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

Ocjena rada u tijeku!

Osijek, 2026.

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:

U HepG2 stanicama uspostavljeni su terapijski i preventivni model MASLD-a. Oleinska kiselina povećala je nakupljanje lipida i razinu triglicerida u oba modela te smanjila vijabilnost. Semaglutid je u terapijskom modelu povećao vijabilnost, smanjio nakupljanje lipida i trigliceride te utjecao na razine proteina TNF-a i PPAR-α. U preventivnom modelu učinci su bili mješoviti: razine proteina nisu se značajno promijenile, dok se ekspresija gena *TNF*, *PPAR-α* i *PPAR-γ* smanjila pri pojedinim tretmanima.

Broj stranica: 133

Broj slika: 40

Broj tablica: 10

Broj literaturnih navoda: 134

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: MASLD, semaglutid, HepG2, metabolizam lipida, steatohepatitis

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. **prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj**, znanstvena savjetnica u trajnom izboru Instituta Ruđer Bošković Zagreb i naslovna redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predsjednica;
2. **izv. prof. dr. sc. Senka Blažetić**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
3. **izv. prof. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić**, docentica Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
4. **izv. prof. dr. sc. Lucija Virović Jukić**, izvanredna profesorica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zamjena člana.

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

Ocjena rada u tijeku!

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:

Therapeutic and preventive MASLD models were established in HepG2 cells. Oleic acid increased lipid accumulation and triglyceride levels in both models and reduced cell viability. In the therapeutic model, semaglutide increased viability, reduced lipid accumulation and triglyceride levels, and affected TNF and PPAR-α protein levels. In the preventive model, its effects were mixed: protein levels did not change significantly, while the expression of *TNF*, *PPAR-α*, and *PPAR-γ* decreased under some treatment conditions.

Number of pages: 133

Number of figures: 40

Number of tables: 10

Number of references: 134

Original in: Croatian

Key words: MASLD, semaglutide, HepG2, lipid metabolism, steatohepatitis

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. **Prof. Koraljka Gall Trošelj, PhD**, Senior Scientist at the Ruđer Bošković Institute, Zagreb, and Adjunct Full Professor at Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Chair of the Committee)
2. **Assoc. Prof. Senka Blažetić, PhD**, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Committee Member)
3. **Assoc. Prof. Katarina Mišković Špoljarić, PhD**, Faculty of Medicine Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Committee Member)
4. **Assoc. Prof. Lucija Virović Jukić, PhD**, University of Zagreb School of Medicine (Substitute Member)

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

Ocjena rada u tijeku!

Sadržaj

1. Uvod 6
1.1. Metabolički uzrokovana masna bolest jetre 6
1.1.1. Nazivlje 6
1.1.2. Epidemiologija 7
1.1.3. Patofiziologija 8
1.1.4. Klinička slika i dijagnostičke metode MASLD-a 23
1.2. Farmakoterapija MASLD-a 24
1.2.1. Inkretini 24
1.2.1. Glukagonu sličan peptid 1 25
1.2.2. GLP-1RA 26
1.2.3. Uloga GLP-1RA u MASLD-u 27
1.3. HepG2 stanična linija 30
2. Hipoteza 34
3. Ciljevi istraživanja 35
4. Materijali i metode 36
4.1. Kultivacija stanica i nasađivanje stanica u eksperimentalne mikropločice 36
4.2. Uspostava dva eksperimentalna modela MASLD-a 37
4.3. Određivanje optimalne koncentracije oleinske kiseline za uspostavu modela MASLD-a 37
4.4. Tretman stanica semaglutidom u terapijskom i preventivnom modelu MASLD-a 39
4.5. Mjerenje stanične vijabilnosti testom MTS 43
4.6. Vizualizacija DNA stanica Hoechst bojom 43
4.7. Mjerenje učinaka semaglutida na nakupljanje lipida 44
4.8. Procjena učinka semaglutida na metabolizam triglicerida 45
4.9. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u stanicama. 45
4.10. Određivanje razine proteina uključenih u patofiziologiji MASLD-a 47
4.11. Određivanje razine ekspresije gena uključenih u patofiziologiju MASLD-a .. 48
4.11.1. Izdvajanje ukupne RNA iz HepG2 stanica 48
4.11.2. Reverzna transkripcija 49
4.11.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 50
4.12. Statističke metode 52
5. Rezultati 54

Ocjena rada u tijeku!

5.1. Procjena učinka semaglutida u terapijskom modelu MASLD-a 54
5.1.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost MTS-om u terapijskom modelu 54
5.1.2. Procjena učinka semaglutida na staničnu vijabilnost u terapijskom modelu MASLD-a 56
5.1.3. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom 60
5.1.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem 61
5.1.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH 64
5.1.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u terapijskom modelu MASLD-a 65
5.1.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u terapijskom modelu MASLD-a 72
5.2. Procjena učinka semaglutida u preventivnom modelu MASLD-a 80
5.2.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost MTS-om u preventivnom modelu 80
5.2.2. Procjena učinka semaglutida na staničnu vijabilnost u preventivnom modelu MASLD-a 82
5.2.3. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida 85
5.2.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem 86
5.2.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH 88
5.2.6. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih proteina u preventivnom modelu MASLD-a 89
5.2.7. Procjena učinka semaglutida na razine steatogenih, upalnih i profibrotičkih gena u preventivnom modelu MASLD-a 94
6. Rasprava 100
6.1. Učinci terapijske primjene semaglutida 102
6.2. Učinci preventivne primjene semaglutida 109
7. Zaključci 114
8. Sažetak 116
9. Summary 117
10. Literatura 118
11. Životopis 131

Ocjena rada u tijeku!

1. Uvod

1.1. Metabolički uzrokovana masna bolest jetre

Metabolički uzrokovana masna bolest jetre (MASLD, od engl. *Metabolic Dysfunction - Associated Steatotic Liver Disease),* rastući je globalni javnozdravstveni problem, karakteriziran prekomjernim nakupljanje masnoća u jetri i što se povezuje s razvojem pretilosti, šećerne bolesti tipa 1 i 2 (ŠB1 i ŠB2), hiperlipidemijom i drugim kardiometaboličkim poremećajima. MASLD tijekom vremena može napredovati u steatohepatitis (MASH, engl. *Metabolic Dysfunction - Associated Steatohepatitis*), steatofibrozu, cirozu te zloćudnu bolest jetre. Unatoč globalnom opterećenju zdravstvenog sustava, patogeneza ove bolesti još nije potpuno razjašnjena, a odobrena farmakoterapija za ovu bolest i dalje je nedovoljno razvijena s obzirom na optećerenje zdravstvenog sustava ovom bolesti te se MASLD liječi konzervativno – promjenama životnih navika, smanjenjem tjelesne mase, dijetalnim mjerama te farmakoterapeuticima kao što su hipolipidemici i hipoglikemici [1,2]. Ovakav terpijski pristup, iako uspješan u reguliranju dislipidemije, hiperglikemije te inzulinske rezistencije, ima samo djelomičan učinak na kompleksne patofiziološke procese u podlozi MASLD-a, kao što su upala ili fibrogeneza [3], što ograničava njihovu terapijsku učinkovitost u liječenju MASLD-a te prevenciji i usporavanju u progresivne oblike. Nadalje, nedavno odobreni farmakoterapeutici kao što su resmetirom te semaglutid [4,5] (ispitivan u ovoj studiji) službeno su indicirani za MASH i fibrozu, čime se ne rješava pitanje liječenja blažih oblika i prevencija progresije MASLD-a [6].

1.1.1. Nazivlje

MASLD je noviji naziv koji sve više zamijenjuje donedavno primjenjenjivani naziv : nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, od engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) [7,8]. Potreba za promjenom nazivlja proizlazila je iz stigmatizirajućih pojmova (“nealkoholna” i “masna”) ovog kliničkog entiteta te djelomično nejasnih kriterija za dijagnosticiranje NAFLD-a. Točnije, dotadašnje nazivlje nije u potpunosti omogućavalo razlikovanje pacijenata s NAFLD-om od pacijenata s NAFLD-om i povećanim unosom alkohola, zbog čega bolesnici nisu bili adekvatno prepoznati te su u specifičnim

Ocjena rada u tijeku!

slučajevima zbog nedovoljno definiranih kriterija isključivani iz ispitivanja i razmatranja za farmakoterapiju [8,9].

Zbog navedenih razloga, Delphi konsenzusom iz 2023. godine, društva kao što su Američko društvo za proučavanje bolesti jetre (AASLD, od engl. *American Association for the Study of Liver Diseases*) i Europsko društvo za istraživanje jetre (EASL, od engl. *European Association for the Study of the Liver*), uz brojne stručnjake u polju istraživanja i liječenja masnih bolesti jetre, stvorili su novi krovni termin - steatotična bolest jetre (SLD, od engl. *Steatotic Liver Disease*) koja obuhvaća MASLD, MASLD s povećanim unosom alkohola (MetALD, od engl. *MASLD And Increased Alcohol Intake*), alkoholna bolest jetre (ALD, od engl. Alcohol – associated Liver Disease), kriptogeni SLD te SLD specifične etiologije (kao što su lijekovima uzrokovano oštećenje jetre, monogenske bolesti) [8,9].

U kontekstu istraživanja MASLD-a, postavilo se pitanje utječe li promjena nazivlja na interpretaciju i translaciju rezultata i spoznaja dosadašnjih studija o tijeku bolesti, patofiziologiji, biljezima i kliničkim ispitivanjima potencijalnih farmakoterapeutika u odnosu na novije studije. Stoga je važno naglasiti da su robustne analize postojećih registara u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama pokazale 98-99 % preklapanja između pacijenata s dijagnosticiranim NAFLD-om/MASLD-om, ali i njihovim progresivnijim oblicima, odnosno MASH-u i steatofibrozi povezanoj s MASLD-om[8,10,11]. Ove činjenice omogućile su neometan daljnji tijek studija koje se bave tematikom MASLD-a, kao i ovog istraživanja.

U doktorskom radu, 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 drugačiju terminologiju.

1.1.2. Epidemiologija

MASLD se smatra najčešćim uzrokom kronične bolesti jetre (CLD, od engl. *Chronic Liver Disease*) a najnovijom meta-analizom procjenjuju se da, globalno, ~40 % odraslih pacijenata boluje od MASLD-a [12]. U pedijatrijskoj populaciji prevalencija se procjenjuje na 7 - 15 % [13]. Zabrinjavajuć je rastući trend prevalencije MASLD-a unazad

Ocjena rada u tijeku!

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 situacija ponešto bolja (25 %) [14]. S modernim „sjedilačkim načinom života“ opsežnim konzumiranjem rafiniranog šećera i zasićenih masti u “fast food” kulturi, trend porasta prevalencije MASLD-a izravno je povezan s rastom prevalencije pretilosti i šećerne bolesti [15]. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, trenutno vlada “epidemija” pretilosti čija se prevalencija trenutno procjenjuje na 16 % svjetske populacije [12], 43 % odraslih ima prekomjernu tjelesnu masu, dok od ŠB boluje 15 % svjetske odrasle populacije [16,17].

Značaj porasta prevalencije pretilosti i šećerne bolesti u kontekstu razumijevanja MASLD-a, posebno je ukazan činjenicom da je prevalencija MASLD-a značajno veća u pacijenata s ovim bolestima. Postoje studije kojima je pokazano da je čak 75 % pretilih pacijenata razvilo MASLD, pri čemu je u 34 %, odnosno 20 %, došlo je do napredovanja u MASH, odnosno fibrozu [18]. Među pacijentima sa ŠB2, prevalencija MASLD-a procijenjena je na 50 – 80 %. Najviša incidencija je u Istočnoj Europi (68 %), a u populaciji bolesnika kojima je učinjena biopsija jetre, 66 % razvilo je MASH sa značajnim ili uznapredovalim stupnjem fibroze [15].

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 ultrazvuk abdomena iz bilo kojeg razloga, u 48,5 % pacijenata ultrazvukom je utvrđena masna jetra [19,20].

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

1.1.3. Patofiziologija

Unatoč intenzivnim istraživanjima, patogeneza i molekularni mehanizmi uključeni u razvoj i progresiju MASLD-a još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Razlog tomu je izrazita složenost bolesti, koja ne zahvaća samo jetru, već uključuje i druge organe

Ocjena rada u tijeku!

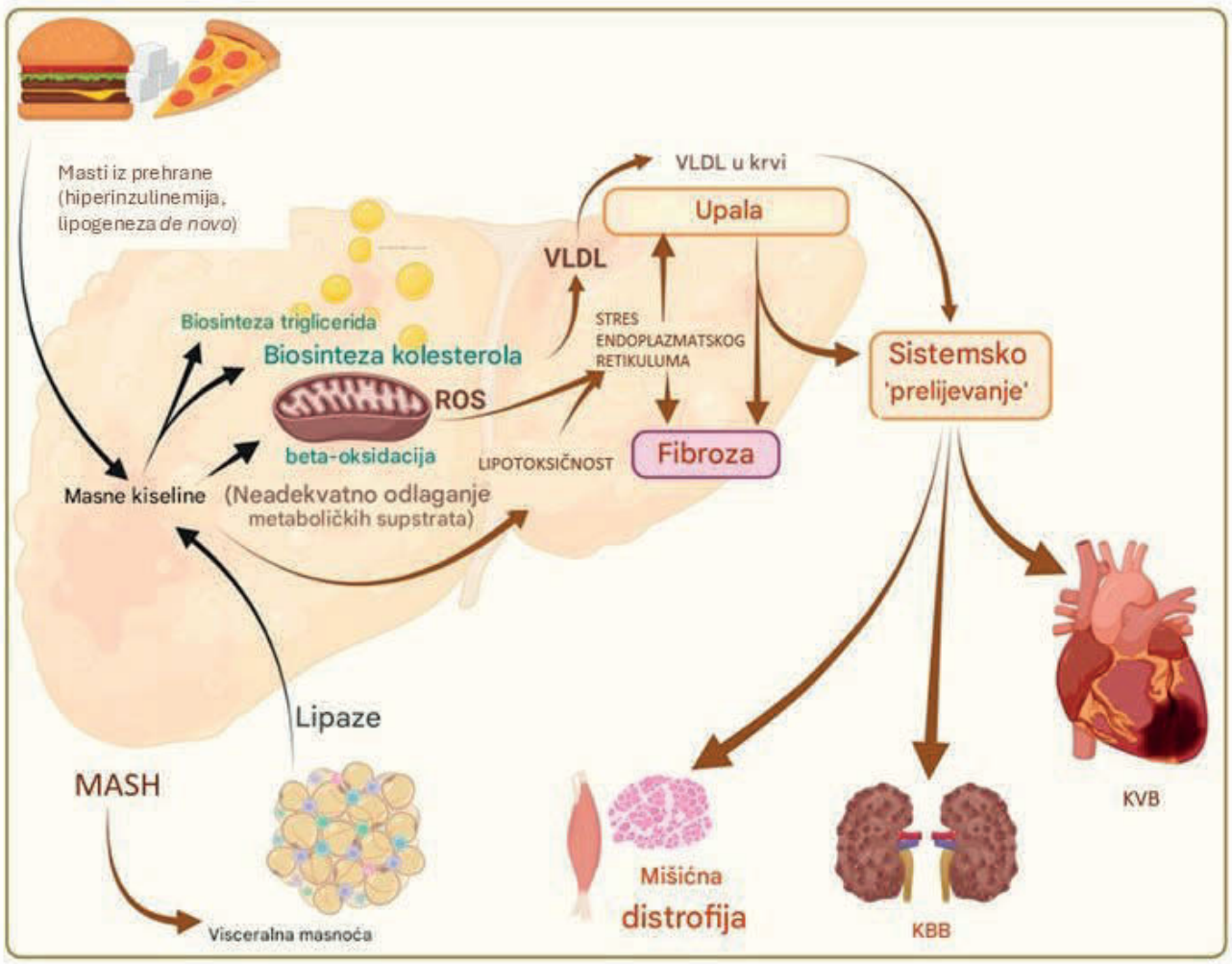
poput gušterače i masnog tkiva. MASLD je usko povezan sa šećernom bolešću, pretilošću i drugim metaboličkim poremećajima, pri čemu ti poremećaji međusobno djeluju i pojačavaju svoje učinke. Zbog takve međuovisnosti ne može se izdvojiti jedan uzročni mehanizam, što otežava razumijevanje bolesti, ali i razvoj ciljanih dijagnostičkih i terapijskih pristupa [21]. Upravo zbog toga danas se prihvaća hipoteza višestrukih „hitaca" (od engl. *Multiple-hit Hypothesis*), prema kojoj razvoj MASLD-a nije posljedica jednog uzroka, već istodobnog djelovanja više čimbenika. Ti čimbenici uključuju inzulinsku rezistenciju, povećani dotok slobodnih masnih kiselina u jetru, oksidacijski stres, upalne procese i poremećaje u signalnim putevima. Njihovo zajedničko djelovanje dovodi do nakupljanja lipida u hepatocitima, oštećenja stanica i progresije bolesti [22].

Prema ovoj hipotezi, kombinacija genetskih i epigenetskih, okolišnih čimbenika, prehrambenih i drugih 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 između masnog tkiva, gušterače i jetra. Inzulinska rezistencija smatra se ključnim čimbenikom u patofiziologiji MASLD-a [22].

U organizmu s inzulinskom rezistencijom dolazi do hiperinzulinemije. Ovaj višak inzulina u jetri aktivacijom proteina 1c koji veže sterolni regulatorni element (SREBF-1c, od engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*) rezultira povećanjem lipogeneze *de novo.*Pri inzulinskoj rezistenciji u masnom tkivu, izostaje inhibicija lipolize, zbog čega se iz adipocita u cirkulaciju oslobađaju masne kiseline koje pristižu u jetru [23]. Cirkulirajuće masne kiseline oslobođene lipolizom u masnom tkivu, sinteza *de novo* masnih kiselina te hranom unesene masti pristigle u jetru, u hepatocitima rezultiraju velikom količinom slobodnih masnih kiselina, uzrokujući nakupljanje masnoća, odnosno, steatozu jetre. Nakupljene masne kiseline postaju lipotoksične, dolazi do povećanog oksidacijskog stresa u hepatocitima, disfunkcije mitohondrija i peroksisoma, stresa endoplazmatskog retikuluma, te apoptoze hepatocita [24]. Dva ključna mehanizma uklanjanja masnih kiselina iz hepatocita su oksidacija u mitohondrijima i peroksisomima te njihovo izlučivanje u krvotok u obliku lipoproteina. Dok jetra ima kapacitete za održavanje ravnoteže povećanom oksidacijom masnih kiselina, regulacijom oksidacijskog stresa i transportom triglicerida u obliku

Ocjena rada u tijeku!

lipoproteina, nakupljanje lipida u hepatocitima može biti ograničeno. Daljnim preopterećenjem jetre masnim kiselinama dolazi do zasićenja ovih protektivnih procesa, aktivacije proupalnih čimbenika te progresije u MASH [25,26]. Ovi procesi sažeto su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Patogeneza MASLD-a. Preuzeto i prilagođeno: Zhang i sur.[27]

ROS (reaktivne kisikove vrste, engl. *reactive oxygen species*); KBB (kronična bubrežna bolest), KVB (kardiovaskularne bolesti), MASH (metabolički uzrokovan steatohepatitis, engl. *Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis*), VLDL (lipoprotein vrlo niske gustoće, engl. *Very-Low-Density Lipoprotein*)

1.1.3.1. Oksidacijski stres u patofiziologiji MASLD-a

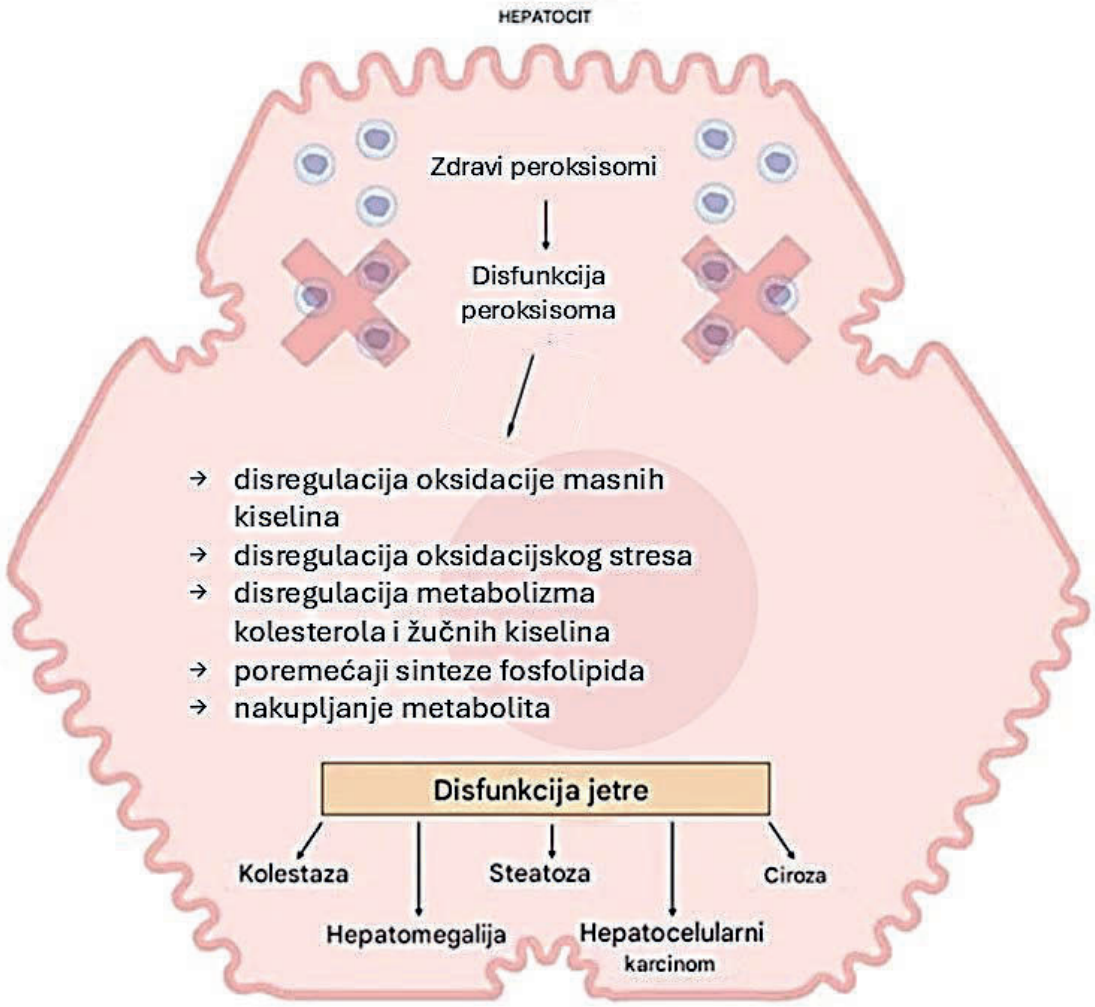
U kontekstu MASLD-a, oksidacijski stres predstavlja jedan od ključnih mehanizama u patofiziologiji bolesti. Povećana akumulacija masnih kiselina u hepatocitima dovodi do pojačane mitohondrijske β-oksidacije i posljedične povećane produkcije reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*). Njihovo prekomjerno nakupljanje uzrokuje oksidativno oštećenje hepatocitra te potiče upalni odgovor i daljnju progresiju bolesti [28].

U održavanju redoks ravnoteže ključnu ulogu ima glutation (GSH), glavni intracelularni niskomolekularni tiol sintetiziran pretežno u jetri. Glutation (GSH) je tripeptid sastavljen od glutamata, cisteina i glicina te predstavlja najvažniji intracelularni tiol uključen u održavanje redoks homeostaze. Njegova antioksidativna funkcija temelji se na sposobnosti tiolne skupine cisteina da reducira reaktivne vrste kisika (ROS), pri čemu se GSH oksidira u glutation disulfid (GSSG). GSH djeluje kao ključni kosupstrat za enzime poput glutation peroksidaze, omogućujući detoksifikaciju peroksida i zaštitu stanica od oksidativnog oštećenja [29]. U MASLD-u dolazi do poremećaja homeostaze glutationa, a brojna istraživanja ukazuju na povećanu potrošnju i iscrpljivanje GSH-a, što može smanjiti antioksidativni kapacitet hepatocita i dodatno pojačati oksidacijski stres. Cesarini i sur. sustavnim preglednim radomsveobuhvatno su saželi dosadašnje spoznaje o promjenama glutationske homeostaze u MASLD-u te istaknuli značajnu heterogenost rezultata dobivenih mjerenjem GSH-a te nedosljednost spoznaja o razinama GSH u animalnim i humanim istraživanjima MASLD-a [26]. Dokazane su povišene razine GSH [30,31], ali i izraženo smanjenje GSH u bolesnika, te je pokazano da nadomjesna antioksidativna terapija glutationom ima povoljan učinak u bolesnika s MASLD-om [29]. U regulaciji redoks homeostaze, iznimno važnu ulogu imaju stanični organeli - peroksisomi [26,32].

Peroksisomi su stanični organeli koji sadrže enzime ključne za metaboličke procese kao što su sinteza žučnih kiselina, β-oksidacija masnih kiselina i metabolizam ROS-aPeroksisomi su specifični organeli koji posjeduju mogućnost prilagodbe ovisno o staničnim metaboličkim potrebama. U odgovoru na promjene u količini metabolita, poremećaje metabolizma, izvanstanične signale, peroksisomi se mogu rapidno degradirati ili proliferirati, što rezultira povećanjem broja i volumena peroksisoma te promjenom aktivnosti peroksisomalnim enzima. U ovim procesima, ključni su

Ocjena rada u tijeku.

peroksisomskim proliferatorima aktivirani receptori (PPAR-ovi, engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*). Hepatociti sadrže izrazito velik broj peroksisoma (300 - 600/stanici) u usporedbi s ostalim stanicama, a disfunkcija peroksisoma povezana je s masnom promjernom jetre [33]. . U redoks homeostazi, iznimno je važna peroksisomska katalaza koja štiti hepatocite od oksidacijskom stresa stoga ne čudi da se disregulacija peroksisoma pokazala kao važan čimbenik u oštećenju jetre te patofiziologiji MASLD-a, ŠB, pretilosti, ali i onkogenezi [33]. Utjecaj disfunkcije peroksisoma na razvoj bolesti jetre shematski su prikazani na Slici 2.



Slika 2. Mehanizam razvoja jetrenih poremećaja disfunkcijom peroksisoma. Preuzeto i prilagođeno: Vinoy i sur.[33]

1.1.3.2. Ključni geni i proteini u patofiziologiji MASLD-a

U opisanoj kompleksnoj patofiziologiji MASLD-a, istraživanjima su utvrđeni brojni signalni putevi te geni, odnosno proteini, koji imaju važnu ulogu u molekularnim mehanizmima razvoja i progresije MASLD-a.

U ovom doktorskom radu, za procjenu učinka semaglutida u modelu MASLD-a odabrani su geni:

- peroksisomskim proliferatorima aktiviran receptor α (*PPARα*, engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha),
- peroksisomskim proliferatorima aktiviran receptor γ (*PPARγ*, engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma),
- mikrosomalni protein za prijenos triglicerida (*MTTP*, engl. Microsomal Triglyceride Transfer Protein)
- tumorski nekrotizirajući faktor alfa (*TNF*, engl. Tumor Necrosis Factor Alpha),
- Transformirajući čimbenik rasta beta 1 (*TGF-β1*, engl. Transforming Growth Factor Beta 1)

Peroksisomskim proliferatorima aktivirani receptori

Ovi nuklearni transkripcijski faktori pripadaju skupini steroidnih hormonskih receptora reguliraju transkripciju brojnih gena uključenih u metaboličke i stanične procese, uključujući proliferaciju stanica, diferencijaciju te imunološke i upalne odgovore. Identificirana su tri podtipa - PPAR-α, PPAR-β/δ i PPAR-γ - koji pokazuju različitu, ali djelomično preklapajuću distribuciju i funkcije u tkivima [33]. Osnovna molekularno-genetička svojstva te klinička relevantnost peroksisomskim proliferatorima aktiviranih receptora proučavanih u ovoj studiji sažeto su prikazana u Tablici 1.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 1. Molekularno-genetička svojstva peroksisomskim proliferatorima aktiviranih receptora *α* i *γ*

GEN	***PPARα*** **(OMIM # 170998)**	***PPARγ*** **(OMIM # 601487)**
Lokus	22q12–q13.1	3p25
Genomska pozicija (GRCh38)	chr22:46,198,384 - 46,235,377	chr3:12,351,593 - 12,434,142
Tip gena	Protein-kodirajući gen, nuklearni receptor	Protein-kodirajući gen, nuklearni receptor
Genska građa	~ 84 kb, više eksona	~50 kb, više eksona
Transkript (mRNA)	Glavni referentni transkript, inducibilna ekspresija ovisna o ligandima	Više transkripata, alternativni promotori i *splicing*
Transkripcijske inačice	Gen *PPARA* kodira nekoliko mRNA transkripata (RefSeq/Ensembl), koji se razlikuju prvenstveno u 5' i 3' UTR regijama, dok kodirajuća sekvenca ostaje visoko konzervirana. Glavni referentni transkript (npr. NM_005036) kodira protein duljine 468 aminokiselina.	Najvažnije izoforme: *PPARγ1* (široka ekspresija), *PPARγ2* (pretežno adipociti), *PPARγ3* (makrofagi i crijevo) Gen *PPARγ* kodira više mRNA transkripata koji nastaju alternativnim korištenjem promotora i alternativnim splicingom. Najvažniji RefSeq transkripti uključuju: NM_138711 → kodira PPARγ1 (najčešće referentni transkript; široka ekspresija) NM_015869 → kodira PPARγ2 (adipocitno-specifična izoforma s dodatnih 30 aminokiselina na N-terminalu) NM_138712 → kodira PPARγ3 (izražena u makrofagima i gastrointestinalnom tkivu) Sve izoforme dijele istu DNA-*binding* i ligand-*binding* domenu, dok se razlikuju u N-terminalnoj regiji, što utječe na transkripcijsku aktivnost i tkivnu specifičnost.
Regulacija ekspresije	Aktivacija vezanjem liganda: endogeni (masne kiseline, eikosanoidi), egzogeni (hipolipidemici)	Aktivacija vezanjem liganda: endogeni (masne kiseline, eikosanoidi), egzogeni (hipolipidemici)
Protein	PPARα, ~52 kDa, nuklearni receptor	PPARγ, ~57 kDa, nuklearni receptor
UniProt ID	Q07869	P37231

Ocjena rada u tijeku!

