

# Promjene u masnoj degeneraciji jetre kao pokazatelj odgovora na terapiju metforminom i liraglutidom kod štakora hranjenih masnom i slatkom hranom

---

Imširović, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:009603>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicine**

**Alen Imširović**

**PROMJENE U MASNOJ**  
**DEGENERACIJI JETRE KAO**  
**POKAZATELJ ODGOVORA NA**  
**TERAPIJU METFORMINOM I**  
**LIRAGLUTIDOM KOD ŠTAKORA**  
**HRANJENIH MASNOM I SLATKOM**  
**HRANOM**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicine**

**Alen Imširović**

**PROMJENE U MASNOJ**  
**DEGENERACIJI JETRE KAO**  
**POKAZATELJ ODGOVORA NA**  
**TERAPIJU METFORMINOM I**  
**LIRAGLUTIDOM KOD ŠTAKORA**  
**HRANJENIH MASNOM I SLATKOM**  
**HRANOM**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za medicinsku biologiju i genetiku.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 51 radni list, 7 tablica i 24 slike.

**ZAHVALE:**

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Heffer na prihvaćanju mentorstva i vođenju kroz mikroskopski svijet jetara štakora, omogućavanju novih spoznaja, strpljenju, vremenu te pomoći u izradi i uređivanju ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem Miloradu Zjaliću na vremenu, savjetima, zanimljivim idejama te upoznavanju s tehnikom rezanja, bojenja i slikanja preparata.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na neizmornoj podršci i razumijevanju tijekom svih godina studija.*

*Zahvaljujem najdražim prijateljima i kolegama koji su ovo razdoblje studiranja učinili lakšim i zabavnijim.*

# SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA</b> .....	II
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Jetra.....	1
1.1.1. Histološka građa jetre.....	1
1.1.2. Metabolička funkcija jetre .....	1
1.1.3. Masna jetra i steatohepatitis.....	2
1.2. Pretilost.....	4
1.3. Šećerna bolest.....	5
1.3.1. Klasifikacija šećerne bolesti.....	5
1.3.2. Liječenje šećerne bolesti .....	5
1.3.3. Metformin .....	6
1.3.4. Liraglutid.....	7
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	8
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	9
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Materijali .....	10
4.3. Metode .....	10
4.3.1. Makrolokacija masnih kapljica .....	11
4.3.2. Određivanje površine pojedinih masnih kapljica.....	11
4.3.3. Određivanje stupnja upale.....	12
4.4. Statističke metode.....	14
<b>5. REZULTATI</b> .....	15
5.1. Rezultati analize makrolokacije masnih kapljica u jetri .....	15
5.2. Rezultati analize površine pojedinih masnih kapljica .....	19
5.3. Rezultati analize stupnja upale .....	22
<b>6. RASPRAVA</b> .....	36
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	40
<b>8. SAŽETAK</b> .....	41
<b>9. SUMMARY</b> .....	42
<b>10. LITERATURA</b> .....	43
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	50

