

Vizualizacija proliferirajućih imunskih stanica u mišjem modelu metabolički uzrokovane bolesti masne jetre (MASLD)

Plantak, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:472123>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-17**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Diplomski sveučilišni smjer

Biotehnologija u medicini

Patricia Plantak

***Vizualizacija proliferirajućih imunskih stanica u mišjem modelu
metabolički uzrokovane bolesti masne jetre (MASLD)***

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Diplomski sveučilišni smjer

Biotehnologija u medicini

Patricia Plantak

***Vizualizacija proliferirajućih imunskih stanica u mišjem modelu
metabolički uzrokovane bolesti masne jetre (MASLD)***

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: doc.dr.sc. Maja Lenartić

Komentor rada: izv.prof.dr.sc. Jelena Ban

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Master's program

Biotechnology in medicine

Patricia Plantak

***Visualization of proliferating immune cells in a mouse model of
metabolic associated steatotic liver disease (MASLD)***

Master's thesis

Rijeka, 2023

Diplomski rad obranjen je 26.rujna 2024. godine

pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Ovaj rad sastoji se od 56 stranica te sadrži 13 slika, 2 tablice i 50 literaturnih navoda.

Zahvala

Prije svega, želim se iskreno zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Lenartić, na neizmjerne podršci, strpljenju, razumijevanju i suosjećanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala za svaki odgovor na moja pitanja, dani stručni savjet i komentar. Cijenim Vaše vrijeme i predanost koje ste nesebično uložili u moj rad.

Velika zahvala ide i mojim prijateljima, s kojima sam provela dane ne samo učeći, nego i stvarajući neprocjenjive uspomene. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene kroz sve ove godine. Ponosna sam na nas i na to u kakve smo mlade ljude odrasli.

Mojoj obitelji, koju volim beskrajno, dugujem duboku zahvalnost za bezuvjetnu ljubav, razumijevanje i motivaciju. Vaša podrška bila je ključna ne samo tijekom ovog rada, već i kroz cijelo moje školovanje. Hvala vam što ste vjerovali u mene.

Posebnu zahvalu želim uputiti svojoj sestri Luciji, koja je uvijek bila tu kao moj najveći oslonac. Tvoje riječi podrške, pomoć, prisutnost i ljubav značile su mi više nego što riječi mogu opisati.

Sažetak

Moderni način života često dovodi do stresa, neaktivnosti i manjka sna, što rezultira lošim prehrambenim navikama bogatim rafiniranim šećerima i zasićenim mastima. Dugotrajna izloženost takvom stilu života može dovesti do povišenog kolesterola, triglicerida, šećera u krvi, inzulinske rezistencije i visokog krvnog tlaka, što se zajednički naziva metaboličkim sindromom. Metabolički uzrokovana bolest steatitične jetre (engl. *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, MASLD) predstavlja manifestaciju ovog sindroma, a obilježava je nakupljanje masti u jetri. MASLD napreduje kroz različite faze, od steatoze, preko fibroze pa sve do ciroze. Opći je konsenzus da aktivacija proupalnih imunskih efektorâ igra ključnu ulogu u tranziciji steatoze u steatohepatitis uzrokovan metaboličkom disfunkcijom (engl. *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*, MASH). Cilj diplomskog rada bio je dokazati da zapadnjačka prehrana kod miševa dovodi do razvoja MASH-a, prvenstveno infiltracijom aktivnih proliferirajućih imunskih stanica u jetri. Korištenjem imunohistokemijskih i imunofluorescentnih metoda identificirali smo te stanice, dok je protočna citometrija omogućila detaljnu analizu njihovih podtipova. U miševa hranjenih prehranom SSD, otkrili smo histopatološke promjene u jetri koje odgovaraju onima u MASH pacijenata. Imunohistokemijska bojenja pokazala su prisutnost CD45⁺ i Ki-67⁺ imunskih stanica u tkivu jetre, dok je imunofluorescencija potvrdila dvostruko pozitivne stanice. Kod miševa na SSD prehrani primijetili smo povećanu infiltraciju imunskih stanica, posebno unutar upalnih žarišta, s većim brojem CD45⁺Ki-67⁺ stanica. Također, rezultati protočne citometrije pokazali su značajan porast proliferirajućih CD8⁺ limfocita T, NK stanica i $\gamma\delta$ limfocita T u jetrama SSD miševa u usporedbi s kontrolnom grupom što ukazuje na aktivnu upalu u jetri uzrokovanu SSD prehranom. Ove promjene sugeriraju da prehrana SSD značajno utječe na proliferaciju i dinamiku leukocita u tkivu jetre, potencijalno mijenjajući imunski odgovor i pridonoseći progresiji MASLD-a. Ovi rezultati mogli bi usmjeriti

buduća istraživanja na imunološke aspekte bolesti, što bi pomoglo u razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih strategija za MASLD.

Ključne riječi: MASLD, MASH, imunosne stanice, proliferacija, histologija

Abstract

The modern lifestyle often leads to stress, inactivity, and lack of sleep, resulting in poor eating habits rich in refined sugars and saturated fats. Prolonged exposure to this lifestyle can cause elevated cholesterol, triglycerides, blood sugar, insulin resistance, and high blood pressure, which are collectively referred to as metabolic syndrome. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is a manifestation of this syndrome and is characterized by fat accumulation in the liver. MASLD includes various stages, ranging from steatosis to cirrhosis. It is widely accepted that the activation of pro-inflammatory immune effectors plays a key role in the transition from steatosis to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH).

This thesis aimed to demonstrate that a Western diet in mice leads to the development of MASH, primarily through the infiltration of actively proliferating immune cells into the liver. Using immunohistochemical and immunofluorescent methods, these cells were identified, while flow cytometry provided detailed analysis of their subtypes. In SSD-fed mice, we discovered histopathological changes in the liver resembling those observed in MASH patients. Immunohistochemical staining revealed the presence of CD45⁺ and Ki-67⁺ immune cells in the liver tissue, and immunofluorescence confirmed the presence of double-positive cells. In SSD-fed mice, we observed increased immune cell infiltration, particularly within inflammatory foci, with a higher number of CD45⁺Ki-67⁺ cells. Additionally, flow cytometry results showed a significant increase in proliferating CD8⁺ T lymphocytes, NK cells and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the livers of SSD-fed mice compared to the control group indicating active liver inflammation caused by the SSD diet.

These changes suggest that the SSD diet significantly affects leukocyte proliferation and dynamics within liver, potentially altering the immune response and contributing to the progression of MASLD. These findings

may direct future research toward the immunological aspects of the disease, aiding in the development of new diagnostic and therapeutic strategies for MASLD.

Key words: MASLD, MASH, immune cells, proliferating, histology

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Metabolički sindrom (MetS)	1
1.2. Bolest steatotične jetre uzrokovana metaboličkom disfunkcijom (MASLD)	3
1.2.1. Struktura jetre i njena funkcija u homeostazi	4
1.2.2. Histopatologija i prevalencija	7
1.2.3. Patogeneza MASLD-a.....	10
1.2.4. MASLD i imunosni sustav	11
1.2.5. Dijagnosticiranje MASLD-a	12
1.2.6. Modeli prehrane u istraživanju MASLD-a	13
2. Cilj rada.....	15
3. Materijali i metode	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Laboratorijski miševi	16
3.1.2. Protutijela	16
3.1.3. Reagensi i puferi	18
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Žrtvovanje miševa	21
3.2.2. Fiksacija tkiva i parafinsko ukapljanje	22
3.2.3. Imunohistokemija	22
3.2.4. Imunohistokemijsko bojenje CD45 stanica	24
3.2.5. Imunoflourescentno bojenje	25
3.2.6. Protočna citometrija	26
3.2.7. Bojenje Sirius crvenilom	28
4. Rezultati	29
4.1. SSD prehrana stvara patogenezu MASH-a	29
4.2. Razrada metode za dvostruko imunohistokemijsko bojenje	32
4.3. Jetre SSD-om hranjenih miševa pokazuju visoku razinu proliferacije imunosnih stanica	36

4.4. Kod MASH-a dolazi do značajnih promjena u sastavu i broju imunskih stanica	38
5. Rasprava.....	44
6. Zaključak	47
7. Literatura	48
8. Životopis.....	54

1. Uvod

Ubrzani životni stil modernog čovjeka uzrok je pretjeranoj izloženosti stresu, neaktivnosti i nedostatku sna što često rezultira neredovitom, neadekvatnom i nepravilnom visokokaloričnom ishranom koja se većinom sastoji od brzih rafiniranih šećera i zasićenih masti (1). Duži period izloženosti takvom stilu života može u pojedinca izazvati visoku razinu kolesterola i triglicerida u krvi, hiperglikemiju, inzulinsku rezistenciju (IR) i povišeni krvni tlak (2,3). Navedeni čimbenici modernog sjedilačkog života razlog su razvoju metaboličkog sindroma (MetS), pretilosti, dijabetesa tipa 2 (DMT2), kardiovaskularnih oboljenja i sl. Prevalencija pretilosti odraslih može iznositi 2-35% s obzirom na područje (4). U 2022. godini, svaka osma osoba bila je pretila. Udio pretilosti među odraslima u svijetu više se nego udvostručio od 1990. godine, dok se pretilost među adolescentima učetverostručila (5).

1.1. Metabolički sindrom (MetS)

Metabolički sindrom je poremećaj povezan s prevalencijom pretilosti. Kako raste učestalost pretilosti, paralelno se povećava i prevalencija MetS-a. Prema metaanalizi iz 2022. godine, koja je obuhvatila podatke o prevalenciji metaboličkog sindroma iz 1129 studija, globalna prevalencija ovog sindroma kretala se između 12,5% i 31,4%. Značajno veće stope prevalencije zabilježene su u regiji Istočnog Mediterana i Americi (6). U kontinentalnom dijelu Hrvatske se procjenjuje da 40% ljudi (42% žena i 35% muškaraca) ima metabolički sindrom (7). U svim epidemiološkim studijama udio ljudi pogođenih MetS-om raste sa starošću. Ova činjenica ne čudi s obzirom da biokemijske promjene starenja i MetS/DMT2 dijele puno zajedničkih stavki (8). Najprevalentnija dobna skupina je između 60 i 69 godina gdje se postotak penje do 43.5% (9). Kao pojam MetS se prvi put spominje 1940. godine gdje opisuje ljude s više zdravstvenih čimbenika koji imaju veći rizik za razvitak bolesti (10). MetS danas predstavlja skup patoloških stanja koja uključuju hiperglikemiju, IR,

dislipidemiju (hipertrigliceridemiju i niske razine triglicerida visoke gustoće- HDL kolesterola), središnju abdominalnu pretilost i hipertenziju (11). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) prvi put je definirala MetS 1998. godine kao „intoleranciju glukoze, poremećenu toleranciju glukoze ili dijabetes melitus i/ili inzulinsku rezistenciju, zajedno s dvije ili više sljedećih komponenti:

- Povišeni arterijski tlak, tj. $\geq 140 / 90$ mm Hg
- Povišeni plazma trigliceridi (≥ 150 mg/dl) i/ili nizak HDL kolesterol (< 35 mg/dl kod muškaraca i < 39 mg/dl kod žena)
- Abdominalna (visceralna) pretilost, tj. BMI > 30 kg/m²
- Omjer struka/bokova >0.9 za muškarce i 0.85 za žene
- Mikroalbuminurija, tj. izlučivanje albumina urinom ≥ 20 µg/min ili omjer albumin/kreatinin ≥ 30 µg/mg^g (10)

Dijagnoza metaboličkog sindroma može se postaviti prema različitim kriterijima što dovodi do razlika u dijagnosticiranju, te je potrebno normirati i prilagoditi kriterije kako bi dijagnoza postala usuglašena i što točnija. Najčešće korišteni kriteriji su NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III) i IDF (International Diabetes Federation). Smjernice NCEP ATP III je razvio National Institute of Health, a definiraju metabolički sindrom prisutnošću najmanje tri od pet sljedećih kriterija:

- Opseg struka od ≥ 102 cm kod muškaraca ili ≥ 88 cm kod žena
- Razina triglicerida od $\geq 1,7$ mmol/L
- HDL kolesterol $> 1,03$ mmol/L kod muškaraca ili $> 1,29$ mmol/L kod žena

- Sistolički krvni tlak ≥ 130 mmHg ili dijastolički krvni tlak ≥ 85 mmHg
- Razina glukoze natašte $\geq 6,1$ mmol/L ili prethodno dijagnosticiran dijabetes tipa 2 (12,13)

Iako nemaju sve pretile osobe MetS, značajan broj njih otporan je na inzulin (14). U normalnim uvjetima inzulin inhibira lipolizu masnog tkiva. Međutim, kada dođe do IR-a, inzulin nije u stanju pravilno potisnuti lipolizu što rezultira većim oslobađanjem slobodnih masnih kiselina (FFA) u plazmu. Kod osoba s IR-om, visoki dotok FFA u jetru ometa inzulinsko djelovanje u jetri, povećava sintezu i pohranu triglicerida. Kako se višak triglicerida izlučuje kao lipoprotein vrlo niske gustoće (VLDL) triglicerid, smatra se da je dislipidemija povezana s IR-om izravna posljedica povećanog izlučivanja VLDL-a iz jetre (15).

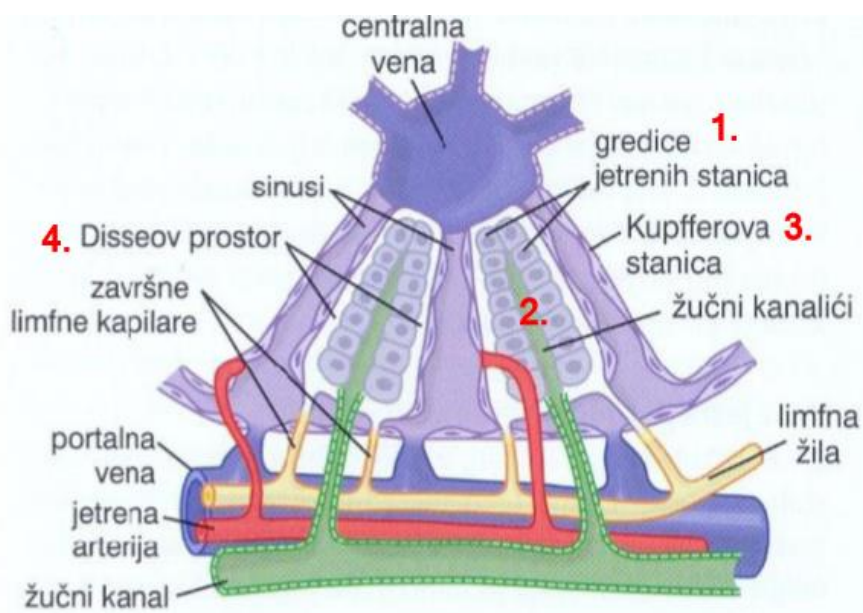
1.2. Bolest steatotične jetre uzrokovana metaboličkom disfunkcijom (MASLD)

MASLD je uobičajeni komorbiditet povezan s pretilošću, IR-om, DMT2 i dislipidemijom. Ova bolest se gotovo isključivo pojavljuje u vezi s MetS-om te se stoga općenito smatra njegovom hepatičkom manifestacijom. Zbog toga je njezin izvorni naziv nealkoholna bolest masne jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) 2020. godine promijenjen u metabolički uzrokovana bolest masne jetre (engl. *metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD*) (16). Danas je na snazi novija nomenklatura koja glasi bolest steatotične jetre povezana s metaboličkom disfunkcijom (engl. *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD*) koja je predložena kao sveobuhvatan i nestigmatizirajući izraz (17).