Subcelularna lokalizacija	Jezgra, nukleoplazma	Jezgra, citoplazma
Molekularni mehanizam	Heterodimer s RXR, veže se na PPRE sekvence DNA i regulira transkripciju ciljnih gena	Heterodimer s RXR, veže se na PPRE sekvence DNA i regulira transkripciju ciljnih gena
Tkivna ekspresija	Visoka u jetri, srčanom mišiću, bubrezima, skeletnim mišićima te monocitima (imunološki sustav).	Visoka u masnom tkivu
Funkcija	Regulacija β-oksidacije masnih kiselina, metabolizma lipida, glukoneogeneze	Adipogeneza, metabolizam lipida i glukoze
Klinička relevantnost	Disregulacija povezana s dislipidemijama, inzulinskom rezistencijom, MASLD-om Terapijska meta u liječenju poremećaja metabolizma lipida i metaboličkih bolesti	Disregulacija povezana s pretilošću, dislipidemijama, inzulinskom rezistencijom, MASLD-om Terapijska meta u liječenju poremećaja metabolizma lipida i ŠB

*Podaci u tablici preuzeti su iz baza podataka: omim.org; uniprot.org

Peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptori (PPAR) pripadaju skupini ligandom aktiviranih nuklearnih receptora koji nakon vezanja liganda tvore heterodimere s retinoidnim X receptorom (RXR) te se vežu na specifične PPAR-odgovorne elemente (PPRE) u promotorima ciljnih gena, regulirajući njihovu transkripciju. Smatra se da u MASLD-u dolazi do poremećaja aktivnosti PPAR-ova, pri čemu smanjena aktivnost PPAR-α rezultira smanjenom β-oksidacijom masnih kiselina, dok promjene signalizacije posredovane PPAR-γ dodatno pridonose poremećaju metabolizma lipida i razvoju hepatične steatoze [34]. PPAR-α se visoko eksprimira u tkivima s aktivnom oksidacijom masnih kiselina, primarno u jetri, ali i srčanom i skeletnom mišiću, a PPAR-γ je najzastupljeniji u masnom tkivu [35].

Peroksisomski proliferatori su ligandi koji mogu biti endogeni (masne kiseline), ili egzogeni, među kojima je i cijela skupina hipolipidemijskih lijekova, PPAR agonista [36], koji se koriste u liječenju metaboličkih poremećaja kao što su dislipidemija, ŠB2, hipertenzija, pretilost, masna promjena jetre te u terapiji metaboličkog sindroma, koji predstavlja skupinu srodnih metaboličkih poremećaja. Ovi lijekovi aktivacijom PPAR-ova povećavaju oksidaciju masnih kiselina i smanjuju nakupljanje lipida u jetri te snižavajukoncentracije triglicerida u plazmi, reguliraju homeostazu glukoze i smanjuju inzulinsku rezistenciju, a utječu i na adipogenezu. U kontekstu MASLD-a, također

Ocjena rada u tijeku!

imaju značajne učinke na smanjenje upale i fibrinogeneze [34], zbog čega su se novije generacije dualnih/pan agonista posebno istaknule kao farmakoterapijska opcija za liječenje MASH-a [37].

PPARα

Funkcija i disregulacija aktivnosti PPAR-ova u MASLD-u izrazito je kompleksan proces, a uključuje pojačanu kompenzatornu aktivaciju *PPARα* te regulaciju alternativnih transkripcijskih čimbenika kao što je protein koji veže regulatorne elemente sterola (SREBP-1c engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*).

Povišeni unutarstanični priljev i akumulacija slobodnih masnih kiselina (endogeni ligandi ovih receptora) aktiviraju *PPAR-α* kako bi se pojačala oksidacija masnih kiselina [38]. No, unutarstanični višak lipida i kronična hiperinzulinemija dodatno aktiviraju SREBP-1c, koji je glavni je regulator sinteze masnih kiselina i triglicerida. U MASLD-u, kako je već opisano, nastaje hiperinzulinemija, povišeni inzulinski podražaj trajno stimulira PI3K/Akt/mTORC1 signalizaciju [39], a utjecajem tog signala, SREBP-1c se oslobađa iz svog neaktivnog kompleksa te nakon proteolitičkog cijepanja prelazi u jezgru stanice, N-terminalna domena veže na elemente regulacije sterola (SRE) unutar promotora ciljnih gena, povećavajući lipogenezu *de novo,* odnosno ekspresiju ključnih lipogenih enzima: acetil-CoA sintetaze (*ACS*), acetil-CoA karboksilazu (*ACC*), sintazu masnih kiselina (*FAS*) [40], Istodobno, u uvjetima pojačanog inzulinskog signala PPAR-α može, preko jetrenog X receptora (LXR, engl. *Liver X Receptor*), povećati ekspresiju SREBP-1c i njegovih ciljnih lipogenih gena [41], što rezultira masivnim nakupljanjem lipida u hepatocitima i trajnom disregulacijom oksidacijske homeostaze [38].

Također, pojačana kompenzatorna aktivacija PPAR-α stimulira ekspresiju gena odgovornih za katabolizam lipida, uključujući karnitin-palmitoiltransferazu 1A (*CPT1A*) za mitohondrijski transport, acil-CoA oksidazu 1 (*ACOX1*) za peroksisomsku razgradnju te srednjelančanu acil-CoA dehidrogenazu (*MCAD*) za mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina. Iako peroksisomska β-oksidacija posredovana ACOX1 dovodi do stvaranja vodikovog peroksida (H_2O_2), on se u fiziološkim uvjetima učinkovito uklanja djelovanjem antioksidativnih sustava, prvenstveno katalaze. U uvjetima poremećene redoks ravnoteže zbog povećanog metabolizma masnih kiselina, povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta može dodatno opteretiti

Ocjena rada u tijeku!

antioksidativni kapacitet stanice. Na taj način PPAR-α ima dvostruku ulogu u metabolizmu jetre: primarno djeluje zaštitno poticanjem oksidacije masnih kiselina i smanjenjem lipotoksičnosti, dok u uvjetima kroničnog metaboličkog opterećenja može pridonijeti povećanom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta [42].

PPAR-γ

PPAR-γ ima složene i tkivno specifične učinke u metabolizmu lipida i glukoze, zbog čega može pokazivati i zaštitno i steatogeno djelovanje u MASLD-u. Visoko je eksprimiran i aktivan u masnom tkivu, gdje potiče diferencijaciju adipocita, unos i skladištenje masnih kiselina te poboljšava osjetljivost na inzulin. Time smanjuje koncentraciju slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji i njihov dotok u jetru, ograničavajući ektopično nakupljanje lipida i lipotoksičnost. Nasuprot tome, ekspresija PPAR-γ u zdravoj je jetri relativno niska, ali se povećava u uvjetima pretilosti, inzulinske rezistencije i jetrene steatoze. Povećana aktivnost PPAR-γ u hepatocitima potiče ekspresiju gena uključenih u unos, sintezu i skladištenje lipida, čime može pridonijeti razvoju steatoze [43].

PPAR-γ također ima važnu ulogu u regulaciji upalnog odgovora i polarizacije makrofaga u razvoju i progresiji MASLD-a. U uvjetima steatoze i povišenih masnih kiselina u jetri, dolazi do pojačane NF-κB signalizacije što potiče ekspresiju proupalnih gena, odnosno, stvaranje proupalnih citokina TNF, IL-1β i IL-6 i razvoj M1-sličnog proupalnog fenotipa makrofaga. Oslobođeni citokini mogu dodatno potaknuti upalu, inzulinsku rezistenciju i nakupljanje lipida u hepatocitima. Aktivacija *PPAR-γ* inhibira signalizaciju NF-κB, smanjuje ekspresiju proupalnih gena i usmjerava polarizaciju makrofaga prema M2-sličnom protuupalnom fenotipu, čime može ublažiti upalu i poremećaj metabolizma lipida u jetri [43]. U jetrenim zvjezdastim stanicama *PPAR-γ* inhibira signalizaciju *TGF-β*, njihovu aktivaciju i sintezu kolagena, čime može ograničiti razvoj fibroze [43]. Stoga konačan učinak *PPAR-γ* u MASLD-u ovisi o vrsti stanice i metaboličkom “kontekstu”.

Ocjena rada u tijeku!

Mikrosomalni protein za prijenos triglicerida

Izlučivanje 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, engl. *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*), visoko eksprimiran u enterocitima i hepatocitima. U jetri ima ključnu ulogu u sekreciji triglicerida iz jetre i održavanje homeostaze lipida u hepatocitima. Njegova primarna funkcija je ugradnja triglicerida, fosfolipida i kolesterola u apolipoprotein B (apoB), omogućujući formiranje i izlučivanje lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL, engl. *Very-Low-Density Lipoproteins*), time sprječavajući nakupljanje lipida u hepatocitima [44,45].

Farmakološka inhibicija ovog proteina, pokazala je učinkovitost snižavanja serumskih razina lipida, ali također dovodi do disregulacije jetrenog metabolizma lipida, povišenja razine transaminaza i hepatičke steatoze zbog smanjenog izlučivanja triglicerida[46]. Slično tome, patogene varijante gena *MTTP* uzrokuju abetalipoproteinemiju, obilježenu izrazito smanjenim stvaranjem lipoproteina koji sadržavaju apolipoprotein B. Unatoč niskim koncentracijama lipida u krvi, smanjeni izvoz triglicerida iz hepatocita dovodi do njihova nakupljanja u jetri i razvoja steatoze, što pokazuje da poremećaj funkcije MTTP-a može uzrokovati nakupljanje jetrenih lipida neovisno o pretilosti i inzulinskoj rezistenciji [47]. Molekularno-genetička svojstva ovog gena prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2. Molekularno-genetička svojstva

GEN	***MTTP* (OMIM # 157147)**
Lokus	4q23
Genomska pozicija (GRCh38)	chr4:99,574,910-99,622,845
Tip gena	Protein-kodirajući gen, transportni protein
Genska građa	~60 kb, više eksona
Transkript (mRNA)	Više transkripata
Transkripcijske inačice	Izoforme: *MTTP-A, MTTP-B,* *MTTP-C*

Ocjena rada u tijeku!

	Gen *MTTP* kodira više mRNA transkripata koji se razlikuju u 5' i 3' regulatornim regijama, dok je kodirajuća sekvenca visoko očuvana. Glavni RefSeq transkript uključuje: NM_000253 → kodira kanonski MTTP protein (~894 aminokiselina) Dodatni transkripti (npr. alternativni splice varijanti opisani u bazama poput Ensembl) razlikuju se u UTR regijama i potencijalno u regulaciji stabilnosti i translacije, ali ne rezultiraju značajno različitim proteinskim izoformama s jasno definiranim funkcionalnim razlikama.
Regulacija ekspresije	Tkivno specifična (regulirana metaboličkim signalima)
Protein	MTTP, ~88–97 kDa
UniProt ID	P55157
Subcelularna lokalizacija	Endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat
Tkivna ekspresija	Visoka u jetri i tankom crijevu
Funkcija	Ključan za apsorpciju, transport i formiranje lipida u lipoproteine
Klinička relevantnost	Mutacije uzrokuju abetalipoproteinemiju Terapijska meta u liječenju poremećaja metabolizma lipida

*Podaci u tablici preuzeti su iz baza podataka: omim.org; uniprot.org

Proupalni i profibrotički čimbenici

U ovom istraživanju bila je važna i procjena učinka semaglutida na proupalne i profibrotičke čimbenike kako bi se istražio učinak na proupalne i profibrotičke čimbenike na razini hepatocita, bez prisutnosti Kupferovih i zvjezdastih stanica jetre, tj. potencijal ovog farmakoterapeutika u terapiji i prevenciji progresije blažih oblika MASLD-a. Dakle, zanimalo nas je može li semaglutid već na razini hepatocita ograničiti progresiju upale i profibrotičkih procesa.

Proupalni i profibrotički procesi nastaju zbog prolongiranog oksidacijskog stresa te zasićenjem metaboličkih puteva u regulaciji homeostaze lipida i daljnjim nakupljanjem lipida u hepatocitima. Dolazido aktivacije sinusoidalnih endotelnih stanica jetre (LSEC, engl. *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*), Kuppferovih stanica (makrofazi jetre) i zvjezdastih stanica jetre (HSC, eng. Hepatic stellate cells), koje, izlučivanjem proupalnih i profibrotičkih čimbenika TNFdovode 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

Ocjena rada u tijeku!

oboljenja jetre kao što je hepatocelularni karcinom [23,27] te dovodi do sistemskih poremećaja kardiovaskularnog, renalnog, disfunkcije adipoznog tkiva i ostalih organskih sustava [48].

TNF i TGF-β

TNF jedan je od ključnih proupalnih citokina uključenih u razvoj MASLD-a i njegovu progresiju prema MASH-u. Lipotoksičnost, oksidativni stres i oštećenje hepatocita potiču aktivaciju Kupfferovih stanica te nakupljanje monocita i makrofaga u jetri, koji predstavljaju važne izvore TNF. Vezanjem za svoje receptore TNF aktivira proupalnu signalizaciju, uključujući NF-κB, čime potiče i održava upalni odgovor. Trajna aktivacija ovih procesa pogoduje prijelazu jednostavne steatoze u MASH i aktivaciji jetrenih zvjezdastih stanica [49].

TGF-β smatra se glavnim profibrogenim citokinom u jetri. Oslobađaju ga različite stanice jetre, uključujući aktivirane makrofage i jetrene zvjezdaste stanice, kao odgovor na kronično oštećenje tkiva. TGF-β potiče prijelaz jetrenih zvjezdastih stanica u aktivirani, miofibroblastima sličan fenotip, a aktivirane zvjezdaste stanice pojačano sintetiziraju kolagen i druge sastavnice izvanstaničnog matriksa, dok se istodobno smanjuje njihova razgradnja. Posljedično dolazi do progresivnog nakupljanja izvanstaničnog matriksa i razvoja fibroze [49]. Molekularno-genetička svojstva ovih gena prikazana su u Tablici 3.

Ekspresija ovih gena/proteina analizirana je radi procjene upalnog i profibrotičkog odgovora HepG2 stanica. Međutim, ovaj model ne uključuje Kupfferove i jetrene zvjezdaste stanice, koje imaju ključnu ulogu u nastanku upale i fibroze. Dobivene promjene stoga prvenstveno odražavaju odgovor hepatocita na lipotoksični stres, a ne cjelokupne upalne i fibrogene procese karakteristične za MASH.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 3. Molekularno-genetička svojstva proupalnih i profibrotičkih gena

GEN	***TNF* (OMIM #191160)**	***TGF-β1* (OMIM #190180)**
Lokus	6p21.33	19q13.2
Genomska pozicija (GRCh38)	chr**:** 31,575,565 - 31,578,336	chr19:41,331,055 - 41,353,044
Tip gena	Protein-kodirajući gen - citokin	Protein-kodirajući gen – čimbenik rasta
Genska građa	Mali gen (~3 kb), više eksona	Više eksona
Transkript (mRNA)	Referentni transkript, inducibilna ekspresija	Referentni transcript, inducibilna ekspresija
Transkripcijske inačice	Nema značajnih funkcionalnih izoformi, regulacija stabilnosti mRNA putem AU-elemenata Gen *TNF* ima relativno jednostavnu transkripcijsku organizaciju s dominantnim RefSeq transkriptom: • NM_000594 → kodira TNF prekurzorski protein (233 aminokiseline) Alternativni transkripti postoje, ali nemaju značajnu ulogu u generiranju funkcionalno različitih proteinskih izoformi. Regulacija ekspresije TNF-a odvija se na više razina: • transkripcijska aktivacija (npr. putem NF-κB) • posttranskripcijska regulacija putem AU-rich elemenata u 3' UTR regiji, koji utječu na stabilnost mRNA • kontrola translacije	Transkripcijska inačica Gen *TGFB1* kodira više transkripata, pri čemu je dominantan RefSeq transkript: NM_000660 → kodira pre-protein (390 aminokiselina) koji se procesira u aktivni TGF-β1 Opisani su dodatni transkripti (razlike u UTR regijama), no oni uglavnom ne rezultiraju različitim proteinskim izoformama s jasno definiranim funkcionalnim razlikama.
Regulacija ekspresije	Snažno inducirana upalnim signalima, regulirana i na razini promotora	Regulirana na više razina (SMAD, MAPK, PI3K/AKT signalizacija)
Protein	TNF, 17 kDa, citokin	TGF--β1, ~25 kDa
UniProt ID	P01375	P01137
Subcelularna lokalizacija	Stanična membrana	Izvanstanični matriks

Ocjena rada
U tijeku!

Molekularni mehanizam	Djeluje preko receptora TNFR1 (TNFRSF1A), TNFR2 (TNFRSF1B)	Veže se na TGFβ receptore (TGFBR1/2)
Tkivna ekspresija	Primarno makrofagi i monociti, inducirano - u hepatocitima, adipocitima i endotelnim stanicama	Široko izražen (imunološke stanice, fibroblasti, trombociti, jetrene zvjezdaste stanice)
Funkcija	Proinflamatorni citokin	Regulacija proliferacije, diferencijacije, apoptoze i imunološkog odgovora
Klinička relevantnost	Upala, imunološki odgovor	Ključan faktor u fibrogenezi

*Podaci u tablici preuzeti su iz baza podataka: omim.org; uniprot.org

Ocjena rada u tijeku!

1.1.4. Klinička slika i dijagnostičke metode 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 povećana jetra (hepatomegalija), ali učestaliji klinički indikator MASLD-a su povišeni jetreni enzimi. Pri sumnji na SLD, daljnje pretrage uključuju radiološke metode kao što jeultrazvuk,, magnetska rezonanca (MR) 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 od engl. *Controlled Attenuation Parameter*), koji zbog dobre osjetljivosti i specifičnosti detektira i steatoze niskog stupnja [19,50].

Pri diferencijalnoj dijagnostici, važno je isključiti ostale uzroke MASLD-a, kao što je infekcija virusom hepatitisa, autoimune i druge metaboličke bolesti. Kliničke smjernice objavljene 2024. godine od strane europskih društava za istraživanje jetre, dijabetesa i pretilosti definirale su MASLD kao prisutnost steatoze jetre u kombinaciji s barem jednim kardiometaboličkim čimbenikom rizika – debljina ili pretilost utvrđena povišenim indeksom tjelesne mase (BMI, eng. body mass index) i povećanim opsegom struka; disglikemija ili ŠB2; hipertrigliceridemija; nizak HDL-kolesterol; hipertenzija; korištenje lijekova s antilipidemijskim, antidijabetičkim ili antihipertenzivnim učincima. Anamnestički podaci o konzumaciji alkohola, liječenjem hepatotoksičnim lijekovima, monogenskim bolestima, kao što su hemokromatoza ili Wilsonova bolest, , ključni su za diferenciranje MASLD-a od ostalih SLD-a. Prema Delphi konsenzusu, raspon unosa etanola za MetALD iznosi 140–350 g/tjedno za žene i 210–420 g/tjedno za muškarce; iznad toga se razvrstava u ALD, a ispod gornje granice MASLD-a. 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 [50].

Ocjena rada u tijeku!

1.2. Farmakoterapija MASLD-a

Mogućnosti preciznog farmakoterapijskog liječenja MASLD-a do 2024. bile su izrazito oskudne, odnosno, MASLD se konzervativno liječio promjenama životnih navika te u sklopu liječenja drugih kardiometaboličkih bolesti, antilipidemicima i antidijabeticima. U Sjedinjenim Američkim Državama 2024. godine, ubrzanim je postupkom („fast track“) odobrena klinička upotreba resmetiroma, selektivnog agonista beta receptora hormona štitnjače (THRβ), kao prvog lijeka za liječenje MASH-a. a primarna indikacija za liječenje ovim lijekom je necirotični MASH s umjerenom do uznapredovalom fibrozom jetre. Sredinom 2025. godine Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and DrugAdministration*) za iste indikacije odobrila je semaglutid [51,52].

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 kojom bi se omogućila potencijalna intervencija prije progresije u ozbiljnije oblike bolesti. Među najozbiljnijim kandidatima u razvoju farmakoterapijskog pristupa MASLD-u su agonisti receptora glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1RA, od engl. Glucagon-like peptide 1 receptor agonist), među kojima je i semaglutid. Ovaj peptid i agonisti njegova receptora pripadaju u skupinu hormona nazvanih inkretini, čije je otkriće predstavilo prekretnicu u razumijevanju endokrinoloških i metaboličkih procesa.

1.2.1. Inkretini

Bayliss i Starling 1902. godine 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 [53]. Uslijedile su hipoteze kojima su Moore i sur. predložili potencijalnu prisutnost produkata intestinalne sluznice koji stimuliraju gušteraču i njezinu endokrinu aktivnost [54], 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[55] . Do 1920-ih, odnosno otkrića inzulina, i 1950-ih te razvoja metoda za mjerenje koncentracije i mehanizme lučenja inzulina, inkretini su i dalje bili nedovoljno razjašnjeni. Napokon, razvojem biotehnologije, znanstvenici su jasno demonstrirali

Ocjena rada u tijeku!

pojačanu sekreciju inzulina nakon primjene glukoze *per os*, u odnosu na parenteralno primijenjene glukoze, iako se koristila jednako koncentrirana otopina. Ovo je kasnije prepoznato kao *inkretinski učinak*. 1970-ih, Brown i suradnici učinili su značajan iskorak u istraživanju inkretina kada su uspješno pročistili i okarakterizirali o glukozi ovisan inzulinotropni polipeptid (GIP, od engl. *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) [56]. Napokon, 1986. godine iz crijeva je izoliran GLP-1 za koji je utvrđeno da stimulira lučenje inzulina i inhibira lučenje glukagona [57-60].

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 farmakoterapeutika temeljenih na GLP-1 [61,62]. 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 [63].

Studije su također demonstrirale da je inkretinski učinak neadekvatan u pacijenata s metaboličkim poremećajima, ŠB 1 i 2 [64,65], pretilosti te MASLD-om [66]. Također, GLP-1 stimulira lučenje inzulina na način ovisan o glukozi, odnosno, inzulinotropni učinci inkretinskih hormona uvijek ovise o prisutnosti određenog stupnja glikemije. Uloga inkretina je pojačati odgovor na sekreciju inzulina koji je već pokrenut povišenom razinom glukoze [67]. Ove su spoznaje dovele do posebnog interesa za GLP-1 i agonista njegova receptora u liječenju metaboličkih bolesti.

1.2.1. Glukagonu sličan peptid 1

Glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1, od engl. *Glucagon-like peptide 1*) intestinalni je peptidni hormon klasificiran u skupinu hormona poznatih kao inkretini. Izlučuje se iz crijevnih enteroendokrinih L-stanica kaopostranslacijski je proizvod proglukagona,. Proglukagon se u crijevnim L-stanicama enzimskom obradom, koja ovisi o konvertazi 1, cijepa u GLP-1. Biološki aktivni GLP-1 nastaje iz prekursora GLP-1(1–37) te se u cirkulaciji pojavljuje u dva jednako učinkovita molekularna oblika: GLP-1(7–37) i GLP-1(7–36) amid. GLP-1(7–36) amid je najzastupljeniji aktivni oblik GLP-1 u ljudskoj plazmi[68]. Glavni učinak je postprandijalna stimulacija lučenja inzulina iz gušterače [69].

Ocjena rada u tijeku!

Početni izazov u razvoju terapije GLP-1 peptidom bila je brza razgradnja pri parenteralnoj i *per os* primjeni. Jedna od pivotalnih studija [70] u razvoju i otkriću potencijala GLP-1RA u terapiji ŠB, ali i pretilosti te metaboličkim poremećajima, dokazala je efikasnost kontinuirane parenteralne primjene GLP-1 (7–36) amida tijekom šest tjedana u pretilih pacijenata sa ŠB2. Ukohorti od 20 ispitanika, ispitanici na inkretinskoj terapiji pokazali su smanjenje GUK-a natašte i 8-satne srednje vrijednosti, hemoglobin A1c (ključni pokazatelj dugoročne regulacije glikemije i jedan od najvažnijih parametara u praćenju šećerne bolesti) smanjio se za 1,3 %, a koncentracije slobodnih masnih kiselina smanjile su se za 23 – 30 % Također, uz terapiju GLP-1 pražnjenje želuca je bilo usporeno, apetit je bio smanjen, a tjelesna masa smanjila se za 1,9 kg. Osjetljivost na inzulin i funkcija β-stanica poboljšale su se, a nisu uočene značajne nuspojave. Međutim, brza razgradnja GLP-1 djelovanjem enzima dipeptidil-peptidaze-4 (DPP-4), (poluživot intaktnog GLP-1 u plazmi je svega 1–2 minute) predstavljala je jedno od glavnih ograničenja njegove terapijske primjene [58].. Otkriće 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.

1.2.2. GLP-1RA

FDA je 2005. odobrila eksenatid, prvi 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.

Semaglutid je agonist GLP-1R [71], građen od 31 aminokiseline, čija je struktura 94 % podudarna s humanim GLP-1. U njegovoj je strukturi alanin na položaju 8 zamijenjen α-aminoizomaslačnom kiselinom, čime je povećana otpornost na razgradnju djelovanjem dipeptidil-peptidaze-4 (DPP-4). Na lizin na položaju 26 preko hidrofilnog

Ocjena rada u tijeku!

razmaknika vezan je C18 masnokiselinski lanac, koji omogućuje snažno vezanje za albumin te usporava razgradnju i bubrežno izlučivanje semaglutida. Lizin na položaju 34 zamijenjen je argininom kako bi se masnokiselinski lanac selektivno vezao za lizin na položaju 26. Navedene strukturne modifikacije pridonose produljenom poluvijeku eliminacije što omogućuje primjenu semaglutida jednom tjedno. 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 β 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 [72,73]. Također, brojna istraživanja indiciraju snažnu ulogu GLP-1RA u inflamatornim stanjima brojnih organskih sustava, neurološkim poremećajima pa i infektivnim bolestima [74]. GLP-1R pronađeni su u α-stanicama gušterače, nekoliko regija mozga (odgovornih za apetit i sitost), srčanom i krvožilnom tkivu te bubrezima, plućima i gastrointestinalnom traktu [63]. Ekspresija GLP-1R u tkivu jetre detaljnije je opisana u daljnjem tekstu.

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 [63]. Zbog neizostavne povezanosti jetre sa ŠB2, interes i istraživanje GLP-1RA u kontekstu regulacije metabolizma lipida bio je razumljiv. Unatoč velikom broju 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 metabolizma lipida [75-78].

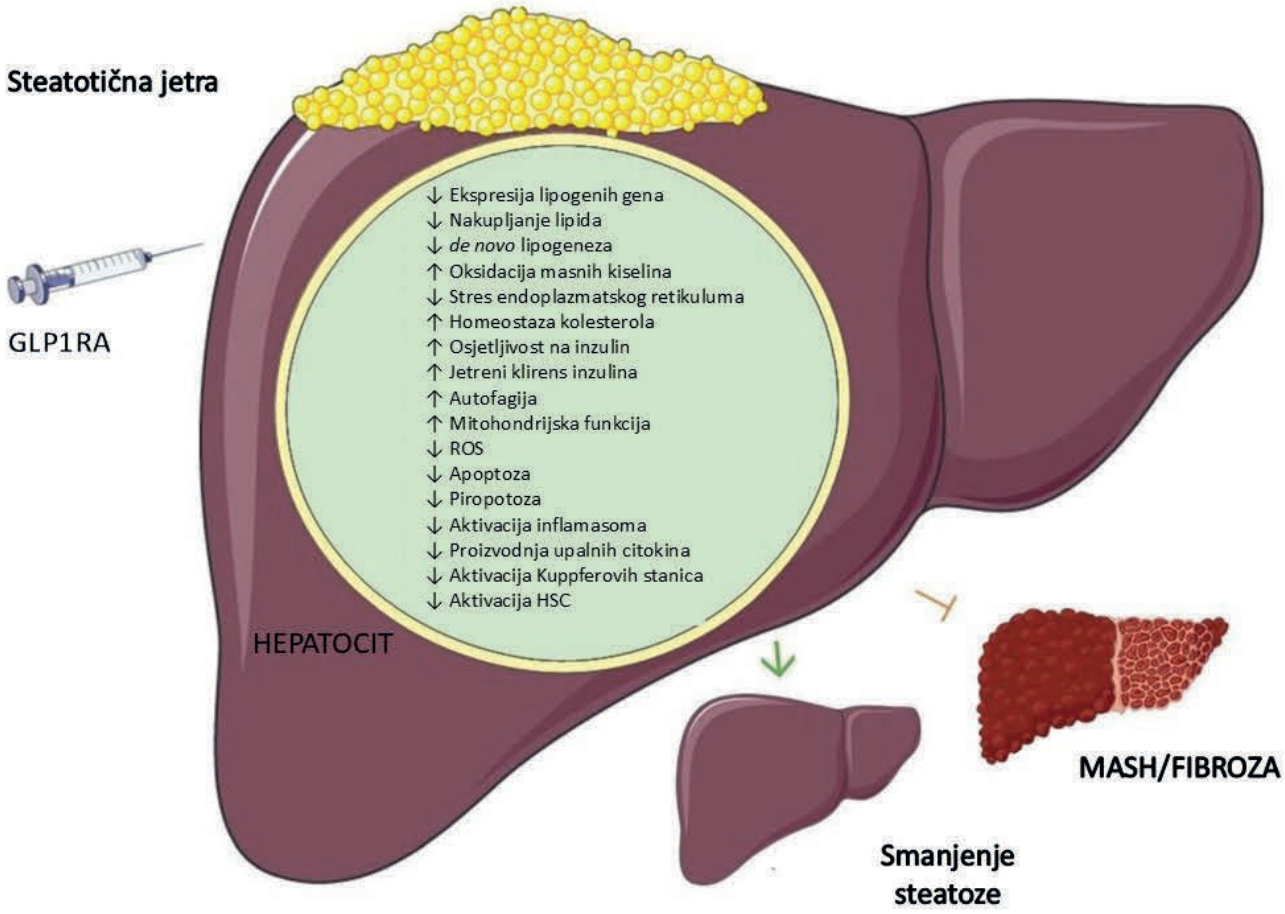
Moguće obrazloženje ovom manjku fokusa na učinke ovih peptida u MASLD-u je i dalje upitna ekspresija GLP-1 receptora u hepatocitima, zbog čega se pozitivni učinci na masnu jetru učestalo pripisuju indirektnim, pleiotropnim učincima, odnosno

Ocjena rada u tijeku!

poboljšanju metaboličkog profila zbog smanjenja BMI [74,79]. Nekolicina studija objavila je dokaze o prisutnosti GLP-1 receptora na hepatocitima [80,81], no i dalje se smatra da pitanje prisutnosti ovih receptora u jetri nije razjašnjeno. Iako su pojedine studije opisale ekspresiju GLP-1R u humanim hepatocitima i izravne učinke GLP-1 agonista na hepatocelularnu signalizaciju i akumulaciju lipida, funkcionalno relevantna prisutnost kanonskog GLP-1R u zrelim hepatocitima i dalje je predmet rasprave. Razlozi uključuju nisku i nedosljednu detekciju GLP1R transkripta, ograničenu specifičnost dijela korištenih protutijela, oslanjanje na tumorske stanične linije te mogućnost receptora-neovisnih učinaka GLP-1 metabolita ili nespecifičnih učinaka pri suprafiziološkim koncentracijama. Noviji funkcionalni nalazi također nisu potvrdili izravne učinke GLP-1R agonista u humanim hepatocitima, zbog čega se kliničko poboljšanje steatozne bolesti jetre pretežno pripisuje neizravnim učincima, uključujući smanjenje tjelesne mase, poboljšanje inzulinske osjetljivosti i glikemijske kontrole.

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 GLP-1RA utječu na disregulirani lipidni metabolizam [82]. Opisani učinci tih studija sažeti su na Slici 3.

Ocjena rada u tijeku!



Slika 3. Učinci GLP-1RA u in vitro modelima MASLD-a. Preuzeto i prilagođeno: Petrović i sur. .