## POPIS KRATICA

**1m** – 1. skupina štakora mužjaka, hranjenih normalnom dijetom

**1f** – 1. skupina štakora ženki, hranjenih normalnom dijetom

**2m** – 2. skupina štakora mužjaka, hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima

**2f** – 2. skupina štakora ženki, hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima

**3m** – 3. skupina štakora mužjaka, tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijete

**3f** – 3. skupina štakora ženki, tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijete

**4m** – 4. skupina štakora mužjaka, tretiranih liraglutidom nakon masne i slatke dijete

**4f** – 4. skupina štakora ženki, tretiranih liraglutidom nakon masne i slatke dijete

**AF 488** – zeleni fluorofor (Alexa Fluor 488)

**AMP** – adenozin monofosfat

**AMPK** – proteinska kinaza aktivirana AMP-om (engl. *AMP-activated protein kinase*)

**BMI** – index tjelesne mase (engl. *body mass index*)

**CD 197** – C-C kemokinski receptor tip 7 na površini M1 makrofaga (engl. *Cluster of Differentiation 197*)

**CD 206** – manozna-vezujući receptor na površini M2 makrofaga (engl. *Cluster of Differentiation 206*)

**DAPI** – fluorescentna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

**dH<sub>2</sub>O** – destilirana voda

**GLP-1** – glukagonu sličan polipeptid (engl. *glucagone like polipeptide*)

**HRZZ** – Hrvatska zaklada za znanost

**IFN** – interferon

**IL** – interleukin

**LPS** – lipopolisaharid

**NO** – dušikov monoksid (engl. *nitric oxide*)

**PBS** – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

**PPAR $\delta$**  – receptor za aktivaciju proliferacije peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor delta*)

**RECOOP HST Association** – Udruženje za regionalnu suradnju u zdravstvu, znanosti i tehnologiji (engl. *Regional Cooperation for Health, Science and Technology Association*)

**STAT** – transkripcijski faktor (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

**Th1** – stanična imunost

**Th2** – humoralna imunost

**TNF** – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)



## 1. UVOD

### 1.1. Jetra

Jetra je najveća žlijezda u tijelu te iznosi oko 2 % tjelesne mase odraslog čovjeka, a 5 % u male djece. Najveći je organ u trbušnoj šupljini, crvenkastosmeđe boje, a razvija se kao izdanak dvanaesnika (1).

#### 1.1.1. Histološka građa jetre

Osnovnu građevnu sastavnicu jetre čine jetrene stanice – hepatociti. Hepatociti su stanice višekutna oblika čija citoplazma obiluje staničnim organelima poput mitohondrija, hrapave i glatke endoplazmatske mrežice te Golgijeva kompleksa. U citoplazmi hepatocita također su prisutni lizosomi, lipidne kapljice i glikogen (2).

Hepatociti se udružuju u međusobno povezane gredice koje se zrakasto šire od središnje vene poput žbica na kotaču. Takve strukture višekutna oblika nazivaju se jetreni režnjići i čine osnovnu funkcionalnu jedinicu jetre. Na uglovima jetrenih režnjića smješteni su Kiernanovi portalni prostori, a unutar vezivnog tkiva portalnog prostora nalaze se venula, arteriola, žučni kanal i limfne žile. Središnje vene, iz kojih krv utječe u jetrene vene te iz njih u donju šuplju venu, građene su od endotelnih stanica obloženih malom količinom kolagenih vlakana. Stanične membrane susjednih hepatocita tvore stijenku žučnih kapilara u kojima žuč teče od centra prema periferiji režnjića i koje međusobno anastomoziraju i završavaju u žučnim kanalićima koji se ulijevaju u žučne kanale u portalnim prostorima (2, 3).

Osim hepatocita u jetrenim režnjićima nalaze se i endotelne stanice te makrofazi poznati kao Kupfferove stanice. Između endotelnih stanica i hepatocita nalazi se uski subendotelni (Disseov ili perisinusni) prostor te isprekidana bazalna membrana koji omogućuju laku izmjenu tvari između hepatocita i krvne plazme unutar sinusoida. U Disseovu prostoru nalaze se stanice (Itove stanice), koje pohranjuju masti i vitamin A (2, 3).

#### 1.1.2. Metabolička funkcija jetre

Jetra je vrlo važan metabolički aktivan organ bez kojeg organizam ne može preživjeti. Proizvodi žuč koja pomaže apsorbirati masti i vitamine topljive u mastima, a 95 % žučnih kiselina vraća se u jetru enterohepatičnom cirkulacijom; sintetizira većinu proteina plazme pa

tako sudjeluje u sustavu zgrušavanja krvi, imunskom sustavu te transportu tvari krvlju; sudjeluje svojim enzimima u metabolizmu bilirubina, alkohola i amonijaka; povećava topljivost egzogenih i endogenih molekula te olakšava njihovo izlučivanje iz organizma (4).

