanovic Kolaric T, Kizivat T, Mihaljevic V, et al. Liraglutide Exerts Protective Effects by Downregulation of. *Curr Issues Mol Biol* 2022;44(8):3465-3480, doi:10.3390/cimb44080239
72. Sikkeland J, Jin Y, Saatcioglu F. Methods to assess lipid accumulation in cancer cells. *Methods Enzymol* 2014;542(407-23, doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00021-2
73. Armitage P, Perry G. Statistical methods in medical research. Wiley-Blackwell: 2001.
74. Groves T. Enhancing the quality and transparency of health research. *Bmj* 2008;337(7661):a718, doi:10.1136/bmj.a718
75. Pelechá M, Villanueva-Bádenas E, Timor-López E, et al. Cell Models and Omics Techniques for the Study of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focusing on Stem Cell-Derived Cell Models. 2022.
76. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(5):830-40, doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x
77. Zeng X, Zhu M, Liu X, et al. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr Metab (Lond)* 2020;17(11, doi:10.1186/s12986-020-0434-8
78. Jin L, Sun Y, Li Y, et al. A synthetic peptide AWRK6 ameliorates metabolic associated fatty liver disease: involvement of lipid and glucose homeostasis. *Peptides* 2021;143(170597, doi:10.1016/j.peptides.2021.170597
79. Khalifa O, Al-Akl NS, Errafii K, et al. Exendin-4 alleviates steatosis in an in vitro cell model by lowering FABP1 and FOXA1 expression via the Wnt/-catenin signaling pathway. *Sci Rep* 2022;12(1):2226, doi:10.1038/s41598-022-06143-5

- 
80. Liu J, Dang L, Yang J, et al. HPP-1S attenuates oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells and nonalcoholic fatty liver disease in a rat model of high-fat diet-induced obesity. *Journal of Functional Foods* 2024;119(106305, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106305>
81. Liu M, Park S. The Role of PNPLA3\_rs738409 Gene Variant, Lifestyle Factors, and Bioactive Compounds in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based and Molecular Approach towards Healthy Nutrition. *Nutrients* 2024;16(8), doi:10.3390/nu16081239
82. Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res* 2010;2(1):95-104
83. Müller FA, Sturla SJ. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology* 2019;16(9-16, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.03.001>
84. Zhang Q, Liu Q, Niu CY. [Liraglutide alleviates lipotoxic liver cell damage and promotes autophagy to improve non-alcoholic fatty liver]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2021;29(5):456-461, doi:10.3760/cma.j.cn501113-20200427-00219
85. Ao N, Ma Z, Yang J, et al. Liraglutide ameliorates lipotoxicity-induced inflammation through the mTORC1 signalling pathway. *Peptides* 2020;133(170375, doi:10.1016/j.peptides.2020.170375
86. Yu P, Xu X, Zhang J, et al. Liraglutide Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease through Adjusting Lipid Metabolism via SHP1/AMPK Signaling Pathway. *Int J Endocrinol* 2019;2019(1567095, doi:10.1155/2019/1567095
87. Li S, Wang X, Zhang J, et al. Exenatide ameliorates hepatic steatosis and attenuates fat mass and FTO gene expression through PI3K signaling pathway in nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 2018;51(8):e7299, doi:10.1590/1414-431x20187299
88. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(18):3313-3327, doi:10.1007/s00018-018-2860-6
89. Hefer M, Petrovic A, Roguljic LK, et al. Green Tea Polyphenol (-)-Epicatechin Pretreatment Mitigates Hepatic Steatosis in an In Vitro MASLD Model. *Curr Issues Mol Biol* 2024;46(8):8981-8994, doi:10.3390/cimb46080531
90. Niu S, Wang L, He M, et al. Exendin-4 regulates redox homeostasis in rats fed with high-fat diet. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015;47(6):397-403, doi:10.1093/abbs/gmv027
91. Liao Z, Huang L, Chen J, et al. Liraglutide Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Diabetic Mice by Activating Autophagy Through AMPK/mTOR Signaling Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2024;17(575-584, doi:10.2147/dmso.s447182
92. Donna DYaGaHLaBMSaBMF. Discovery of novel modulators for the PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ): Potential therapies for nonalcoholic fatty liver disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2021;41(116193, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116193>
93. Todisco S, Santarsiero A, Convertini P, et al. PPAR Alpha as a Metabolic Modulator of the Liver: Role in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Biology (Basel)* 2022;11(5), doi:10.3390/biology11050792
94. Seidemann L, Krüger A, Kegel-Hübner V, et al. Influence of Genistein on Hepatic Lipid Metabolism in an In Vitro Model of Hepatic Steatosis. *Molecules* 2021;26(4), doi:10.3390/molecules26041156