HSC (jetrene zvjezdaste stanice, engl. *Hepatic Stellate Cells*); ROS (reaktivne kisikove vrste, engl. Reactive Oxygen Species), MASH (metaboličkom disfunkcijom povezan steatohepatitis, engl. *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*), GLP-1RA (agonisti receptora glukagonu sličnog peptida-1, engl. *glucagon-like peptide-1 receptor agonists*)

Ocjenski u tijeku

1.3. HepG2 stanična linija

Primjena staničnih kultura u biomedicinskim i biotehnološkim istraživanjima široko je korištena metoda [16,83,84] 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 pretežno koristile [85,86]. Iako su istraživanja na životinjama i dalje značajno prisutna u biomedicini, stanične kulture predstavljaju 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 [87].

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 [16,83,85].

Stanične linije klasificiraju se kao - primarne stanice linije stanica kontinuirane stanične linije i matične stanice. Primarne stanice pružaju *in vitro* model najbliži nativnim stanicama u međutim, ograničene su u kontekstu umnožavanja. Matične stanice, kao pluripotentni izvori raznih tipova stanica, tehnički su zahtjevne i skupe za održavanje i diferencijaciju. Kontinuirane stanične linije imaju sposobnost neograničenog umnažanja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Najčešće se dobivaju iz tumorskih tkiva, čije stanice prirodno pokazuju visok proliferativni kapacitet, ili imortalizacijom primarnih stanica. Imortalizacija se može postići, primjerice, uvođenjem virusnih onkogena ili gena koji kodira reverznu transkriptazu ljudske telomeraze (hTERT). Jednostavnost uzgoja, mogućnost dugotrajnog održavanja i razmjerno stabilna obilježja čine kontinuirane stanične linije važnim modelima u biomedicinskim istraživanjima. [88].

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

Ocjena rada u tijeku!

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 predstavljaju jasno karakteriziran, praktičan i reproducibilan model za istraživanje akumulacije lipida i početni farmakološki probir . HepG2 stanična linija kontinuirana je stanična linija, karakterizirana kao hepatoblastom i hepatocelularni karcinom (HCC). Primarno klasificirane 1975. kao stanice nastale od HCC-a, naknadnom je genotipizacijom otkriveno da ove stanice imaju sličnije karakteristike hepatoblastomu nego HCC-u [89]. 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 [90].

Razlog širokoj uporabi HepG2-stanica je značajan broj studija koje su pokazale prednosti HepG2-stanice kao što su jednostavno održavanje, stabilnost, humana jetrena provenijencija i očuvanje dijela diferenciranih jetrenih funkcija primarnih hepatocita,kao što je ekspresija jetreno specifičnih proteina, albumina i transferina. Također, njihove su prednosti jednostavno održavanje, stabilnost, humana jetrena provenijencija i očuvanje dijela diferenciranih jetrenih funkcija. Istodobno, zbog tumorskog podrijetla, slabije β-oksidacije, poremećene sekrecije VLDL-a i niske aktivnosti enzima metabolizma lijekova, ne mogu u potpunosti zamijeniti primarne humane hepatocite ili metabolički kompetentnije modele poput diferenciranih HepaRG stanica. Dodatne 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 [90]. Ovaj gen kodira β-katenin, važan za Wnt/β-katenin signalni put, koji koji sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije, jetrenog

Ocjena rada u tijeku!

metabolizma i regeneracije te u održavanju metaboličke zonacije jetre. Metabolička zonacija podrazumijeva prostornu raspodjelu hepatocita s različitim metaboličkim funkcijama duž osi jetrenog režnjića, od periportalnog do pericentralnog područja. Primjerice, periportalni hepatociti pretežno sudjeluju u glukoneogenezi i β-oksidaciji masnih kiselina, dok su u pericentralnim hepatocitima izraženiji glikoliza, lipogeneza i biotransformacija ksenobiotika. U kontekstu ove studije,"bazalno" pojačana aktivnost Wnt/β-katenin signalizacije predstavlja 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. U ovom *in vitro* sustavu nema plazmatskog metabolizma, sistemske distribucije ni bubrežnog klirensa, pa se farmakokinetika lijeka ne može izravno izjednačiti s onom u organizmu. Međutim, odsutnost plazme ne znači nužno da se peptid ne metabolizira. Mogući procesi su: proteoliza enzimima prisutnima u serumu dodanom mediju; djelovanje membranskih ektopeptidaza na stanicama; enzimi izlučeni u medij ili internalizacija nakon vezanja na receptor (što su demonstrirali Gupta i sur [80]).

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. Primjerice, Cui i sur. [91] izlažući HepG2 stanice oleinskoj kiselini (0,1–2,0 mM) tijekom 24 sata, dokazali su da steatoza ne uzrokuje samo smanjenje stanične vijabilnosti i nakupljanje triglicerida (potvrđeno Oil Red O bojenjem), već i koncentracijski ovisno aktivira upalne, oksidativne i proapoptotske procese kroz povećanu ekspresiju *TNF*, smanjenu ekspresiju *PPAR-α*, aktivacije kaspaza. S druge strane, Bao i sur. [92]fokusirali su se na optimizaciju i validaciju samog modela za farmakološka istraživanja tretiranjem stanica oleinskom

Ocjena rada
U tijeku!

kiselinom u rasponu od 0,125 do 1,0 mM pouzdano su inducirali o koncentraciji ovisno nakupljanje lipidnih kapljica i triglicerida.. 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 [92,93].

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.

Ocjena rada u tijeku!

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.

Ocjena rada u tijeku!

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-α, PPAR-γ, MTTP, TNF, TGF-β*) i istoimenih proteina uključenih u lipogenezu, homeostazu lipida, mitohondrijsku disfunkciju, profibrotičke i proupalne procese u modelu masne jetre.

Ocjena rada u tijeku!

4. Materijali i metode

4.1. Kultivacija stanica i nasađivanje stanica u eksperimentalne mikropločice

HepG2-stanice (HB-8065, ATCC, SAD) komercijalno su pribavljene te nakon odmrzavanja primarno nasađene u petrijeve zdjelice promjera 100 mm - 1 × 10^6 stanica/mL u 10 mLmedija s niskom koncentracijom (5,55 mM) glukoze(DMEM, engl. *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/streptomicin (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka). Zatim su održavane u logaritamskoj fazi rasta do dostizanja 70 - 80 % konfluencije u inkubatoru (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka) na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO_2.

Nakon dostizanja konfluencije od 70-80%, iz petrijevih zdjelica uklonio se medij, a dodano je 2 mL 0,25% Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, SAD) te nakon 4 minute u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO_2, HepG2-stanice su odlijepljene te je dodano još 2 mL medija s FBS-om koji inaktivira tripsin. Suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 250 RCF. Zatim su stanice resuspendirane u DMEM-u bez FBS-a teobojene koristeći Eritrozin B (Sigma Aldrich, SAD). Eritrozin B prodire u stanice s oštećenom membranom boja crveno. U mikrotubici pomiješano je 10 uL suspenzije i 10 uL Eritrozina B, a 10 uL otopine vizualizirano je koristeći svjetlosni mikroskop (Motic, SAD). Stanice su prebrojene pomoću Neubauerove komorice, a koncentracija stanica u suspenziji izračunata je prema formuli: broj stanica/mL = (ukupan broj stanica/broj kvadranata) × 10^4 × faktor razrjeđenja.

Nadalje su stanice nasađene u gustoći ~1.56 × 10^5 stanica/cm^2 u mikrotitarske pločice (Termo Fischer Scientific, SAD) s 96, 24 i 6 jažica, ovisno o eksperimentu. Kako bi se postigla jednaka konfluencija stanica u svim mikrotitarskim pločicama, korišten je Thermo Fisherov protokol [94], a izračun je vidljiv u Tablici 4. Eksperimenti, odnosno daljnja mjerenja, provedeni su u najmanje tri neovisna ponavljanja u tehničkim triplikatima..

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 4. Gustoća nasađivanja HepG2 stanica u mikropločice.

Mikrotitarska pločica	***Površina jažice (cm²)***	***Volumen suspenzije u jažici (mL)***	***Broj stanica/ cm²***	***Broj stanica/ jažici***	***Broj stanica/mL***
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 *in vitro* modela MASLD-a koristeći staničnu liniju HepG2: terapijski i preventivni model. U oba modela stanice su nasađene u mikropločice s 96, 24, 6 jažica u opisanoj gustoći (Tablica 4) u DMEM-u s niskom razinom glukoze, ovisno o vrsti mjerenja te su nakon nasađivanja inkubirane 24 sata u standardnim opisanim uvjetima stanične kulture. Razlika između modela odnosila se na vrijeme primjene semaglutida u odnosu na patološki induktor, oleinsku kiselinu. U terapijskom modelu semaglutid je primijenjen istodobno s oleinskom kiselinom, dok je u preventivnom modelu semaglutid primijenjen 24 sata prije izlaganja oleinskoj kiselini, detaljno opisano u podpoglavlju 4.4. Detaljan postupak pripreme otopina te metodologija odabira optimalne koncentracije oleinske kiseline opisane su u podpoglavlju 4.3.

4.3. Određivanje optimalne koncentracije oleinske kiseline za uspostavu modela MASLD-a

Na temelju pregleda literature [92,93] među koncentracijama oleinske kiseline koje se najčešće koriste za induciranje steatogenih promjena u HepG2 stanicama odabrane su tri koncentracije za preliminarno testiranje: 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM. Cilj je bio odrediti koncentraciju koja omogućuje uspostavu održivog *in vitro* modela MASLD-a, uz očuvanje vijabilnosti stanica za provedbu tretmana i mjerenja.

Ocjena rada u tijeku!

4.3.1. Priprava stock i radnih otopina oleinske kiseline

Stock otopina oleinske kiseline koncentracije 100 mM pripravljena je otapanjem 0,06 g natrijeva oleata (Sigma-Aldrich, SAD) u 1200 µL 70 %-tnog etanola i 800 µL FBS-a. Radne otopine oleinske kiseline pripravljene su razrjeđivanjem stock otopine u DMEM mediju koji je sadržavao 1 % penicilina/streptomicina: 0,5 mM (10 µL stock otopine + 1990 µL DMEM-a), 1 mM (20 µL stock otopine + 1980 µL DMEM-a) i 1,5 mM (30 µL stock otopine + 1970 µL DMEM-a). Kao kontrole otapala pripravljene su odgovarajuće radne otopine otapala u DMEM-u, pri čemu su finalni udjeli otapala u DMEM-u iznosili 0,5 %, 1 % i 1,5 %. Omjer etanol:FBS iznosili su 0,3% : 0,2% (pri ukupnom udjelu otapala od 0,5%), 0,6% : 0,4% (pri ukupnom udjelu otapala od 1%), 0,9% : 0,6% (pri ukupnom udjelu otapala od 1,5%).

4.3.2. Određivanje optimalne koncentracije oleinske kiseline za uspostavu terapijskog modela

U preliminarnom eksperimentu za odabir optimalne koncentracije oleinske kiseline u terapijskom modelu, HepG2-stanice nasađene su u mikrotitarske pločice s 96 jažica u gustoći od 1,56 × 10^5 stanica/cm^2 u DMEM-u u standardnim opisanim uvjetima stanične kulture.

Nakon 24 sata uklonjen je medij, a stanice su tretirane radnim otopinama oleinske kiseline u koncentracijama od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM te odgovarajućim radnim otopinama otapala, koje su služile kao kontrole otapala.

Nakon 24 sata inkubacije provedeno je mjerenje korištenjem MTS CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, SAD) 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, metabolički aktivne stanice reduciraju MTS u obojeni, u ljubičasti formazan, čiji se intenzitet zatim mjeri na 490 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica (iMarkTM Microplate Absorbance Reader; Bio-Rad, SAD). Vrijednosti apsorbancije proporcionalne su količini proizvedenog formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti HepG2 stanica.

Važno je naglasiti da metabolička aktivnost nije istoznačna staničnoj vijabilnosti, no nastanak formazana rezultat je metaboličke aktivnosti koju u pravilu imaju žive stanice, stoga razina metaboličke aktivnosti korelira sa staničnom vijabilnošću te se u tom

Ocjena rada u tijeku!

kontekstu i koristi kao indikator stanične vijabilnosti. Stanična vijabilnost prikazna je kao postotak u odnosu na netretirane stanice kultivirane u DMEM-u, prema formuli: stanična vijabilnost (%) = (apsorbancija tretiranih stanica / apsorbancija stanica u DMEM-u) × 100.

4.3.3. Određivanje optimalne koncentracije za uspostavu preventivnog modela

Postupak određivanja optimalne koncentracije oleinske kiseline u preventivnom modelu bio je jednak kao u terapijskom modelu, osim što stanicama 24 sata nakon nasađivanja nije dodana oleinska kiselina, nego je samo zamijenjen medij. Nakon dodatnih 24 sata inkubacije stanice su tretirane oleinskom kiselinom, odnosno odgovarajućim otapalom, te je nakon još 24 sata inkubacije provedeno mjerenje stanične vijabilnosti testomMTS. Vijabilnost stanica prikazna je kao postotak u odnosu na netretirane stanice kultivirane u DMEM-u, prema formuli: vijabilnost stanica (%) = (apsorbancija tretiranih stanica / apsorbancija stanica u DMEM-u) × 100.

4.3.4. Procjena optimalne koncentracije oleinske kiseline

Na temelju stanične vijabilnosti odabrana je koncentracija 1mM oleinske kiseline koncentraciju koja omogućuje uspostavu održivog in vitro modela MASLD-a, uz očuvanje stanične vijabilnosti za provedbu tretmana i mjerenja, što je prikazano u poglavlju Rezultati (Slika 7 i Slika 24).

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

Za uspostavu terapijskog modela, 24 sata nakon nasađivanja stanica uklonjen je medij te su stanice istodobno tretirane otopinom oleinske kiseline kao patološkim induktorom i semaglutidom kao farmakoterapeutikom. Nakon dodavanja tretmana stanice su ponovno inkubirane 24 sata, nakon čega su provedena mjerenja i analize. Navedeno je opisano grafički na Slici 4.

Za uspostavu preventivnog modela, 24 sata nakon nasađivanja, stanice su najprije tretirane otopinom semaglutida te inkubirane 24 sata. Nakon toga uklonjen je medij/otopina semaglutida i dodana je otopina oleinske kiselina, nakon čega su stanice ponovno inkubirane 24 sata. Po završetku inkubacije provedena su mjerenja i analize. Navedeno je opisano grafički na Slici 5, a priprema otopina opisana je u podpogljavlju 4.4.1.

Ocjena rada u tijeku!

4.4.1. Priprema stock i radnih otopina semaglutida

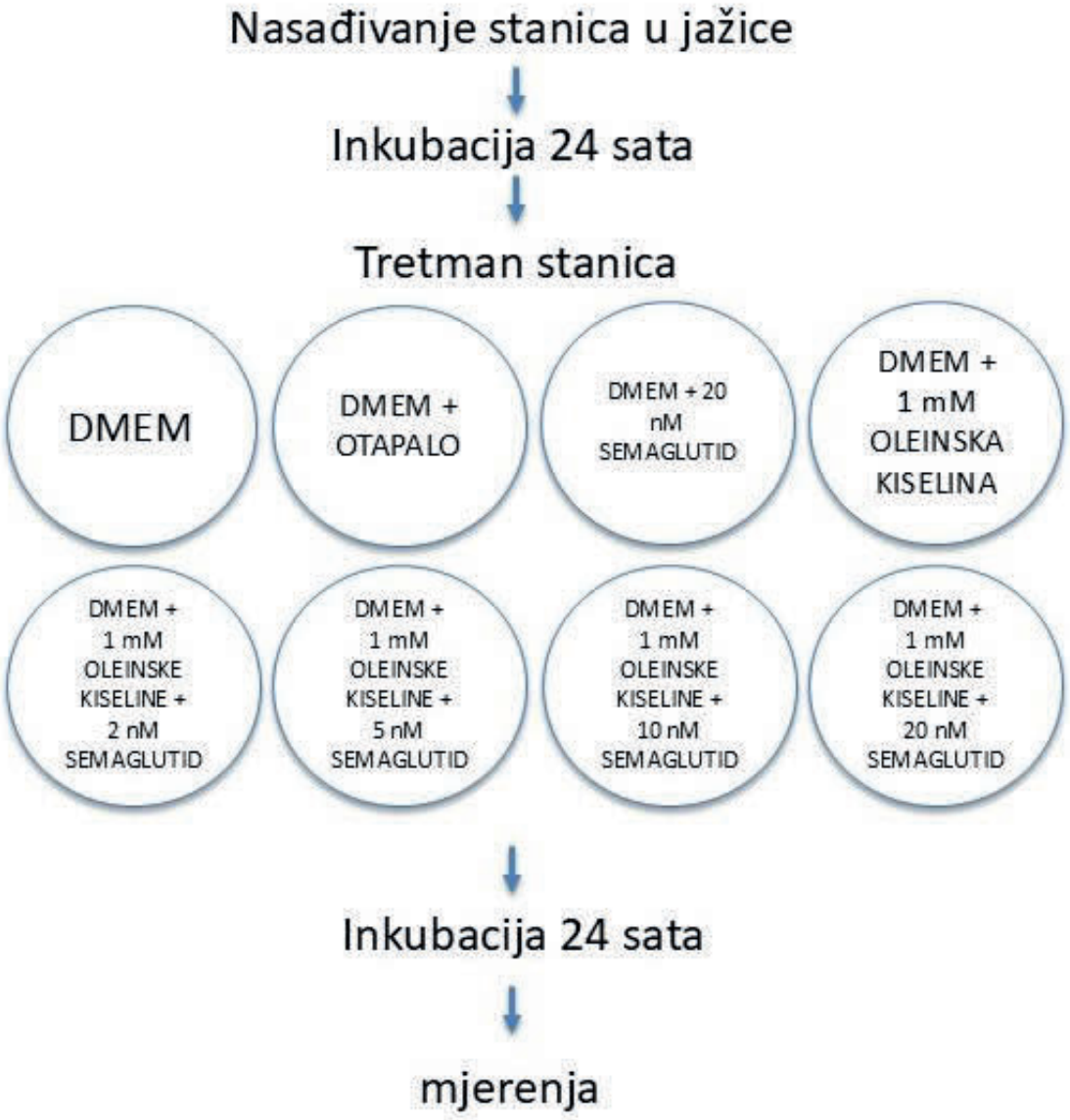
Nulti dan eksperimenta stanice su nasađene u opisanoj gustoći u pločice s 96 ili 6 jažica (ovisno o eksperimentu), u DMEM-u s 1 %-tnom otopinom penicilina i streptomicina. Nakon 24 sata inkubacije, u logaritamskoj fazi rasta HepG2 stanica, mikroskopski je utvrđena konfluencija od ~70 % te provedena indukcija 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 semaglutida po dozi, što odgovara molarnoj koncentraciji od 0,328 mM Na temelju poznate molekularne mase semaglutida (4113,58 g/mol), za pripremu 1 mL stock otopine 10 000 nM semaglutida, izmjereno je 30,45 µL Ozempica i razrijeđeno s 969,55 µL 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, 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 [95]. Stock i radna otopina oleinske kiseline (1 mM) pripremljena je na ranije opisani način. Odgovarajuća kontrola otapala sadržavala je 12 µL 70 %-tnog etanola, 8 µL FBS-a i 1980 µL DMEM-a. Za kontrolu semaglutida koristila se 20 nM koncentracija semaglutida u DMEM-u.

4.4.2. Tretman HepG2-stanica u terapijskom i preventivnom modelu

TERAPIJSKI MODEL

Za uspostavu terapijskog modela, 24 sata nakon nasađivanja stanica uklonjen je medij te su stanice istodobno tretirane otopinom oleinske kiseline kao patološkim induktorom i semaglutidom kao farmakoterapeutikom u koncentracijama od 2, 5, 10 i 20 nM u periodu od 24 sata. Kao kontrole koristile su se netretirane stanice u DMEM-u, kontrola otapala (stanice tretirane otapalom) te kontrola čistog semaglutida (stanice tretirane 20 nM semaglutidom). Stock i radna otopina oleinske kiseline (1 mM) pripremljena je na već opisani način. Nakon dodavanja tretmana stanice su ponovno inkubirane 24 sata, nakon čega su provedena mjerenja i analize. Navedeno je detaljno prikazano na Slici 4.

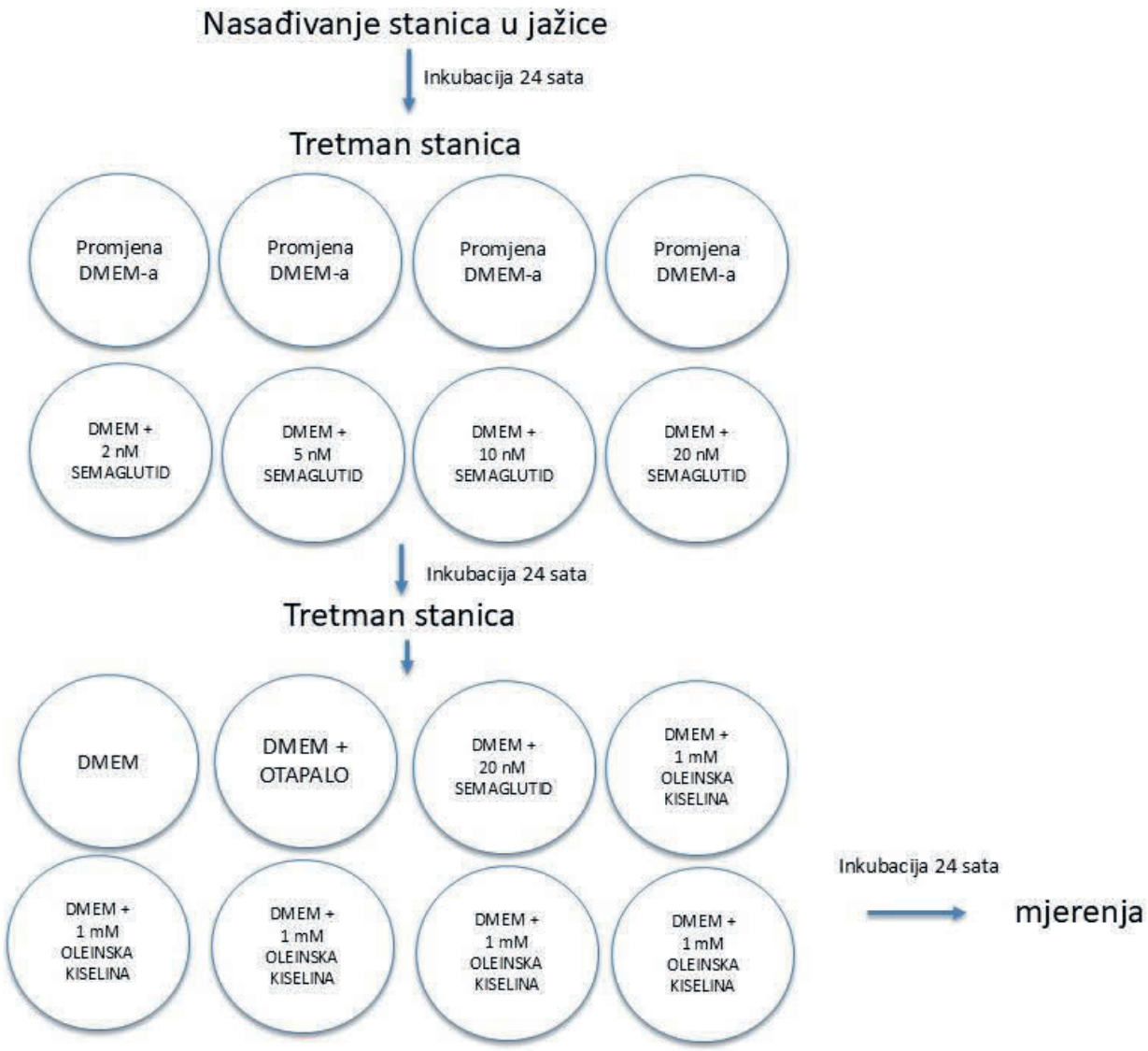
Ocjena rada u tijeku!



Slika 4. Tretman terapijskog modela MASLD-a.

PREVENTIVNI MODEL

Za uspostavu preventivnog modela, 24 sata nakon nasađivanja, stanice su najprije tretirane semaglutidom u koncentraciji od 2, 5, 10 i 20 nM te inkubirane 24 sata. Nakon toga uklonjen je medij/semaglutid i dodana je otopina 1 mM oleinske kiseline, a stanice su ponovno inkubirane 24 sata. Kao kontrole koristile su se netretirane stanice u DMEM-u, kontrola otapala (stanice tretirane otapalom) te kontrola čistog semaglutida (stanice tretirane 20 nM semaglutidom). Stock i radna otopina oleinske kiseline (1 mM) pripremljena je na već opisani način. Navedeno je detaljno prikazano na Slici 5.



Slika 5. Tretman preventivnog modela MASLD-a.

4.5. Mjerenje stanične vijabilnosti testom MTS

Mjerenje stanične vijabilnosti provedeno korištenjem MTS-om kako je već opisano. Vrijednosti apsorbancije proporcionalne su količini proizvedenog formazana, odnosno metaboličkoj aktivnosti HepG2 stanica. Vijabilnost stanica prikazna je kao postotak u odnosu na netretirane stanice kultivirane u DMEM-u: vijabilnost stanica (%) = (apsorbancija tretiranih stanica / apsorbancija stanica u DMEM-u) × 100.

4.6. Vizualizacija DNA stanica Hoechst bojom

) Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, SAD) bojenje korišteno je za vizualizaciju jezgara i kvalitativnu procjenu nuklearne morfologije.,Ova boja jenuklearni markerostanica 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. Nakon tretmana u mikropločama s 96 jažica, provedeno je bojenje jezgre pomoću Hoechst boje prema uputama proizvođača. Stock otopina pripremljena je otapanjem sadržaja jedne bočice (100 mg) u 10 mL deionizirane vode kako bi se dobila konačna koncentracija od 10 mg/mL (16,23 mM). Nadalje, pripremljena je radna otopina koncentracije 5 µg/mL razrjeđivanjem stock otopine 1:2000 u natrijevom fosfatnom puferu (PBS, engl. Sodium Phosphate Buffer, Sigma Aldrich, SAD). Medij je uklonjen iz svake jažice i dodana je radna otopina u volumenu 50 µL kako bi se stanice potpuno prekrile. Stanice su inkubirane 5-10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti. Nakon inkubacije, otopina za bojenje je uklonjena, a stanice su tri puta isprane PBS-om kako bi se uklonio višak boje.

Stanice su vizualizirane digitalnim mikroskopom EVOS M3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) uporabom objektiva povećanja 10 × i funkcije *Overlay*. Ovom su funkcijom u sklopu iste akvizicije prikazane stanice u načinu propuštenog svjetla (*brightfield)* i fluorescentni prikaz Hoechstom obojenih jezgara uporabom DAPI Light Cube AMEP4950, s ekscitacijskim rasponom 357/44 nm i emisijskim rasponom 447/60 nm, kao jedinstvena preklopljena slika. Sve su skupine snimane uz jednake akvizicijske postavke.

Nuklearna morfologija procijenjena je kvalitativnom analizom raspodjele i intenziteta plave fluorescencije te oblika jezgara. Jezgre pravilnog, uglavnom okruglog oblika i homogene fluorescencije smatrane su jezgrama bez izraženih morfoloških promjena. Intenzivno fluorescentne, kondenzirane jezgre smatrane su morfološki

Ocjena rada u tijeku!

promijenjenima, nalik apoptotskom fenotipom. S obzirom na to da bojanje Hoechstom samo po sebi nije specifična metoda za dokazivanje apoptoze, nalazi su korišteni isključivo kao kvalitativni pokazatelji promjena stanične morfologije.

4.7. Mjerenje učinaka semaglutida na nakupljanje lipida

Kvalitativna analiza i kvantifikacija akumulacije lipida u HepG2 stanicama provedena je bojenjem Oil Red O bojom [96]. 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 filtrirana kroz filter papir veličine pora 11 µm čuvana na sobnoj temperaturi do primjene.

Nakon provedenog tretmana, stanice su isprane PBS-om, 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 vizualizirane su digitalnim mikroskopom EVOS M3000 (Thermo Fisher Scientific, SAD) u načinu propuštenog svjetla, uporabom objektiva povećanja 10×. Za svaku jažicu snimljeno je 3 nepreklapajućih vidnih polja. Sve eksperimentalne skupine snimljene su uz jednake postavke osvjetljenja, ekspozicije i kontrasta.

Nakon vizualizacije, za kvantifikaciju prema dostupnom protokolu [96], boja Oil Red O vezana za unutarstanične lipide ekstrahirana je dodatkom 1 mL izopropilnog alkohola u svaku jažicu. Pločice su inkubirane 5 minuta kako bi se boja otopila, nakon čega je dobiveni ekstrakt centrifugiran 1 minutu pri 2300 × *g* radi uklanjanja staničnih ostataka. Potom je 100 µL bistrog supernatanta preneseno u pločicu s 96 jažica, a apsorbancija je izmjerena pri valnoj duljini od 490 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Izmjerena apsorbancija bila je proporcionalna količini unutarstaničnih lipida obojenih bojom Oil Red O. Razina lipida prikazna je kao postotak u odnosu na netretirane

Ocjena rada u tijeku!

stanice kultivirane u DMEM-u, prema formuli: razina lipida (uzorak) (%) = (apsorbancija tretiranih stanica / apsorbancija stanica u DMEM-u) × 100. Podaci su normalizirani paralelno provedenim MTS testom.

4.8. 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 uputama proizvođača. Metoda se temelji na reakciji:

$$\text{Trigliceridi} + H_2O \xrightarrow{\text{lipaza}} \text{glicerol} + \text{slobodne masne kiseline}$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \overset{\text{GK}}{\rightleftarrows} \text{glicerol-3-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicerol-3-fosfat} + O_2 \overset{\text{GPO}}{\rightleftarrows} \text{dihidroksiaceton-fosfat} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{4-aminoantipirin} + \text{4-klorofenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{kinonimin} + 4\,H_2O$$

(GK = glicerol-kinaza; GPO = glicerol-3-fosfat oksidaza; POD = peroksidaza)

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. Razina triglicerida prikazna je kao postotak u odnosu na netretirane stanice kultivirane u DMEM-u, prema formuli: razina triglicerida (uzorak) (%) = (apsorbancija tretiranih stanica / apsorbancija stanica u DMEM-u) × 100. Podaci su normalizirani paralelno provedenim MTS testom.

4.9. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u stanicama.

Koncentracija GSH u lizatima stanične kulture odredila se korištenjem Glutation 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 × *g*. Supernatant je otpipetiran, a iz tubica je otpipetirano 40 uL

Ocjena rada u tijeku!

staničnog taloga koji je prebačen u mikrotubicu, u koju je dodano je 5%-tne otopine 5-sulfosalicilne kiseline (SSK) u omjeru 3:1 (SSA:talog stanica). SSK je ključna za denaturaciju proteina iz uzorka uz ekstrakciju i stabilizaciju GSH. Stanična suspenzija je zatim podvrgnuta dvama ciklusima smrzavanja i odmrzavanja pomoću tekućeg dušika i termalnog *shakera* na 37 °C, nakon čega je slijedila 5-minutna inkubacija na 2 – 8 °C. Stanični lizat je centrifugiran na 10000 × *g* tijekom 10 minuta kako bi se uklonili istaloženi proteini. Dobiveni supernatant korišten je kao uzorak staničnog lizata za ispitivanje koncentracije ukupnog glutationa. Stock i radne otopine reagensa, pripremljene su prema uputama proizvođača te se dobila reakcijska otopina opisana u Tablici 5.