Jetra igra veliku ulogu u energijskom metabolizmu masti (olakšanje probave i apsorpcije masti proizvodnjom žuči koja sadrži kolesterol i žučne soli, oksidacija masnih kiselina, sinteza kolesterola, fosfolipida i lipoproteina te sinteza masti iz bjelančevina i ugljikohidrata), ugljikohidrata (pohranjivanje glikogena, pretvaranje galaktoze i fruktoze u glukozu te glukoneogeneza) i bjelančevina (deaminacija aminokiselina te stvaranje ureje i bjelančevina plazme) (3, 5).

Probava masti počinje usitnjavanjem kapljica masti, emulgiranjem, a postiže se žučnim solima koje se nagomilavaju na površini kapljice masti i smanjuju površinsku napetost zbog čega se kapljica masti lakše raspada da bi ju do kraja mogle razgraditi lipaze (6). Glikogen se osim u jetri sintetizira i u mišićima. Inzulin i glukozu potiču sintezu glikogena te koče njegovu razgradnju, dok razgradnju glikogena potiču adrenalin, vazopresin, oksitocin i angiotenzin II, a sve pod kontrolom dvaju enzima – glikogen fosforilaze i glikogen sintaze. (3, 5). Glukoza, galaktoza i fruktoza iz hrane prenose se hepatičnom portalnom venom u jetru gdje se galaktoza i fruktoza prevode (izomeriziraju) u glukozu (5). U jetri se sintetizira većina glavnih plazmatskih proteina, isključivo je mjesto sinteze albumina, a još se sintetiziraju i transferin i feritin (proteini odgovorni za transport željeza), ceruloplazmin (glikoprotein koji sadržava bakar),  $\alpha$ -1 antitripsin te koagulacijski faktori I (fibrinogen), II (protrombin), V, VII, IX, XI i XII u hepatocitima i VIII u epitelnim stanicama jetre, a također se sintetiziraju i inhibitori koagulacije, antitrombin te proteini C i S (7).

### **1.1.3. Masna jetra i steatohepatitis**

Nakupljanje masti u obliku triglicerida, unutar stanica koje normalno ne sadrže velike količine masti zbog neravnoteže između biosinteze triglicerida i njihova izlučivanja iz hepatocita, naziva se masna promjena ili masna pretvorba, a najčešće je zahvaćena jetra. Masna jetra (masna promjena jetre, steatoza jetre) javlja se u oko 25 % populacije podjednako u muškaraca i žena, a najčešće je uzrokovana pretilošću, šećernom bolesti i kroničnim alkoholizmom. Može biti prirođena i stečena (češće u odraslih); mikrovezikularna (u obliku brojnih malih masnih kapljica bez promjena u položaju jezgre hepatocita) i makrovezikularna (gdje je zbog velike kapljice masti jezgra hepatocita potisnuta na rub, što stanici daje izgled

„prstena pečatnjaka“); a neki autori razlikuju diseminiranu (hepatociti s masnim kapljicama razasuti po parenhimu), zonalnu (veće skupine takvih hepatocita na određenom području ili sektoru jetrenog režnjića) te difuznu (ravnomjerno zahvaćanje cijelog jetrenog parenhima). Osim hepatomegalije u 50 % bolesnika, većina bolesnika nema nikakve simptome, pretiła je ili ima centralni adipozitet i povećani opseg struka. Masna promjena jetre reverzibilan je proces, ali ako se ne isključe uzroci, može doći, ovisno o uzroku, do alkoholnog ili nealkoholnog steatohepatitisa koji se očituju upalom i odlaganjem vezivnog tkiva oko hepatocita (pericelularna fibroza). Steatohepatitis u nekih bolesnika može progredirati u cirozu jetre i dovesti do zatajenja jetrenih funkcija (8 – 11).