- 
95. Moliterni C, Vari F, Schifano E, et al. Lipotoxicity of palmitic acid is associated with DGAT1 downregulation and abolished by PPAR $\alpha$  activation in liver cells. *J Lipid Res* 2024;65(12):100692, doi:10.1016/j.jlr.2024.100692
96. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 2017;136(75-84, doi:10.1016/j.biochi.2016.12.019
97. Wierzbicki M, Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, et al. Chronic, in vivo, PPARalpha activation prevents lipid overload in rat liver induced by high fat feeding. *Adv Med Sci* 2009;54(1):59-65, doi:10.2478/v10039-009-0010-y
98. Lim WS, Ng DL, Kor SB, et al. Tumour necrosis factor alpha down-regulates the expression of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) in human hepatocarcinoma HepG2 cells by activation of NF- $\kappa$ B pathway. *Cytokine* 2013;61(1):266-74, doi:10.1016/j.cyto.2012.10.007
99. Wang H, Wang L, Li Y, et al. The HIF-2 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  pathway is essential for liraglutide-alleviated, lipid-induced hepatic steatosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021;140(111778, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111778>
100. Ding X, Saxena NK, Lin S, et al. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* 2006;43(1):173-81, doi:10.1002/hep.21006
101. Chávez-Tapia NC, Rosso N, Uribe M, et al. Kinetics of the inflammatory response induced by free fatty acid accumulation in hepatocytes. *Ann Hepatol* 2013;13(1):113-20
102. Kwon Y, Gottmann P, Wang S, et al. Induction of steatosis in primary human hepatocytes recapitulates key pathophysiological aspects of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *J Hepatol* 2025;82(1):18-27, doi:10.1016/j.jhep.2024.06.040
103. Yang Z, Zhao J, Xie K, et al. MASLD development: From molecular pathogenesis toward therapeutic strategies. *Chin Med J (Engl)* 2025;138(15):1807-1824, doi:10.1097/cm9.0000000000003629
104. Maretty L, Gill D, Simonsen L, et al. Proteomic changes upon treatment with semaglutide in individuals with obesity. *Nature Medicine* 2025;31(1):267-277, doi:10.1038/s41591-024-03355-2
105. Rodbard HW, Rosenstock J, Canani LH, et al. Oral Semaglutide Versus Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes Uncontrolled on Metformin: The PIONEER 2 Trial. *Diabetes Care* 2019;42(12):2272-2281, doi:10.2337/dc19-0883
106. Mosenzon O, Capehorn MS, De Remigis A, et al. Impact of semaglutide on high-sensitivity C-reactive protein: exploratory patient-level analyses of SUSTAIN and PIONEER randomized clinical trials. *Cardiovascular Diabetology* 2022;21(1):172, doi:10.1186/s12933-022-01585-7
107. Rakipovski G, Rolin B, Nøhr J, et al. The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  and LDLr $^{-/-}$  Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC: Basic to Translational Science* 2018;3(6):844-857, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.09.004>
108. Chaudhary R, Weiskirchen R, Ehrlich M, et al. Dual signaling pathways of TGF- $\beta$  superfamily cytokines in hepatocytes: balancing liver homeostasis and disease progression. 1663-9812 (Print):
109. Hawary OA, Wadie W, El-Said YAM, et al. Repurposing of semaglutide by targeting SIRT1 and TGF- $\beta$ /Smad signaling in hepatic fibrosis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2025, doi:10.1007/s00210-025-04675-x

- 
110. Sanyal AJ, Newsome PN, Kliers I, et al. Phase 3 Trial of Semaglutide in Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2025;392(21):2089-2099, doi:10.1056/NEJMoa2413258
111. Jara M, Norlin J, Kjær MS, et al. Modulation of metabolic, inflammatory and fibrotic pathways by semaglutide in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Nature Medicine* 2025;31(9):3128-3140, doi:10.1038/s41591-025-03799-0

---

## 11. Životopis

Ana Petrović, dr. med., rođena je 1995. u Lisabonu, Portugal. Pohađala je Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Osijeku, a 2019. diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Zaposlena je kao asistent na Zavodu za translacijsku medicinu Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Popis publikacija u znanstvenim časopisima:

Brlek, Petar, Vedrana Škaro, Nenad Hrvatinić, Luka Bulić, Ana Petrović, Petar Projić, Martina Smolić, Parth Shah, and Dragan Primorac. 2025. "Advances in Precision Oncology: From Molecular Profiling to Regulatory-Approved Targeted Therapies" *Cancers* 17, no. 21: 3500. <https://doi.org/10.3390/cancers17213500>

Juzbašić, Martina, Matej Tomas, Ana Petrović, Marija Hefer, Renata Sikora, Ana Mačković, Stjepan Siber, and Martina Smolić. 2025. "Interaction Between Periodontitis and MASLD: Pathophysiological Associations and Possibilities of Prevention and Therapy" *Biomedicines* 13, no. 6: 1346. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13061346>

Sikora R, Duspara K, Matić A, Petrović A, Kralik K, Smolić R, Sikora M, Šarac MČ, Bojanić K, Smolić M. Stabilization Splint Therapy for Patients with Temporomandibular Disorders Improves Opening Movements and Jaw Limitation and Attenuates Pain by Influencing the Levels of IL-7, IL-8, and IL-13 in the Gingival Crevicular Fluid. *Medicina (Kaunas)*. 2025 Feb 21;61(3):375. doi: 10.3390/medicina61030375.