Tablica 5. Koncentracije komponenti u reakcijskoj otopini. .

Komponenta	Konačna koncentracija
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0	95 mM
EDTA	0,95 mM
DTNB (5,5′-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina, Ellmanov reagens)	0,031 mg/mL
Glutation reduktaza	0,115 U/mL

U mikropločicama s 96 jažica, multikanalnom pipetom dodano je 10 µL supernatanta i 150 µL reakcijske otopine. 5 % otopina 5-sulfosalicilne kiseline služila je kao slijepa proba (*blank)*, a pripremljena GSH standard otopina kao standard.Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodano 50 µL razrijeđene otopine NADPH te ponovno izmiješano pipetiranjem. Apsorbancija je zatim očitana spektrofotometrijski pomoću čitača mikropločica pri 415 nm. Iz vrijednosti dobivenih čitačem izračunate su koncentracije glutationa u nmol/mL koristeći formulu: nmol/mL (GSH) = ΔA (uzorak) / (ΔA/(standard) × volumen).

Ocjena rada u tijeku!

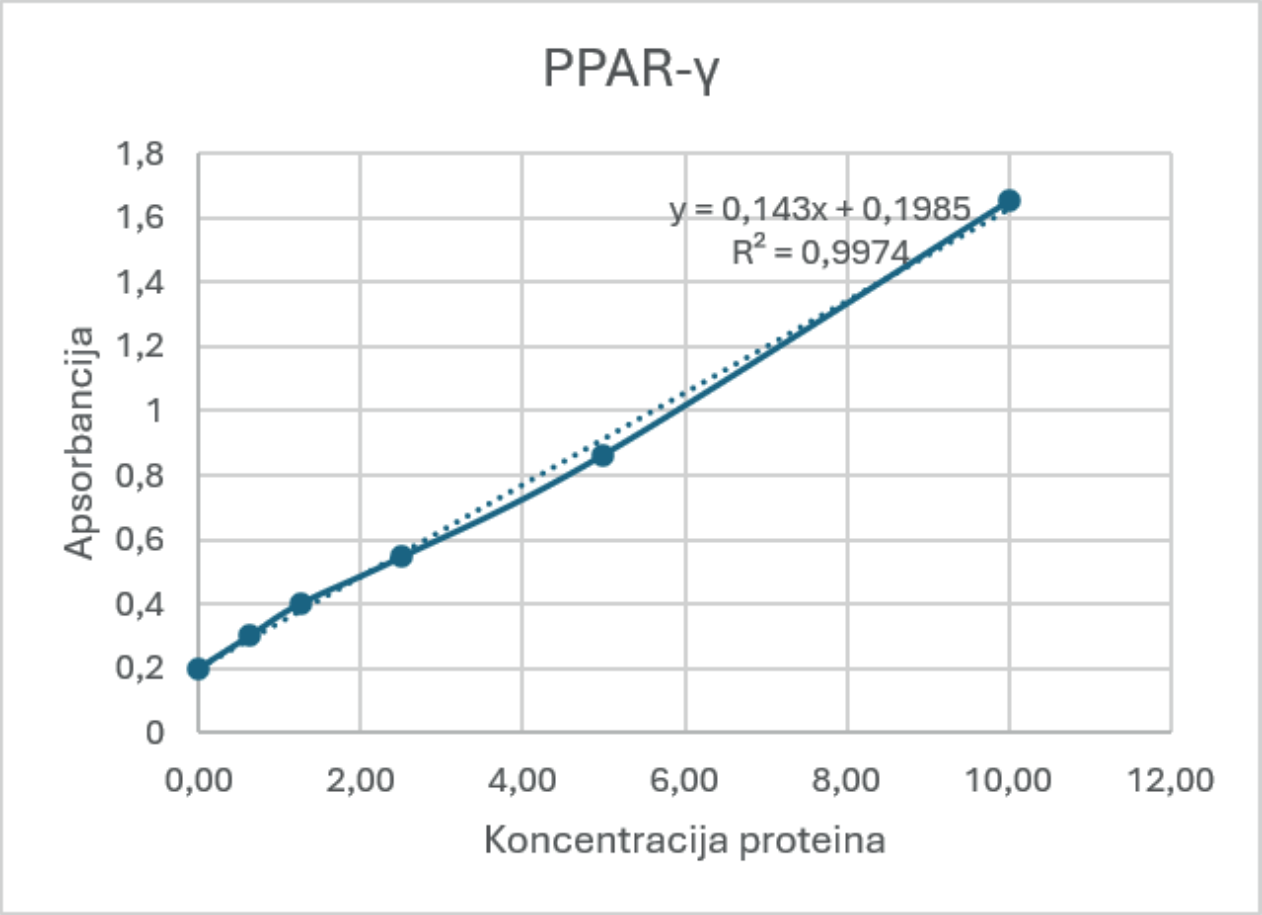
4.10. Određivanje razine proteina uključenih u patofiziologiji MASLD-a

Razina proteina odredila se koristeći enzimsko-imunokemijsku metodu (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA), komercijalno dostupnim kompletima kemikalija Human PPAR-alpha ELISA Kit, Human PPAR-gamma ELISA Kit, Human MTTP ELISA Kit, Human TGF-beta, Human TNF-alpha (ELK Biotechnology, SAD).

Nakon provedenog tretmana u mikropločicama sa 6 jažica, stanični lizati pripremili su se prema uputama proizvođača, metodom zamrzavanja i otapanja. Stanice u jažicama su isprane PBS-om, sakupljene struganjem, a dobiveni talog je centrifugiran na 1000 × *g* (5 min), ispran i resuspendiran u PBS-u. Za postizanje jednake koncentracije stanica u uzorcima, korišteno je opisano bojenje Eritrozinom B i brojanje u Neubauerovoj komorici te razrjeđenje do jednakih koncentracija. Stanični lizat dobiven je ponovljenim ciklusima smrzavanja i odmrzavanja – 5 ciklusa zamrzavanja na -80°C (15 min) i odmrzavanja u inkubatoru (15 min) na temperaturi 37 °C. Lizati su zatim centrifugirani na 1500 × *g* tijekom 10 minuta na 4 °C kako bi se uklonili stanični ostaci te je stanični lizat resuspendiran u PBS-u za određivanje razine proteina prema uputama proizvođača.Uzorci su dodani u mikropločice s 96 jažica, koje su komponenta seta kemikalija, a obložene su specifičnim protutijelom koja se selektivno vežu za ciljani antigen iz dodanih uzoraka i standarda. Nakon inkubacije i uklanjanja nevezanih komponenti ispiranjem, u jažice je dodano protutijelo konjugirano s biotinom, koje se specifično vezalo na antigena, čime je formiran imunokompleks. Potom je dodan konjugat streptavidina i enzima hrenove peroksidaze (HRP), pri čemu se streptavidin vezao za biotin. Enzimska reakcija inicirana je dodavanjem kromogenog supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), koji pod katalitičkim djelovanjem HRP-a oksidira i razvija plavu boju čiji je intenzitet razmjeran koncentraciji proteina u uzorku. Reakcija je prekinuta dodavanjem stop-reagensa. Apsorbancija se mjerila korištenjem čitača mikropločica na valnoj duljini od 450 nm. Koncentracije u ng/mL (PPAR-γ, PPAR-α, MTTP) ili pg/mL (TGF-β, TNF) su izračunate pomoću standardnu krivulje.

Za svaki je standard, kontrolu i uzorak izračuna srednja vrijednost, od koje je oduzeta srednja vrijednost apsorbancije slijepe probe. Standardna krivulja konstruirana je na temelju korigiranih srednjih vrijednosti apsorbancije standarda poznatih koncentracija, pri čemu je apsorbancija prikazana na osi y, a koncentracija proteina na osi x, u skladu s uputama proizvođača (Slika 6).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 6. Standardna krivulja za PPAR-γ.

4.11. Određivanje razine ekspresije gena uključenih u patofiziologiju MASLD-a

4.11.1. Izdvajanje 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 NuceloZOL-a. Stanice su se pažljivo odlijepile strugačem stanica te prikupile u mikrotubicu od 2 mL. Dodano je 400 µL 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. Jedan mL supernatanta koji sadrži

Ocjenski u tijeku

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 u 400 µL vode bez RNaza (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon završenog protokola izolacije, izmjerena je koncentracija RNA i čistoća uzoraka pomoću nanofotometra (Implen, Njemačka).

Kako bi se uklonilo eventualno prisutne, kontaminirajuće molekule genomske DNA, ukupna RNA izložena je djelovanju enzima DNAze, korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija RQ1 RNase-Free DNase (Promega, SAD), prema uputama proizvođača.

Uvijek se pročišćavala jednaka količina RNA (1 mikrogram; 125 ng/µL), kojoj je dodan 1 µL 10X DNaza reakcijskog pufera i 1 µl enzima DNAza. Uzorak je inkubiran 30 minuta na 37°C., nakon čega je dodan 1 µl otopine RQ1 DNase Stop Solution, s kojom je uzorak inkubiran 10 minuta na 65°C. Konačna koncentracija pročišćenih uzoraka bila je 90-92 ng/µL.

4.11.2. 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 (50 U/µL)
Inhibitor RNaza	1 µL (20 U/µL)
Voda bez RNAza	2,2 µL
Ukupni volumen otopine	9 uL

Ocjena rada u tijeku

Zatim je 9 µL pripremljene reakcijske otopine pipetirano u PCR tubice u kojiima se nalazilo 11 µl prethodno pročišćenog uzorka, sve je promješano pipetiranjem te lagano centrifugirano. Postavke za reverznu transkriptazu opisane su u Tablici 7. Reakcijska otopina i pipetiranje otopine je rađeno koristeći prethodno ohlađeni (-20 stupnjeva) stalak za PCR tubice.

Tablica 7. Uvjeti provođenja reakcije reverzne transkripcije

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

4.11.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* Real-Time Polymerase Chain Reaction, qPCR) provedena je korištenjem uređaja QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, Inc., SAD) i ORA™ qPCR Green ROX L Mix reagensa (highQu GmbH, Njemačka), pri čemu je fluorescencija detektirana u SYBR Green kanalu. 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. Odabir i dizajn početnica provedeni su korištenjem NCBI Primer-BLAST programa.

Tablica 8. Početnice za qPCR analizu.

Gen	Simbol	**Forward (F) primer**	**Reverse (R) primer**	**Veličina odsječka**
Beta - Actin	ACTB	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	135 bp
PPAR gama	PPARG	AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG	152 bp
PPAR alfa	PPARA	AACCCATGACACCCTCGTCTA	CAAGCTACTGTCCTGGGCTT	139 bp
MTTP	MTTP	AGGCTGTCAGAAACTTCCTGGC	GTCTGAGCAGAGGTGACAGCAT	133 bp
TNF	TNF	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC	135 bp

Ocjena rada u tijeku!

TGF beta 1	TGFB1	TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC	GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA	122 bp

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 nM (*ACTB, PPARG, PPARA, MTTP*); 400 nM (*TNF, TGFB1*)	0,3-0,4
Reverse početnica	Konačna koncentracija 300 nM (*ACTB, PPARG, PPARA, MTTP*); 400 nM (*TNF, TGFB1*)	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 treshold). Ct vrijednost je ključna za izračunavanje relativne promjene ekspresije gena korištenjem metode 2^−ΔΔCt[97]. Za ovu metodu potreban je gen kućepazitelj (*housekeeping gen*) kao referentni gen, a u ovom eksperimentu korišten je *β-aktin*. Relativna ekspresija gena izračunata je metodom 2^−ΔΔCt. Najprije su izračunate

Ocjena rada u tijeku!

prosječne Ct vrijednosti mjerenja, nakon čega je Ct vrijednost svakoga gena od interesa normalizirana prema Ct vrijednosti β-aktina:

$$\Delta Ct_{\text{uzorak}} = Ct_{\text{gen od interesa}} - Ct_{\beta-\text{ aktin}}$$

Srednja vrijednost ΔCt stanica kultiviranih u DMEM-u primijenjena je kao kalibrator za izračun ΔΔCt:

$$\Delta\Delta Ct_{\text{uzorak}} = \Delta Ct_{\text{uzorak}} - \overline{\Delta Ct}_{\text{DMEM}}$$

Relativna promjena ekspresije gena izračunata je prema formuli:

$$\text{Relativna ekspresija gena} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

dobivene vrijednosti prikazuju relativnu promjenu ekspresije gena u tretiranim stanicama u odnosu na stanice kultivirane u DMEM-u.

4.12. Statističke metode

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 i više nezavisnih skupina testirale su se jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), u ovisnosti o normalnosti raspodjele (uz *post hoc* test Tukey-Kramer) Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirala 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 nezavisnih skupina testirale su se jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz post hoc Tukey-Kramerov test ili odgovarajućim neparametarskim inačicama, ovisno o distribuciji podataka [98]. Sve P-vrijednosti su dvostrane, a razina značajnosti postavljena je na α = 0,05. Eksperimenti su provedeni u minimalno tri biološka replikata s minimalno 3 tehnička replikata. Rezultati su grafički prikazani stupčastim dijagramima koji prikazuju aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju (SD). Broj prikazanih mjerenja unutar

Ocjena rada
U tijeku!

skupina u pravilu je iznosio n = 3, dok je u iznimnim slučajevima, zbog isključenja stršećih vrijednosti (engl. *outlier*), u pojedinim skupinama iznosio n = 2. Statistički značajne razlike među skupinama na grafovima su označene zvjezdicama (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001). Za statističku analizu i grafički prikaz podataka koristio se statistički paket GraphPad Prism® verzija 11.0.2 (GraphPad Software, Boston, MA, USA; graphpad.com). Izvješće o provedenom istraživanju načinilo se prema smjernicama za izvještavanje rezultata istraživanja u biomedicini i zdravstvu [99].

Ocjena rada u tijeku!

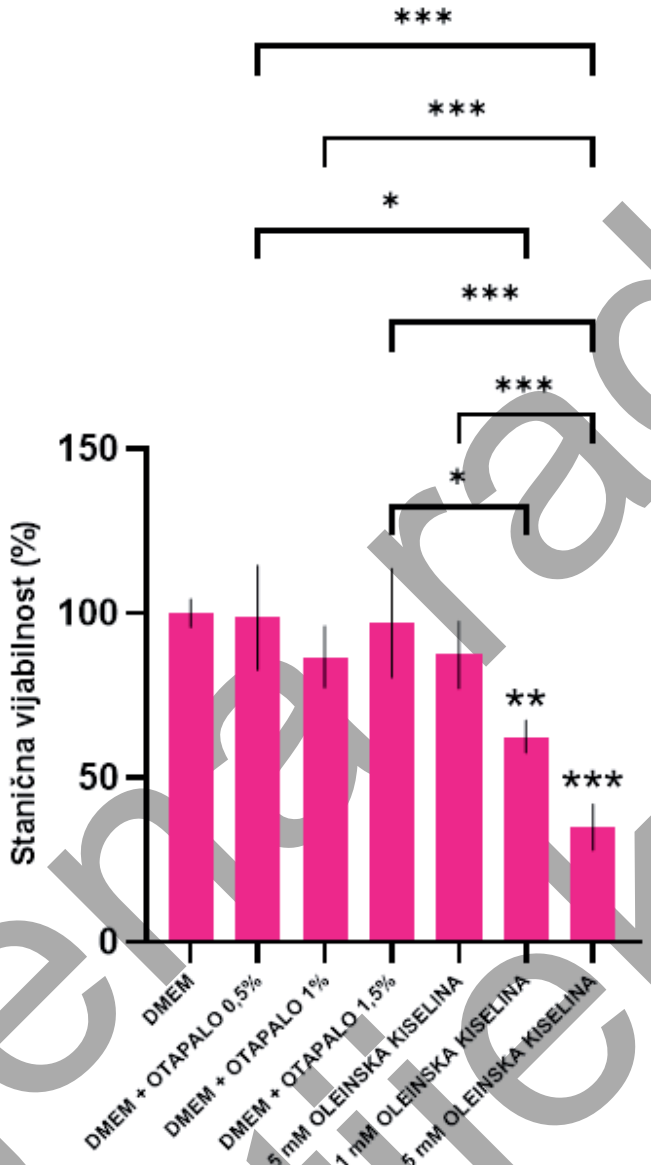
5. Rezultati

5.1. Procjena učinka semaglutida u terapijskom modelu MASLD-a

5.1.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost MTS-om u terapijskom modelu

Vijabilnost stanica nakon tretmana različitim koncentracijama otapala nije se statistički značajno razlikovala od netretiranih stanica, što upućuje na to da samo otapalo nije značajno utjecalo na vijabilnost stanica. Tretman 0,5 mM oleinskom kiselinom nije značajno promijenio vijabilnost stanica u odnosu na DMEM, dok su koncentracije od 1 mM i 1,5 mM dovele do njezina značajnog smanjenja ($P < 0,01$ i $P < 0,001$). Najizraženije smanjenje zabilježeno je pri koncentraciji od 1,5 mM oleinske kiseline. S obzirom na to da je tretman 1 mM oleinskom kiselinom doveo do približno 60 % vijabilnosti stanica u odnosu na DMEM, uz istodobno očuvanje dovoljnog broja vijabilnih stanica za daljnje analize, ta je koncentracija odabrana za uspostavu *in vitro* modela MASLD-a (Slika 7).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 7. Učinci različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao postotak stanične vijabilnosti u odnosu na grupu DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

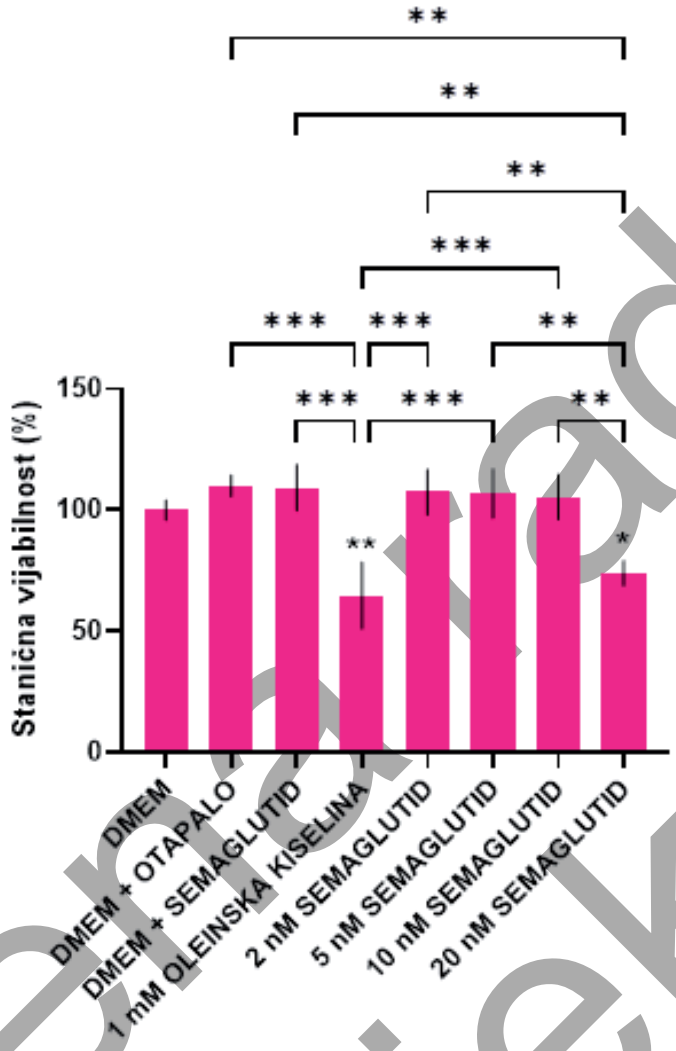
Ocjena rada u tijeku!

5.1.2. Procjena učinka semaglutida na staničnu vijabilnost u terapijskom modelu MASLD-a

Procjena stanične vijabilnosti MTS-om

Između netretiranih stanica, stanica tretiranih otapalom i stanica tretiranih čistim semaglutidom, nije uočena statistički značajna razlika, što upućuje na to da semaglutid i otapalo samostalno nisu značajno utjecali na staničnu vijabilnost. Tretman 1 mM oleinskom kiselinom doveo je do statistički značajnog smanjenja vijabilnosti stanica u odnosu na netretirane stanice u DMEM-u i stanice u otapalu ($P < 0,01$ i $P < 0,001$), što ukazuje na samostalni citotoksični učinak oleinske kiseline. U terapijskim skupinama, tretman stanicama semaglutidom u koncentracijama od 2 nM, 5 nM i 10 nM doveo je do statistički značajno više vijabilnosti stanica u usporedbi sa skupinom tretiranom samo oleinskom kiselinom ($P < 0,001$), što upućuje na protektivni učinak semaglutida pri nižim koncentracijama. Međutim, pri koncentraciji od 20 nM nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na skupinu tretiranu samo oleinskom kiselinom. Također, vijabilnost stanica tretiranih s 20 nM semaglutida bilo je statistički značajno niže u odnosu na DMEM ($P < 0,05$) (Slika 8).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 8. Učinci semaglutida na staničnu vijabilnost u terapijskom modelu MASLD-a

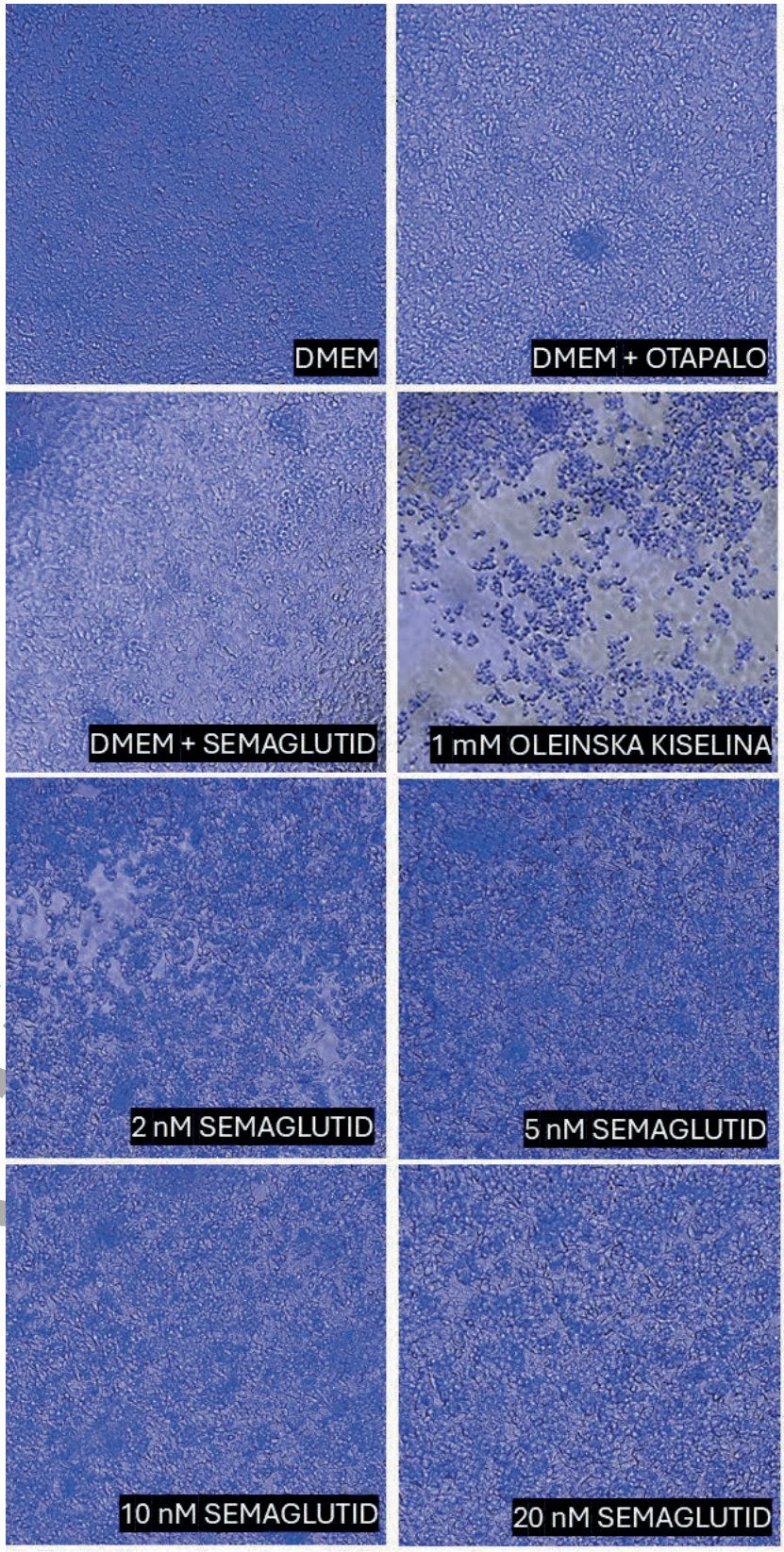
Podaci su prikazani kao postotak stanične vijabilnosti u odnosu na grupu DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjenska rada u tijeku!

Procjena stanične vijabilnosti Hoechst-bojenjem

Hoechst-bojenjem pokazana je uredna morfologija jezgara i ravnomjerna raspodjela fluorescentnog signala u kontrolnim stanicama u DMEM-u, stanicama izloženim otapalu, odnosno semaglutidu. U skupini tretiranoj oleinskom kiselinom uočena je smanjena vijabilnost u odnosu na kontrolne skupine. U terapijskim skupinama, pri tretmanu semaglutidom vidljiv je veći broj stanica u odnosu na stanice izložene oleinskoj kiselini, osobito pri koncentracijama 2, 5 i 10 nM. Međutim, pri ovim koncentracijama semaglutida i prisutne su nakupine stanica s intenzivnijim Hoechst signalom što ukazuje na kondenzacijom kromatina, odnosno prisutnost apoptotičnih promjena. Intenzivniji Hoechst signal može biti u skladu s kondenzacijom kromatina, odnosno prisutnosti apoptotičnih promjena, ali samo Hoechst-bojenje ne dokazuje apoptozu niti omogućuje kvantitativnu procjenu vijabilnosti (Slika 9).

Ocjena rada u tijeku!

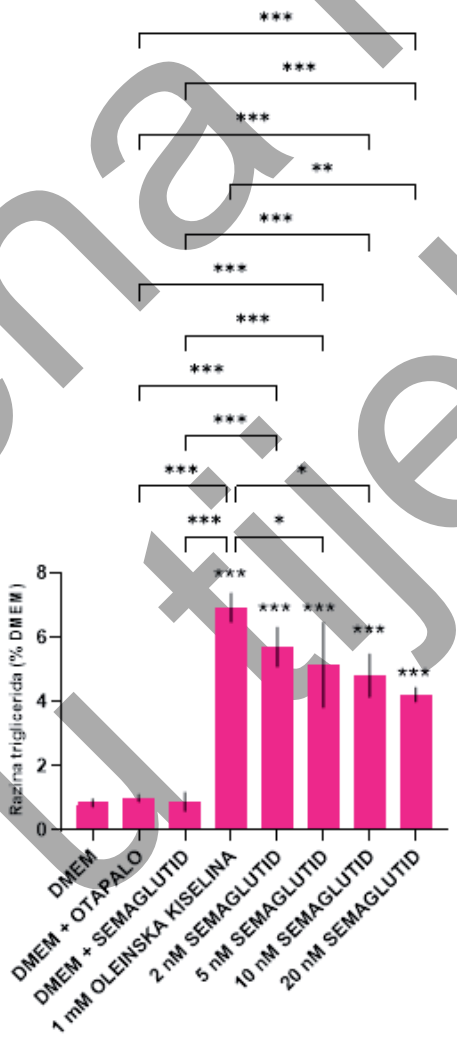


Slika 9. Kvalitativni prikaz flourescentne mikroskopije Hoechst-bojenja HepG2 stanica u terapijskom modelu.

Invitrogen™ EVOS™ M3000, povećanje: 10 ×.

5.1.3. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida GPO-PAP testom

Nisu uočene značajne razlike između netretiranih stanica, stanica tretiranih otapalom i stanica tretiranih čistim semaglutidom, što potvrđuje da ni otapalo ni semaglutid u koncentraciji 20 nM nisu utjecali na promjene koncentracije staničnih triglicerida. Tretman oleinskom kiselinom statistički značajno je povećao koncentraciju triglicerida u usporedbi sa svim kontrolnim skupinama (P < 0,001). Semaglutid statistički je značajno smanjio koncentraciju triglicerida u koncentracijama 5 nM i 10 nM (P < 0,05) te u koncentracji 20 nM (P < 0,01) u usporedbi sa stanicama tretiranom samo oleinskom kiselinom što ukazuje na način ovisan o dozi semaglutida (Slika 10).



Slika 10. Učinci semaglutida na razinu triglicerida u terapijskom modelu MASLD-a.

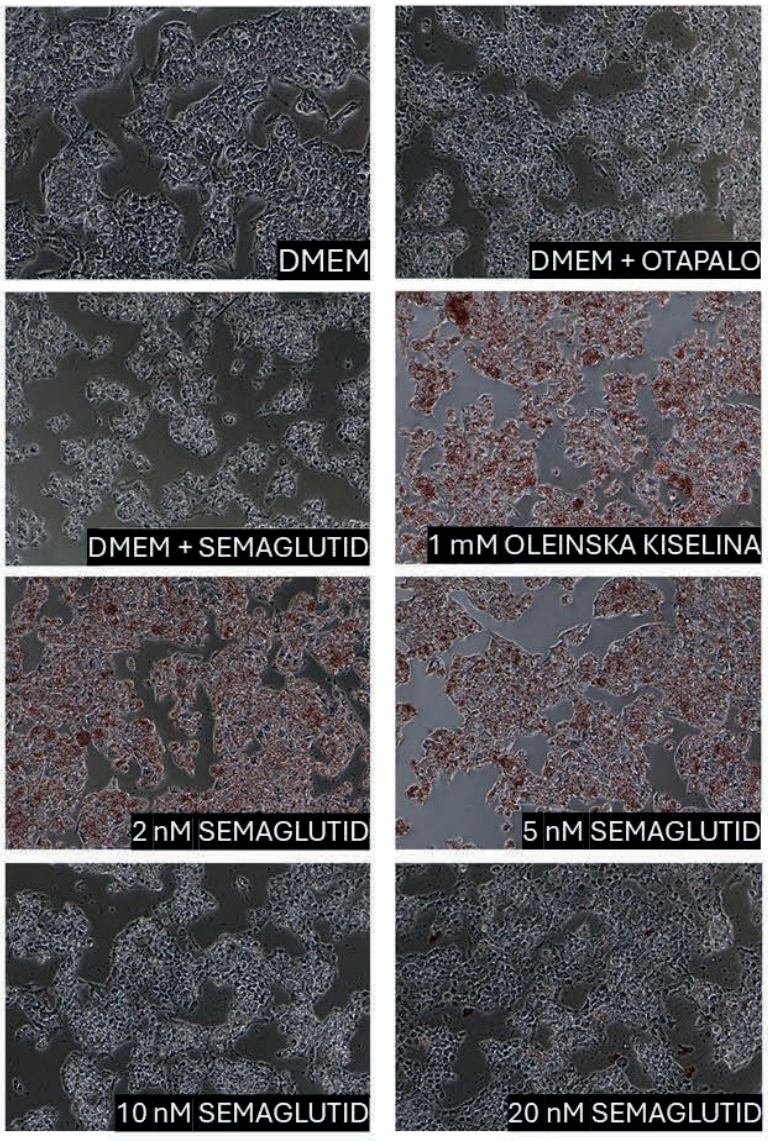
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost postotka razine triglicerida u odnosu na grupu DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

5.1.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem

Mikroskopska analiza nakupljanja lipida ORO bojenjem

U skupinama tretiranim oleinskom kiselinom i semaglutidom u koncentraciji 2 nM, 5 nM vidljive su intenzivnije nakupine crveno obojanih lipida u odnosu na ostale grupe (Slika 11).