Jedne od glavnih stanica koje sudjeluju u upalnom procesu zovu se makrofazi. Upalni monociti mogu se diferencirati u dvije vrste makrofaga, takozvane M1 i M2 makrofage jer sudjeluju u Th1 i Th2 imunološkom odgovoru. M1 makrofazi aktiviraju se klasičnim putem i imaju proupalni učinak te središnju ulogu u obrani domaćina. M2 makrofazi aktiviraju se alternativnim putem i preoblikuju tkivo zahvaćeno upalom. Dok se M1 makrofazi aktiviraju pomoću interferona gamma (IFN- $\gamma$ ), faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) ili lipopolisaharida (LPS) preko transkripcijskog faktora STAT1, M2 makrofazi aktiviraju se pomoću interleukina 4 i 13 (IL-4 i IL-13) preko transkripcijskog faktora STAT6. M1 makrofazi proizvode dušikov monoksid (NO) koji inhibira diobu stanica pa oni imaju citotoksični i protutumorski učinak, dok M2 makrofazi proizvode ornitin, prekursor poliamina i kolagena koji oporavljaju i grade novo tkivo. Stoga, M1 i M2 makrofazi mogu imati suprotan učinak u upalnim reakcijama. Prelazak M2 u M1 makrofage regulira početak, razvoj i prestanak upalnih procesa. U jetri Kupfferove stanice, makrofagi jetre, olakšavaju metaboličke prilagodbe hepatocita tijekom povećanog unosa kalorija. U pretilosti neravnoteža između unosa, sinteze i oksidacije masnih kiselina rezultira povećanim skladištenjem lipida u hepatocitima, što je ključni čimbenik u razvoju otpornosti na inzulin u jetri, a Kupfferove stanice direktno sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina. Studije su pokazale da je PPAR $\delta$  važan regulator pomoću IL-4 i IL-13 pokrenutog programa aktivacije alternativnih makrofaga. Gubitak PPAR $\delta$  u stanicama specifično otežava alternativnu aktivaciju Kupfferovih stanica, što rezultira steatozom jetre i otpornošću na inzulin. Iako svi učinci Kupfferovih stanica nisu još poznati, studije upućuju da postoje mnogi čimbenici koji utječu na održavanje homeostaze masnih stanica u jetrenom tkivu (12 – 17).

Retikulinska vlakna dugi su i tanki polimeri bjelančevina, a sastoje se od kolagena tipa III povezanog s drugim tipovima kolagena, glikoproteinima i proteoglikanima. Nalaze se u

međustaničnoj tvari, najviše u glatkom mišićju, jetri i koštanoj srži. Najviše dolaze do izražaja tijekom embriogeneze, upala i cijeljenja rana. Nakupljanje retikulinskih i ostalih vlakana (fibroza) povezano je s oštećenom funkcijom jetre i upalom. Malo je poznato o mogućem utjecaju šećerne bolesti, pretilosti i masne jetre na nakupljanje retikulinskih vlakana, ali ono se češće događa kod pretilih osoba sa šećernom bolesti. Bojenja na retikulin koriste se radi određivanja stupnja jetrenog oštećenja ili upale, a jače bojenje povezano je s težim stupnjem patoloških stanja jetre (18 – 20).

## 1.2. Pretilost

Pretilost (lat. *adipositas*, *obesitas*) sustavni je poremećaj organizma u kojem prekomjerno nakupljanje masti ugrožava zdravlje. Pretilost je uzrokovana pretjeranim unosom energije koja premašuje potrebe organizma. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, pretilost je definirana indeksom tjelesne mase (BMI) većim od  $30 \text{ kg/m}^2$ , a računa se kao tjelesna masa u kilogramima podijeljena s tjelesnom visinom u metrima na kvadrat. To je ekvivalentno povećanju tjelesne mase za 20 – 30 % iznad normalne. Sve veća prevalencija pretilosti i njezina povezanost sa širokim spektrom bolesti (šećernom bolesti, kardiovaskularnim bolestima i karcinomima) postaje glavni javnozdravstveni problem modernog doba u većini razvijenih zemalja svijeta, naročito u SAD-u, dok je prevalencija pretilosti u Hrvatskoj visokih 20 % populacije. Uz hiperlipoproteinemiju, hipertenziju, aterosklerozu, kolelitijazu i ostale komplikacije pretilosti, jedna od najuočljivijih komplikacija povećano je lučenje inzulina, odnosno kompenzacijska hiperinzulinemija koja nastaje zbog neosjetljivosti na inzulin u perifernim tkivima. Stoga je pretilost jedan od glavnih čimbenika koji pridonose nastanku šećerne bolesti u odraslih (9 – 11, 21).