Hefer, Marija; Petrovic, Ana; Kuna, Lucija; Omanovic Kolaric, Tea; Kizivat, Tomislav; H. Wu, Catherine; A. Tabll, Ashraf; Smolic, Robert; Vcev, Aleksandar; Smolic, Martina. Green Tea Polyphenol (-)-Epicatechin Pretreatment Mitigates Hepatic Steatosis in an In Vitro MASLD Model // *Current issues in molecular biology*, 46 (2024), 8; 8981-8994. doi: <https://doi.org/10.3390/cimb46080531>

Khaznadar, Farah; Khaznadar, Omar; Petrovic, Ana; Hefer, Marija; Gjoni, Fabian; Gjoni, Stefan; Steiner, Justinija; Smolic, Martina; Bojanic, Kristina. MAFLD Pandemic: Updates in Pharmacotherapeutic Approach Development // *Current issues in molecular biology*, 46 (2024), 7; 6300-6314. doi: 10.3390/cimb46070376

Tabll, A. A., Sohrab, S. S., Ali, A. A., Petrovic, A., Steiner Srdarevic, S., Siber, S., Glasnovic, M., Smolic, R., & Smolic, M. (2023). Future Prospects, Approaches, and the Government's Role in the Development of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(1), 38. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010038>

Duspara, Kristina; Sikora, Renata; Petrovic, Ana; Kuna Roguljic, Lucija; Matic, Anita; Kralik, Kristina; Roguljic, Hrvoje; Kizivat, Tomislav; Duspara, Mirjana; Igrec, Dunja et al. Changes in Dickkopf-1, but Not Sclerostin, in Gingival Crevicular Fluid Are Associated with Peroral Statin Treatment in Patients with Periodontitis // *Medicina*, 60 (2024), 3; 508-522. doi: 10.3390/medicina60030508

---

Tabll AA, Shahein YE, Omran MM, Hussein NA, El-Shershaby A, Petrovic A, Glasnovic M, Smolic R, Smolic M. Monoclonal IgY antibodies: advancements and limitations for immunodiagnosis and immunotherapy applications. *Ther Adv Vaccines Immunother.* 2024 Jul 25;12:25151355241264520. doi: 10.1177/25151355241264520.

Omar, Mona A.; Omran, Mohamed M.; Farid, Khaled; Tabll, Ashraf A.; Shahein, Yasser E.; Emran, Tarek M.; Petrovic, Ana; Lucic, Nikola R.; Smolic, Robert; Kovac, Tanja; Smolic, Martina. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma: From Origin to Clinical Diagnosis. // *Biomedicines*, 11 (2023), 7; 1852-1872 doi:10.3390/biomedicines11071852

Khaznadar, F., Petrovic, A., Khaznadar, O., Roguljic, H., Bojanic, K., Kuna Roguljic, L., Siber, S., Smolic, R., Bilic -Curcic, I., Wu, G. Y., & Smolic, M. (2023). Biomarkers for Assessing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus on Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Therapy. *Journal of clinical medicine*, 12(20), 6561. <https://doi.org/10.3390/jcm12206561>

Naiera M. Helmy; Reem El-Shenawy; Tawfeek H. Abdelhafez; Ashraf A. Tabll; Petrović, Ana; Horvatić, Elizabeta; Smolić, Martina; Gjoni, Dominik; Smolić, Robert. Optimization of HCV cell culture system for evaluation of antiviral drugs against HCV genotypes 2a and 4a // *Acta clinica Croatica*, (2023)

Megahed, Fayed; Tabll, Ashraf; Atta, Shima; Ragheb, Ameera; Smolic, Robert; Petrovic, Ana; Smolic, Martina. MicroRNAs: Small Molecules with Significant Functions, Particularly in the Context of Viral Hepatitis B and C Infection. // *Medicina*, 59 (2023), 1; 1-13 doi:10.3390/medicina59010173

Petrovic, Ana; Igrec, Dunja; Rozac, Karla; Bojanic, Kristina; Kuna, Lucija; Kolaric, Tea Omanovic; Mihaljevic, Vjera; Sikora, Renata; Smolic, Robert; Glasnovic, Marija et al. The Role of GLP-1-RAs in Direct Modulation of Lipid Metabolism in Hepatic Tissue as Determined Using In Vitro Models of NAFLD. // *Current Issues in Molecular Biology*, 45 (2023), 6; 4544-4556 doi:10.3390/cimb45060288