1.2.1. Struktura jetre i njena funkcija u homeostazi

Jetra je organ s mnogim funkcijama. Jedan je od glavnih organa odgovoran za održavanje sistemske homeostaze širokog spektra molekula. Osim toga, uključena je u metabolizam ugljikohidrata, bjelančevina, masti, hormona i stranih kemijskih tvari kroz proizvodnju žuči, filtraciju i pohranjivanje krvi, skladištenje vitamina i željeza, stvaranje čimbenika zgrušavanja i zaštitu od mikroorganizama koji dolaze iz crijeva (18).

Makroskopski, jetra se sastoji od nekoliko režnjeva. Na mikroskopskoj razini, svaki režanj se sastoji od milijuna jetrenih lobula, koji predstavljaju funkcionalne jedinice jetre (slika 1). Svaki lobul sastoji se od hepatocita koji su raspoređeni u vrpčama, radijalno se šireći od centralne vene prema portalnim trijadama (koje se sastoje od portalne vene, jetrene arterije i jetrenog žučnog kanala), tvoreći otprilike heksagonalni oblik. Jetrena arterija i portalna vena odvođe krv u mrežu sinusoidnih kapilara koje dovode krv iz portalne trijade u centralnu venu, osiguravajući kisik i hranjive tvari stanicama jetre. Sinusi su u izravnom kontaktu s hepatocitima, omogućujući aktivnu razmjenu hranjivih tvari. Žučna kiselina proizvedena od hepatocita odvođi se u žučne kanaliće koji ulaze u žučni kanal. Dakle, protok žuči je u suprotnom smjeru od krvi (19).

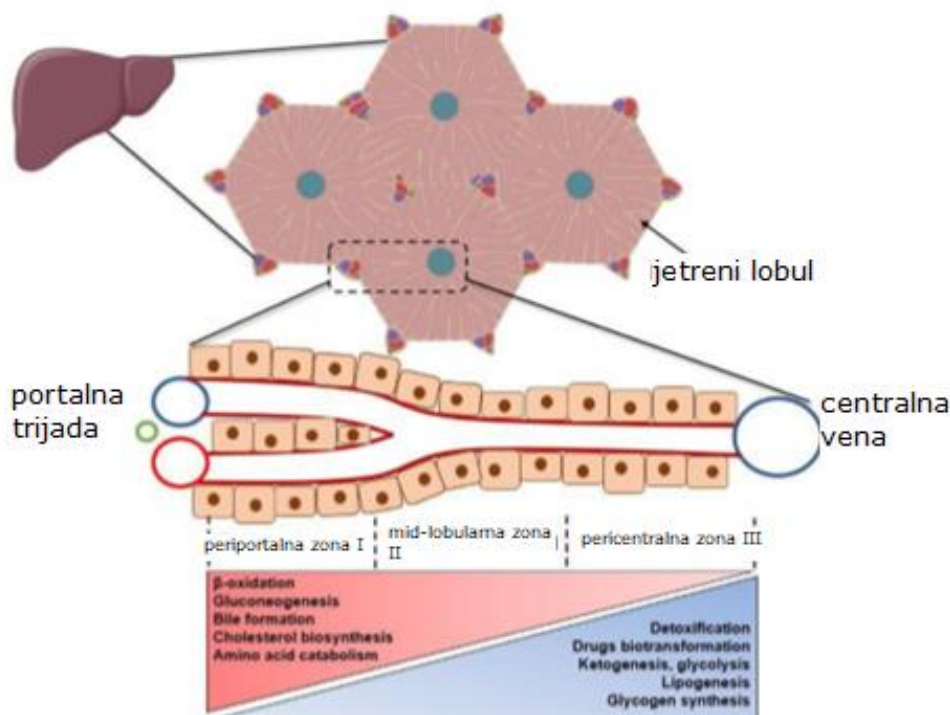


Slika 1. Temeljna građa jetrenog režnjača. Prikazane su gredice jetrenih stanica, krvne žile, sustav za protjecanje limfe sastavljen od Disseovih prostora i limfnih žila između režnjača. Prema (18)

Pored hepatocita, koji čine većinu stanica jetre, jetra se također sastoji od neparenhimskih stanica kao što su jetrene sinusoidalne endotelne stanice (engl. *liver sinusoidal endothelial cells*, LSECs), Kupfferove stanice, limfociti, kolangiociti i jetrene stelatne stanice (engl. *hepatic stellate cells*, HSCs). LSECs su najzastupljenije među neparenhimskim stanicama. Ove visoko specijalizirane endotelne stanice s fenestrama, koje imaju oskudnu isprekidanu bazalnu membranu, čine zid jetrenih sinusa (20). Prostor između tankog sinusoidnog endotela i hepatocita naziva se Disseov prostor. On služi kao niša za HSCs koje su rezervoari za retinoičnu kiselinu i grade okosnicu vezivnog tkiva. Njihova aktivacija i trans-diferencijacija u proliferativne, fibrogene miofibroblaste je glavni pokretač fibroze kod oštećenja jetre (21). Kolangiociti su epitelne stanice koje oblažu žučne kanale. Jetra je također važan imunosni organ. Kupfferove stanice su najzastupljenija imunosna populacija u jetri, čineći 20% neparenhimskog odjeljka, i nalaze se unutar stijenke sinusoida. Spadaju u tkivne makrofage i dio su mononuklearno-fagocitnog sustava. Od limfoidnog

odjeljka, urođeni limfociti gama delta T ($\gamma\delta$ T) specifično su obogaćeni u jetri, čineći gotovo polovinu jetrenih limfocita. Populacije adaptivnih limfocita kao što su CD4⁺ limfociti T, CD8⁺ limfociti T i limfociti B također se mogu naći u jetri. Imunosni odjeljak igra jedinstvenu ulogu u otkrivanju i eliminaciji prijetnji koje dolaze kroz krvotok. Sve vrste stanica jetre formiraju složenu multicelularnu mrežu uključenu u održavanje homeostaze jetre (22).

Na staničnoj razini, parenhim jetre uglavnom se sastoji od hepatocita koji posreduju u gotovo svim funkcijama jetre. Hepatociti se mogu podijeliti u tri zone prema perfuziji i funkcionalnosti (slika 2). Zona I je najbolje oksigenirana i smatra se periportalnim područjem hepatocita gdje prevladavaju procesi poput β -oksidacije, glukoneogeneze, stvaranja žuči, biosinteze kolesterola i katabolizma aminokiselina. U ovoj zoni stanice se prve regeneriraju i zadnje propadaju. Zona II se smatra prijelaznim srednjim područjem između zone I i III s posebnim funkcijama poput homeostaze željeza i modulacije faktora rasta sličnih inzulinu. Zona III ima najnižu stopu oksigenacije zbog udaljenosti od portalne trijade, što je važno za detoksikaciju, biotransformaciju lijekova i metaboličke procese poput ketogeneze, glikolize, lipogeneze i sinteze glikogena (19).

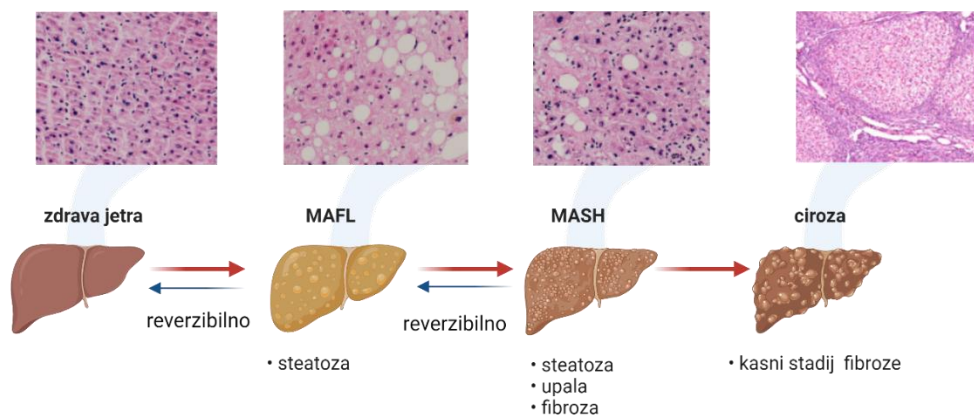


Slika 2. Metabolički procesi u zonama hepatocita. Na mikroskopskoj razini, jetra se sastoji od milijuna jetrenih lobula. Hepatocite dijelimo u tri zone na temelju perfuzije i funkcionalnosti. U zoni I (periportalna zona) dominiraju procesi poput β -oksidacije, glukoneogeneze, formiranja žuči, biosinteze kolesterola i katabolizma aminokiselina. Zona II (mid-lobularna zona) smatra se prijelaznim područjem. Zona III (pericentralna zona) je važna za detoksifikaciju, biotransformaciju lijekova i metaboličke procese poput ketogeneze, glikolize, lipogeneze i sinteze glikogena.

1.2.2. Histopatologija i prevalencija

Primarni histološki znak MASLD-a je steatoza, tj. nakupljanje triglicerida u hepatocitima (najmanje 5% hepatocita). Ovisno o veličini i broju lipidnih kapljica, steatoza se može podijeliti na makrovezikularnu i mikrovezikularnu. Faza u kojoj je prisutna samo klinički benigna steatoza naziva se MAFL (engl. *metabolic-associated fatty liver*). Steatohepatitis uzrokovan metaboličkom disfunkcijom (engl. *metabolic-associated steatohepatitis*, MASH) predstavlja sljedeću histopatološku fazu u MASLD-u, koja je obilježena lobularnom infiltracijom različitih imunskih stanica,

kao što su CD4⁺ limfociti T, CD8⁺ limfociti T i makrofagi, koji formiraju stanične agregate (mikrogranulome). Ozbiljnost portalne upale korelira s fazom fibroze, što sugerira uzročnu povezanost između ova dva fenomena. Hepatocelularna oštećenja su također karakteristična za MASH, od baloniranja hepatocita do apoptoze. Razvoj fibroze je jedna od karakteristika MASH-a, koja se obično u početku primjećuje u acinarnoj zoni III (23,24). Razvoj fibroze se može podijeliti u 5 faza (F0-F4). Blaga pericelularna fibroza predstavlja prvu fazu (F1), nakon čega slijedi razvoj pericelularne i portalne fibroze (F2), pregrađujuće uznapredovale fibroze (F3) i ciroze (F4). Završna faza u patofiziologiji MASLD-a je ciroza (25). U ovoj fazi, drugi patofiziološki znakovi su izgubljeni, a normalna funkcija jetre više nije moguća. Faze MASLD-a, zajedno s njihovim glavnim histološkim značajkama, sažete su na slici 3.



Slika 3. Histopatološki prikaz stupnjeva MASLD patogeneze. Histološki presjeci ilustriraju normalnu jetru, steatozu tj. MAFL, MASH i cirozu. Nakupljanje triglicerida unutar hepatocita uzrokuje steatozu. Steatoza praćena upalom, apoptozom i fibrozom naziva se MASH. MASH može dalje napredovati do ciroze. Osobe s cirozom imaju povećan rizik od hepatocelularnog karcinoma (HCC). Napravljeno u BioRenderu.

Iako MASLD, bez vaskularnih komplikacija, ima relativno benignu prognozu, oko 20% pacijenata s masnom jetrom na kraju razvije MASH,

koji može dovesti do razvoja ciroze jetre unutar pet do deset godina. Opće je prihvaćeno da je za prijelaz iz jednostavne steatoze u MASH, osim kronične sistemske upale i inzulinske rezistencije, također ključna upala jetre (26).

U razvijenim zemljama, MASLD se smatra jednim od glavnih uzroka kroničnih bolesti jetre i ima visoku stopu incidencije. Procijenjena globalna prevalencija MASLD-a iznosi oko 25–30%, što je rezultat rastuće epidemije pretilosti i dijabetesa tipa 2 (13). Epidemiološke studije ukazuju na veću učestalost MASLD-a u rizičnim skupinama. Steatoza jetre zabilježena je kod 50-60% osoba s prekomjernom tjelesnom težinom. Kod bolesnika s dijabetesom tipa 2, prevalencija MASLD-a iznosi oko 55% globalno, dok je u Europi taj postotak 68%. U Hrvatskoj, istraživanje na uzorku od 454 pacijenta s dijabetesom tipa 2 pokazalo je učestalost masne jetre od 78%. Ipak, MASLD pogađa i oko 7% osoba normalne tjelesne mase, što se češće javlja kod žena, mlađih osoba, te onih s inzulinskom rezistencijom i hiperkolesterolemijom, pri čemu su jetreni enzimi često unutar normalnih granica. Smatra se da je prevalencija MASLD-a u Hrvatskoj slična onoj u zemljama Zapadne Europe (20%-30%), iako nedostatak epidemioloških istraživanja u općoj populaciji otežava pouzdanu procjenu (25). Razlika u prevalenciji MASLD-a vidljiva je između spolova i dobi te između rasa i različitih narodnosti (27).