Kod nekih ljudi indeks tjelesne mase nije dobra mjera za procjenu pretilosti. Bodibilderi koji imaju indeks tjelesne mase veći od  $30 \text{ kg/m}^2$  mogu imati nizak postotak tjelesne masti i oni nisu pretili. Indeks tjelesne masti ne korelira uvijek s postotkom tjelesne masti (22). Isto tako, indeks tjelesne masti ne korelira ni s razinom leptina, proizvodom lučenja masnih stanica koji je uzročno povezan s debljinom (23). Treba uzeti više parametara kada se određuje pretilost, no kod većine ljudi indeks tjelesne mase veći od  $30 \text{ kg/m}^2$  opasan je po zdravlje te smanjuje kvalitetu života.

### 1.3. Šećerna bolest

Šećerna je bolest heterogena skupina poremećaja različite etiologije, patogeneze, kliničke slike, tijeka i odgovora na terapiju kojoj je najznačajnije obilježje prisutnost povišene razine glukoze u krvi. To je kronična, metabolička bolest obilježena poremećenim metabolizmom ugljikohidrata, proteina i masti, a karakteriziraju ju akutne metaboličke te kasne komplikacije na velikim i malim krvnim žilama, živcima te bazalnim membranama tkiva (11, 21).

#### 1.3.1. Klasifikacija šećerne bolesti

Danas je prihvaćena klasifikacija Američke dijabetološke udruge iz 2000. godine. Tip 1 (ovisan o inzulinu) i tip 2 (neovisan o inzulinu) šećerne bolesti najčešći su oblici bolesti. Uzrok tipa 1 šećerne bolesti uništenje je  $\beta$ -stanica gušterače koje proizvode inzulin što dovodi do apsolutnog manjka inzulina. To uništenje može biti autoimunskog porijekla ili idiopatsko. Uzrok tipa 2 šećerne bolesti poremećaj je u lučenju inzulina i rezistencija perifernih tkiva na učinak inzulina. Vrlo je važno odrediti od kojeg tipa šećerne bolesti osoba boluje zbog različitog liječenja i prognoze bolesti (11).

#### 1.3.2. Liječenje šećerne bolesti

Osnovni su ciljevi liječenja šećerne bolesti sprječavanje akutnih i kroničnih komplikacija bolesti, uspostava uredne metaboličke ravnoteže u organizmu, postizanje radne sposobnosti i urednoga socijalnog života te kod djece tjelesnog i duševnog razvoja. Liječenje edukacijom za samopraćenje i samozbrinjavanje, pravilnom i dijetalnom prehranom te tjelesnom aktivnosti potrebno je svakoj osobi koja boluje od šećerne bolesti. Ako razina glukoze kod osoba sa šećernom bolesti tipa 2 nakon osnovnih principa liječenja nije zadovoljavajuća, u terapiju se dodaju oralni lijekovi, dok se kod šećerne bolesti tipa 1 primjenjuje inzulin. Lijekovi koji smanjuju apetit ili unos energije mogu djelovati na smanjenje tjelesne mase osobe pa se time uspostavlja ravnoteža između proizvedenog inzulina i potrebe organizma za inzulinom te posljedično poboljšanje reguliranja glukoze u krvi iako ti lijekovi ne sudjeluju neposredno u metabolizmu glukoze (11).

Lijekovi koji se koriste u liječenju šećerne bolesti tipa 2 jesu derivati sulfonilureje (glipizid, gliburid, glimepirid), meglitinidi (repaglinid), derivati D-fenilalanina (nateglinid), bigvanidi (metformin), inhibitori  $\alpha$ -glukozidaza (akarboza, miglitol), tiazolidindioni

(rosiglitazon, pioglitazon), lijekovi na bazi inkretina (eksenatid, sitagliptin, liraglutid) te analog amilina (pramlintid) (24).