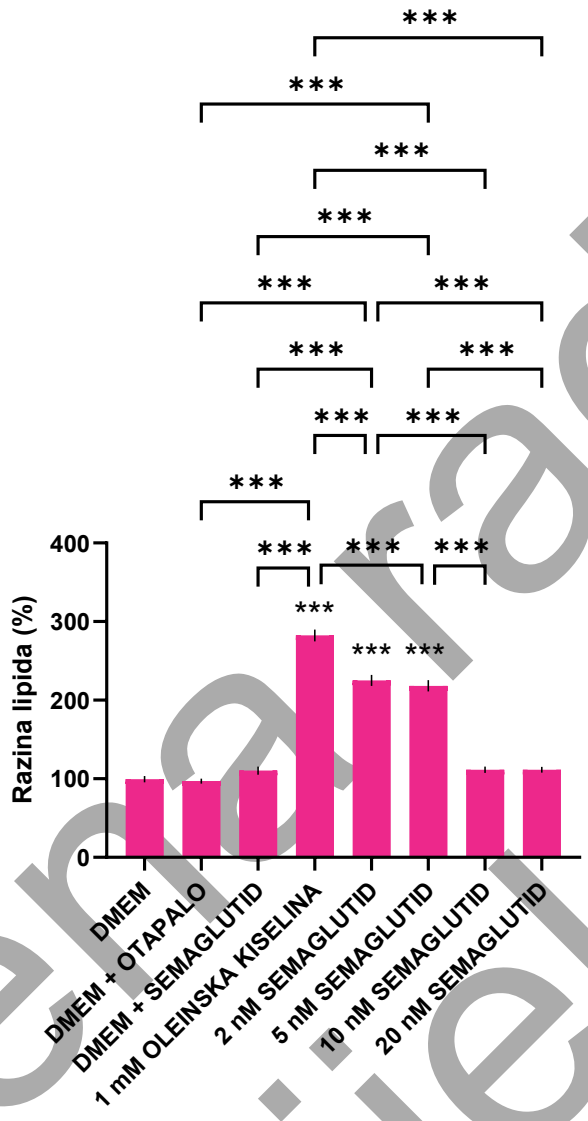
Slika 11. Svjetlosna mikroskopija HepG2 stanica obojenih ORO bojom u terapijskom modelu MASLD-a. *Invitrogen™ EVOS™ M3000, povećanje: 10 ×.*

Očitanica!

Procjena nakupljanja lipida kvantifikacijom ORO-boje

Kvantifikacijom ORO-boje utvrđeno je statistički značajno povećanje razine unutarstaničnih lipida u stanicama tretiranima 1 mM oleinskom kiselinom u odnosu na stanice uzgajane u DMEM-u i stanice tretirane otapalom ($P < 0,001$), čime je kvantitativno potvrđeno nakupljanje lipida izazvano oleinskom kiselinom, bez učinka otapala. Razina lipida u stanicama tretiranima samo semaglutidom također se nije značajno razlikovala od DMEM kontrole, što pokazuje da semaglutid samostalno nije utjecao na bazalno nakupljanje lipida. Tretman semaglutidom u koncentraciji 2 nM i 5 nM) doveo je do statistički značajnog smanjenja razine unutarstaničnih lipida u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom ($P < 0,001$). Pri koncentracijama semaglutida od 10 i 20 nM razina lipida nije se značajno razlikovala od vrijednosti zabilježenih u stanicama u kontrolnim skupinama, dok je u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom bila značajno niža ($P < 0,001$). Razina unutarstaničnih lipida bila je značajno niža nakon tretmana s 10 i 20 nM nego nakon tretmana s 2 i 5 nM semaglutida ($P < 0,001$), što upućuje na učinak ovisan o koncentraciji semaglutida (Slika 12).

Ocjena rada u tijeku!



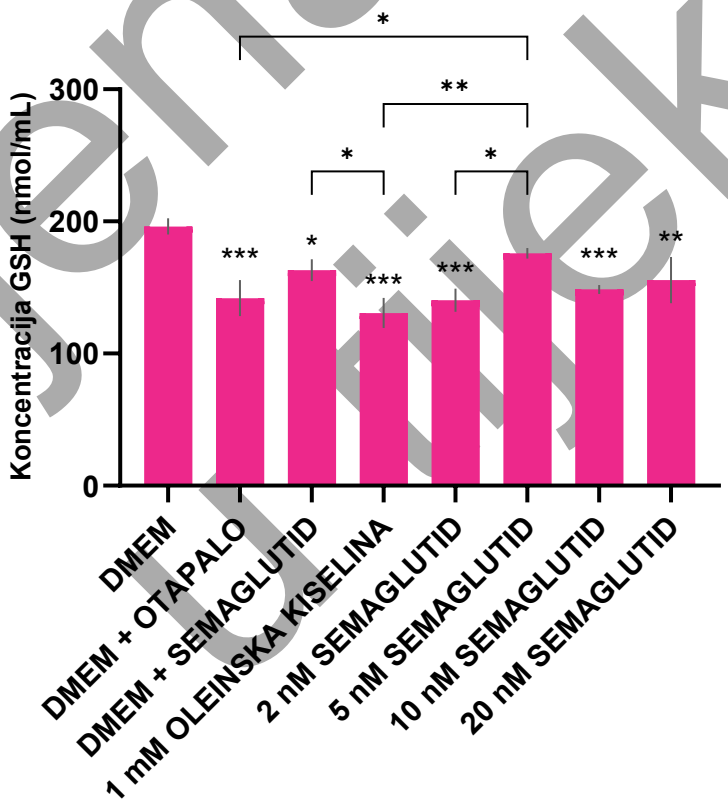
Slika 12. Učinci semaglutida na razinu unutarstaničnih lipida u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost postotka razine lipida u odnosu na DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

5.1.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH

Razina GSH bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranim otapalom, u usporedbi s DMEM ($P < 0,001$), što pokazuje da otapalo doprinosi smanjenju GSH, a kontrola semaglutide također je pokazala niže vrijednosti GSH u odnosu na DMEM ($P < 0,05$). Tretman oleinskom kiselinom doveo je do značajnog smanjenja razine GSH u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,001$), ali ne i u odnosu na stanice u otapalu. Semaglutid je statistički značajno povećao razinu GSH pri koncentraciji od 5 nM u usporedbi sa skupinom tretiranom samo oleinskom kiselinom ($P < 0,01$). Pri ostalim koncentracijama (2, 10 i 20 nM) nije uočena statistički značajna razlika. Promjene koncentracije GSH ne mogu se jasno pripisati oleinskoj kiselini zbog učinka otapala, ali učinci semaglutida pokazuju trend povećanja GSH u odnosu na oleinsku kiselinu, statistički značajno samo u koncentraciji 5 nM (Slika 13).



Slika 13. Učinci semaglutida na koncentraciju GSH u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracija GSH ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

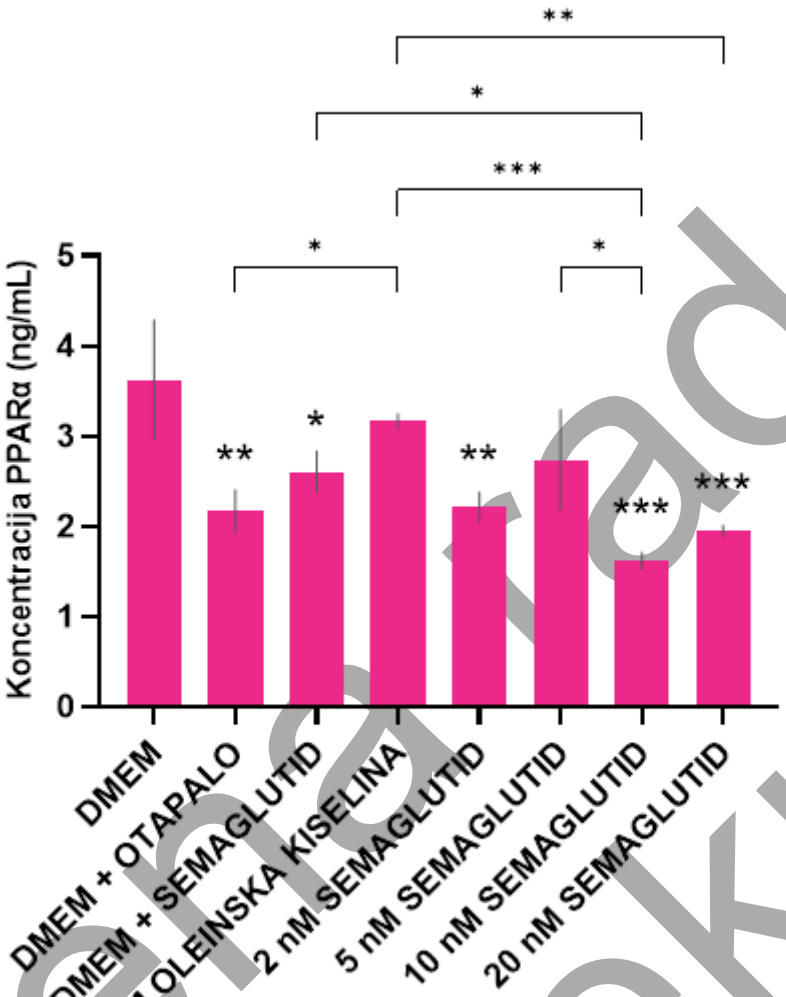
Ocjena rada u tijeku!

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

Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-α

Razina proteina PPAR-α bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranima otapalom u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,01$). Stanice tretirane semaglutidom također su pokazale nižu razinu PPAR-α u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,05$), što ukazuje na učinak otapala i semaglutida na bazalne razine proteina. Tretman oleinskom kiselinom nije statistički značajno promijenio razinu PPAR-α u odnosu na netretirane stanice, ali je razina PPAR-α bila statistički značajno viša u usporedbi sa stanicama tretiranima otapalom ($P < 0,05$), što upućuje na samostalni učinak oleinske kiselin. U terapijskom modelu razina PPAR-α bila je statistički značajno niža pri koncentracijama semaglutida od 10 nM ($P < 0,001$) i 20 nM ($P < 0,01$) u usporedbi sa stanicama tretiranima samo oleinskom kiselinom, dok pri koncentracijama od 2 nM i 5 nM nije uočena statistički značajna razlika. Također, razina PPAR-α pri 10 nM bila je značajno niža u odnosu na 5 nM ($P < 0,05$). Iako su stanice tretirane otapalom i samo semaglutidom pokazale nižu koncentraciju proteina, u usporedbi sa stanicama tretiranima oleinskom kiselinom, koja uključuje istu komponentu otapala, trend pada razina proteina PPAR-α vidljiv je i statistički značajno niži pri koncentracijama semaglutida od 10 nM ($P < 0,001$) i 20 nM ($P < 0,01$), što upućuje na dodatni učinak semaglutida u terapijskom modelu (Slika 14).

Ocjena rada u tijeku!



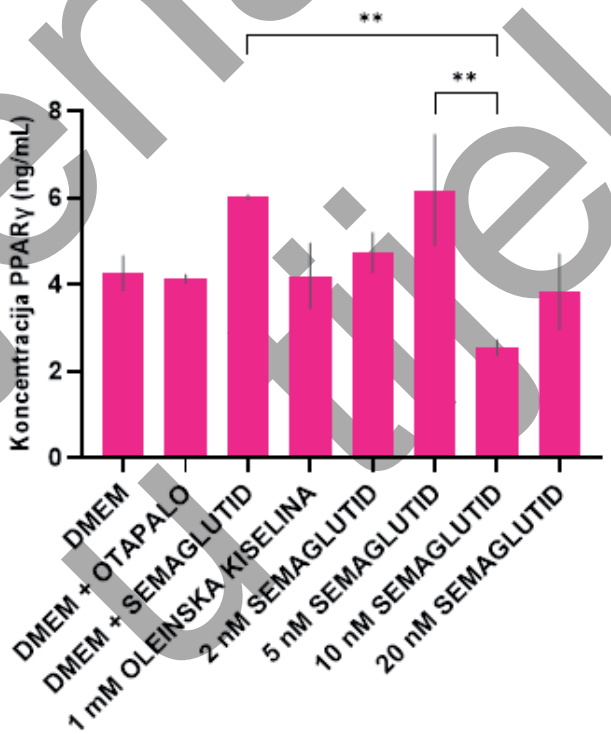
Slika 14. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-α u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ

Razina proteina PPAR-γ nije se statistički značajno razlikovala između stanica tretiranih otapalom i netretiranih stanica, što ukazuje da samo otapalo nije imalo značajan učinak na bazalnu razinu proteina. Stanice tretirane semaglutidom također nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, što upućuje na izostanak značajnog učinka samog semaglutida na bazalne vrijednosti. Tretman oleinskom kiselinom nije statistički značajno promijenio razinu proteina u odnosu na netretirane stanice niti u odnosu na stanice tretirane otapalom. U terapijskim skupinama, razina proteina PPAR-γ nije se statistički značajno razlikovala između stanica tretiranih samo oleinskom kiselinom i stanica tretiranih semaglutidom. Međutim, uočen je specifičan trend rasta razina PPAR-γ pri koncentraciji 2 i 5 nM, i pada pri višim koncentracijama u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom, no bez statističke značajnosti (Slika 15).



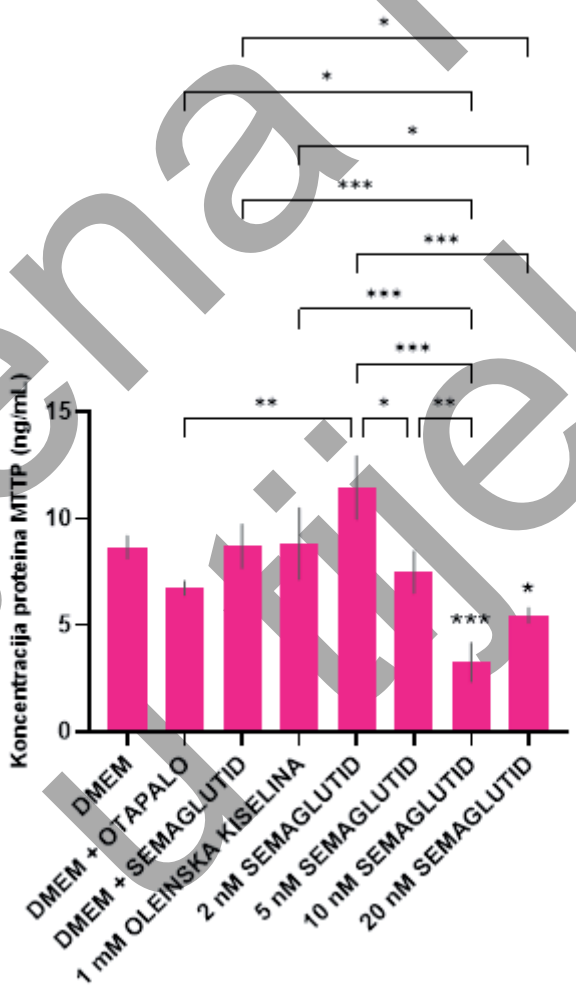
Slika 15. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina MTTP

Razina proteina u stanicama tretiranima otapalom nije se statistički značajno razlikovala od razine u netretiranim stanicama, što pokazuje da samo otapalo nije značajno utjecalo na bazalnu koncentraciju proteina, kao ni čisti semaglutid. Tretman 1 mM oleinskom kiselinom nije značajno promijenio razinu proteina u odnosu na netretirane stanice, a u usporedbi s otapalom oleinska kiselina povisila je razinu proteina, bez statističke značajnosti, no ipak ukazuje na povećanje razine inducirano oleinskom kiselinom. U usporedbi sa stanicama tretiranima samo oleinskom kiselinom, tretman s 10 i 20 nM semaglutida značajno je smanjio razinu proteina ($P < 0,001$ i $P < 0,05$), dok pri nižim koncentracijama nije utvrđen značajan učinak (Slika 16).



Slika 16. Učinci semaglutida na razine proteina MTTP u terapijskom modelu

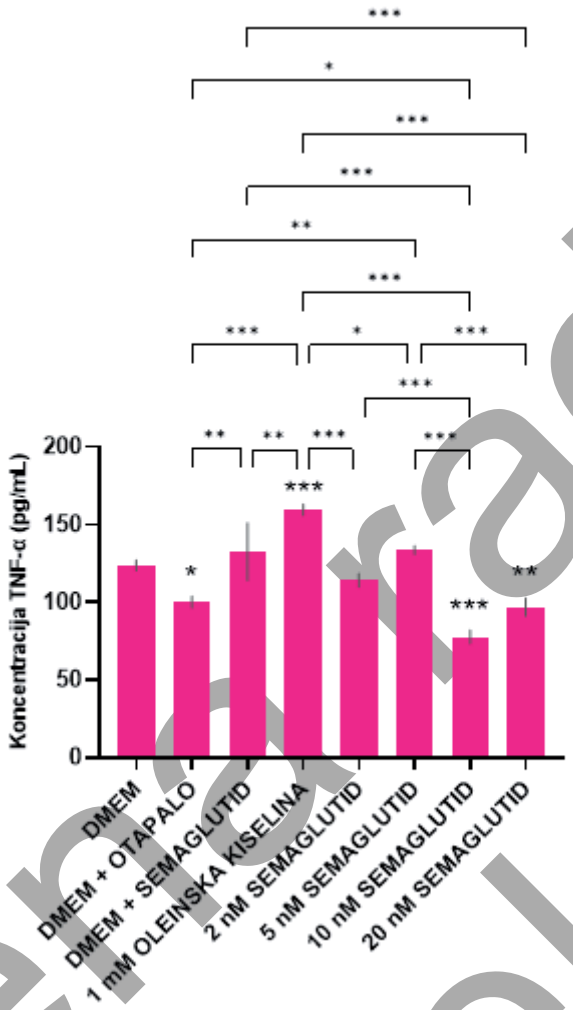
Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracije ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada
Uredu!

Učinci semaglutida na razine proteina TNF

Razina TNF bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranima otapalom u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,05$), što ukazuje na učinak otapala na smanjenje bazalne razine TNF, a semaglutid samostalno nije statistički značajno mijenjao bazalne razine TNF. Tretman 1 mM oleinskom kiselinom doveo je do statistički značajnog povećanja TNF u odnosu na netretirane stanice i stanice tretirane otapalom ($P < 0,001$). Unatoč smanjenju TNF u stanicama tretiranima otapalom u odnosu na netretirane stanice, 1 mM oleinska kiselina (koja sadržava i komponentu otapala) značajno je povisila razinu TNF u odnosu na obje navedene kontrole, što upućuje na to da opaženo povećanje proizlazi iz dodatnog učinka oleinske kiseline. U terapijskim skupinama, razina TNF bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranima svim ispitivanim koncentracijama semaglutida 2 nM ($P < 0,001$), 5 nM ($P < 0,05$), 10 nM ($P < 0,001$), 20 nM ($P < 0,001$) u usporedbi sa stanicama tretiranima samo oleinskom kiselinom. Stanice tretirane semaglutidom i oleinskom kiselinom sadržavaju istu komponentu otapala, stoga nižu razinu TNF u skupini tretiranoj semaglutidom u odnosu na skupinu tretiranu oleinskom kiselinom nije moguće jednoznačno pripisati semaglutidu. Međutim, statistički značajno niža razina TNF nakon tretmana s 10 nM semaglutida u odnosu na kontrolu otapala ukazuje na mogući učinak semaglutida neovisan o otapalu (Slika 17).

Ocjena rada u tijeku!



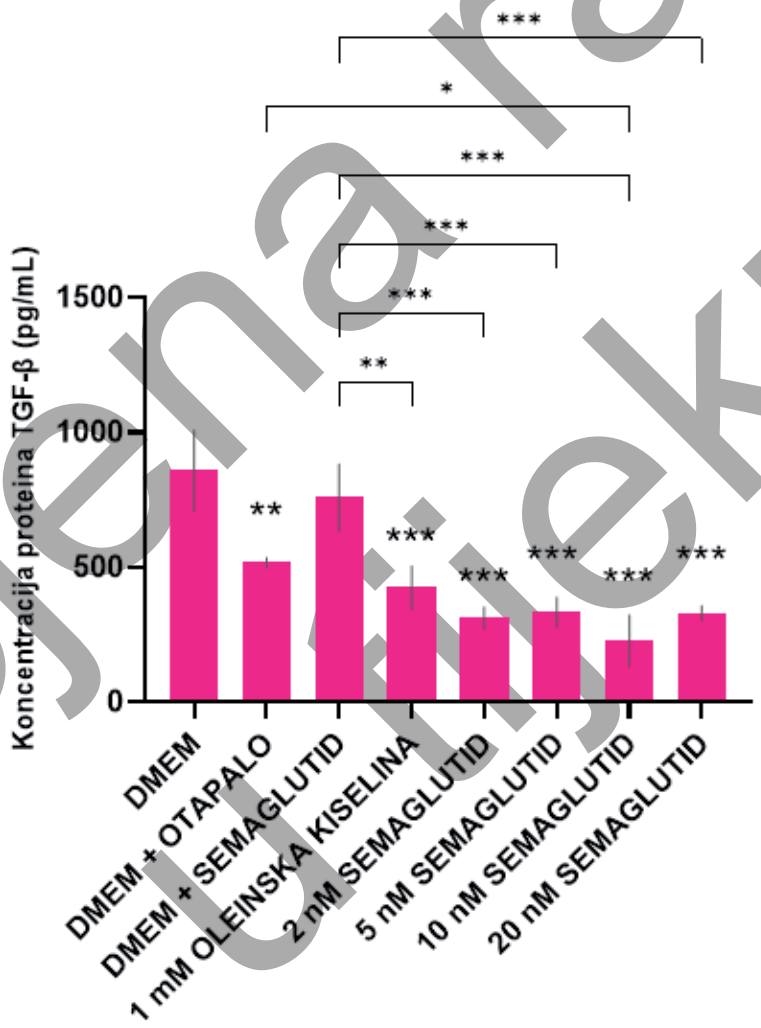
Slika 17. Učinci semaglutida na razine proteina TNF u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina TGF-β

Razina proteina TGF-β bila je niža u stanicama tretiranima otapalom nego u netretiranim stanicama ($P < 0,01$), dok se čisti semaglutid nije značajno razlikovao od DMEM kontrole. Oleinska kiselina snizila je razinu TGF-β u odnosu na DMEM ($P < 0,001$), ali ne i u odnosu na otapalo. Sve terapijske skupine sa semaglutidom snizile su razinu TGF-β u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,001$), ali se nisu značajno razlikovale od skupine tretirane samo oleinskom kiselinom (Slika 18).



Slika 18. Učinci semaglutida na razine proteina TGF-β u terapijskom modelu MASLD-a

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

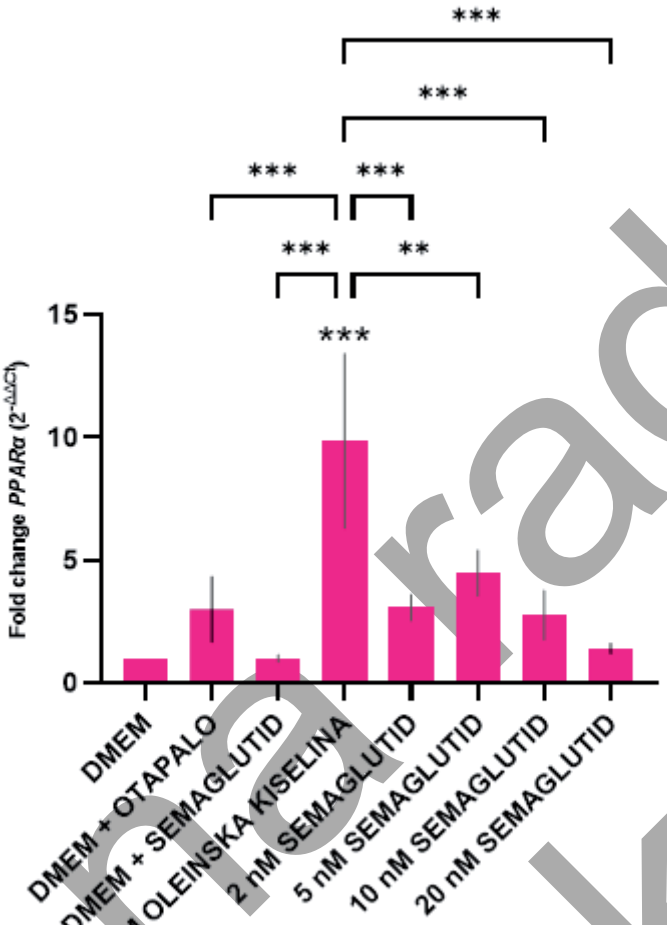
Ocjena rada Uniju!

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

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena PPAR-α

Ekspresija gena *PPAR-α* nije se statistički značajno razlikovala između stanica tretiranih otapalom i netretiranih stanica, što ukazuje da samo otapalo nije značajno utjecalo na bazalnu ekspresiju gena. Također, stanice tretirane semaglutidom nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane stanice, što upućuje na izostanak učinka samog semaglutida na bazalnu ekspresiju *PPAR-α*. Nasuprot tome, ekspresija gena *PPAR-α* bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranim 1 mM oleinskom kiselinom u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,001$), kao i u usporedbi sa stanicama tretiranim otapalom ($P < 0,001$) i stanicama tretiranim semaglutidom ($P < 0,001$), što ukazuje na snažnu indukciju ekspresije *PPAR-α* djelovanjem oleinske kiseline. U usporedbi sa stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, ekspresija *PPAR-α* bila je niža pri koncentracijama semaglutida od 2 nM ($P < 0,001$), 5 nM ($P < 0,01$), 10 nM ($P < 0,001$) i 20 nM ($P < 0,001$) (Slika 19).

Ocjena rada u tijeku.



Slika 19. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *PPAR-α* u terapijskom modelu MASLD-a

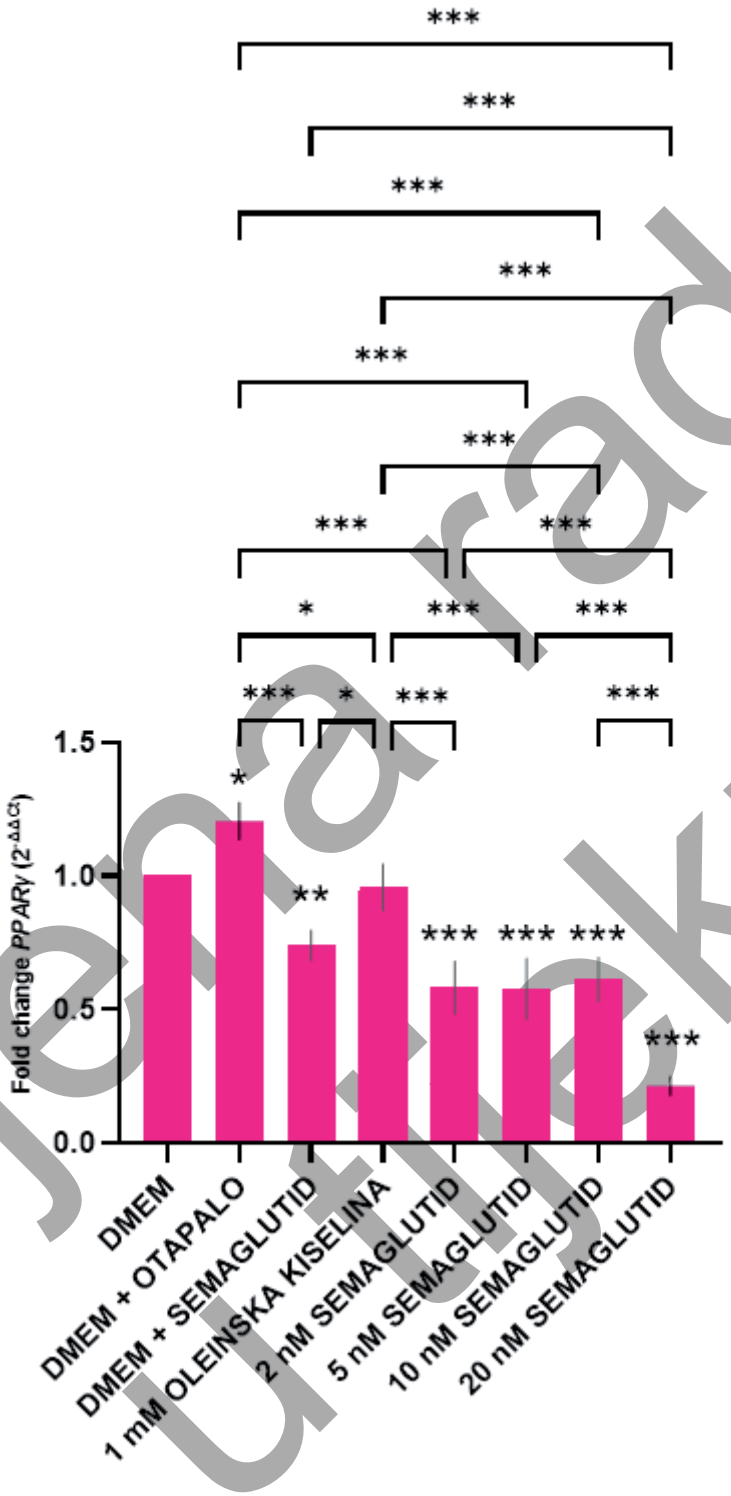
Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena PPAR-γ

Genska ekspresija *PPAR-γ* bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranim otapalom u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,05$). Stanice tretirane semaglutidom su pokazale statistički značajno nižu ekspresiju *PPAR-γ* u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,01$), što ukazuje na učinak otapala i semaglutida na bazalnu ekspresiju gena. Tretman 1 mM oleinskom kiselinom nije statistički značajno promijenio ekspresiju *PPAR-γ* u odnosu na netretirane stanice, međutim ekspresija *PPAR-γ* bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranim otapalom ($P < 0,05$). Dakle, s obzirom da je u stanicama tretiranim otapalom vidljivo statistički značajno povećanje ekspresije u usporedbi s netretiranim stanicama i stanicama tretiranim 1 mM oleinskom kiselinom, dok između tih stanica nema statistički značajne razlike, moglo bi se zaključiti da oleinska kiselina samostalno doprinosi smanjenju ekspresije gena *PPAR-γ*. U terapijskom modelu ekspresija *PPAR-γ* bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranim svim ispitivanim koncentracijama semaglutida u usporedbi sa stanicama tretiranim samo oleinskom kiselinom. U odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom, ekspresija *PPAR-γ* bila je niža pri koncentracijama semaglutida od 2 nM ($P < 0,001$), 5 nM ($P < 0,001$), 10 nM ($P < 0,001$) i 20 nM ($P < 0,001$) što ukazuje na to da semaglutid smanjuje ekspresiju ovog gena na način djelomično ovisan o koncentraciji semaglutida (Slika 20).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 20. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *PPAR-γ* u terapijskom modelu

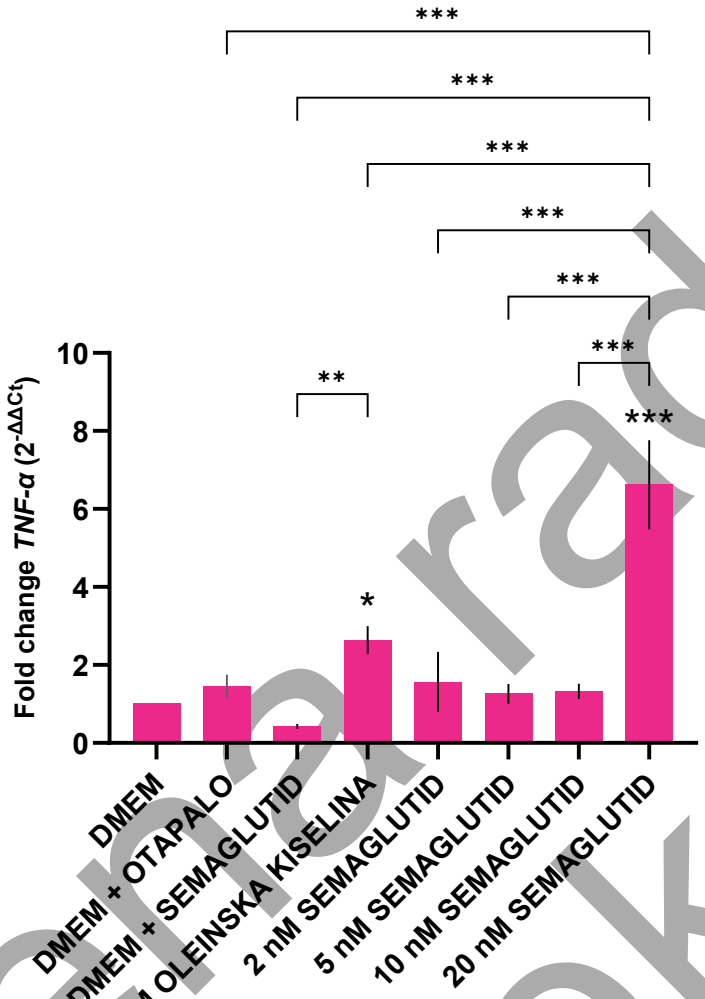
Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena TNF

Genska ekspresija *TNF* nije se statistički značajno razlikovala između stanica tretiranih otapalom i netretiranih stanica, što ukazuje da samo otapalo nije značajno utjecalo na bazalnu ekspresiju gena. Također, stanice tretirane semaglutidom nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane stanice ($P > 0,05$). Nasuprot tome, ekspresija *TNF* bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranim 1 mM oleinskom kiselinom u usporedbi s netretiranim stanicama ($P < 0,05$). Koncentracije semaglutida od 2 nM, 5 nM i 10 nM nisu značajno promijenile ekspresiju *TNF* u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom, no vidljiv je trend smanjenja ekspresije gena pri ovim koncentracijama. Nasuprot tome, pri koncentraciji od 20 nM ekspresija *TNF* bila je statistički značajno viša u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom ($P < 0,001$). Također, ekspreija *TNF* pri koncentraciji od 20 nM bila je statistički značajno viša u odnosu na sve ostale stanice (Slika 21).