Neki od rizičnih faktora za razvoj MASLD-a uključuju dislipidemiju, genetsku predispoziciju, loše životne navike u vidu prehrane, obrazaca spavanja i fizičke aktivnosti, pretilost, inzulinsku rezistenciju/ dijabetes tipa 2, metabolički sindrom, sarkopeniju, mikrobiom crijeva/ oksidativni stres... (27)

1.2.3. Patogeneza MASLD-a

Mehanizmi uključeni u patogenezu MASLD-a još uvijek nisu u potpunosti shvaćeni. "Teorija dvaju udaraca" jedna je od najranijih prihvaćenih hipoteza (28). Prva faza u razvoju MASLD-a je evolucija steatoze jetre, dok je druga faza naknadna apoptoza hepatocita koja dovodi do upale jetre i fibroze. Točnije, za uspostavu MASLD-a, "prvi udarac" je nakupljanje lipida u hepatocitima, uglavnom u obliku triglicerida. Ovo je posljedica neravnoteže između dvaju metaboličkih puteva; prvog koji promiče sintezu i unos masnih kiselina u hepatocite u odnosu na drugi koji promiče oksidaciju i izvoz masnih kiselina. Predloženo je da je inzulinska rezistencija najvažniji uzrok nakupljanja lipida i razvoja steatoze jetre. Osim toga, IR dovodi do periferne lipolize i hiperinzulinemije. Lipoliza povećava cirkulaciju FFA i njihov unos u jetru. Hiperinzulinemija pojačava sintezu masnih kiselina u jetri poticanjem glikolize i favorizira nakupljanje triglicerida unutar hepatocita smanjujući sposobnost jetre da reesterificira i izlučuje trigliceride (29). Nakupljanjem lipida, liposomi u hepatocitima povećavaju se po veličini i oblikuju velike vakuole koje su karakteristične za steatozu jetre. Kao rezultat steatoze, hepatociti postaju osjetljiviji na oksidativni stres. Oksidacija masnih kiselina u mitohondrijima dovodi do proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (ROS) i inducira stanje oksidativnog stresa. U slučaju steatoze jetre, zalihe antioksidansa ne uspijevaju ukloniti nakupljen ROS te se proizvodnja slobodnih radikala dodatno povećava, što posljedično dovodi do oksidativnog oštećenja DNA, lipida i proteina, kao i apoptoze. Osim toga, ROS može imati ulogu u regulaciji gena koji kodiraju za proinflamatorne i profibrogene citokine poput tumor-nekrotizirajućeg faktora (TNF), transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β) ili interleukina 8 (IL-8). Stoga se oksidativni stres predlaže kao "drugi udarac" odgovoran za progresiju od masne jetre do steatoze obilježene upalom jetre i fibrozom (30). Nakupljanje lipida u stanicama jetre dovodi do metaboličkog i oksidativnog stresa, što inducira lokalnu imunu aktivaciju i

upalu. Posljednjih godina prihvaćena je teorija „višestrukih paralelnih udaraca“ jer jednostavna teorija „dva udarca“ ne objašnjava napredovanje bolesti u svim slučajevima (31). Prvi udarac bio bi inzulinska rezistencija i povezani metabolički poremećaj. Hiperinzulinemija uzrokovana IR-om rezultira povećanom *de novo* lipogenezom u jetri. Nakon „prvog udarca“ može slijediti niz paralelnih udaraca na već ranjivu jetru aktivacijom različitih signalnih puteva koji se aktiviraju međuorganskom komunikacijom između masnog tkiva, jetre, gušterače i crijeva. Posljedično, dolazi do napredovanja od jednostavne steatoze do MASH-a i fibroze (32).

1.2.4. MASLD i imunosni sustav

Jetra sadrži svoj vlastiti imunosni sustav. U homeostazi imamo raznolik sastav imunosnih stanica, no taj se sastav potpuno transformira prilikom razvoja MASLD-a. Razina upale odgovara težini bolesti, stoga je i razina proliferacije imunosnih stanica drugačija u različitim stadijima. Iako adaptivne imunosne stanice predstavljaju drugu liniju obrane protiv različitih prijetnji, urođene imunosne stanice su prve koje reagiraju. Rasteći konsenzus je da međusobna komunikacija između imunosnih stanica, hepatocita, HSC-ova i LSEC-ova u jetri određuje ukupni slijed upale i posreduje u napredovanju od MAFL-a do MASH-a. Fibroza, koja je ključna karakteristika MASH-a, obično se prvo pojavljuje u pericentralnoj zoni i širi se prema periportalnoj zoni kako bolest napreduje. S obzirom na to da je zona 3 najmanje oksigenirana, ovo sugerira da hipoksija igra važnu ulogu u poticanju stresnih liganada koji aktiviraju tkivno-rezidentne imunosne stanice. Nadalje, prostorna distribucija imunosnih stanica unutar jetrenog lobula nije jednaka, što može doprinijeti usmjerenom napredovanju MASH-a. Dugo je bilo nejasno kako se kumulativni faktori metaboličkog stresa prevode u signal koji aktivira imunosni sustav, čime se jetrena sredina mijenja iz antiupalnog u proupalno stanje. Međutim, nedavna otkrića pokazuju da se mora dogoditi kaskada upalnih događaja, koja se grubo može podijeliti u tri faze: 1) Početna faza u kojoj urođene,

tkivno-rezidentne imunosne stanice prepoznaju stres jetre i počinju proizvoditi citokine, 2) regrutacija i aktivacija proupalnih stanica, uglavnom mijeloične loze, koja pojačava početne upalne signale, i 3) ekspanzija upalnog odgovora tijekom koje se uključuju adaptivne imunosne stanice i dolazi do opsežnog oštećenja tkiva. MASLD je označen kao upalni odgovor tipa 3, karakteriziran fibrozom i proizvodnjom citokina IL-17A (33).

1.2.5. Dijagnosticiranje MASLD-a

Prema definiciji, MASLD nije istovjetan dijagnozi NAFLD-a. MASLD se dijagnosticira na temelju prisutnosti hepatičke steatoze kada je zahvaćeno više od 5% hepatocita uz prisutnost definiranog skupa metaboličkih abnormalnosti poput dijabetesa tipa 2 i/ili prekomjerne tjelesne težine i/ili pretilosti i/ili hiperlipidemije, bez obzira na unos alkohola. Dakle, svaka osoba s metaboličkim sindromom i hepatičkom steatozom bit će dijagnosticirana s MASLD-om. Ranije se dijagnoza nealkoholne masne bolesti jetre mogla postaviti tek nakon što se isključila prekomjerna konzumacija alkohola (<30 g po danu za muškarce i <20 g po danu za žene) (16,33). Također, velik broj oboljelih od MASLD-a nema nikakvih kliničkih simptoma, a dijagnoza im se postavlja tijekom sistematskih pregleda ili posjeta liječniku iz nekog drugog razloga (34).

Prilikom procjene bolesnika sa sumnjom na MASLD, važno je isključiti prisutnost drugih uzroka bolesti jetre, poput virusnih hepatitisa, autoimunih, toksičnih i drugih metaboličkih bolesti. Potrebno je potvrditi prisutnost steatoze pomoću slikovnih metoda, kao što su ultrazvuk abdomena, tranzijentna elastografija ili histologija, te isključiti sekundarne uzroke steatoze. Među sekundarnim uzrocima ubrajamo lijekove ili druge rjeđe uzroke poput totalne parenteralne prehrane, gladovanja ili naglog mršavljenja. Jedan od prvih znakova MASLD-a u bolesnika je asimptomatsko povišenje jednog ili više jetrenih biokemijskih testova

(AST, ALT i GGT) i hepatomegalija. Pojava splenomegalije je prvi znak portalne hipertenzije i uznapredovale bolesti jetre (25).

Očekuje se da će MASLD postati vodeći uzrok transplantacije jetre, nadmašivši kronični hepatitis C, te da će postati najbrže rastući uzrok raka jetre. Unatoč ozbiljnosti i raširenosti ove bolesti, liječenje se i dalje zasniva na promjeni životnih navika i životnog stila, dok su farmakološka terapija i kirurške metode indicirane kod manjeg dijela oboljelih (35). U Europi trenutno ne postoje odobreni lijekovi za MASH, osim primjerice, Rezdiffre koju je ove godine odobrila FDA (engl. *Food and Drug Administration*) (36,37).

1.2.6. Modeli prehrane u istraživanju MASLD-a

Istraživanje MASLD-a suočava se s izazovima zbog nedostatka prikladnih pretkliničkih modela. Iako postoji nekoliko genetskih modela, njihova primjenjivost na ljudske bolesti je upitna. Najčešći način induciranja inzulinske rezistencije kod miševa je prehrana bogata zasićenim mastima (engl. *high fat diet*, HFD), koja dovodi do teške steatoze nakon dugotrajnog hranjenja. Međutim, ovaj model uzrokuje samo blagu upalnu reakciju u jetri i ne dovodi do fibroze. Alternativni modeli uključuju dijetu koje se sastoje od visokog postotka saharoze i masti, te su siromašne kolinom ili istovremeno kolinom i metioninom (MCD). Ove hranjive tvari ključne su za jetrenu β -oksidaciju i proizvodnju lipoproteina vrlo niske gustoće, pa njihov nedostatak uzrokuje nakupljanje triglicerida, steatozu, steatohepatitis i fibrozu u roku od nekoliko tjedana. Ipak, MCD model ne inducira metabolički sindrom, već umjesto toga uzrokuje gubitak tjelesne težine. Stoga su neki istraživači kombinirali MCD i HFD modele, ali ovaj pristup odvaja pretilost i fibrozu jetre, što njegovu relevantnost čini upitnom. Nadalje, primjena hepatotoksičnih spojeva poput CCl_4 pružila je uvid u molekularne mehanizme fibroze jetre, no ovaj model ne replicira druge aspekte MASLD-a (38).

Noviji model prehrane Gubra Amylin NASH (GAN) sadrži 46% masti, 22% fruktoze, 10% saharoze i 2% kolesterola. GAN model uspješno replicira simptome MASH-a kod ljudi pokazujući slične morfološke karakteristike, te GAN miševi pokazuju ključne komponente metaboličkog sindroma, uključujući pretilost i smanjenu toleranciju glukoze (39). Amylin model prehrane jetre za MASH, koji uključuje 40% masti, 2% kolesterola i 22% fruktoze, oponaša prehranu današnjice i uspješno inducira različite faze MASLD-a (MAFL, MASH i ciroza), potvrđene histološkim i biokemijskim metodama (40). U laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju medicinskog fakulteta u Rijeci razvijen je modificirani Amylin MASH model prehrane s visokim razinama masti, fruktoze i kolesterola koji oponaša nezdrave prehrambene navike poznate kao zapadnjački stil života (41).

2. Cilj rada

MASH karakterizira dramatično povećanje upalnih stanica u jetri, što pokreće razvoj fibroze i može u konačnici uzrokovati cirozu i zatajenje jetre. Zbog ograničenih mogućnosti liječenja, MASLD/MASH brzo postaje jedan od vodećih uzroka smrti povezanih s jetrom diljem svijeta. Bolje razumijevanje molekularnih okidača koji pokreću prijelaz steatoze u hepatitis i cirozu su stoga od velikog značaja, no rani metabolički signali specifični za stres koji pokreću upalu u jetri su i dalje uglavnom nepoznati (41).

Naša pretpostavka je da je upravo prehrana bogata mastima, šećerima te kolesterolom povezana s upalnim odgovorima u jetri. Cilj diplomskog rada biti će pokazati da mišji model zapadnjačke prehrane dovodi do razvoja MASH-a i to infiltracijom upravo aktivno proliferirajućih imunskih stanica u tkivu jetre. Kako bismo detektirali proliferirajuće upalne stanice koristiti ćemo se imunohistokemijskim i imunofluorescentnim metodama. Na taj način, utvrđivanjem neposredne blizine signala lokalizacije biljega za proliferaciju i stanice imunskog sustava, ustanovit ćemo postojanje dvostrukopozitivnih stanica. Također, analizirati ćemo vrste proliferirajućih stanica i takve imunoprofile usporediti između miševa hranjenih standardnom prehranom te onih na prehrani koja inducira MASLD. Ovaj rad mogao bi usmjeriti pažnju budućih istraživanja na imunološke aspekte upalnih procesa, čime bi se doprinijelo definiranju novih terapijskih i dijagnostičkih ciljeva unutar imunološke kaskade za pacijente s MASLD-om.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Laboratorijski miševi

Miševi korišteni u eksperimentima pažljivo su usklađeni prema dobi i spolu te su držani u specifičnim nepatogenim uvjetima (engl. "specific pathogen-free" SPF), u skladu s institucijskim, nacionalnim i/ili EU smjernicama. Muški miševi, stari 8-12 tjedana, imali su neograničen pristup normalnoj prehrani (engl. "normal chow diet" NCD, SSNIFF) ili prehrani bogatoj mastima (engl. "steatosis-steatohepatitis diet" SSD) koja se sastojala od 40% kalorija iz životinjskih zasićenih masnih kiselina (Bregi), 22% fruktoze (SSNIFF) i 2% kolesterola (SSNIFF). Linija miševa održavana je kao uzgojna kolonija u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska. Eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Republike Hrvatske (broj odobrenja UP/1-322-01/21-01/31).

3.1.2. Protutijela

Sva korištena protutijela te njihovi dobavljači i identifikacijski brojevi navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Protutijela korištena u eksperimentima

Reagensi ili resursi	Dobavljač/izvor	Identifikacijski broj proizvoda
Rabbit anti-mouse CD45 (D3F8Q)	Cell Signaling	70257S
Goat anti-rabbit IgG-HRP	abcam	ab6721

Rat anti-mouse Ki67	Invitrogen	14-5698-82
Peroxidase- conjugated donkey anti-rat IgG	Jackson ImmunoResearch	712-035-153
Biotinylated sheep anti-rat IgG	abcam	ab6851
Biotinylated goat anti-rabbit IgG	Abcam	ab64256
Streptavidin-AP	Roche diagnostics	11089161001
Goat anti-rabbit IgG Alexa Flour-647	abcam	ab150083
Rat anti-dog/monkey/human/mouse Ki-67 mAb (SolA15)	eBioscience	11-5698-82
Goat anti-rat IgG Alexa Flour 594	Invitrogen	1008647
DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindiol)	BioLegend	422801
Mouse anti-mouse NK1.1-FITC (PK136)	eBioscience	11-5941-82
Rat anti-mouse Ki67-PE (Sol1A15)	eBioscience	12-5698-82
Armenian hamster anti-mouse CD3e-PE-eFluor 610 (145-2C11)	eBioscience	61-0031-82
Rat anti-mouse CD11b-PE-Cy7 (M1/70)	eBioscience	25-0112-82
Armenian hamster anti-mouse TCR gamma/delta-APC (GL-3)	eBioscience	17-5711-82

Mouse anti-mouse CD45.2-Alexa Fluor 700 (104)	eBioscience	56-0454-82
Rat anti-mouse CD19-APC-eFluor 780 (eBio1D3)	eBioscience	47-0193-82
Rat anti-mouse CD8a-eFluor 450 (53-6.7)	eBioscience	48-0081-82
Rat anti-mouse CD4-Super Bright 600 (RM4-5)	eBioscience	63-0042-82
Rat anti-mouse CD16/32 (93)	eBioscience	14-0161-82

3.1.3. Reagensi i puferi

Većina reagensa i pufera bila je kupljena te se njihov popis uz identifikacijske brojeve može pročitati u tablici 2. Za otopine koje je tehničko osoblje laboratorija br. 1 Zavoda za histologiju i embriologiju, u kojem smo izvodili pokuse, samo izradilo, dodatno je opisan sastav u tablici 2.

Tablica 2. Korišteni kupljeni reagensi i puferi

Reagens	Dobavljač	Identifikacijski broj proizvoda
PBS (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)	homemade	140 mM natrijev klorid (NaCl), 2.7 mM kalijev klorid (KCl), 6.5 mM natrijev hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 1.5 mM kalijev dihidrogenfosfat

		(KH_2PO_4), 0.7 mM kalcijev klorid (CaCl_2), 0.7 mM magnezijev klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
DAB	Dako	K3468
Dual Endogenous Enzyme Block for Autostainer	Dako	S2003
Fixable Viability Dye eFluor 506	eBioscience	65-0866-14
EDTA	Kemika	1136808
Tris pufer	Roth	4855.2
Albumin iz goveđeg seruma (BSA)	Thermo Fisher Scientific	15561020
Tris buffer saline (TBS)	homemade	24 g Tris, 88 g NaCl, rastopljeni u do 1000 mL vode, pH=7,6
Citratni pufer	homemade	Natrijev citrat dihidrat 2,94g u 1000 mL ddH ₂ O

Entalan	Sigma-Aldrich	1079600500
Mayer's hematoksilin	Sigma Aldrich	MDL# MFCD00078111
Liquid permanent red	Dako	K0640
Aquatex	Merck	108562
Mowiol	MilliporeSigma	81381
Percoll	Cytiva	P06-07100
DMEM (4.5 g/L glukoze, w L-glutamin)	Pan Biotech	P04-01549
RPMI 1640	Pan Biotech	P04-18047
Fix/Perm kit BD	Biosciences	554714
Pufer za lizu crvenih krvnih stanica	homemade	44,95 g NH ₃ Cl, 5 g KHCO ₃ , 0,185 g EDTA u 500 mL vode

Također, napravili smo otopine i pufere potrebne za protočnu citometriju.