Khaznadar, Omar; Khaznadar, Farah; Petrovic, Ana; Kuna, Lucija; Loncar, Ana; Omanovic Kolaric, Tea; Mihaljevic, Vjera; Tabll, Ashraf A.; Smolic, Robert; Smolic, Martina Antimicrobial Resistance and Antimicrobial Stewardship: Before, during and after the COVID-19 Pandemic. // *Microbiology Research*, 14 (2023), 2; 727-740 doi:10.3390/microbiolres14020052

Kolaric, Tea Omanovic; Kuna, Lucija; Covic, Marina; Roguljic, Hrvoje; Matic, Anita; Sikora, Renata; Hefer, Marija; Petrovic, Ana; Mihaljevic, Vjera; Smolic, Robert et al. Preclinical Models and Promising Pharmacotherapeutic Strategies in Liver Fibrosis: An Update. // *Current Issues in Molecular Biology*, 45 (2023), 5; 4246-4260 doi:10.3390/cimb45050270

Ćurčić, Ines Bilić; Kizivat, Tomislav; Petrović, Ana; Smolić, Robert; Tabll, Ashraf; Wu, George Y.; Smolić, Martina. Therapeutic Perspectives of IL1 Family Members in Liver Diseases: An Update. // *Journal of clinical and translational hepatology*, 10 (2022), 6; 1186-1193 doi:10.14218/jcth.2021.00501

---

Peric, Luka; Vukadin, Sonja; Petrovic, Ana; Kuna, Lucija; Puseljic, Nora; Sikora, Renata; Rozac, Karla; Vcev, Aleksandar; Smolic, Martina. Glycosylation Alterations in Cancer Cells, Prognostic Value of Glycan Biomarkers and Their Potential as Novel Therapeutic Targets in Breast Cancer. // Biomedicines, 10 (2022), 12; 1-18  
doi:10.3390/biomedicines10123265 (međunarodna

Petrovic, Ana; Vukadin, Sonja; Sikora, Renata; Bojanic, Kristina; Smolic, Robert; Plavec, Davor; Wu, George Y; Smolic, Martina. Anabolic androgenic steroid-induced liver injury: An update. // World journal of gastroenterology, 28 (2022), 26; 3071-3080  
doi:10.3748/wjg.v28.i26.3071

Ana, Petrović; Tomislav, Kizivat; Ines, Bilić Curčić; Robert, Smolić; Martina, Smolic In Vitro Cell Culture Models of Hyperoxaluric States: Calcium Oxalate and Renal Epithelial Cell Interactions. // Crystals, 11 (2021), 7; 735, 8  
doi:10.3390/cryst11070735

#### Prilozi u knjigama:

Topić, Elizabeta; Včev, Aleksandar; Smolić, Martina; Petrović, Ana; Samardžija, Marko; Smolić, Robert. Bolesti jetre // Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi / Topić, Elizabeta; Primorac, Dragan; Janković, Stipan et al. (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2025. str. 96-118

Petrović, Ana; Smolić, Robert; Smolić, Martina. Pharmacogenomics Education // Pharmacogenomics in Clinical Practice / Primorac, Dragan ; Höppner, Wolfgang ; Bach-Rojecky, Lidija (ur.). Švicarska: Springer Cham, 2023. str. 261-264

Vukadin, Sonja; Petrović, Ana; Primorac, Dragan; Smolić, Martina. Pharmacogenomics of Drug Safety // Pharmacogenomics in Clinical Practice / Primorac, Dragan ; Höppner, Wolfgang ; Bach-Rojecky, Lidija (ur.). Švicarska: Springer Cham, 2023. str. 413-473

Petrović, Ana; Smolić, Robert; Smolić, Martina. Primarna i sekundarna prevencija infekcije virusima hepatitisa B i hepatitisa C // Primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenog čovjeka / Galić, Josip (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 10 000 Zagreb, Cankarova 13, 2023. str. 261-264

#### Nagrade:

Međunarodna izložba inovacija, prototipova i poslovnih planova INOVA/BUDI UZOR 2023. GRAND PRIX: Stanični modeli za procjenu primjene agonista GLP-1 receptora u translacijskom pristupu liječenju nealkoholne masne bolesti jetre, Martina Smolić s koautorima: Ana Petrović, Lucija Kuna Roguljić, Tea Omanović Kolarić, Marija Hefer, Dunja Igrec, Karla Rožac, Kristina Bojanić, Vjera Mihaljević, Renata Sikora, Nikola Raguž- Lučić, Tomislav Kizivat, Robert Smolić, George Y. Wu i Aleksandar Včev