Ocjena rada u tijeku!



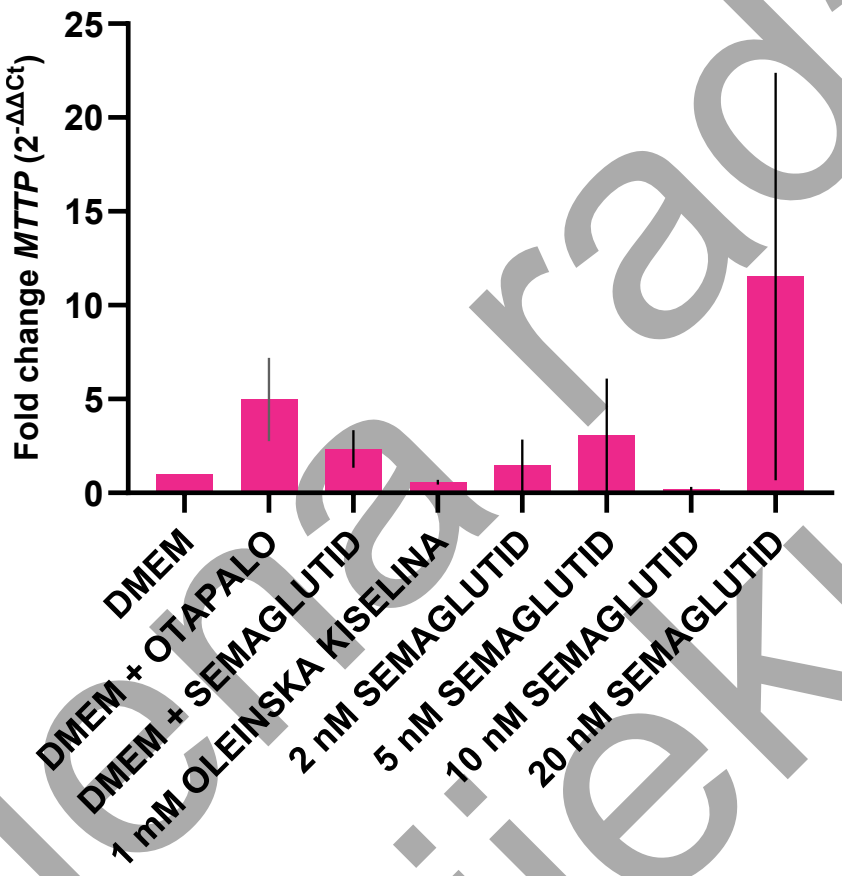
Slika 21. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *TNF* u terapijskom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena *MTTP*

Koncentracija proteina nije se statistički značajno razlikovala između stanica u različitim eksperimentalnim uvjetima.



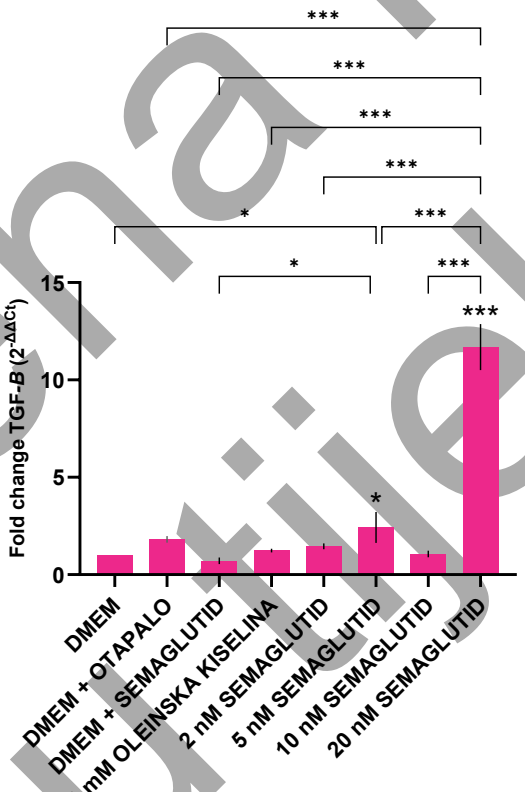
Slika 22. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *MTTP* u terapijskom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena TGF-β1

Genska ekspresija *TGF-β1* nije se statistički značajno razlikovala između netretiranih stanica, stanica tretiranih otapalom i stanica tretiranih semaglutidom, što upućuje na izostanak učinka otapala i samog semaglutida na bazalnu ekspresiju ovog gena. Također, tretman 1 mM oleinskom kiselinom nije doveo do statistički značajne promjene ekspresije *TGF-β1* u odnosu na netretirane stanice niti u odnosu na stanice tretirane otapalom. U terapijskom modelu koncentracije semaglutida od 2 nM i 10 nM nisu značajno promijenile ekspresiju *TGF-β1* u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Značajna promjena ekspresije gena uočena je pri koncentraciji semaglutida od 5 nM u odnosu na netretirane stanice, a koncentraciji semaglutida od 20 nM, statistički značajno viša u odnosu na sve ostale stanice ($P < 0{,}001$) (Slika 23).



Slika 23. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *TGF-β1* u terapijskom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

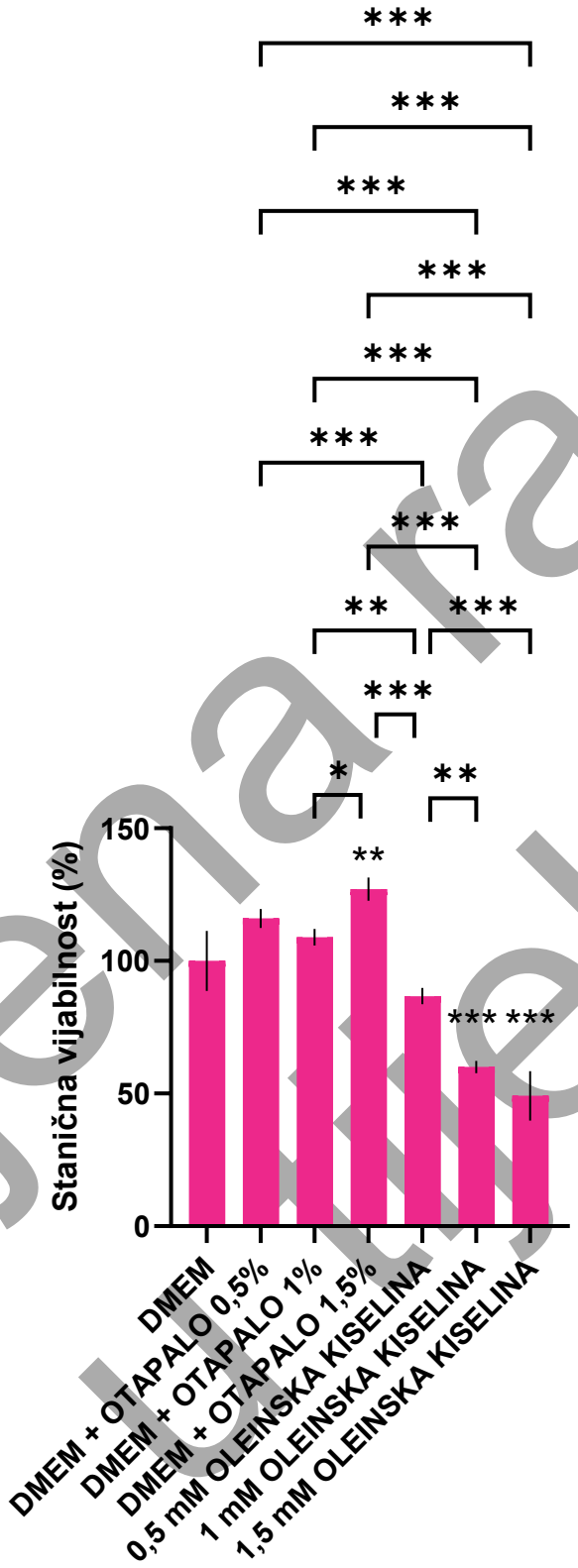
Ocjena rada u tijeku!

5.2. Procjena učinka semaglutida u preventivnom modelu MASLD-a

5.2.1. Procjena učinka različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost MTS-om u preventivnom modelu

Vijabilnost stanica nakon tretmana s 0,5 % i 1 % otapala nije se statistički značajno razlikovala od DMEM kontrole, dok je 1,5 % otapala dovelo do njezina značajnog povećanja ($P < 0,01$). Tretman 0,5 mM oleinskom kiselinom nije značajno promijenio vijabilnost stanica u odnosu na DMEM, ali ju je značajno smanjio u odnosu na 0,5 % otapala ($P < 0,001$). Koncentracije oleinske kiseline od 1 mM i 1,5 mM značajno su smanjile vijabilnost stanica u odnosu na DMEM i pripadajuće kontrole otapala ($P < 0,001$). Najizraženije smanjenje zabilježeno je pri koncentraciji od 1,5 mM oleinske kiseline. S obzirom na to da je tretman 1 mM oleinskom kiselinom doveo do približno 60 % vijabilnosti stanica u odnosu na DMEM, uz istodobno očuvanje dovoljnog broja vijabilnih stanica za daljnje analize, ta je koncentracija odabrana za uspostavu in vitro modela MASLD-a u preventivnom modelu (Slika 24).

Ocjena rada u tijeku



Slika 24. Učinci različitih koncentracija oleinske kiseline na staničnu vijabilnost u preventivnom modelu MASLD-a

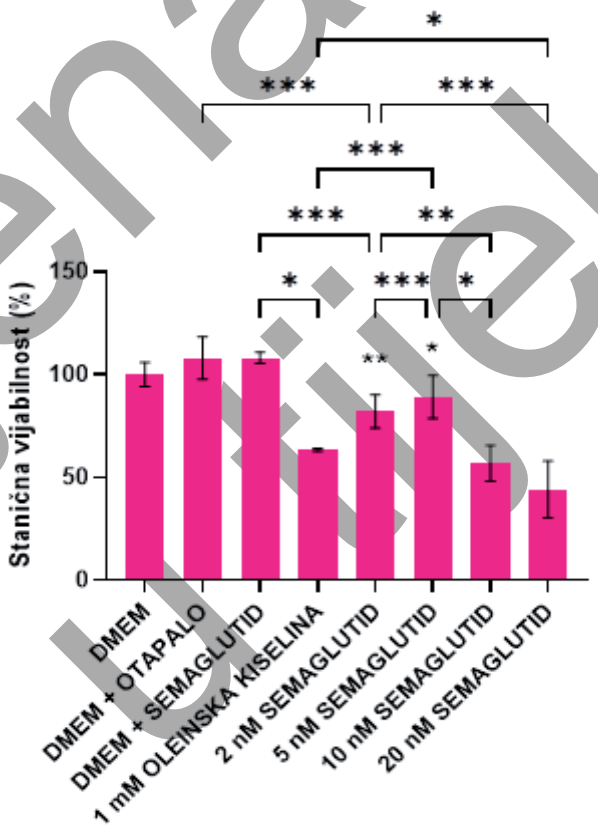
Podaci su prikazani kao postotak stanične vijabilnosti u odnosu na grupu DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

5.2.2. Procjena učinka semaglutida na staničnu vijabilnost u preventivnom modelu MASLD-a

Procjena stanične vijabilnosti MTS-om

Vijabilnost stanica nakon tretmana otapalom, čistim semaglutidom i oleinskom kiselinom nije se značajno razlikovala od netretiranih stanica. Oleinska kiselina snizila je vijabilnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu otapala, ali bez statistički značajne razlike. Nakon pretretmana s 2 nM semaglutida vijabilnost je bila značajno viša u odnosu na DMEM kontrolu ($P < 0,01$) i kontrolu otapala ($P < 0,001$), ali se nije razlikovala od tretmana samo oleinskom kiselinom. Pretretman semaglutidom u koncentracijama 2 i 5 nM povećao je vijabilnost u usporedbi sa stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, statistički značajno u koncentraciji 5 nM ($P < 0,001$). Nakon pretretmana s 20 nM vijabilnost je bila niža nego nakon tretmana samo oleinskom kiselinom ($P < 0,05$).



Slika 25. Učinci semaglutida na staničnu vijabilnost u preventivnom modelu MASLD-a

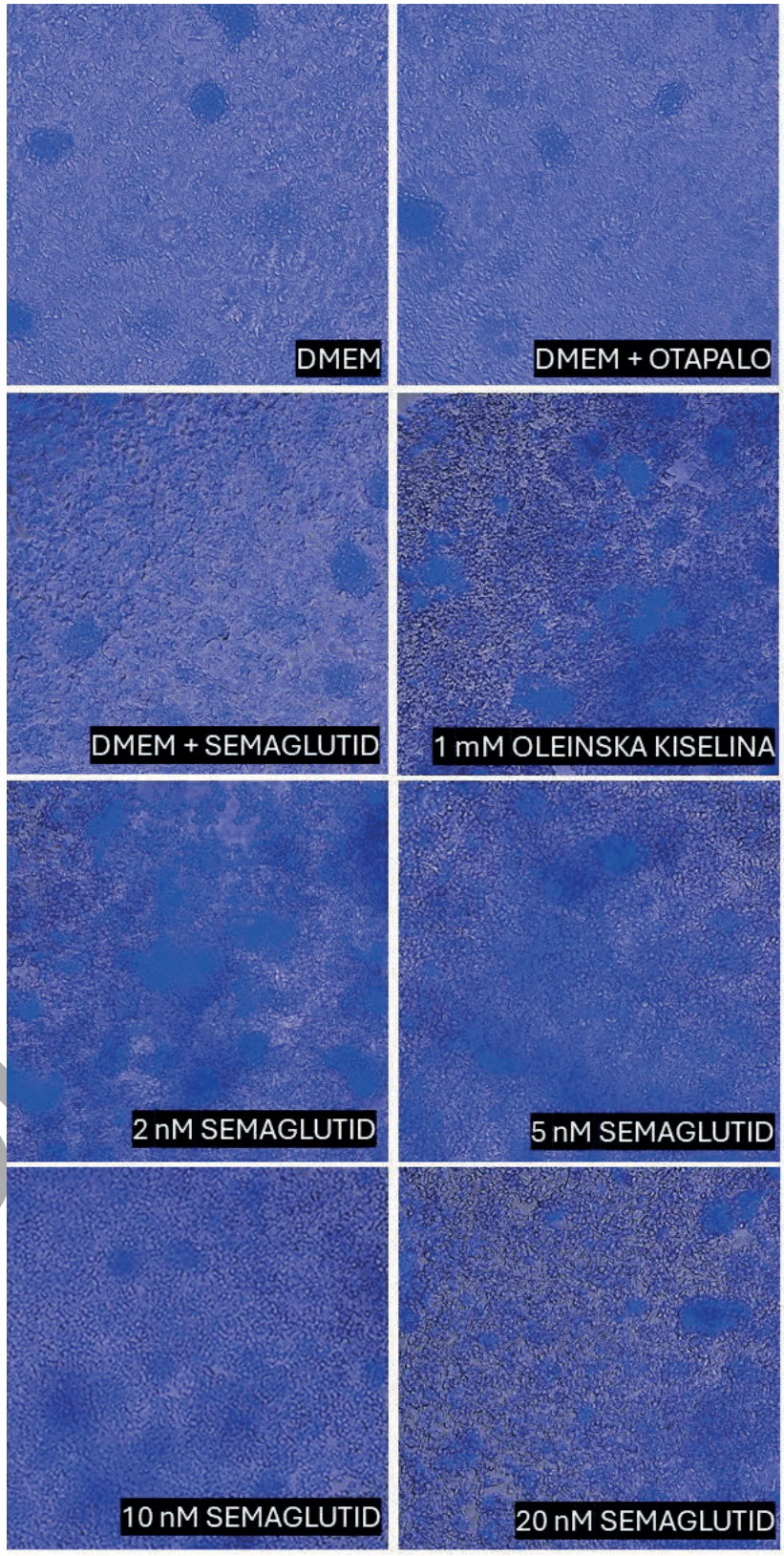
Podaci su prikazani kao postotak stanične vijabilnosti u odnosu na grupu DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena stanične vijabilnosti Hoechst-bojom

Procjena stanične vijabilnosti Hoechst-bojom pokazala je urednu morfologiju jezgara i ravnomjernu raspodjelu fluorescentnog signala u kontrolnim skupinama DMEM, DMEM + otapalo i DMEM + semaglutid. Uočen je intenzivniji fluorescentni signal u stanicama tretiranima oleinskom kiselinom i pretretmanom semaglutidom u svim ispitivanim koncentracijama što se može pripisati kondenzaciji kromatina i apoptotičnim promjenama (Slika 26).

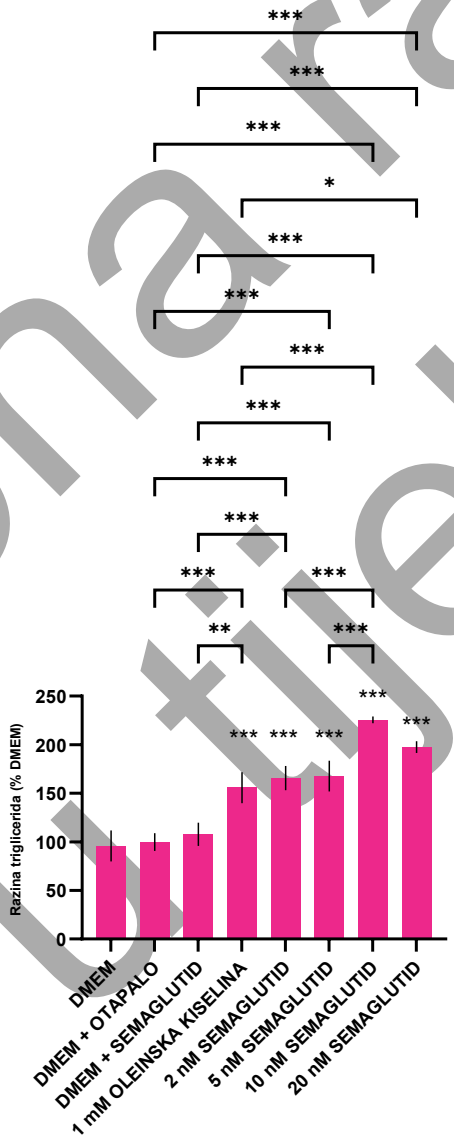
Ocjena rada u tijeku!



Slika 26. Kvalitativni prikaz fluorescentne mikroskopije Hoechst-bojenja HepG2 stanica u preventivnom modelu MASLD-a. *Invitrogen™ EVOS™ M3000, povećanje: 10 ×.*

5.2.3. Procjena učinka semaglutida na razinu triglicerida

Tretman oleinskom kiselinom značajno je povećao razinu triglicerida u odnosu na netretirane stanice u DMEM-u, stanice tretirane otapalom i stanice tretirane samo semaglutidom (P < 0,001 za usporedbe s DMEM-om i otapalom; P < 0,01 za semaglutid). Pretretman s 2 i 5 nM semaglutida nije značajno promijenio razinu triglicerida u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Nasuprot tome, nakon pretretmana s 10 i 20 nM semaglutida razina triglicerida bila je značajno viša (P < 0,001 odnosno P < 0,05) u odnosnu na skupinu tretiranu oleinskom kiselinom.



Slika 27. Učinci semaglutida na razinu triglicerida u preventivnom modelu.

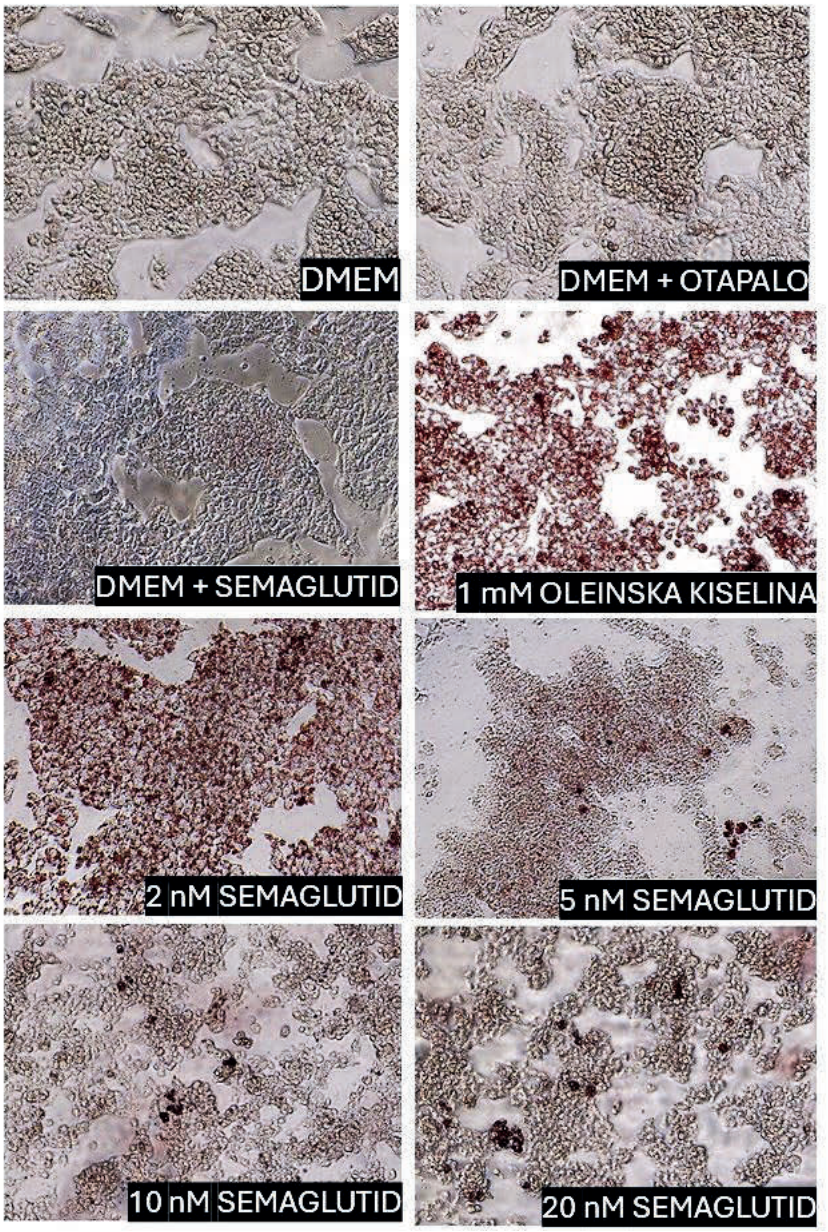
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost postotka razine triglicerida u odnosu na DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

5.2.4. Procjena učinka semaglutida na nakupljanje lipida ORO bojenjem

Mikroskopska analiza nakupljanja lipida ORO bojenjem

U skupinama tretiranim oleinskom kiselinom i semaglutidom vidljive su intenzivnije nakupine crveno obojanih lipida u odnosu na netretirane stanice, stanice tretirane otapalom i stanice tretirane čistim semaglutidom (Slika 28).

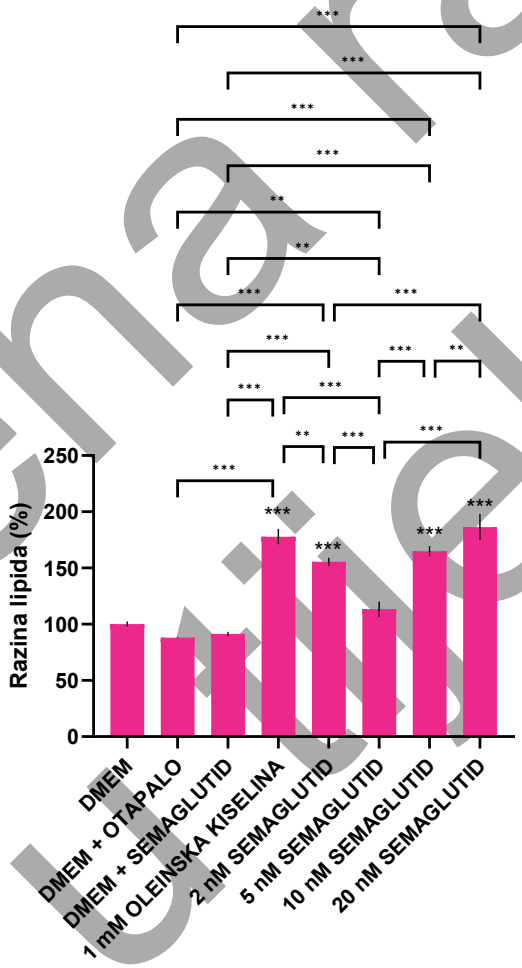


Slika 28. Svjetlosna mikroskopija HepG2 stanica obojenih ORO bojom u preventivnom modelu.

Invitrogen™ EVOS™ M3000, povećanje: 10 ×.

Procjena nakupljanja lipida kvantifikacijom ORO-boje

Kvantifikacijom ORO-boje utvrđeno je da se razina lipida nakon tretmana otapalom i samo semaglutidom nije značajno razlikovala od netretiranih stanica. Tretman oleinskom kiselinom značajno je povećao razinu lipida u odnosu na netretirane stanice, stanice tretirane otapalom i stanice tretirane samo semaglutidom ($P < 0,001$). Nakon pretretmana s 2 i 5 nM semaglutida razina lipida bila je značajno niža nego nakon tretmana samo oleinskom kiselinom ($P < 0,01$ i $P < 0,001$). Pretretman s 10 i 20 nM semaglutida nije značajno promijenio razinu lipida u odnosu na tretman samo oleinskom kiselinom.



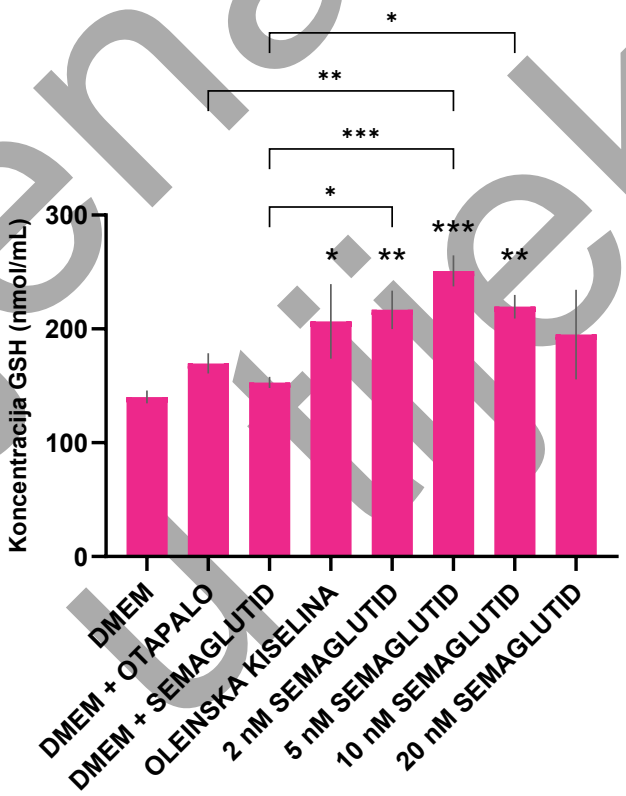
Slika 29. Učinak semaglutida na razinu unutarstaničnih lipida u preventivnom modelu.

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost postotka razine lipida u odnosu na DMEM ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada Stiješku!