- Percoll stock otopina:
54 mL Percoll (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), 6 mL 10x PBS
- Percoll 80%:
40 mL Percoll stock otopina, 10 mL 1x PBS

- Percoll 40%:
20 mL Percoll stock otopina, 30 mL 1x PBS

- Medij za protočnu citometriju (FACS medij)

PBS (fosfatno-puferirana fiziološka otopina), 1% BSA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), 0,1% natrijevog azida (NaN₃) (Sigma-Aldrich Corporation), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Corporation)

- Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) (Pan Biotech, GmbH, Aidenbach, Njemačka)

DMEM medij je bio nadopunjen s 4,5 g/L glukoze, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES-a (pH 7,2), 3-10% fetalnog telećeg seruma (FCS), 105 U/L penicilina, 0,1 g/L streptomicina.

- Roswell park memorial institute (RPMI) medij 1640 (Pan Biotech, GmbH, Aidenbach, Njemačka)

RPMI medij je bio nadopunjen s 4,5 g/L glukoze, 10 mM HEPES-a (pH 7,2), 1,5 g/L NaHCO₃, 2 mM L-glutamina, 3-10% FCS, 105 U/L penicilina, 0,1 g/L streptomicina, te β₂-merkaptetanolom (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Žrtvovanje miševa

Miševe smo žrtvovali asfiksijom, tj. eutanizirali intoksikacijom CO₂ / O₂, nakon čega je uslijedilo gušenje s CO₂. Zatim je provedena perfuzija PBS-om kako bi isprali krv iz cirkulacije i organa. PBS smo ubrizgavali okomito u vrh lijevog ventrikula dok smo desni atrij zarezali kako bi se omogućilo izlivanje krvi i tekućine iz tijela. Sljedeći korak bila je izolacija

jetre te njeno pohranjivanje u kazetice koje smo potopili u formalin te inkubirali 24 h na sobnoj temperaturi (RT) prije daljnje obrade.

3.2.2. Fiksacija tkiva i parafinsko uklapljanje

Nakon 24 h kazetice s uzorcima jetre izvadili smo iz formalina, isprali vodom te premjestili u histokinet (TP1020, Leica, Wetzlar, Njemačka) na daljnu obradu. Uzorci u histokinetu prolazili su kroz proces dehidracije uranjanjem u niz alkohola rastućih koncentracija (50-100%). Nakon dehidracije slijedilo je pročišćavanje kroz tri serije ksilola kako bi uklonili alkohol, te uklapanje u impregirajući medij, tj. parafin. Nakon pripreme tkiva u histokinetu slijedila je ugradnja tkiva jetre u parafinske blokove pomoću parafinskog dispensora. Nakon što su se blokovi stvrdnuli pohranili smo ih u zamrzivač. Sljedećeg dana zamrznute parafinske blokove rezali smo na 3-5 μm debele rezove pomoću mikrotoma (Microtome HM340E, Microm, Thermo Fisher Scientific) te smještali na silanizirana predmetna stakalca uz pomoć vodene kupelji. Rezove smo ostavili sušiti 24h nakon čega su bojeni imunohistokemijski.

3.2.3. Imunohistokemija

Nakon sušenja krenuli smo u protokol za imunohistokemiju (IHC). Prvi korak bio je deparafiniranje u digestoru. Rezove smo prvo uranjali 3x po pet minuta u ksilol nakon čega su uzorci prolazili kroz nizove alkohola. U 100% alkohol uzorci su uranjani 2x po 3 minute, zatim u 90% alkohol 3 minute te toliko i u 70% alkohol. Nakon niza alkohola, uzorci su stajali sedam minuta u dH_2O . Da bi se omogućila interakcija protutijela s antigenima u fiksiranom tkivu, potrebno je otkriti ili izložiti antigen. Kako bi to postigli, uzorke smo ostavili 20 minuta u vodenoj kupelji na 97°C u kontejneru s Tris-EDTA puferom ($\text{pH}=9$) ili citratnim puferom ($\text{pH}=6,5$). Zatim smo uzorke hladili 20 minuta te još dodatno rashladili u dH_2O 2x po tri minute, te ih ostavili pet minuta u PBS-u. Kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja koje bi utjecalo na pozadinski signal i specifičnost reakcije, stakalca smo inkubirali u vlažnoj komori na RT jedan sat u 3%

BSA (Thermo Fisher Scientific). Nakon sat vremena dodavali smo primarno štakorsko anti-mišje Ki-67 protutijelo (Invitrogen) u volumenu izračunatom pomoću formule:

$$c1 \cdot V1 = c2 \cdot V2$$

Protutijela smo razrjeđivali u 1% BSA-TBS-u. Uzorke s primarnim protutijelima inkubirali smo na 4°C preko noći (engl. *over night*, ON). Na negativne kontrole nakapavali smo identičan volumen 1% BSA-TBS, ali bez dodanog primarnog protutijela. Sljedeći dan ispirali smo primarna protutijela u PBS-u 3x po pet minuta te napravili blokadu endogene peroksidaze kako bismo kasnije izbjegli potencijalno pozadinsko obojenje jer je sekundarno protutijelo bilo konjugirano s hrenovom peroksidazom (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Na svaki uzorak nakapali smo 250 µL komercijalnog kita (Dual block Dako kit), ostavili pet minuta na RT i zatim ispirali uzorke u PBS-u 3x po pet minuta. Nakon ispiranja slijedila je inkubacija sekundarnog magarećeg anti-štakorskog IgG-HRP (Jackson) gdje smo nakapali po 200 µL razrijeđenog protutijela te ostavili na RT sat vremena. Nakon toga slijedilo je ponovno ispiranje u PBS-u, te smo krenuli na detekciju. Kako bismo napravili detekciju same IHC interakcije obojeni supstrat DAB smo miješali s njegovim puferom iz kita u omjeru 1/1000 i 200 µL te smjese nakapavali po uzorku. Razvijanje obojenja pratili smo golim okom dok nismo primijetili smečkasto obojenje (oko 45 sekundi) koje je označavalo razvoj netopljivog taloga supstrata DAB na mjestu interakcije protutijelo-antigen. Reakciju smo zaustavili uranjanjem uzoraka u vodu. Kadicu s uzorcima smo zatim ostavili u netom prije profiltriranom hematoksilinu kroz 12 minuta, nakon čega smo ga ispirali 10 minuta pod tekućom vodom. U digestoru smo prošli kroz niz alkohola rastućih koncentracija (70, 90 i 100%). U svakom alkoholu uzorci su se držali po minutu te su zatim prebačeni u ksilen na pet minuta. Nakon brze dehidracije i pročišćavanja slijedilo je uklapanje uzoraka s kapljicom

bevodnog smolastog medija Entalana te pokrivnim stakalcem. Ovako dobiveni histološki preparati tkiva jetre nakon kraćeg sušenja bili su spremni za analizu.

3.2.4. Imunohistokemijsko bojenje CD45 stanica

Za detekciju CD45⁺ stanica radili smo dva bojenja. Postupak pripreme uzoraka bio je jednak kao i s imunohistokemijskim bojenjem za Ki-67⁺ stanice do koraka inkubacije sekundarnog protutijela. Za primarno protutijelo u oba bojenja korišteno je zečje anti-mišje CD45 (Cell Signaling). Nakon što su uzorci s primarnim protutijelom inkubirani preko noći te sljedećeg dana isprani PBS-om, slijedila je inkubacija sekundarnih protutijela.

Na dio uzoraka nakapali smo 200 µL razrijeđenog protutijela kozje anti-zečji IgG-biotin (Dako) i ostavili inkubirati sat vremena na RT, nakon čega smo uzorke ispirali 3x po pet minuta u TBS-u.

Drugi dio uzoraka nakapali smo s 200 µL razrijeđenog kozje anti-zečje IgG - HRP (abcam) sekundarnog protutijela. Nakon inkubacije od sat vremena na RT, uzorke smo ispirali 3x po pet minuta u PBS-u.

Uzorke s biotin-konjugiranim sekundarnim protutijelom inkubirali smo s razrijeđenom alkalnom fosfatazom (AP) Streptavidin-AP (Roche) 45 minuta na RT te ispirali 3x u TBS-u.

Razvijanje kromogena je također bilo različito ovisno o uzorku. Kod prvog uzorka s AP-om razvijanje se vršilo pomoću Liquid permanent red-a (Dako), gdje smo jednu kap Liquid permanent red kromogena kapali u tri mL Liquid Permanent Red substrate pufera te inkubirali otprilike jednu minutu da se razvije talog kromogenog supstrata. Kod uzoraka s HRP-om dodavali smo DAB (Dako) napravljen tako da smo jednu kap dodavali u jedan mL preporučenog pufera iz kita. Talog se razvijao cca 30 sekundi, a po postizanju odgovarajuće razine intenziteta signala, uzorci su ispirani

pod tekućom vodom. Kontrastiranje je za oba uzorka bilo jednako, kadicu s uzorcima u digestoru uronili smo na dvije minute u prefiltriran hematoksilin. Kadicu smo potom ispirali još 8 minuta pod tekućom vodom te na poslijetku montirali uzorke. Budući da je Liquid Permanent Red iznimno osjetljiv na organska otapala i dehidraciju, uzorke dobivene tom metodom montirali smo jednom kapljicom na vodi baziranog montirajućeg medija Aquatexa. Za uzorke s HRP-om, učinjen je prethodno već opisan proces dehidracije (rastući niz alkohola i ksilen) te montiranja s jednom kapljicom Entalana.

3.2.5. Imunofluorescentno bojenje

Postupak pripreme uzoraka do inkubacije primarnog protutijela je identičan kao u imunohistokemijskim bojenjima. Uzorci prolaze kroz deparafinaciju, razotkrivanje antigena i blokadu s 3% BSA. Zatim smo nakapavali prvo primarno protutijelo štakorsko anti-pas/majmun/čovjek/mišji Ki-67 monoklono protutijelo (eBioscience), te ga inkubirali preko noći na 4°C. Sljedeće smo jutro nevezana protutijela ispirali 3x po 5 minuta s PBS-om, te dodali prvo sekundarno kozje anti-štakorsko IgG Alexa Flour 594 protutijelo (Invitrogen) i ostavili inkubirati na sat vremena u hladnjaku. Nakon toga uslijedilo je opetovano ispiranje s PBS-om, te inkubacija i drugog primarnog monoklalnog protutijela zečje anti-mišji CD45 (Cell Signaling) preko noći na 4°C. Sljedeći dan, nakon ispiranja PBS-om dodali smo sekundarno kozje anti-zečje IgG Alexa Flour-647 protutijelo (abcam) te nakon inkubacije od sat vremena u hladnjaku, dodali smo i razrijeđen fluorescentni indikator plavi fluorokrom DAPI za kontrastiranje jezgara kojeg smo inkubirali 5 min na RT, a zatim smo uzorke ispirali PBS-om. Nakon toga uzorke smo unutar digestora montirali na stakalcima pomoću Mowiola 4-88. Uzorci su analizirani na RT pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa Leica TCS SP8 s 3 lasera (UV 405 nm, plavi argonski 458, 488 i 514 nm, žuti laser DPSS 561 nm te crveni laser HeNe 633 nm), koristeći objektiv HC PL APO 40x/1.30 OIL

CS2 i akvizicijski softver LasX (verzija 3.5.6.21594) bez prilagodbe gama vrijednosti.

3.2.6. Protočna citometrija

3.2.6.1. Izolacija leukocita

Nakon perfuzije, cijela jetra, osim žučnog mjehura, je izolirana. Jetra je mehanički homogenizirana pritiskanjem tučka kroz sito za stanice s veličinom pora od 70 μm , postavljeno na epruvetu od 50 mL. Za svaku jetru korišteno je 5-10 mL 3% RPMI kako bi se dobila suspenzija pojedinačnih stanica. Suspenzija stanica je centrifugirana pri 1700 okretaja u minuti (rpm) kroz 5 min. Za izolaciju leukocita iz jetre korištena je metoda izolacije na gradijentu gustoće, a za njegovo stvaranje je korišten Percoll. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantiran, a talog stanica je resuspendiran u 40% Percoll otopini. Resuspendirani stanični talog je nanesen na sloj 80% Percoll otopine te centrifugiran pri 2100 rpm 30 minuta na RT. Prstenovi leukocita su izolirani te isprani s 8 mL 3% RPMI-ja. Epruvete su centrifugirane pri 1700 rpm 5 minuta. Talog je resuspendiran u 1 mL pufera za lizu eritrocita i prenesen u 2 mL Eppendorf epruvete. Nakon 3 minute, dodano je 500 μL hladnog 3% RPMI-ja. Epruvete su zatim centrifugirane pri 4000 rpm 5 minuta na RT. Supernatant je na posljetku uklonjen, a talog resuspendiran u 350 μL 3% RPMI-ja.

3.2.6.2. Bojenje stanica na površini

Fenotipska analiza limfocita provedena je pomoću fluoroforom obilježenih protutijela specifičnih za određene stanične markere. Za protočnu citometriju pripremljena je jednostanična suspenzija jetre prema gore opisanom protokolu. Za analizu površinskih markera, obilježena protutijela su razrijeđena u FACS mediju (40 μL) koji sadrži specifična protutijela, kao i 2.4G2 protutijelo koje blokira FcRII / III (CD16/32) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje obilježenih protutijela (protutijelo proizvedeno na medicinskom fakultetu u Rijeci). Nakon 30 minuta inkubacije na +4 °C,

stanice su isprane FACS medijem, centrifugirane 4 minute pri 300 g i ponovno suspendirane u 120 μ L FACS medija. Rezultati fenotipskih analiza stanica dobiveni su protočnom citometrijom FACSVerse (BD) i analizirani pomoću softvera FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, SAD).

3.2.6.3. Unutarstanično bojenje

Za unutarstanično bojenje korišten je komplet za fiksaciju i permeabilizaciju stanica prema uputama proizvođača (BD Biosciences, San Jose, SAD). Nakon bojenja staničnih površina, stanice su prvo fiksirane 20 minuta na RT s Cytofix/Cytoperm (BD) puferom, a zatim isprane u permeabilizacijskom puferu Perm/Wash (BD). Nakon centrifugiranja, stanice su inkubirane u 40 μ L mješavine protutijela 30 minuta na +4 °C. Stanice su zatim isprane, centrifugirane i ponovno suspendirane u FACS puferu. Uzorci su analizirani nakon inkubacije preko noći na +4 °C. Rezultati fenotipskih analiza stanica dobiveni su protočnom citometrijom FACSVerse (BD) i analizirani pomoću softvera FlowJo (FlowJo LLC).

3.2.6.4. Unutarstanično bojenje Ki-67

Bojenje Ki-67 izvedeno je nakon bojenja stanične površine korištenjem kompleta za fiksaciju/permeabilizaciju za intranuklearno bojenje u skladu s uputama proizvođača (eBioscience). Ukratko, stanice su obojene za površinske markere, isprane, centrifugirane i ponovno suspendirane u Fixation/Permeabilization otopini na RT. Nakon 20 minuta, stanice su isprane u permeabilizacijskom puferu i ponovno suspendirane u 40 μ L mješavine protutijela Ki-67 (1:100 u 1x permeabilizacijskom puferu). Stanice su inkubirane 30 minuta na +4 °C, isprane u puferu, centrifugirane i zatim ponovno suspendirane u 120 μ L FACS medija. Rezultati fenotipskih analiza stanica dobiveni su protočnom citometrijom FACSVerse (BD) i analizirani pomoću softvera FlowJo (FlowJo LLC).

3.2.6.5. Bojenje za vijabilnost

Boja za vijabilnost korištena je u razrjeđenju 1:1000 u FACS mediju zajedno s protutijelima za bojenje staničnih površina. Stanice su bojene

30 minuta na +4 °C. Za sva bojenja korištena je eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780.

3.2.7. Bojenje Sirius crvenilom

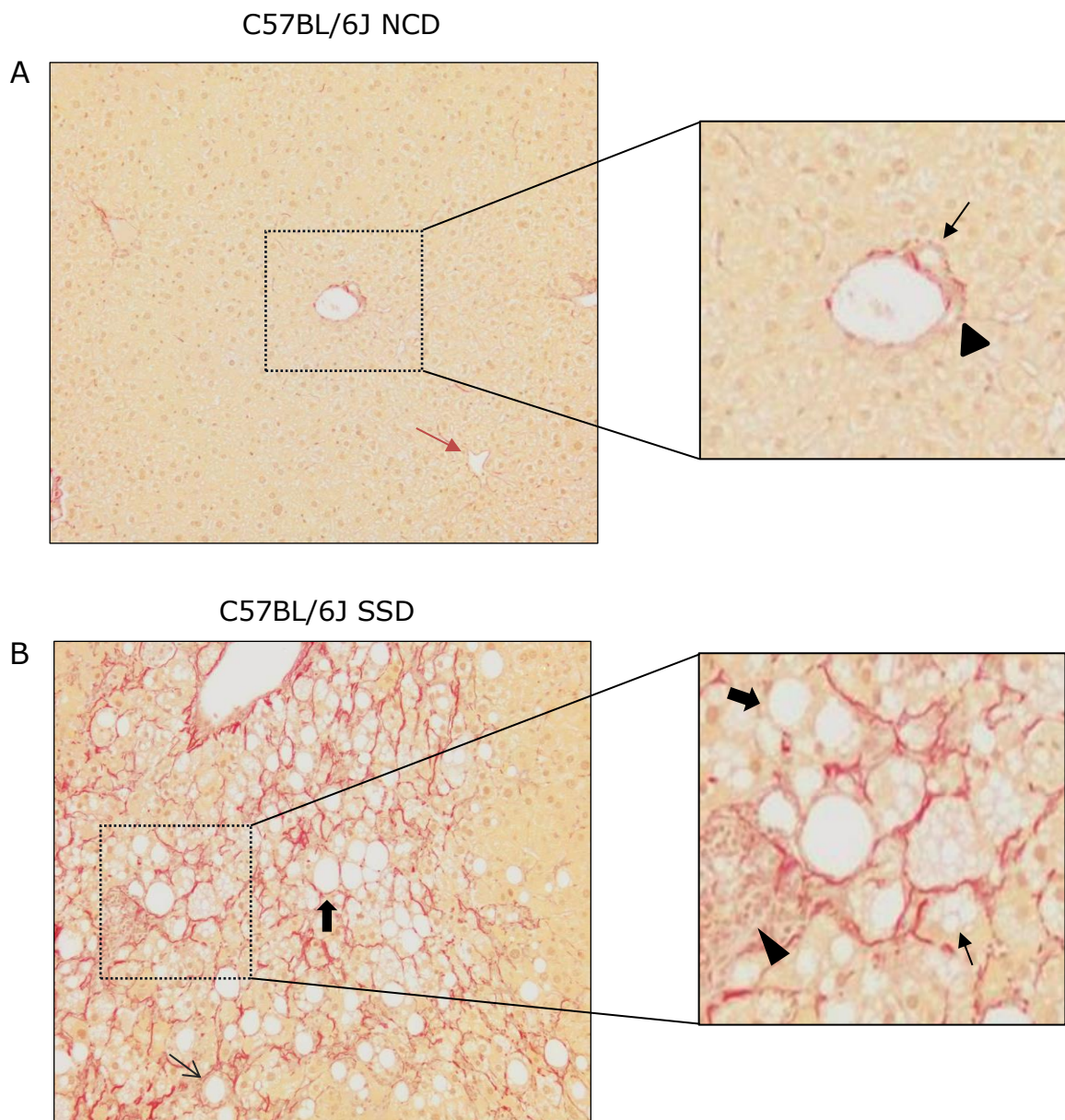
Parafinski rezovi su deparafinirani i rehidratizirani. Jezgre su obojene profiltriranim Weigertovim hematoksilinom 12 minuta, nakon čega su stakalca isprana 10 minuta pod tekućom vodom. Stakalca su zatim bojana u Pikro-sirius crvenilu 75 minuta, a potom isprana u dvjema promjenama zakiseljene vode. Voda je uklonjena sa stakalaca snažnim otresanjem. Sljedeći korak je bio dehidracija stakalaca u tri promjene 100% etanola, pročišćavanje u ksilenu i montiranje u Entalanu.

4. Rezultati

4.1. SSD prehrana stvara patogenezu MASH-a

MASLD karakteriziraju steatoza, upala te fibroza u tkivu jetre. Kako bih reproducirala fenotip MASLD-a i istražila njenu etiologiju, u svom istraživanju koristila sam mišji dijetalni model. U laboratoriju Zavoda za histologiju dizajnirana je posebna prehrana - modificirana prehrana Amylin, nazvana SSD (engl. *steatosis steatohepatitis diet*). Miševe divljeg crnog soja C57BL/6J podvrgnuli smo prehrani SSD kroz 16 tjedana. Miševi hranjeni normokalorijskom dijetom NCD nisu razvili histološke značajke MASH-a (slika 4a), dok su SSD-om hranjeni miševi pokazali te karakteristike (slika 4b). Pregledom histoloških preparata dobivenih bojenjem Sirius crvenilom prereza jetre, ustvrdili smo klasičnu strukturu zdrave jetre. Jetre su pokazivale uobičajenu strukturu pri čemu su se iz heksagonalnih režnjića hepatociti zrakasto širili od centralne vene prema portalnoj trijadi koja se sastojala od portalne vene, portalne arterije te žučnog kanalića. Vidljivi su bili i prostori između hepatocita, sinusoide, te nešto nehepatocitnih stanica. Na slici 4b se može primijetiti da su hepatociti bili pretežito distenzirani, u većini hepatocita je bila prisutna jedna veća, odnosno više manjih masnih kapljica što je karakteristično za mikro- odnosno, makrovezikularnu steatozu, a jezgra je bila povučena u periferiju stanice. Osim raširene steatoze, zamijetili smo brojna upalna žarišta, granulome, ciste i degeneraciju hepatocita, što ukazuje na prijelaz iz steatoze jetre u MASH. Nadalje, bojenjem Sirius crvenilom rutinski se utvrđuje nakupljanje kolagena u tkivima poput bubrega i jetre, stoga smo u našem eksperimentalnom postupku ovom metodom odredili količinu kolagena koji je pokazatelj postojanja fibroze jetre. Slikom 4b potvrdili smo prisutnost značajne fibroze, koja se prvenstveno nalazila periportalno, okružujući tanjim svjetlije pobojenim i debljim tamnije crveno pobojenim kolagenim vlaknima hipertrofične hepatocite, te upalna mjesta poput granuloma i cista. Zbog značajne prisutnosti naslaga kolagenih vlakana, te uznapredovale steatoze odredili smo da patologija

jetre koju smo pronašli u miševima hranjenima sa SSD-om odgovara F2 stadiju MASH-a kod ljudi.

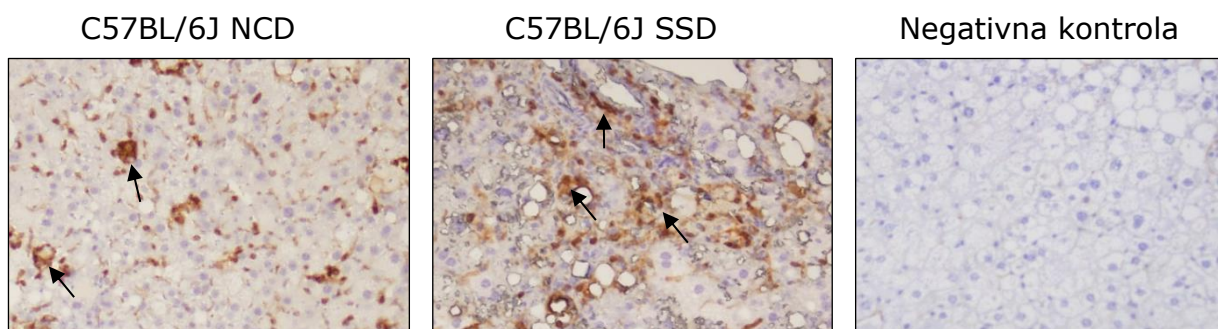


Slika 4. Učinak SSD prehrane na histološke pokazatelje MASLD-a i MASH-a kod miševa. C57BL/6J miševi su hranjeni NCD i SSD prehranom. Nakon 16 tjedana na prerezima jetre učinjeno je bojenje Sirius crvenilom. a) Miševi hranjeni NCD prehranom pokazuju histologiju normalne jetre i nisu razvili značajke MASH-a. Crvenom strelicom označena je centralna vena. Na uvećanoj slici je portalna trijada. U sredini je portalna vena, žučni kanalić označen je strelicom, a portalna arterija trokutom. b) Miševi hranjeni SSD prehranom razvijaju MASLD/MASH. Tanka strelica označava granulom, a punija cistu. Na uvećanoj slici trokut označava infiltraciju imunih stanica, puna strelica označava makrovezikularnu steatozu, dok tanja strelica mikrovezikularnu steatozu. Crveno pobojena su kolagena vlakna koja označavaju fibrozu (povećanje 200x).

4.2. Razrada metode za dvostruko imunohistokemijsko bojenje

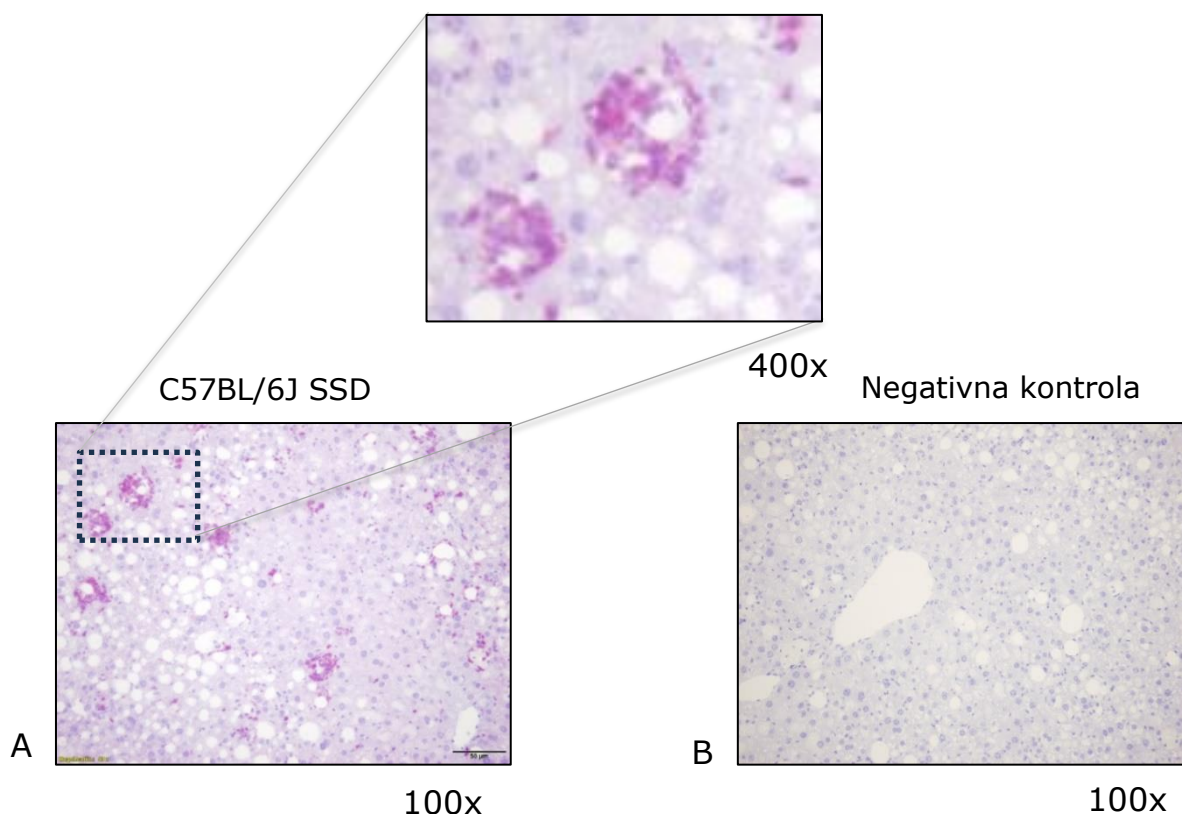
Nakon što smo potvrdili histopatologiju MASLD-a u jetrama miševa hranjenih SSD-om, ispitali smo infiltraciju tkiva jetre imunოსnim stanicama. Povrh toga, željeli smo pokazati upravo one imunოსne stanice, naročito u SSD-u, koje aktivno proliferiraju. Kako bismo postigli kvalitativnu detekciju proliferirajućih imunოსnih stanica odlučili smo se uspostaviti klasičnu dvostruku imunohistologiju.

CD45 je antigen prisutan na površini svih hematopoetskih stanica, osim zrelih eritrocita i trombocita, stoga smo se koristili protutijelom specifičnim na CD45 kako bismo detektirali imunოსne stanice. CD45 je bio prvi biljeg za koji smo optimizirali uvjete i protutijela u protokolu. Izvodili smo dva tipa bojenja kako bismo detektirali i lokalizirali vezanje primarnog protutijela na antigen: 1. koristeći sekundarno protutijelo konjugirano s hrenovom peroksidazom (slika 5); 2. koristeći biotinizirano sekundarno protutijelo i alkalnom fosfatazom konjugirani streptavidin, tj. metodu LSAB. Na posljetku smo usporedili razinu intenziteta detekcije antigena između oba pristupa.