5.2.5. Procjena učinka semaglutida na koncentraciju GSH

Razina GSH nije se statistički značajno razlikovala između kontrolnih skupina (netretiranih stanica, stanica tretiranih otapalom, stanica tretiranih semaglutidom). Razina GSH bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranima oleinskom kiselinom u usporedbi s netretiranim stanicama u DMEM-u ($P < 0,05$), ali ne i u usporedbi sa stanicama tretiranima otapalom. Pretretman semaglutidom u koncentracijama 2 i 10 nM rezultirao je statistički značajno višim razinama GSH u odnosu na netretirane stanice u DMEM-u ($P < 0,01$), dok je pri koncentraciji od 5 nM razina GSH bila viša uz još veću statističku značajnost ($P < 0,001$). Međutim, ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji pretretman semaglutidom nije doveo do statistički značajne promjene razine GSH u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom (Slika 30).



Slika 30. Učinak semaglutida na koncentraciju GSH u preventivnom modelu.

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracija GSH ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

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

Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-α

Razina proteina PPAR-α nije se statistički značajno razlikovala između netretiranih stanica u DMEM-u, stanica tretiranih otapalom i stanica tretiranih čistim semaglutidom. Tretman oleinskom kiselinom smanjio je razinu proteina u usporedbi s otapalom, ali bez statističke značajnosti. Međutim, pretretman semaglutidom ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji nije doveo do statistički značajne promjene razine PPAR-α u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Dobiveni rezultati stoga ne ukazuju na statistički značajan učinak semaglutida na promjene razine proteina PPAR-α u stanicama dodatno tretiranim oleinskom kiselinom.



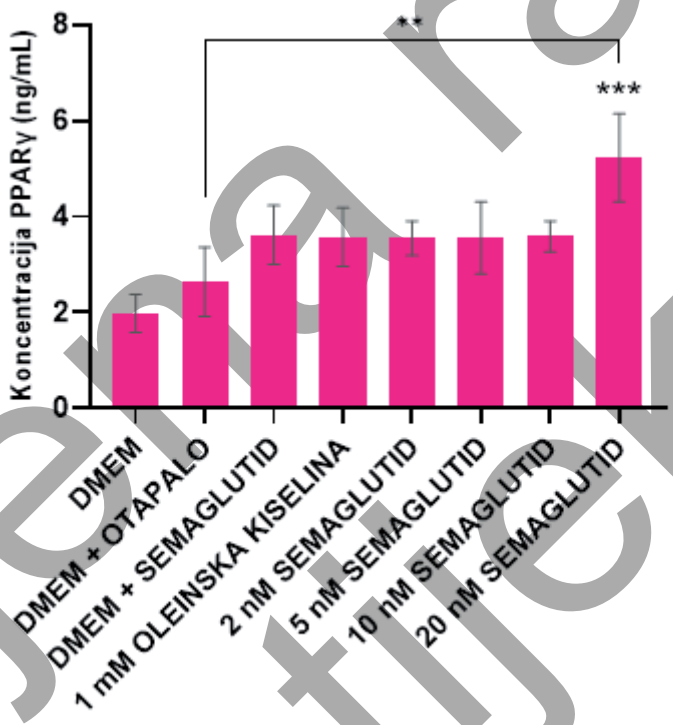
Slika 31. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR- α u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada
U tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ

Tretman oleinskom kiselinom doveo je do povećanja razine proteina PPAR-γ u odnosu na netretirane stanice u DMEM-u i stanice tretirane otapalom, ali razlike nisu bile statistički značajne. Pretretman semaglutidom ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji nije značajno promijenio razinu PPAR-γ u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Statistički značajno povećanje utvrđeno je samo nakon pretretmana s 20 nM semaglutida u odnosu na netretirane stanice u DMEM-u ($P < 0,001$) i stanice tretirane otapalom ($P < 0,01$).



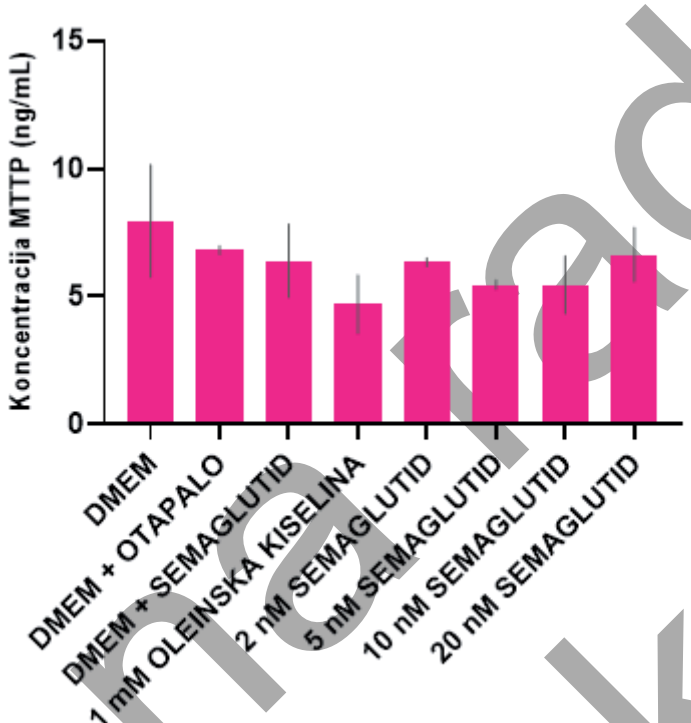
Slika 32. Učinci semaglutida na razine proteina PPAR-γ u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina MTTP

Koncentracija proteina nije se statistički značajno razlikovala između stanica u različitim eksperimentalnim uvjetima.

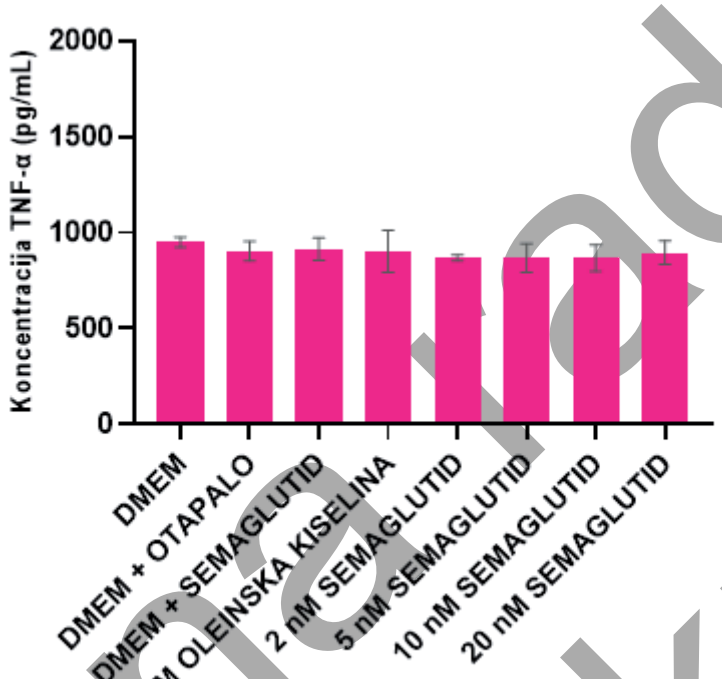


Slika 33. Učinci semaglutida na razine proteina MTTP u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije proteina ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Koncentracija proteina TNF nije se statistički značajno razlikovala između stanica u različitim eksperimentalnim uvjetima.



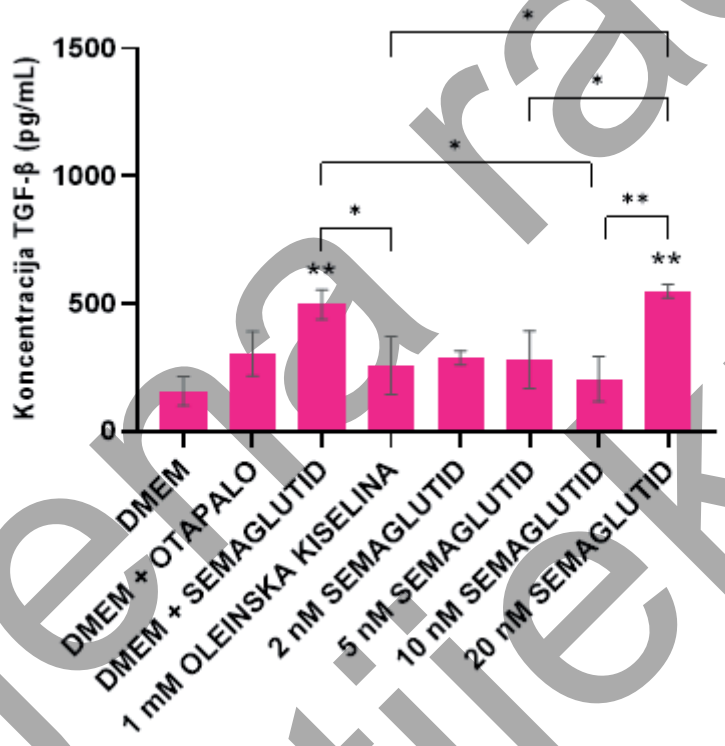
Slika 34. Učinci semaglutida na razine proteina TNF u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena u tijeku!

Učinci semaglutida na razine proteina TGF-β

Razina TGF-β bila je statistički značajno viša u stanicama tretiranima DMEM-om sa semaglutidom u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,01$). U terapijskom modelu, pri 20 nM semaglutida razina TGF-β bila je statistički značajno viša u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,01$), stanice tretirane oleinskom kiselinom ($P < 0,05$) te stanice tretirane semaglutidom u koncentracijama od 5 nM ($P < 0,05$) i 10 nM ($P < 0,01$). Ipak, u usporedbi s odgovarajućom kontrolom otapala nije utvrđen statistički značajan učinak (Slika 35).



Slika 35. Učinci semaglutida na razine proteina TGF-β u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti koncentracija ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

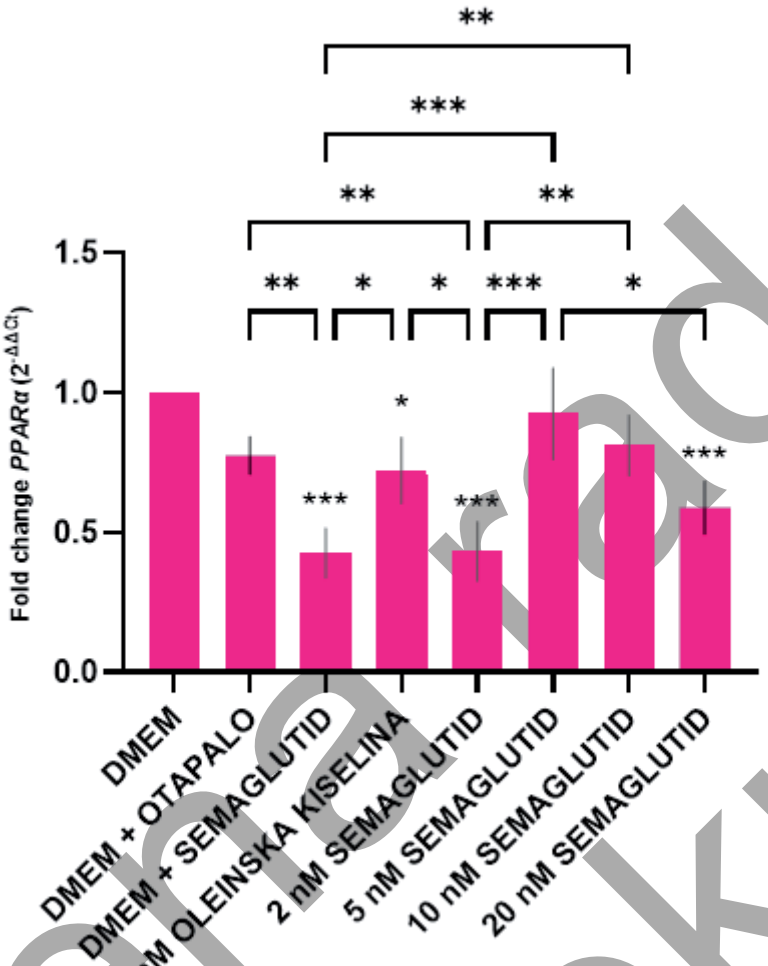
Ocjena rada u tijeku!

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

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena PPAR-α

Genska ekspresija *PPAR-α* bila je statistički značajno niža u stanicama tretiranima 1 mM oleinskom kiselinom u odnosu na kontrolne stanice uzgojene u DMEM-u ($p < 0,05$), dok između stanica tretiranih otapalom i stanica tretiranih oleinskom kiselinom nije utvrđena statistički značajna razlika. Tretman semaglutidom također je doveo do značajnog smanjenja ekspresije *PPAR-α* u odnosu na DMEM ($p < 0,001$), otapalo ($p < 0,01$) i oleinsku kiselinu ($p < 0,05$), što upućuje na samostalni učinak semaglutida na bazalnu ekspresiju *PPAR-α*. U preventivnim skupinama, prethodni tretman semaglutidom u koncentraciji od 2 nM rezultirao je statistički značajno nižom ekspresijom *PPAR-α* u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom ($p < 0,05$), a pri ostalim koncentracijama nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na oleinsku kiselinu (Slika 36).

Ocjena rada u tijeku

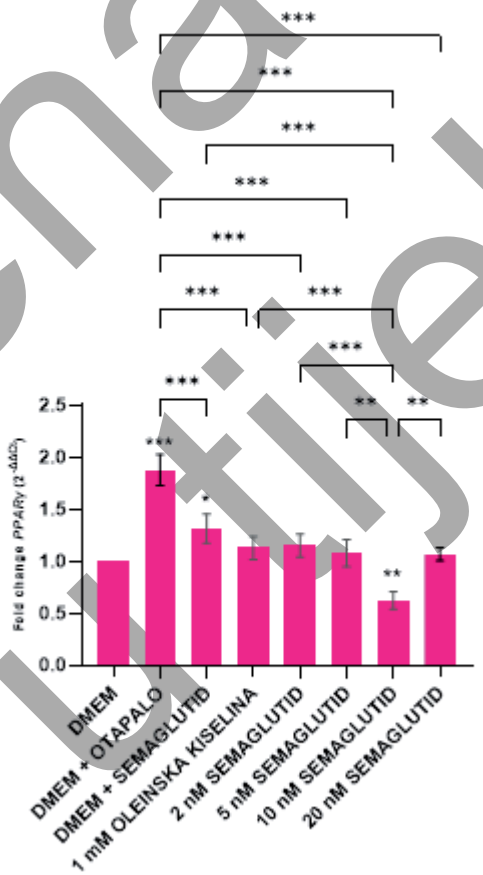


Slika 36. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *PPAR-α* u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

U preventivnom modelu tretman otapalom doveo je do značajnog povećanja relativne ekspresije gena *PPAR-γ* u odnosu na DMEM kontrolu ($p < 0,001$). U stanicama tretiranima samo semaglutidom ekspresija gena *PPAR-γ* također je bila viša nego u DMEM kontroli ($p < 0,05$), ali značajno niža nego u stanicama tretiranima otapalom ($p < 0,001$). Tretman oleinskom kiselinom rezultirao je značajno nižom ekspresijom gena *PPAR-γ* u odnosu na odgovarajuću kontrolu s otapalom ($p < 0,001$), dok se nije značajno razlikovala od DMEM kontrole. Pretretman semaglutidom u koncentracijama 2, 5 i 20 nM nije značajno promijenio ekspresiju gena *PPAR-γ* u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom. Značajno smanjenje utvrđeno je jedino nakon pretretmana s 10 nM semaglutida ($p < 0,001$) u usporedbi s tretmanom oleinskom kiselinom.

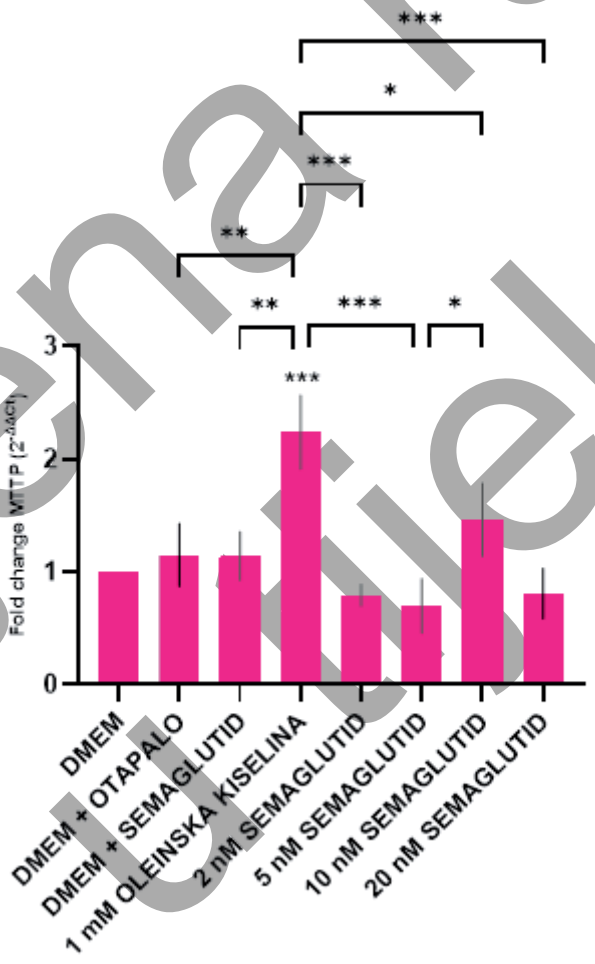


Slika 37. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *PPAR-γ* u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja u tehničkim triplikatima.

Ocjena rada u tijeku!

Tretman otapalom i čistim semaglutidom nije značajno promijenio ekspresiju gena *MTTP* u odnosu na DMEM kontrolu. Oleinska kiselina značajno je povećala ekspresiju gena *MTTP* u odnosu na DMEM kontrolu ($p < 0,001$) i odgovarajuću kontrolu otapala ($p < 0,01$). Nakon pretretmana svim ispitivanim koncentracijama semaglutida ekspresija gena *MTTP* bila je značajno niža nego nakon tretmana samo oleinskom kiselinom (2, 5 i 20 nM: $p < 0,001$; 10 nM: $p < 0,05$). Vrijednosti se nisu razlikovale od DMEM kontrole, kontrole otapala ni čistog semaglutida.

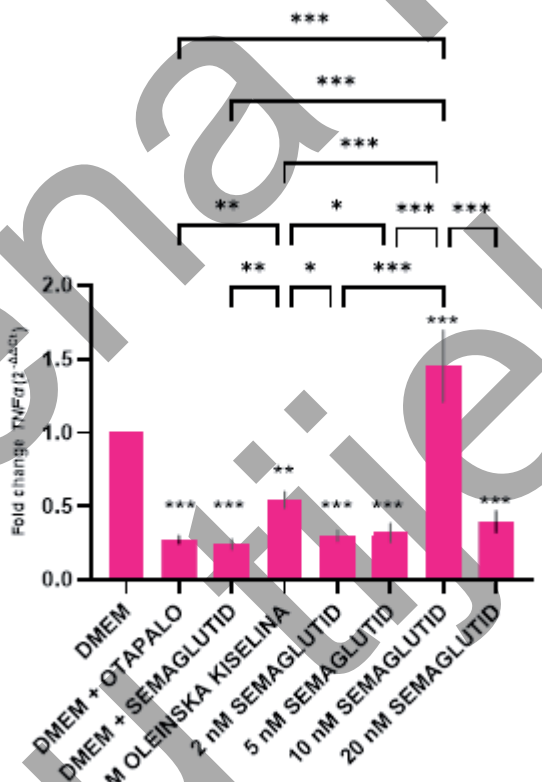


Slika 38. Učinci semaglutida na ekspresiju gena MTTP u preventivnom modelu
Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

Procjena učinka semaglutida na promjenu ekspresije gena TNF

U usporedbi s DMEM kontrolom, ekspresija gena *TNF* bila je značajno niža u stanicama tretiranima otapalom i semaglutidom ($p < 0,001$). Oleinska kiselina je smanjila ekspresiju gena *TNF* u odnosu na DMEM kontrolu ($p < 0,001$), a u odnosu na kontrolu otapala značajno ju je povećala ($p < 0,01$), što potvrđuje samostalni učinak oleinske kiseline. U usporedbi s ekspresijom gena u stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, ekspresija gena *TNF* bila je značajno niža nakon pretretmana s 2 i 5 nM semaglutida ($p < 0,05$), a nakon pretretmana s 10 nM bila značajno viša ($p < 0,001$) (Slika 39).

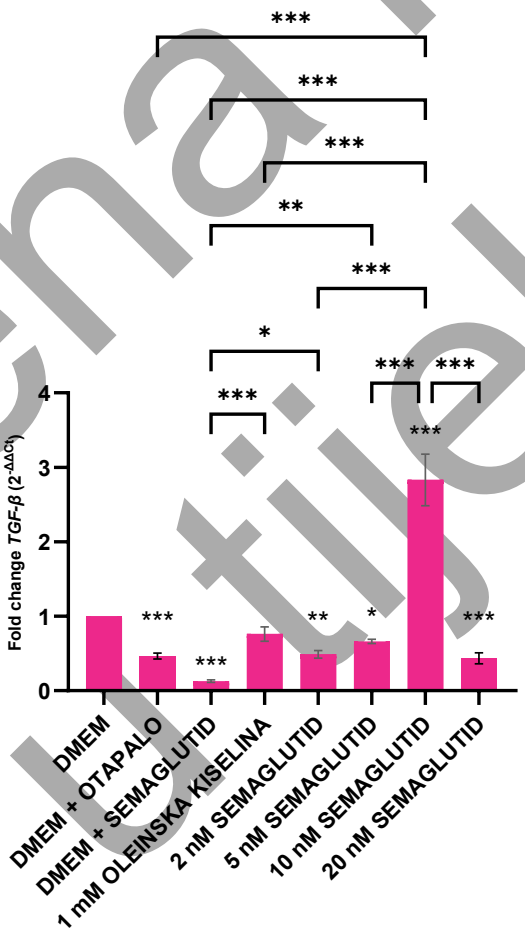


Slika 39. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *TNF* u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada Učiteljeku!

Tretman otapalom i čistim semaglutidom značajno je smanjio ekspresiju gena *TGF-β1* u odnosu na DMEM kontrolu ($p < 0,001$). Oleinska kiselina nije značajno promijenila ekspresiju gena *TGF-β1* u odnosu na DMEM kontrolu ni odgovarajuću kontrolu otapala. Stoga ovom analizom genske ekspresije nije utvrđen učinak oleinske kiseline na ekspresiju gena *TGF-β1*. Pretretman s 2, 5 i 20 nM semaglutida nije značajno promijenio ekspresiju u odnosu na tretman samo oleinskom kiselinom. Nakon pretretmana s 10 nM semaglutida ekspresija gena *TGF-β1* bila je značajno viša nego nakon tretmana samo oleinskom kiselinom i u svim ostalim ispitivanim uvjetima ($p < 0,001$) (Slika 40).



Slika 40. Učinci semaglutida na ekspresiju gena *TGF-β1* u preventivnom modelu

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti promjene razine transkripata (*fold change*) ± standardna devijacija (SD). Eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna ponavljanja.

Ocjena rada u tijeku!

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 [82,92,100].

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 [101]. Brojne studije istražile su razne mehanizme kojima oleinska kiselina u mješavini s palmitinskom pokazuje protektivna svojstva [102]. 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 [103-105]. 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 staničnu vijabilnost uspješno postiže nakupljanje lipida u HepG2 stanicama te povećava koncentraciju triglicerida [92]. Po uzoru na ovu studiju te dodatnim MTS testiranjem učinka oleinske kiseline u koncentracijama 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM na staničnu vijabilnost, odabrala se optimalna koncentracija oleinske kiseline, dostatna za poticanje citotoksičnosti, a održiva za daljnje

Ocjena rada u tijeku!

eksperimente. Uspostavljena su dva modela MASLD-a, terapijski i preventivni, koristeći oleinsku kiselinu u koncentraciji 1 mM (Slika 7).

U kontekstu uspješnosti uspostave MASLD-a, pokazalo se da su parametri stanične vijabilnosti, 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 staničnu vijabilnost (Slika 8 i Slika 25), povećala nakupljanje lipida u stanicama (Slika 12 i Slika 29) i razinu triglicerida (Slika 10 i Slika 27) u odnosu na netretirane stanice. Isti učinci primijećeni su u brojnim studijama, specifično koristeći HepG2 stanice i oleinsku kiselinu već spomenutoj studiji koju su proveli Bao i sur. [92], Liu i Park [106], te brojne druge [91,107].

Ocjena rada u tijeku!

6.1. Učinci terapijske primjene semaglutida

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 koncentracijama 2 nM, 5 nM i 10 nM statistički značajno ($P < 0,001$ za sve navedene koncentracije) povećao je staničnu vijabilnost u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom, a semaglutid u koncentraciji 20 nM statistički značajno ($P < 0,01$) je smanjio staničnu vijabilnost u usporedbi s ostalim koncentracijama na razinu sličnu vijabilnost stanica tretiranim oleinskom kiselinom što ukazuje na potencijalni citotoksični učinak ove koncentracije (Slika 8).

U kontekstu nakupljanja lipida, semaglutid je pri svim ispitivanim koncentracijama statistički značajno ($P < 0,001$) smanjio oleinskom kiselinom inducirano unutarstanično nakupljanje lipida. Dok su koncentracije od 2 i 5 nM dovele do djelomičnog smanjenja nakupljenih lipida, pri 10 i 20 nM njihova je razina snižena na vrijednosti koje se nisu statistički značajno razlikovale od razina lipida u netretiranim stanicama i kontrolnim stanicama tretiranima otapalom ili samo semaglutidom. Ovi rezultati upućuju na izraženiji terapijski učinak viših koncentracija semaglutida, koje su gotovo potpuno poništile nakupljanje lipida inducirano oleinskom kiselinom (Slika 12). Ovi učinci su svjetlosnom mikroskopijom vizualizirani na Slici 11.

Razina triglicerida statistički značajno se smanjila tretmanom semaglutidom u svim koncentracijama u odnosu na razinu triglicerida u stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, na način ovisan o koncentraciji (Slika 10).

Rezultati dobiveni u terapijskom modelu u skladu su s dokazima *in vitro* studija provedenih koristeći liraglutid u *in vitro* modelima MASLD-a [95,108-110], kao i druge GLP-1RA [82,103,111], u kojima su ORO bojenjem i mjerenjem razine triglicerida opisani pozitivni učinci ovih peptida na smanjenje nakupljanja lipida u stanicama te smanjenje koncentracije triglicerida.

U patofiziologiji MASLD-a, nakupljanje lipida i povećana oksidacija masnih kiselina dovodi do disregulacije oksidaticijskog stresa što igra ulogu u daljnjem razvoju i progresiji MASLD-a u MASH. GSH ključna je molekula za regulaciju reaktivnih

Ocjena rada u tijeku!

kisikovih vrsta, a studije o promjenama u razinama GSH u MASLD-u pokazale su nejasne zaključke, kako je već opisano. Ni rezultati našega terapijskog modela ne omogućuju jednoznačan zaključak o učincima oleinske kiseline i semaglutida na razinu GSH u HepG2 stanicama. Iako je oleinska kiselina značajno smanjila razinu GSH u odnosu na netretirane stanice, izostanak razlike u odnosu na stanice tretirane otapalom upućuje na to da se opaženi učinak ne može jasno pripisati samoj oleinskoj kiselini. Semaglutid je povećao razinu GSH u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom, ali je povećanje bilo statistički značajno samo pri koncentraciji od 5 nM ($P < 0,01$), bez jasnog učinka ovisnog o koncentraciji (Slika 13).

Začuđujuće, 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 [112,113], 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 neujednačenost u zaključcima studija može biti varijabilnost u metodologiji među studijama [26].

Za raspravu je iznimno važno naglasiti da je analiza genske ekspresije, odnosno, interpretacija qRT-PCR-a u terapijskoj primjeni semaglutida onemogućena zbog pomaka referentnog gena u određenim eksperimentalnim skupinama zbog čega se mjerenja ne mogu smatrati pouzdanima. U raspravi zato nisu navedene izmjerene vrijednosti, no prokomentirani su dosadašnji radovi koji su se bavili ekspresijom ovih gena.

PPAR-α, u jetri najprisutnija izoforma PPAR-ova, već je opisan kao jedan od najvažnijih regulatora lipidnog metabolizma koji sudjeluje u oksidaciji masnih kiselina, homeostazi lipoproteina, regulaciji slobodnih radikala te smanjenju upalnog odgovora u hepatocitima [114,115].U terapijskom modelu, učinak oleinske kiseline na koncentraciju PPAR-α ne može se jasno tumačiti zbog utjecaja otapala koje je statistički značajno ($P < 0,01$) smanjilo razinu proteina u usporedbi s netretiranim stanicama u DMEM-u, a između stanica u oleinskoj kiselini i DMEM-a nije uočena statistički značajna razlika. No, uzimajući u obzir da je otapalo značajno smanjilo koncentraciju proteina u odnosu na netretirane stanice, a oleinska kiselina statistički značajno povećala razinu proteina u osporedbi s kontrolom otapala, može se zaključiti da je oleinska kiselina samostalno

Ocjena rada u tijeku!

utjecala na povećanje razine proteina, što je djelomično poništeno učinkom otapala. Učinci semaglutida stoga su također djelomično nejasni jer je otopina semaglutida sadržavala i komponentu otapala, te pri nižim koncentracijama nije uočena statistički značajna razlika u usporedbi sa stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, ali pri tretmanu semaglutidom u koncentraciji 10 nM, odnosno 20 nM, koncentracija proteina smanjila se s višom statističkom značajnošću ($P < 0,001$, odnosno $P < 0,01$) u usporedbi s oleinskom kiselinom. Ovo upućuje na izolirani učinak semaglutida na smanjenje razine proteina bez učinka otapala (Slika 14).

Iz dosadašnjih studija o aktivnosti PPAR-α u MASLD-u, također se ne može jednoznačno razjasniti promjena razine koncentracije ovog proteina. Francque i sur. pokazali su da uvelike ovisi o jačini steatoze i stupnju progresije bolesti, točnije u biopsijama jetre bolesnika ekspresija gena *PPAR-α* bila je niža u težim oblicima MASH-a te je negativno korelirala sa stupnjem steatoze, baloniranjem hepatocita, upalom [116]. *In vitro* studije na PHH i kontinuiranim staničnim linijama hepatocita, pokazale su povećane razine proteina PPAR-α nakon aktivacije slobodnim masnim kiselinama [117,118]. Pretpostavka je da aktivacija, tj. povećanje koncentracije PPAR-α, odnosno povećana ekspresija *PPAR-α* gena, služi kao protektivni mehanizam u odgovoru na lipidno opterećenje hepatocita [114,119], što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja.