Slika 5. Jak i specifičan signal s minimalnim pozadinskim obojenjem pri detekciji CD45⁺ stanica IHC-om posredovanim HRP-om. Miševi hranjeni NCD i SSD prehranom kroz 16 tjedana. Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojenja antigena CD45 detektiranog sekundarnim protutijelom konjugiranim s HRP-om (povećanje 100x). Smeđe obojene CD45⁺ stanice (DAB), plavo (kontrastiranje hematoksilinom). Strelicama označene imunოსne stanice.

Slijedeći protokol za dvostepensko klasično imunohistokemijsko bojenje antigena CD45 uz korištenje sekundarnog protutijela konjugiranog HRP-om, dobili smo jak, specifičan i dobro lokaliziran signal s minimalnim pozadinskim obojenjem (slika 5). Smeđe obojeni talog isprecipitiranog DAB-a je bio jasno vidljiv na mjestu gdje se dogodila imunohistokemijska interakcija. Smještaj smeđeg taloga karakterističan je bio za površinsko bojenje stanica čime smo dokazali prisutnost antigena CD45, specifičnog za imunosne stanice, u tkivu. Stoga smo zaključili da miševi hranjeni normokalorijskom dijetom imaju umjerenu brojnost CD45⁺ stanica koja se višestruko povećava u fibrotičnom tkivu jetre miševa hranjenih SSD-om. Takva infiltracija u SSD miševima ukazuje na aktivnu upalu jetre.



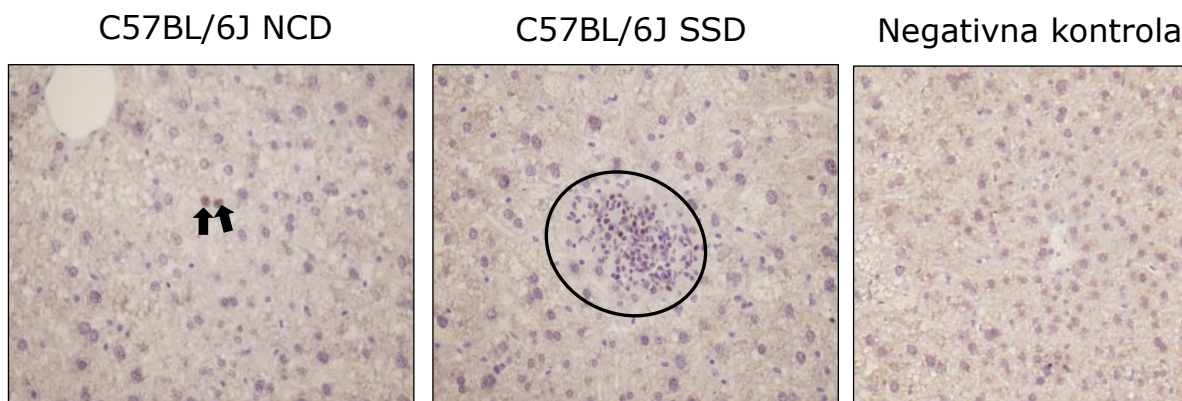
Slika 6. Optimalan signal bojenja CD45⁺ stanica LSAB metodom s neznatnom količinom pozadinskog obojenja. Miševi hranjeni SSD dijetom kroz 16 tjedana. Imunohistokemijsko bojenje antigena CD45. Za detekciju je korišteno biotinizirano sekundarno protutijelo te Streptavidin s AP-om. Ružičasto obojenje prikazuje istaloženi supstrat Permanent Red na CD45⁺ stanicama (100x) te uvećani dio s dva upalna žarišta (400x) (Slika 6a), te negativna kontrola IHC reakcije bez primarnog protutijela za CD45 (Slika 6b).

Kako bismo utvrdili koja će metoda detekcije CD45 u tkivu jetre biti optimalna, izvršili smo imunohistokemijsko bojenje antigena CD45 ovaj puta koristeći LSAB metodu detekcije posredovanu alkalnom fosfatazom. Detekciju imunohistokemijskog bojenja antigena CD45 posredovanu reakcijom alkalne fosfataze i kromogenog supstrata Permanent Red izvršili smo samo na prerezima fibrotične jetre SSD-om hranjenih miševa.

Imunohistokemijsko bojenje dalo je optimalan signal pozitivnog obojenja CD45⁺ stanica s neznatnom količinom pozadinskog obojenja. Vidljiva su

bila upalna žarišta sa znatno infiltriranim ružičasto obojenim imunskim CD45⁺ stanicama. Osim toga, strukture unutar jetre bile su jasno vidljive kao i karakteristične značajke MASH-a poput mikro- i makrovezikularne steatoze. Podjednako snažan signal intenziteta detekcije u obje provedene metode ukazuje na to da se primarnim protutijelom specifičnim za CD45 može vrlo precizno detektirati biljeg CD45 unutar tkiva jetre neovisno o načinu detekcije te time predstavlja dobar kandidat za dvostruko imunohistokemijsko bojenje.

Nakon testiranja protutijela za CD45, iste uvjete i korake protokola smo primijenili kako bismo detektirali antigen Ki-67 u tkivu jetre. Prvo smo radili imunohistokemijsko bojenje antigena Ki-67 koristeći se sekundarnim protutijelom konjugiranim s HRP-om za detekciju vezanja primarnog protutijela specifičnog za Ki-67 (slika 7). Na prerezima jetre miševa hranjenih normokalorijskom prehranom detektirali smo vezanje protutijela za Ki-67 većinom samo u jezgrama hepatocita, dok su u jetrama SSD miševa uz jezgre hepatocita (nije prikazano), pozitivno obojene bile brojne druge vrste stanica koje su infiltrirale u tkivo (slika 7).

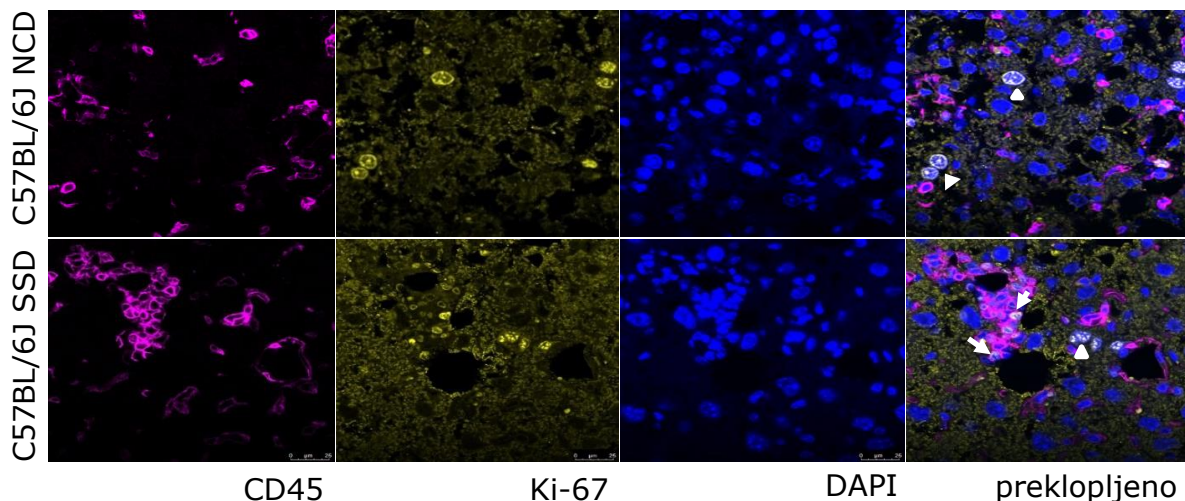


Slika 7. Suboptimalna detekcija antigena Ki-67 IHC-om posredovanim HRP-om. Imunohistokemijsko bojenje Ki-67⁺ stanica sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s HRP-om (povećanje 200x). Strelicama označene Ki-67⁺ jezgre hepatocita. Zaokružena je infiltracija proliferirajućih stanica.

Ipak, negativna kontrola pokazala je jako pozadinsko obojenje koje je onemogućilo preciznu detekciju Ki-67 stanica. S obzirom na teško raščlanjivanje između Ki-67⁺ jezgara i pozadinskog obojenja u ostatku tkiva, isprobali smo bojenje u kojem smo za detekciju koristili biotinizirano sekundarno protutijelo te AP-om konjugirani streptavidin. Pokušaj detekcije vezivanja primarnog protutijela na Ki-67 LSAB metodom te supstratom Permanent redom nije dao zadovoljavajuće rezultate (nije prikazano). Naime, ovom metodom nismo uspjeli detektirati nikakav pozitivan signal obojenja. Imunohistokemijsko bojenje Ki-67⁺ stanica nije bilo jednako uspješno u istim uvjetima u kojima smo provodili bojenje CD45⁺ stanica, stoga smo zaključili da ne bismo mogli dobiti uspješno dvostruko klasično imunohistokemijsko bojenje te smo od istoga odustali.

4.3. Jetre SSD-om hranjenih miševa pokazuju visoku razinu proliferacije imunskih stanica

Urođene imunosne populacije poput urođenih limfocita T te različitih vrsta mijeloidnih stanica opisane su kao rani posrednici upale u kontekstu patogeneze MASLD-a, što pojačava regrutiranje adaptivnih imunskih stanica poput CD4⁺ i CD8⁺ limfocita T te limfocita B. Kako bi pokazali da tijekom upale dolazi upravo do proliferacije imunskih stanica odlučili smo primijeniti metodu imunofluorescentnog bojenja pri čemu smo se koristili istim primarnim protutijelima kao i u klasičnom imunohistokemijskom bojenju, ali smo za detekciju koristili sekundarna protutijela obilježena različitim fluorokromima, te DAPI za kontrastiranje jezgara (slika 8).



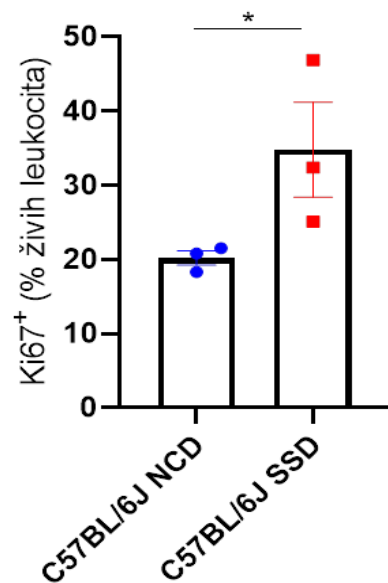
Slika 8. Jetre SSD-om hranjenih miševa pokazuju visoku razinu proliferacije imunskih stanica. Imunofluorescentno označene stanice prereza mišje jetre na NCD i SSD prehrani. Stanice su obilježene primarnim protutijelima anti-CD45 (ljubičasto) i anti-Ki-67 (žuto), a jezgre su obilježene DAPI bojom (plavo). Puna strelica označava primjer dvostruko pozitivne stanice CD45/Ki-67⁺, dok trokut označava samo Ki-67⁺.

Kako bismo detektirali vezivanje primarnih protutijela koristili smo se konfokalnim fluorescentnim mikroskopom. Ružičasta fluorescencija je ukazivala na pozitivnu detekciju CD45⁺ stanica, žuta fluorescencija na detekciju antigena Ki-67, plava na detekciju jezgara hepatocita, a bijelom je prikazana kolokalizacija drugih dviju fluorescencija. Na slici 8 možemo primijetiti određen broj imunskih stanica u prerezima tkiva jetre miševa hranjenih normokalorijskom dijetom. Osim toga, primjećuje se i znatan broj Ki-67⁺ jezgara koje po morfologiji odgovaraju jezgrama hepatocita što ukazuje na već poznatu visoku razinu homeostatske proliferacije tkiva jetre. Preklapanjem fluorescencija potvrdili smo da su upravo jezgre, većinom hepatocita, bile pozitivne na Ki-67. Kod miševa hranjenih SSD prehranom CD45⁺ stanice su prisutne u znatno većem broju nego na kontrolnim prerezima miševa. Dodatno, prisutan je i veliki broj Ki-67⁺ jezgara što ukazuje na visoku razinu proliferacije u tkivu jetre SSD miševa. Veliki dio Ki-67⁺ jezgara se nalazi upravo unutar CD45⁺ membrana, pa zbog toga zaključujemo da su upravo upalne stanice te

koje se u SSD miševima najviše dijele. Ovi rezultati ukazuju na različitu distribuciju i proliferativni profil SSD miševa u odnosu na miševe na normokalorijskog dijeti.

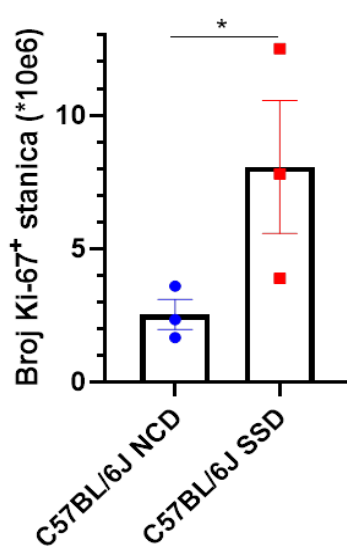
4.4. Kod MASH-a dolazi do značajnih promjena u sastavu i broju imunskih stanica

MASLD karakterizira regrutacija i infiltracija upalnih imunskih stanica. Kako bismo istražili koje imunске stanice više proliferiraju u našem SSD modelu za MASH, izolirali smo sveukupne leukocite iz jetre te ih analizirali protočnom citometrijom. Pri progresiji MASLD-a u stadij MASH-a mijenja se imunski profil s obzirom na razinu upale. Prvo smo ispitali koja je učestalost Ki-67⁺ proliferirajućih stanica među leukocitima izoliranim iz tkiva jetre. Analiza podataka dobivenih protočnom citometrijom pokazala je da su Ki-67⁺ stanice značajno više zastupljene u tkivu jetre miševa hranjenih SSD prehranom u odnosu na miševe na normokalorijskoj dijeti (slika 9).



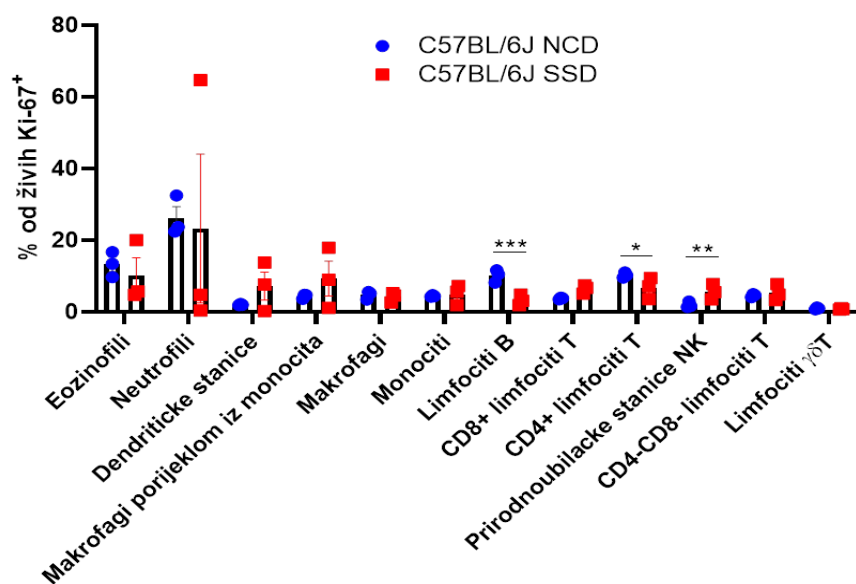
Slika 9. SSD prehrana uzrokuje značajan porast frekvencije Ki-67⁺ stanica u tkivu jetre. Statistička značajnost određena je Studentovim t-testom. Statistička značajnost definirana je kao * $p < 0,05$.

Dodatno, određivši apsolutnu vrijednost brojnosti Ki-67⁺ stanica očekivano smo ustanovili da je ukupni broj Ki-67⁺ stanica značajno povećan u tkivu SSD miševa (slika 10).



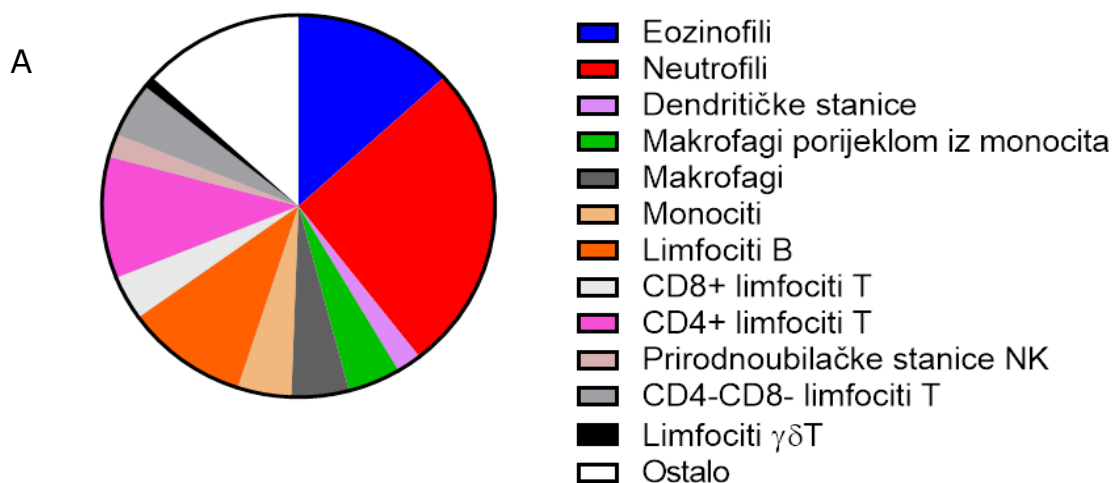
Slika 10. SSD prehrana uzrokuje značajan porast broja proliferirajućih Ki-67⁺ stanica u tkivu jetre. Statistička značajnost određena je Studentovim t-testom. Statistička značajnost definirana je kao * $p < 0,05$.

Nadalje, analizom učestalosti staničnih vrsta uključujući različite limfocitne i mijeloične podpopulacije utvrdili smo da se imunski profil uvelike mijenja, i to na razini gotovo svake od istraženih podvrsta, iako samo neke od njih pokazuju i statistički značajne razlike. Tako se relativna učestalost limfocita B te CD4⁺ limfocita T značajno smanjuje unutar proliferirajućih Ki-67⁺ stanica u jetri SSD miševa u odnosu na kontrolne miševe jetre. S druge strane, relativna učestalost prirodnobilačkih limfocita NK je bila povećana u SSD miševa u odnosu na NCD kontrole (slika 11). Zaključno, ova analiza je pokazala da SSD prehrana značajno utječe na proliferaciju leukocita unutar jetrenog tkiva, posebno modulirajući sastav i mijenjajući dinamiku imunskog odgovora u jetri. Dodatno, kako bi se lakše uočili udjeli pojedinih populacija u ukupnom zbroju prikazali smo podatke i u obliku kružnih dijagrama (slika 12a i b).

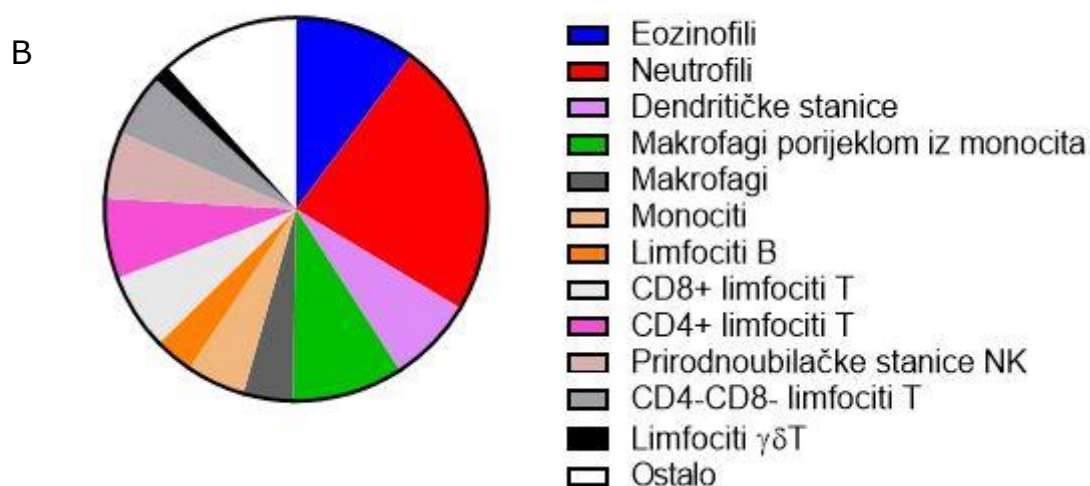


Slika 11. Imunski profil Ki-67⁺ stanica. C57BL/6J miševi su hranjeni NCD ili SSD prehranom tijekom 16 tjedana, a ekspresija Ki-67 kvantificirana je u stanicama jetre pomoću protočne citometrije. Statistička značajnost određena je Studentovim t-testom. Statistička značajnost definirana je kao * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

C57BL/6J NCD miševi



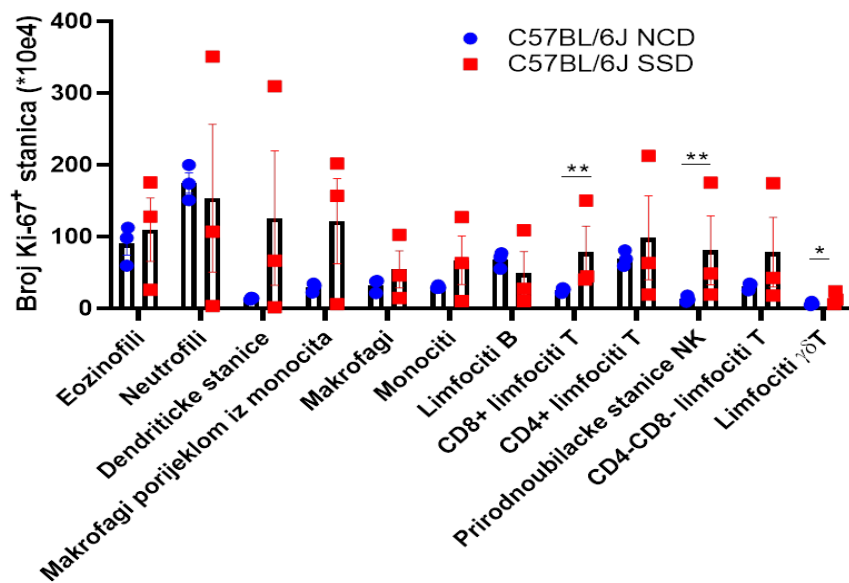
C57BL/6J SSD miševi



Slika 12. Različiti udjeli podvrsta imunosnih stanica kod SSD miševa. Udio vrsta i podvrsta imunosnih stanica u stanicama jetre miševa hranjenih NCD (Slika 12a) i SSD (Slika 12b) prehranom nakon 16 tjedana.

Na posljatku, zanimao nas je i apsolutni broj pojedinih podpopulacija. Dodatnom analizom podataka dobivenih protočnom citometrijom te sveukupnog broja stanica, odredili smo apsolutni broj svake od pojedinih populacija unutar Ki-67⁺ stanica. Ustanovili smo da u jetrama SSD-om hranjenih miševa postoji značajan porast CD8⁺ limfocita

T, prirodnoubilačkih NK stanica i $\gamma\delta$ limfocita T koje su ujedno i Ki-67⁺ (slika 13). Uspoređujući razlike dobivene u frekvencijama i apsolutnom broju stanica primijetili smo nesklad koji se često javlja kada se ukupni broj stanica ili tkivne mase povećava, što može dovesti do promjena i u relativnoj učestalosti populacija unatoč njihovom ukupnom rastu. Ipak, naši rezultati pokazuju da, iako su postotci nekih populacija poput CD4⁺ limfocita T smanjeni, ukupni broj proliferirajućih stanica (Ki-67⁺) i u njima najbitnijih efektorskih populacija (CD8⁺ T, NK, $\gamma\delta$ T) raste što ukazuje na aktivnu upalu jetre u MASLD-u.



Slika 13. U jetrama SSD-om hranjenih miševa postoji značajan porast podpopulacija limfocita T i prirodnoubilačkih NK stanica. Brojnost leukocitnih vrsta u jetrama miševa na NCD i SSD dijeti nakon 16 tjedana. Statistička značajnost određena je Studentovim t-testom. Statistička značajnost definirana je kao * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5. Rasprava

MASLD pogađa otprilike jednu četvrtinu globalne populacije, no njegov utjecaj na javno zdravlje dugo je zanemarivan (42). Prijelaz iz steatoze u MASH označava početak procesa koji može dovesti do fibroze, gubitka funkcije jetre i smrti. Razjašnjavanje mehanizama pod kojim se taj proces odvija stoga je od velike kliničke važnosti. U ovome radu koristili smo se već uspostavljenim dijetalnim mišjim modelom u kojem su crni divlji miševi hranjeni visokokalorijskom prehranom SSD koja oponaša zapadnjačku prehranu. Pokazali smo da prehrana SSD kod miševa potiče histopatološke promjene u jetri koje odražavaju one zapažene kod MASH pacijenata, što prijašnji modeli prehrane nisu uspijevali postići u potpunosti. Nadalje, imunohistokemijskim bojenjima CD45 i Ki-67 pozitivnih stanica ustvrdili smo prisutnost imunosnih i proliferirajućih stanica. Nažalost, dvostruko imunohistokemijsko bojenje koje bi potvrdilo dvostruko pozitivne stanice na spomenute antigene nije uspijevalo. Jedan od mogućih razloga može biti razlika u uvjetima potrebnim za razotkrivanje antigena. Probali smo izlaganje antigena i u kiselim i u lužnatim uvjetima jer je u uputama proizvođača protutijela za CD45 sugerirano koristiti Tris-EDTA, dok za Ki-67 citratni pufer. Iako su po objavljenim podacima korištena protutijela zahtijevala različite uvjete, svejedno smo probali dvostruko imunohistokemijsko bojenje, no nismo dobili reprezentativne rezultate. Stoga smo se odlučili na detekciju CD45⁺Ki-67⁺ stanica imunofluorescencijom pri čemu su korištena fluorokromima konjugirana sekundarna protutijela, te DAPI za prikaz jezgara. Spajanjem pojedinačnih fluorescencija protutijela uspješno smo detektirali kolokalizaciju Ki-67 i DAPI te membransko vezanje CD45 na istim stanicama te time potvrdili postojanje proliferirajućih imunosnih stanica. U tkivu jetre bila je prisutna znatna infiltracija imunosnih stanica između hepatocita te stvaranje upalnih žarišta u kojima smo pronašli najviše CD45⁺Ki-67⁺ stanica upravo kod miševa hranjenih SSD prehranom.

Dio ovih podataka korišteno je i u izradi znanstvenog rada objavljenog u časopisu *Science Immunology* prošle godine. U njemu je još dodatno pokazana i važnost aktivirajućeg receptora NKG2D za nastanak fibroze i progresiju MAFLD-a u MASH. Zbog toga su miševi s nedostatkom receptora NKG2D imali manje dvostrukopozitivnih stanica CD45⁺Ki-67⁺ u SSD-u. NKG2D je visoko izražen upravo na stanicama NK za koje smo promotivnom citometrijom pokazali da su vrlo potentna stanična populacija unutar Ki-67⁺ stanica u SSD-u. To bi moglo ukazivati na njihovu veliku važnost u progresiji bolesti. Takva saznanja već postoje. Naime, pokazano je da NK stanice potiču fibrozu jetre povećanom proizvodnjom različitih upalnih medijatora poput IFN- γ , te pridonose fibrozi jetre aktivacijom JAK-STAT1/3 signalnog puta (43). Osim toga, razina NK stanica povećana je kod ljudskih pacijenata, iako se sposobnost degranulacije i proizvodnja citokina nisu razlikovale u usporedbi sa zdravim kontrolama (44). Nadalje, Marinović i sur. su proučavali ponašanje NKG2D receptora te njegov kaskadni put u vidu MASLD-a (41). NKG2D je konstitutivno izražen na mnogim imunskim stanicama, posebice na urođenim limfocitima kao što su NK, MAIT i $\gamma\delta$ T stanice, no njegovi ligandi obično se induciraju u tkivima kao odgovor na stres. Hipertrofija hepatocita uslijed nakupljanja lipida inducira izražaj liganada, a njihovim vezanjem na receptor NKG2D aktiviraju se imunosne stanice koje posreduju u citotoksičnim odgovorima i/ili proizvode citokine. Ovaj receptor je već od ranije poznat kao jako bitan i u mnogim drugim patologijama (45–47). Zanimljivo, u našoj imunoanalizi protočnom citometrijom ustanovili smo da se u SSD-u povećava brojnost Ki-67⁺ $\gamma\delta$ T stanica što se podudara s nalazima Marinović et al. te brojnih drugih autora (48–50). Nadalje, usprkos različitim aberacijama frekvencije limfocita CD4⁺, CD8⁺ te limfocita B, ustanovili smo statistički značajno povećanje apsolutnog broja CD8⁺ stanica u jetrama SSD-om hranjenih miševa u odnosu na kontrole. Budući je NKG2D izražen na aktiviranim CD8⁺ limfocitima smatramo da ovaj nalaz dodatno potkrjepljuje važnost NKG2D-a u progresiji MASLD-a.