U kontekstu učinka semaglutida, dosadašnje *in vitro* studije pokazale su povećanje aktivnosti i na proteinskoj i genskoj razini u odgovoru na GLP-1RA tretman. Wang i sur. pokazali su da je liraglutid u HepG2 stanicama s lipidima induciranom steatozom smanjio nakupljanje lipidnih kapljica i razinu triglicerida. Taj je učinak bio povezan s povećanjem ekspresije gena i razine proteina PPAR-α. Istodobno je liraglutid povećao ekspresiju ciljnih gena *PPAR-α* uključenih u β-oksidaciju masnih kiselina. Navedeni rezultati upućuju na to da liraglutid u ovom *in vitro* modelu ublažava steatozu povećanjem ekspresije i aktivnosti *PPAR-α*, čime potiče β-oksidaciju masnih kiselina i smanjuje lipogenezu. [120]. Ding i sur. također su pokazali eksendinom-4 inducirano povećanje ekspresije *PPAR-α* u animalnom steatotičnom modelu te izoliranim steatotičnim hepatocitima [121]. Semaglutid je u našem modelu pri višim koncentracijama snizio razinu proteina PPAR-α. Smanjenje ekspresije gena i razine proteina PPAR-α nakon tretmana semaglutidom moglo bi predstavljati normalizaciju kompenzatornog povećanja PPAR-α izazvanog lipidnim opterećenjem oleinskom

Ocjena rada u tijeku!

kiselinom. Međutim, takvo tumačenje je iznimno spekulativno jer u ovom istraživanju nisu određivane transkripcijska aktivnost *PPAR-α* ni ekspresija njegovih ciljnih gena uključenih u β-oksidaciju masnih kiselina.

PPAR-γ, kako je opisano, eksprimiran je primarno u adipocitima, a manje u jetri, no također ključan u regulaciji lipidnog metabolizma, u adipocitima u kojima povoljno djeluje na hepatocite skladištenjem masti u masnom tkivu, no u hepatocitima pojačava steatozu te u MASLD-u dolazi do pojačane aktivacije ovog transkripcijskog čimbenika. U ovoj studiji, u terapijskom modelu,tretman 1 mM oleinskom kiselinom nije značajno promijenio razinu proteina PPAR-γ u odnosu na netretirane stanice ni stanice tretirane otapalom. Tretmanom semaglutidom, uočen je porast proteina pri 2 i 5 nM te pad pri 10 i 20 nM, ali bez statističke značajnosti (Slika 15). U dosadašnjim studijama na HepG2 stanicama u kojima je GLP-1RA exendin-4 također smanjio gensku ekspresiju *PPAR-γ*, kao i liraglutid u Huh7 modelu MASLD-a [95,104].

Sagledavajući funkciju i ulogu PPAR-ova u patofiziologiji MASLD-a te primjenu agonista PPAR-ova u hipolipidemijskoj terapiji koja povoljno djeluje na lipide u perifernoj cirkulaciji, no pojačava jetrenu steatozu, vrlo je važna spoznaja da semaglutid smanjuje *in vitro* steatozu (posebno u višim koncentracijama, Slika 12).

TNF, proupalni čimbenik i TGF-β, profibrotički čimbenik, ključni su u progresiji MASLD-a u MASH i fibrozu. U ovoj studiji, bilo nam je važno ispitati učinak semaglutida na ove čimbenike zbog manjka farmakoterapijskih mogućnosti za liječenje blažih oblika MASLD-a, a učinak na proupalne i profibrotičke procese na samoj razini hepatocita govori u prilog tome da je semaglutid potencijalan kandidat s mogućim izravnim učinkom na ove procese dok je steatoza, odnosno upala, još ograničena na hepatocite.

Tretman 1 mM oleinskom kiselinom značajno je povećao razinu TNF u odnosu na netretirane stanice i stanice tretirane otapalom ($P < 0,001$). Semaglutid je pri svim ispitivanim koncentracijama značajno smanjio razinu TNF u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom (2, 10 i 20 nM: $P < 0,001$; 5 nM: $P < 0,05$) (Slika 17). Iz ovog proizlazi važna spoznaja – proupalni procesi su važna komponenta patofiziolofije MASLD-a i na razini hepatocita, a zanimljivo je da je u ovoj studiji semaglutid utjecao na proupalni čimbenik i bez djelovanja na makrofage.

Ocjena rada u tijeku!

S obzirom da su u našoj studiji korištene HepG2 stanice, hepatoblastomskog podrijetla, ne može se u potpunosti izjednačavati procese upale s onima u nativnim stanicama, no vrlo je zanimljivio što su Kwon i sur., *in vitro* 3D kulturom primarnih hepatocita (PHH) izloženih mješavini oleinske i palmitinske kiseline, u sofisticiranoj studiji pokazali povećanje ekspresije *TNF*, ali i *TGF-β*, [122]. Značajno je što su ovi upalni i profibrotički signali odgovor PHH-a na steatozu, bez prisustva Kupfferovih ili HSC stanica.

Zanimljiva studija ispitala je učinak mješavine slobodnih masnih kiselina (palmitinske i oleinske) na kinetiku ekspresije citokina IL-6, IL-8 i TNF 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* 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 [123]. Ovo je moguće objašnjenje za povećanje razina proteina TNF u stanicama tretiranima oleinskom kiselinom. Dodatno, u kontekstu lipidne oksidacije i peroksisoma, zanimljivo je naglasiti da *TNF* ima učinke na peroksisomskim proliferatorima aktivirane receptore [124].

U kontekstu učinaka semaglutida na proinflamatorne procese, rezultati su slični *in vitro* studijama na ostalim GLP-1RA.

Rezultati terapijskog modela sugeriraju da semaglutid pretežno smanjuje ekspresiju i produkciju TNF, smanjujući proupalnu progresiju. Wong i Drucker u svom preglednom radu o učincima GLP-1RA na upalu i TNF 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,* u adipocitima, perifernim mononuklearnim stanicama, upalnim procesima jetre, neurološkog, kardiovaskularnog, respiratornog sustava, a utječu i na smanjenje cirkulirajućih razina u serumu [74]. Također navode da predkliničke i kliničke studije o semaglutidu, sugeriraju da je protuupalni učinak GLP-1 lijekova značajno posredovan mehanizmima neovisnim o smanjenju tjelesne mase [125-127].

Što se tiče glavnog profibrotičkog čimbenika, tretman 1 mM oleinskom kiselinom u ovoj studiji na proteinskoj razini značajno je smanjio razinu TGF-β u odnosu na netretirane stanice (P < 0,001), a u odnosu na otapalo zabilježeno je dodatno

Ocjena rada u tijeku!

smanjenje, ali bez statističke značajnosti. U terapijskom modelu razine TGF-β pri svim koncentracijama semaglutida bile su značajno niže nego u netretiranim stanicama. Međutim, nisu se značajno razlikovale od razine nakon tretmana samo oleinskom kiselinom, iako je uočen trend smanjenja. Pri 10 nM razina je bila značajno niža i u odnosu na stanice tretirane otapalom ($P < 0,05$) (Slika 18).

Ovo ide u prilog validiranosti našeg modela MASLD-a s blagim upalnim promjenama za ispitivanje semaglutida u neprogresivnim stadijima kao što je steatoza s blagom upalom bez fibrotičkih procesa. Također, većinu TGF-β u jetrenoj fibrinogenezi luče LSEC ili Kupfferove stanice, a ne hepatociti [128], stoga ne čude relativno male promjene ovog proteina.

U kontekstu učinaka semaglutida na profibrotičke čimbenike, rezultati su slični studijama na ostalim GLP-1RA. U predkliničkim animalnim modelima eksendin, liraglutid i semaglutid pokazali su hepatoprotektivne i antiinflamatorne učinke kod miševa s aterosklerozom, smanjujući proupalne citokine i razine *TNF* u jetri, kao i *TGF-β1,* uz smanjenje ekspresije gena povezanih s produkcijom kolagena [74,129].

TGF-β signalizacija doprinosi nakupljanju lipida u hepatocitima i progresiji fibroze, dok u HCC-u, TGF-β 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 [130].

U eksperimentalnoj studiji, semaglutid je poboljšao fibrozu u animalnom modelu masne jetre, smanjenjem TGF-β/Smad signalizacije[131], ključne u fibrogenezi. Brojne kliničke studije dokazale su poboljšanje fibroze u pacijenata s MASLD-om kao odgovor na terapiju GLP-1RA [132 133]. *In vitro* studije MASLD-a koje su ispitale utjecaj GLP-1RA na razine TGF-β 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 je pokazao značajan učinak na poboljšanje vijabilnosti stanica pri koncentracijama od 2, 5 i 10 nM, smanjenje nakupljanja lipida u HepG2 stanicama pri svim ispitivanim koncentracijama te smanjenje razine triglicerida pri 5, 10 i 20 nM u odnosu na oleinsku kiselinu. Inzulinska

Ocjena rada u tijeku!

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. Značajan učinak semaglutida pokazao se u razinama proteina TNF pri svim ispitivanim koncentracijama što sugerira proupalna svojstva. Smanjenje nakupljanja lipida, triglicerida i regulacija navedenih signala ukazuje da ovaj peptid ima potencijal u farmakološkoj intervenciji u pacijenata s blažim oblicima MASLD-a i prevenciji MASH-a.

Ocjena rada u tijeku!

6.2. Učinci preventivne primjene semaglutida

U preventivnom modelu semaglutid nije pokazao jednoznačan zaštitni učinak na sve ispitivane pokazatelje stanične vijabilnosti i nakupljanja lipida, a opaženi učinci nisu pratili jasan obrazac ovisan o koncentraciji. Najdosljedniji povoljni učinci na staničnu vijabilnost zabilježeni su pri nižim koncentracijama: pretretman s 5 nM semaglutida povećao je staničnu vijabilnost u odnosu na tretman samo oleinskom kiselinom (P < 0,001) (Slika 25), a koncentracije od 2 i 5 nM smanjile su količinu lipida određenu ORO-bojenjem (P < 0,01 odnosno P < 0,001) (Slika 29). Ti rezultati upućuju na mogući povoljan učinak nižih koncentracija na vijabilnost i nakupljanje lipida, ali ga treba tumačiti oprezno jer se nije ponovio pri višim koncentracijama. Sveukupno, sugeriraju mogući povoljan učinak 2–5 nM semaglutida na pojedine pokazatelje, osobito na nakupljanje lipida, ali ne pružaju dosljedan dokaz zaštitnog učinka u preventivnom modelu MASLD-a.

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 studije su pokazala da stvaranje triglicerida služi kao kompenzatorni mehanizam protiv oksidacijskog stresa izazvanog slobodnim masnim kiselinama i drugim lipidima [25]. Ovim mehanizmom pretretman semaglutidom potencijalno pokazuje protektivni učinak na lipotoksičnost izazvanu masnim kiselinama u hepatocitima.

U ovoj studiji, učinci oleinske kiseline i semaglutida na razine GSH u HepG2 stanicama također su varijabilni. Oleinska kiselina i semaglutid u preventivnom tretmanu pokazali su povećanje razine GSH u odnosu na netretirane stanice, ali međusobno se nisu razlikovali (Slika 30).

Dosadašnja *in vitro* istraživanja uglavnom su pokazala da agonisti GLP-1 receptora smanjuju nakupljanje lipida u hepatocitima tijekom ili nakon izlaganja masnim kiselinama. Međutim, istraživanja njihove preventivne primjene prije razvoja steatoze vrlo su ograničena. Trenutno je dostupna studija u kojoj su Madhu i sur., pokazali da pretretman agonistom GLP-1 receptora eksendinom-4 ublažava nakupljanje lipida i regulira MAPK signalizaciju u HepG2 stanicama naknadno izloženima palmitinskoj kiselini, ali izravne poveznice s genima analiziranim u ovoj studiji nema [134].

Ocjena rada u tijeku!

S obzirom na nestabilnost referentnog gena u terapijskom modelu, pri preventivnoj primjeni semaglutida referentni gen pokazao se stabilnijim.

U kontekstu razine proteina PPAR-α oleinska kiselina smanjila je razinu proteina u odnosu na stanice tretirane otapalom i netretirane stanice, ali bez statističke značajnosti. Pretretman semaglutidom ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji nije značajno promijenio razinu proteina PPAR-α u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Rezultati stoga ne pokazuju učinak semaglutida na proteinsku razinu PPAR-α (Slika 31). Na razini genske ekspresije oleinska kiselina smanjila je ekspresiju gena *PPAR-α* u odnosu na netretirane stanice ($p < 0,05$)- Što se tiče tretmana semaglutidom, samo je pretretman s 2 nM semaglutida smanjio ekspresiju u odnosu na oleinsku kiselinu ($p < 0,05$), dok pri ostalim koncentracijama nije bilo značajnog učinka (Slika 36). Ovi rezultati ne ukazuju na značajni učinak preventivne primjene semaglutida na PPAR-α regulaciju.

Što se tiče razine proteina PPAR-γ, tretman oleinskom kiselinom doveo je do povećanja razine proteina u odnosu na netretirane stanice i stanice tretirane otapalom, ali razlike nisu bile statistički značajne. Pretretman semaglutidom ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji nije značajno promijenio razinu proteina PPAR-γ u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Razina PPAR-γ bila je značajno viša nakon pretretmana s 20 nM semaglutida u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,001$) i stanice tretirane otapalom ($P < 0,01$), ali ne i u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom (Slika 32). Genska ekspresija *PPAR-γ* pri tretmanu oleinskom kiselinom rezultirao je značajno nižom ekspresijom u odnosu na stanice tretirane otapalom ($P < 0,001$), dok se ekspresija nije značajno razlikovala od netretiranih stanica. U preventivnom modelu pretretman s 2, 5 i 20 nM semaglutida nije značajno promijenio ekspresiju *PPAR-γ* u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. Značajno smanjenje utvrđeno je jedino nakon pretretmana s 10 nM semaglutida ($P < 0,001$). Ovi su rezultati u skladu s dosadašnjim studijama na HepG2 stanicama u kojima je tretman GLP-1R agonistima također smanjio gensku ekspresiju *PPAR-γ*, no studije o učincima preventivnog tretmana na peroksisomskim proliferatorima aktivirane receptore nisu dostupni [95,104].

U kontekstu proupalnih i profibrotičkih čimbenika preventivni tretman semaglutidom nije pokazao značajan učinak.

Ocjena rada
U tijeku!

Koncentracija proteina TNF nije se statistički značajno razlikovala između stanica, Što se tiče genske ekspresije, oleinska kiselina značajno je povećala ekspresiju *TNF* (p < 0,01) s obzirom na kontrolu otapala, a semaglutid u koncentraciji 2 i 5 nM statistički značajno je smanjio ekspresiju gena, a u koncentraciji 10 nM statistički značajno povećao ekspresiju gena s obzirom na oleinsku kiselinu (Slika 39).

Oleinska kiselina nije značajno promijenila koncentraciju proteina TGF-β u odnosu na netretirane stanice ni stanice tretirane otapalom. Značajan je bio učinak pretretmana s 20 nM semaglutida pri čemu je koncentracija TGF-β bila značajno viša nego u stanicama tretiranima samo oleinskom kiselinom (P < 0,05) i netretiranim stanicama (P < 0,01), a ostale koncentracije semaglutida nisu promijenile ekspresiju ovog gena s obzirom na oleinsku kiselinu. Rezultati stoga ne potvrđuju preventivni učinak semaglutide u kontekstu fibrotičkih čimbenika, dok povećanje TGF-β pri najvišoj koncentraciji može upućivati na citotoksični učinak ove koncentracije. Što se tiče genske ekspresije, oleinska kiselina nije značajno promijenila ekspresiju gena *TGF-β* u odnosu na netretirane stanice. Pretretman s 10 nM semaglutida povisio je ekspresiju *TGF-β* u usporedbi sa svim ostalim tretmanima (P < 0,001). Takav rezultat ne upućuje na zaštitni učinak semaglutida, nego na koncentracijski specifično povećanje ekspresije *TGF-β*. Ovo ne ukazuje na značajan učinak preventivne primjene semaglutida u kontekstu fibrotičkih procesa.

Ocjena rada u tijeku!

Ograničenja studije

Sama *in vitro* priroda studije, unatoč tome što pruža izolirani uvid u molekularne mehanizme učinka semaglutida na hepatocite, 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.

Važno je za naglasiti da je u terapijskom modelu utvrđena promjena ekspresije *β-actina* u određeni eksperimentalnim uvjetima što upućuje na to da njegova ekspresija nije bila stabilna. S obzirom da su u terapijskom modelu geni od interesa normalizirani prema ovom genu, nije moguće interpretirati promjenu genske ekspresije te je ovo važno naglasiti kako bi se u daljnjim studijama uporabom dodatnih stabilnih referentnih gena omogućila pouzdana interpretacija.

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*

Ocjena rada u tijeku!

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.

Ocjena rada u tijeku!

7. Zaključci

1. U ovom istraživanju uspostavljena su dva eksperimentalna modela MASLD-a, terapijski i preventivni, izlaganjem HepG2 stanica oleinskoj kiselini u koncentraciji od 1 mM.
2. U terapijskom modelu oleinska kiselina statistički je značajno smanjila staničnu vijabilnost u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,01$). Tretman semaglutidom u koncentracijama od 2 i 5 i 10 nM statistički je značajno povećao vijabilnost u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom ($P < 0,001$). U preventivnom modelu pretretman s 5 nM semaglutida statistički je značajno povećao vijabilnost ($P < 0,001$), dok ju je pretretman s 20 nM značajno smanjio ($P < 0,05$) u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom.
3. Oleinska kiselina statistički je značajno povećala nakupljanje lipida u stanicama u oba modela u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,001$). U terapijskom modelu sve ispitivane koncentracije semaglutida, statistički su značajno smanjile nakupljanje lipida u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom ($P < 0,001$). U preventivnom modelu značajno smanjenje nakupljanja lipida utvrđeno je nakon pretretmana s 2 nM ($P < 0,01$) i 5 nM semaglutida ($P < 0,001$).
4. Oleinska kiselina statistički je značajno povećala razinu triglicerida u oba modela u odnosu na netretirane stanice ($P < 0,001$). U terapijskom modelu semaglutid je značajno smanjio razinu triglicerida pri koncentracijama od 5 i 10 nM ($P < 0,05$) te 20 nM ($P < 0,01$). U preventivnom modelu pretretman s 2 i 5 nM nije značajno promijenio razinu triglicerida, dok su je koncentracije od 10 nM ($P < 0,001$) i 20 nM ($P < 0,05$) značajno povećale u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom.
5. U terapijskom modelu semaglutid je pri 10 i 20 nM statistički značajno smanjio razinu proteina PPAR-α ($P < 0,001$ i $P < 0,01$) u odnosu na stanice tretirane oleinskom kiselinom, a pri svim ispitivanim koncentracijama smanjio je razinu TNF u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom ($P < 0,05$ do $P < 0,001$).

Ocjena rada u tijeku!

6. U preventivnom modelu semaglutid nije značajno promijenio razinu proteina PPAR-α, PPAR-γ ni TNF u odnosu na stanice tretirane samo oleinskom kiselinom. U usporedbi s ekspresijom gena u stanicama tretiranim oleinskom kiselinom, ekspresija gena *TNF* bila je značajno niža nakon pretretmana s 2 i 5 nM semaglutida ($p < 0,05$). Pretretman s 2 nM značajno je smanjio ekspresiju *PPAR-α* ($P < 0,05$), a pretretman s 10 nM ekspresiju *PPAR-γ* ($P < 0,001$).

Ocjena rada u tijeku!

8. Sažetak

U ovom su istraživanju uspostavljena terapijski i preventivni model MASLD-a izlaganjem stanica HepG2 oleinskoj kiselini (1 mM). U terapijskom modelu oleinska je kiselina smanjila vijabilnost stanica, dok ju je semaglutid pri 2, 5 i 10 nM povećao. U preventivnom modelu pretretman s 5 nM semaglutida povećao je, a tretman s 20 nM smanjio vijabilnost u odnosu na tretman samo oleinskom kiselinom. Oleinska kiselina povećala je nakupljanje lipida i razinu triglicerida u oba modela. U terapijskom modelu sve ispitivane koncentracije semaglutida smanjile su nakupljanje lipida, a koncentracije od 5, 10 i 20 nM smanjile su razinu triglicerida u usporedbi sa stanicama tretiranima oleinskom kiselinom. U preventivnom modelu pretretman s 2 i 5 nM smanjio je nakupljanje lipida, dok koncentracije od 10 i 20 nM nisu značajno smanjile trigliceride, nego su ih povećale. U terapijskom modelu semaglutid je smanjio razinu proteina TNF pri svim ispitivanim koncentracijama, a proteina PPAR-α pri 10 i 20 nM. U preventivnom modelu nije značajno promijenio razinu proteina PPAR-α, PPAR-γ ni TNF. Ipak, pretretman semaglutidom smanjio je ekspresiju gena *TNF* pri 2 i 5 nM, *PPAR-α* pri 2 nM te *PPAR-γ* pri 10 nM.

Ocjena rada u tijeku!

9. Summary

Therapeutic and preventive MASLD models were established by exposing HepG2 cells to oleic acid (1 mM). In the therapeutic model, oleic acid reduced cell viability, whereas semaglutide at 2, 5, and 10 nM increased it. In the preventive model, pretreatment with 5 nM semaglutide increased viability, while 20 nM reduced it compared with oleic acid treatment alone. Oleic acid increased lipid accumulation and triglyceride levels in both models. In the therapeutic model, all tested semaglutide concentrations reduced lipid accumulation, while concentrations of 5, 10, and 20 nM reduced triglyceride levels. In the preventive model, pretreatment with 2 and 5 nM reduced lipid accumulation; concentrations of 10 and 20 nM did not reduce triglyceride levels significantly but increased them. In the therapeutic model, semaglutide reduced TNF protein levels at all tested concentrations and PPAR-α protein levels at 10 and 20 nM. In the preventive model, it did not significantly alter PPAR-α, PPAR-γ, or TNF protein levels. However, semaglutide pretreatment reduced *TNF* gene expression at 2 and 5 nM, *PPAR-α* expression at 2 nM, and *PPAR-γ* expression at 10 nM.

Ocjena rada u tijeku!

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. Zeng J, Fan JG, Francque SM. Therapeutic management of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease. United European Gastroenterol J 2024;12(2):177-186, doi:10.1002/ueg2.12525
4. Bansal MB, Patton H, Morgan TR, et al. Semaglutide therapy for metabolic dysfunction-associated steatohepatitis: November 2025 updates to AASLD Practice Guidance. Hepatology 2025, doi:10.1097/HEP.0000000000001608
5. Brisnovali NF, Haney C, Goedeke L. Rezdiffra™ (resmetirom): a THR-β agonist for non-alcoholic steatohepatitis. Trends Pharmacol Sci 2024;45(11):1081-1082, doi:10.1016/j.tips.2024.08.009
6. Ratziu V, Scanlan TS, Bruinstroop E. Thyroid hormone receptor-β analogues for the treatment of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). Journal of Hepatology 2025;82(2):375-387, doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.10.018
7. Zhang GY, Brandman D. A Clinical Update on MASLD. JAMA Internal Medicine 2025;185(1):105-107, doi:10.1001/jamainternmed.2024.6431
8. 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
9. 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
10. 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

Ocjena rada u tijeku!

11. Lee BP, Dodge JL, Terrault NA. National prevalence estimates for steatotic liver disease and subclassifications using consensus nomenclature. Hepatology 2024;79(3):
12. 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
13. Paik JM, Kabbara K, Eberly KE, et al. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults. Hepatology 2022;75(5):1204-1217, doi:10.1002/hep.32228
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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

Ocjena rada u tijeku!

21. 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
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, et al. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. Antioxidants (Basel) 2021;10(3), doi:10.3390/antiox10030364
29. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med 2009;30(1-2):1-12, doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
30. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism 2011;60(3):404-13, doi:10.1016/j.metabol.2010.03.006

Ocjena rada u tijeku!

31. Irie M, Sohda T, Anan A, et al. Reduced Glutathione suppresses Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Euroasian J Hepatogastroenterol 2016;6(1):13-18, doi:10.5005/jp-journals-10018-1159
32. Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y, et al. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. Antioxidants (Basel) 2021;10(2), doi:10.3390/antiox10020174
33. Vinoy N, Huang G, Wallace DF, et al. Peroxisome Dysfunction and Steatotic Liver Disease. 2025.
34. 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.
35. 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
36. Delille HK, Bonekamp NA, Schrader M. Peroxisomes and disease - an overview. Int J Biomed Sci 2006;2(4):308-14
37. 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
38. Lonardo A, Weiskirchen R. PPARs in molecular pathogenesis and drug treatment of type 2 diabetes-related MASLD. Exploration of Digestive Diseases 2025;4(100590, doi:10.37349/edd.2025.100590
39. Bo T, Gao L, Yao Z, et al. Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. Cell Metab 2024;36(5):947-968, doi:10.1016/j.cmet.2024.04.006
40. Barbhuiya PA, Yoshitomi R, Pathak MP. Understanding the Link Between Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBPs) and Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). Current Obesity Reports 2025;14(1):36, doi:10.1007/s13679-025-00626-y
41. Fernández-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, et al. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). J Biol Chem 2011;286(24):21466-77, doi:10.1074/jbc.M110.209973

Ocjena rada u tijeku!

42. Xue Chen and Anna Mazur and Wei Xu and WCRaKLDaYL. PPARα regulates acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) but not catalase. Biochemical and Biophysical Research Communications 2025;777(152247, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.152247
43. Wu HM, Ni XX, Xu QY, et al. Regulation of lipid-induced macrophage polarization through modulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity affects hepatic lipid metabolism via a Toll-like receptor 4/NF-κB signaling pathway. J Gastroenterol Hepatol 2020;35(11):1998-2008, doi:10.1111/jgh.15025
44. Marigorta UM, Millet O, Lu SC, et al. Dysfunctional VLDL metabolism in MASLD.
45. 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
46. Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, et al. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. The Lancet 2013;381(9860):40-46, doi:10.1016/S0140-6736(12)61731-0
47. Manabu Takahashi and Hiroaki Okazaki and Ken Ohashi and Masatsune Ogura and Shun Ishibashi and Sachiko Okazaki and Satoshi Hirayama and Mika Hori and Kota Matsuki and Shinji Yokoyama and Mariko. Current Diagnosis and Management of Abetalipoproteinemia. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2021;28(10):1009-1019, doi:10.5551/jat.RV17056
48. 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
49. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. Gastroenterology 2020;158(7):1913-1928, doi:10.1053/j.gastro.2019.11.311
50. 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
51. Patel RH, Parikh C, Upadhyay H, et al. Resmetirom in the Management of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis (MASH): A Comprehensive

Ocjena rada U tijeku!

Review of Current Evidence and Therapeutic Potential. Cureus 2024;16(11):e74772, doi:10.7759/cureus.74772
52. 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
53. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. J Physiol 1902;28(5):325-53, doi:10.1113/jphysiol.1902.sp000920
54. Moore B. On the treatment of Diabetus mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. Biochem J 1906;1(1):28-38, doi:10.1042/bj0010028
55. Labarre J-F. Sur les possibilites d'un traitement du diabete par l'incretine. 1932.
56. Brown JC, Pederson RA. A Multiparameter Study on the Action of Preparations Containing Cholecystokinin-Pancreozymin. Scandinavian Journal of Gastroenterology 1970;5(6):537-541, doi:10.1080/00365521.1970.12096632
57. 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
58. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol Rev 2007;87(4):1409-39, doi:10.1152/physrev.00034.2006
59. 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
60. ØRskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, et al. Glucagon-Like Peptides GLP-1 and GLP-2, Predicted Products of the Glucagon Gene, Are Secreted Separately from Pig Small Intestine but Not Pancreas. Endocrinology 1986;119(4):1467-1475, doi:10.1210/endo-119-4-1467
61. 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
62. 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
63. 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

Ocjena rada U tijeku!

64. 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
65. 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
66. Junker AE. The role of incretin hormones and glucagon in patients with liver disease. Dan Med J 2017;64(5):
67. 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
68. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, et al. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. Diabetes 1994;43(4):535-9, doi:10.2337/diab.43.4.535
69. 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
70. 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. Lancet 2002;359(9309):824-30, doi:10.1016/s0140-6736(02)07952-7
71. Lau J, Bloch P, Schäffer L, et al. Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide. J Med Chem 2015;58(18):7370-80, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00726
72. 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
73. 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

Ocjena rada u tijeku!

74. 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
75. 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
76. Barritt AS, Marshman E, Noureddin 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
77. 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
78. 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
79. 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
80. 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
81. 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
82. Petrovic A, Igrec D, Rozac K, et al. The Role of GLP1-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

Ocjena rada u tijeku!

83. 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.
84. 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
85. 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
86. 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/acsptsci.4c00661
87. 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
88. 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.
89. 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.
90. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. 2021.
91. 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
92. 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
93. 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
94. 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.

Ocjena rada u tijeku!

95. 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
96. 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
97. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 2008;3(6):1101-8, doi:10.1038/nprot.2008.73
98. Armitage P, Perry G. Statistical methods in medical research. Wiley-Blackwell: 2001.
99. Groves T. Enhancing the quality and transparency of health research. Bmj 2008;337(7661):a718, doi:10.1136/bmj.a718
100. 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.
101. 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
102. 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
103. 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
104. 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
105. 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
106. Liu M, Park S. The Role of PNPLA3_rs738409 Gene Variant, Lifestyle Factors, and Bioactive Compounds in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A

Ocjena rada u tijeku!

Population-Based and Molecular Approach towards Healthy Nutrition. Nutrients 2024;16(8), doi:10.3390/nu16081239
107. 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
108. 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
109. 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
110. 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
111. 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
112. 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
113. 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
114. Donna DYaGaHLaBMSaBMF. Discovery of novel modulators for the PPARα (peroxisome proliferator activated receptor α): Potential therapies for nonalcoholic fatty liver disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2021;41(116193, doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116193
115. 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
116. Francque S, Verrijken A, Caron S, et al. PPARα gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2015;63(1):164-73, doi:10.1016/j.jhep.2015.02.019

Ocjena rada U tijeku!

117. 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
118. Moliterni C, Vari F, Schifano E, et al. Lipotoxicity of palmitic acid is associated with DGAT1 downregulation and abolished by PPARα activation in liver cells. J Lipid Res 2024;65(12):100692, doi:10.1016/j.jlr.2024.100692
119. 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
120. Wang H, Wang L, Li Y, et al. The HIF-2α/PPARα 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
121. 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
122. 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
123. 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
124. Lim WS, Ng DL, Kor SB, et al. Tumour necrosis factor alpha down-regulates the expression of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα) in human hepatocarcinoma HepG2 cells by activation of NF-κB pathway. Cytokine 2013;61(1):266-74, doi:10.1016/j.cyto.2012.10.007
125. 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
126. 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

Ocjena rada u tijeku!

127. 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
128. 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
129. 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
130. Chaudhary R, Weiskirchen R, Ehrlich M, et al. Dual signaling pathways of TGF-β superfamily cytokines in hepatocytes: balancing liver homeostasis and disease progression. 1663-9812 (Print)):
131. Hawary OA, Wadie W, El-Said YAM, et al. Repurposing of semaglutide by targeting SIRT1 and TGF-β/Smad signaling in hepatic fibrosis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2025, doi:10.1007/s00210-025-04675-x
132. 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
133. 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
134. Madhu D, Hammad M, Kavalakatt S, et al. GLP-1 Analogue, Exendin-4, Modulates MAPKs Activity but not the Heat Shock Response in Human HepG2 Cells. Proteomics Clin Appl 2018;12(1), doi:10.1002/prca.201600169

Ocjena rada
u tijeku!

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 Hrvatin, 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

Ocjena rada u tijeku!

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, Shimaa; 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

Ocjena rada u tijeku!

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

Očjena rada
u tijeku!