Smatra se da patofiziologija MASH-a zahtijeva više okidača, uključujući nakupljanje masti, disbalans u crijevnom mikrobiomu i oksidativni stres, no opći konsenzus je da je ključni događaj u prijelazu MAFLD-a u MASH inicijacija upale. Stoga su događaji koji vode do upale od velike kliničke važnosti. Ovim radom dokazali smo da su upalne stanice brojnije u jetrama miševa hranjenih SSD-om te da su upravo te stanice vrlo proliferativno aktivne. Uparujući naše rezultate s rezultatima Marinović et al, možemo zaključiti da su za progresiju bolesti iznimno bitni $\gamma\delta$ limfociti T te njihova sekrecija IL-17A rano tijekom patogeneze bolesti. Nastavno na njihovu aktivaciju preko NKG2D-a, $\gamma\delta$ limfociti T upućuju hepatocite na proizvodnju kemokina i privlačenje proupalnih mijeloidnih stanica. Zbog toga je i nedostatak ekspresije NKG2D ili receptora IL-17A na hepatocitima rezultirao značajnim smanjenjem upale i fibroze jetre. Ovi rezultati mogu imati značajan utjecaj na buduće istraživanje MASLD-a i terapijske pristupe. S obzirom na važnost upale i imunosnih stanica u progresiji bolesti, NKG2D se nameće kao potencijalni dijagnostički biomarker te kao cilj za razvoj novih terapija.

6. Zaključak

Prehrana SSD-om, koja imitira visokokaloričnu masnu prehranu u miševa, predstavlja učinkovit model za proučavanje ljudskog MASH-a i MASLD-a. U sklopu upale dolazi do aktivacije i proliferacije imunskih stanica, što smo dokazali imunofluorescentnim bojenjem jetrenih rezova. Tipizacijom protočnom citometrijom pokazali smo značajan porast specifičnih imunoloških podpopulacija, uključujući CD8⁺ limfocite T, NK stanice i $\gamma\delta$ limfocite T među stanicama u proliferaciji, što ukazuje na prisutnost upale jetre.

Međutim, jedan od nedostataka ovog rada je što smo proučavali samo histologiju jetre i tipizaciju imunoloških populacija nakon 4 mjeseca. Rad bi bio potpuniji i značajniji da smo prikupljali podatke kroz više faza, primjerice nakon 4 tjedna, 8 tjedana, 12 tjedana i 16 tjedana miševa na visokokaloričnoj masnoj prehrani (SSD). Tako bismo mogli bolje razumjeti koje se stanice prve regrutiraju i aktiviraju u vidu upale, te kod kojih dolazi do proliferacije i aktivacije u kasnijim fazama. Daljnji cilj bio bi proučavanje početaka imunoloških kaskada, što je već započeto u okviru budućih istraživanja.

Razumijevanje uloge $\gamma\delta$ limfocita T i drugih imunoloških populacija moglo bi pomoći u razvoju ciljanih terapija koje bi spriječile napredovanje MASLD-a u MASH te smanjile rizik od fibroze i gubitka funkcije jetre. S obzirom na to da je upala ključan čimbenik MASH-a, proučavanje početnih faza inflamatorne kaskade može dovesti do otkrića novih biomarkera i terapijskih ciljeva za prevenciju MASLD-a ili za ublažavanje i usporavanje simptoma bolesti.

7. Literatura

1. García-García FJ, Monistrol-Mula A, Cardellach F, Garrabou G. Nutrition, Bioenergetics, and Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2020, Vol 12, Page 2785 [Internet]. 11. rujana 2020.;12(9):2785. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2785/htm>
2. Rippe JM, Crossley S, Ringer R. Obesity as a chronic disease: modern medical and lifestyle management. *J Am Diet Assoc* [Internet]. 1998. 98(10 Suppl 2). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9787730/>
3. González-Gross M, Meléndez A. Sedentarism, active lifestyle and sport: Impact on health and obesity prevention. *Nutr Hosp*. 28. rujana 2013.;(Suppl):89–98.
4. Collaborators G 2015 O. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* [Internet]. 06. srpanja 2017. 377(1):13. Dostupno na: </pmc/articles/PMC5477817/>
5. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. 2024 Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
6. Noubiap JJ, Nansseu JR, Lontchi-Yimagou E, Nkeck JR, Nyaga UF, Ngouo AT, i ostali. Geographic distribution of metabolic syndrome and its components in the general adult population: A meta-analysis of global data from 28 million individuals. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 01. lipanja 2022.188. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35584716/>
7. Pećin I, Reiner Ž. Metabolic Syndrome, Morbidity and Mortality - in the Era of COVID-19 Pandemic. *Psychiatr Danub*. 2021.;Spring-Summer(33(Suppl 4)):441–4.
8. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Sv. 20, *Current Hypertension Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2018.

9. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev* [Internet]. 01. siječanj 2015. [citirano 20. kolovoz 2024.];16(1):1–12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25407540/>
10. Fahed G, Aoun L, Zerdan MB, Allam S, Zerdan MB, Bouferraa Y, i ostali. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. Sv. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
11. Swarup S, Ahmed I, Grigorova Y, Zeltser R. Metabolic Syndrome. *StatPearls* [Internet]. 07. ožujak 2024. [citirano 21. kolovoz 2024.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459248/>
12. Moy FM, Bulgiba A. The modified NCEP ATP III criteria maybe better than the IDF criteria in diagnosing Metabolic Syndrome among Malays in Kuala Lumpur. *BMC Public Health* [Internet]. 2010. [citirano 20. kolovoz 2024.];10. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21054885/>
13. De Cól JP, de Lima EP, Pompeu FM, Cressoni Araújo A, de Alvares Goulart R, Bechara MD, i ostali. Underlying Mechanisms behind the Brain–Gut–Liver Axis and Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD): An Update. *Int J Mol Sci* [Internet]. 01. travanj 2024. [citirano 26. kolovoz 2024.];25(7). Dostupno na: </pmc/articles/PMC11011299/>
14. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, i ostali. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med* [Internet]. 25. kolovoz 2008. [citirano 20. kolovoz 2024.];168(15):1609–16. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695074/>
15. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* [Internet]. 16. travanj 2005.;365(9468):1415–28. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15836891/>
16. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, i ostali. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 01. svibanj 2020. 158(7):1999–2014.e1. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32044314/>

17. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, i ostali. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. Sv. 79, *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V.; 2023. str. 1542–56.
18. Guyton AC, Taylor AE, Granger HJ. Dynamics and control of the body fluids. Sv. 3. Philadelphia: WB Saunders; 1975.
19. Yap KK, Mitchell GM. Recapitulating the liver niche in vitro. 01. siječanj 2022.;6:1–55.
20. Seo W, Jeong W Il. Hepatic non-parenchymal cells: Master regulators of alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol* [Internet]. 28. siječanj 2016. 22(4):1348–56. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26819504/>
21. Sanz-García C, Fernández-Iglesias A, Gracia-Sancho J, Arráez-Aybar LA, Nevzorova YA, Cubero FJ. The Space of Disse: The Liver Hub in Health and Disease. Sv. 1, *Livers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2021. str. 3–26.
22. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 01. svibanj 2016. 13(3):267. Dostupno na: </pmc/articles/PMC4856809/>
23. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Metabolism* [Internet]. 01. kolovoz 2016. 65(8):1080. Dostupno na: </pmc/articles/PMC4889547/>
24. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 23. svibanj 2016. 11:451–96. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980160/>
25. Virović Jukić L, Grgurević I, Mikolašević I, Filipec Kanižaj T, Milić S, Mrzljak A, i ostali. HRVATSKE SMJERNICE ZA DIJAGNOSTIKU I LIJEČENJE NEALKOHOLNE BOLESTI MASNE JETRE. *Acta Clin Croat* (Suppl 2). 2021.;60:53–64.
26. Tosello-Tramont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in

- diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production. *J Biol Chem* [Internet]. 23. studeni 2012. [citirano 20. kolovoz 2024.];287(48):40161–72. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23066023/>
27. Huh Y, Cho YJ, Nam GE. Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Obes Metab Syndr* [Internet]. 03. ožujak 2022. [citirano 18. kolovoz 2024.];31(1):17. Dostupno na: </pmc/articles/PMC8987457/>
 28. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two „hits“? *Gastroenterology* [Internet]. 1998. [citirano 23. kolovoz 2024.];114(4):842–5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9547102/>
 29. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* [Internet]. rujan 2002. [citirano 26. kolovoz 2024.];60(9):289–93. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12296456/>
 30. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 01. siječanj 2012. 52(1):59–69. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064361/>
 31. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* [Internet]. studeni 2010. 52(5):1836–46. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21038418/>
 32. Martinou E, Pericleous M, Stefanova I, Kaur V, Angelidi AM. Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi-Omics Non-Invasive Approaches. *Diagnostics*. 01. veljača 2022.;12(2).
 33. Mladenčić K, Lenartić M, Marinović S, Polić B, Wensveen FM. The “Domino effect” in MASLD: The inflammatory cascade of steatohepatitis. Sv. 54, *European Journal of Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2024.

34. Maruši M, Pai M, Knobloch M, Liberati Pršo AM. Review Article NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. 2021. Dostupno na: <https://doi.org/10.1155/2021/6613827>
35. Wang S, Friedman SL. Found in translation-Fibrosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). *Sci Transl Med* [Internet]. 04. listopad 2023. 15(716). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37792957/>
36. Suvarna R, Shetty S, Pappachan JM. Efficacy and safety of Resmetirom, a selective thyroid hormone receptor- β agonist, in the treatment of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 01. prosinac 2024. 14(1):1–14. Dostupno na: <https://link.springer.com/articles/s41598-024-70242-8>
37. Alshehade SA. Resmetirom's approval: Highlighting the need for comprehensive approaches in NASH therapeutics. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* [Internet]. 01. kolovoz 2024.;48(7). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38772519/>
38. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 05. svibanj 2012.;18(19):2300. Dostupno na: </pmc/articles/PMC3353364/>
39. Hansen HH, Ægidius HM, Oró D, Evers SS, Heebøll S, Eriksen PL, i ostali. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 06. srpanj 2020. [citirano 24. kolovoz 2024.];20(1). Dostupno na: </pmc/articles/PMC7336447/>
40. Clapper JR, Hendricks MD, Gu G, Wittmer C, Dolman CS, Herich J, i ostali. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 01. listopad 2013. 305(7). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23886860/>
41. Marinović S, Lenartić M, Mladenović K, Šestan M, Kavazović I, Benić A, i ostali. NKG2D-mediated detection of metabolically stressed

- hepatocytes by innate-like T cells is essential for initiation of NASH and fibrosis. *Sci Immunol*. 01. rujan 2023.;8(87).
42. Huang T, Behary J, Zekry A. Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Intern Med J [Internet]*. 01. rujan 2020.;50(9):1038–47. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760676/>
 43. Wang F, Zhang X, Liu W, Zhou Y, Wei W, Liu D, i ostali. Activated Natural Killer Cell Promotes Nonalcoholic Steatohepatitis Through Mediating JAK/STAT Pathway. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 01. siječanj 2022.;13(1):257–74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34506952/>
 44. Stiglund N, Strand K, Cornillet M, Stål P, Thorell A, Zimmer CL, i ostali. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol [Internet]*. 2019.;10(JUN). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31214196/>
 45. Chen Y, Wei H, Sun R, Dong Z, Zhang J, Tian Z. Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells. *Hepatology [Internet]*. 2007. 46(3):706–15. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17626270/>
 46. Lenartić M, Jelenčić V, Zafirova B, Ožanić M, Marečić V, Jurković S, i ostali. NKG2D Promotes B1a Cell Development and Protection against Bacterial Infection. *J Immunol [Internet]*. 15. veljača 2017.;198(4):1531–42. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28087665/>
 47. Zafirova B, Mandarić S, Antulov R, Krmpotić A, Jonsson H, Yokoyama WM, i ostali. Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice. *Immunity [Internet]*. 21. kolovoz 2009;31(2):270–82. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19631564/>
 48. Gebru YA, Gupta H, Kim HS, Eom JA, Kwon GH, Park E, i ostali. T Cell Subsets and Natural Killer Cells in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci [Internet]*. 01. studeni 2021. 22(22). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830072/>

49. Torres-Hernandez A, Wang W, Nikiforov Y, Tejada K, Torres L, Kalabin A, i ostali. $\gamma\delta$ T Cells Promote Steatohepatitis by Orchestrating Innate and Adaptive Immune Programming. *Hepatology* [Internet]. 01. veljača 2020.;71(2):477–94. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31529720/>
50. Wang X, Tian Z. $\gamma\delta$ T cells in liver diseases. *Front Med* [Internet]. 01. lipanj 2018.;12(3):262–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29441440/>

8. Životopis



Patricia Plantak

📍 **Kućna** : Kneza Trpimira 2, 44320, Kutina, Hrvatska

📍 **Adresa u Rijeci** : Radmile Matejčić 5, 51000, Rijeka, Hrvatska

✉ **E-adresa**: patricia.plantak13@gmail.com 📞 **Telefonski broj**: (+385) 919592432

Datum rođenja: 23/05/1999 **Državljanstvo**: hrvatsko

O MENI

Komunikativna sam i radoznala osoba. Volim nove izazove i snalažljiva sam u neočekivanim situacijama. Druželjubiva sam osoba koja voli pomagati.

RADNO ISKUSTVO

[06/2023 – 10/2023]

Work & travel program

Maclac Enterprises

Mjesto: Block island, RI | **Zemlja**: Sjedinjene Države

- rad u trgovini
- učenje kulture i poboljšanje jezika
- putovanje po cijelom SAD-u gdje sam razvila vještine potrebne za osobni rast

[2022 – Trenutačno]

Hostesa na promocijama

Belle Futura

Mjesto: Rijeka | **Zemlja**: Hrvatska

- promoviranje raznih brendova
- komunikacija i rad s ljudima

[11/2022 – 04/2023]

Prodavačica

Tommy

Mjesto: Rijeka

- rad na blagajni
- punjenje polica
- pomoć kupcima

[04/07/2021 – 15/07/2021]

Stručna praksa

Ljekarna Nives Miloš

Mjesto: Kutina | **Zemlja**: Hrvatska

OBRAZOVANJE I OSPO-SOBLJAVANJE

[2021 – Trenutačno]

Diplomski studij "Biotehnologija u medicini"

Odje za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Adresa: 51000, Rijeka, Hrvatska |

[2018 – 2021]

Preddiplomski studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Adresa: 51000, Rijeka, Hrvatska |

[2013 – 2018]

Prirodoslovno-matematička gimnazija

Srednja škola Tin Ujević

Adresa: 44320, Kutina, Hrvatska |

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 ČITANJE C1 PISANJE C1

GOVORNA PRODUKCIJA B2 GOVORNA INTERAKCIJA B2

njemački

SLUŠANJE B1 ČITANJE B1 PISANJE B1

GOVORNA PRODUKCIJA B1 GOVORNA INTERAKCIJA B1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Moje digitalne vještine

Aktivno i svakodnevno korištenje Interneta, racunala i e-maila | napredno poznavanje rada na računalu (Windows aplikacije i MS Office) | Poznavanje programa PyMOL Avogadro ChemAxon Marvin VMD GAMESS MacMOLPit

MREŽE I ČLANSTVA

[2009 – 2015] **AK Moslavina** Kutina

VOZAČKA DOZVOLA

Automobili: B

VOLONTIRANJE

[2018 – 2021] **Student mentor** Odjel za biotehnologiju

[2017 – 2021] **Kuglice dobrih želja** Odjel za biotehnologiju

[2021 – Trenutačno] **Putujući znanstvenici** Odjel za biotehnologiju

[2021 – Trenutačno] **Naturis** Odjel za biotehnologiju