Noviji pristupi liječenju šećerne bolesti i njezinih komplikacija uključuju i razne protuupalne lijekove zbog povezanosti šećerne bolesti s nekim upalnim stanjima poput reumatoidnog artritisa, psorijaze i Chronove bolesti (25). Operacija želuca pokazala se kao troškovno učinkovito liječenje za pretilo osobe sa šećernom bolesti. Ima niske stope komplikacija, rezultira trajnim gubitkom težine i kontrolom glikemije, poboljšanjem kvalitete života te većim ukupnim preživljenjem (26). Uspješnija je metoda liječenja od uobičajene medicinske terapije u izazivanju značajnog gubitka težine i kontroli šećerne bolesti, no šećerna bolest može se ponovno pojaviti kao rezultat trajnog oštećenja  $\beta$ -stanica gušterače (27). Novi lijekovi za snižavanje razine glukoze zakomplicirali su liječenje šećerne bolesti zadnjih godina. Postoji mnogo opcija za dvostruku kombiniranu terapiju, a kombinacija triju oralnih lijekova koristi se sve češće (28).

### 1.3.3. Metformin

Metformin je u zadnjih 40-ak godina donio revoluciju u liječenju šećerne bolesti te je još i danas najkorišteniji lijek u liječenju iste. Međunarodne smjernice preporučuju da se metformin uvede što je prije moguće nakon dijagnosticiranja šećerne bolesti (29). Metformin je predstavnik skupine bigvanida, oralnih lijekova za liječenje šećerne bolesti. Cjelokupni mehanizam djelovanja bigvanida i dalje nije poznat, ali je primarni učinak smanjenje proizvodnje glukoze u jetri aktivacijom enzima protein-kinaze koju aktivira AMP (AMPK; engl. *AMP-activated protein kinase*). Ostali mogući manje važni mehanizmi djelovanja jesu smanjenje proizvodnje glukoze u bubrezima, usporavanje apsorpcije glukoze iz probavnog trakta, izravna stimulacija glikolize u tkivima, povećano odstranjivanje glukoze iz krvi i smanjenje razine glukagona u plazmi. Unatoč tomu što uzrokuju probavne smetnje i rijetko laktacidozu, bigvanidi se preporučuju kao terapija izbora u dijabetesu tipa 2 jer štede inzulin, ne povećavaju tjelesnu težinu, ne potiču nastanak hipoglikemije te smanjuju rizik od makrovaskularnih i mikrovaskularnih bolesti (24). Novije studije dokazuju da metformin u bolesnika sa šećernom bolesti sprječava nastanak karcinoma gušterače, njegov rast i daljnje širenje u abdomen te smanjuje smrtnost (30, 31). Također, kod bolesnika sa šećernom bolesti, može smanjiti rizik od nastanka raka pluća (32), debelog crijeva (33), bubrega (34), mokraćnog mjehura (35), prostate (36), endometrija (37), jajnika (38), vrata maternice (39) i štitnjače (40). Iako ublažava sistemske simptome uzrokovane dijetom bogatom mastima,

nema učinka na neovaskularizaciju te očne simptome poput retinopatije (41). Kontraindikacije za primjenu bigvanida jesu bubrežne bolesti, alkoholizam, jetrene bolesti i stanja koja pogoduju nastanku tkivne anoksije pri kojima je uz primjenu bigvanida povećan rizik od laktacidoze (24). Zbog svojih učinaka, metformin je lijek prvog izbora u liječenju šećerne bolesti, a kombinacije lijekova u kojima je metformin osnovni lijek pokazuju slične rezultate (42).

#### 1.3.4. Liraglutid

Liraglutid je analog inkretina, crijevnog hormona koji potiče lučenje inzulina nakon obroka i GLP-1 (engl. *glucagone like polipeptide*) analog, analog glukagonu sličnog polipeptida koji je snažni stimulator sinteze i otpuštanja inzulina, inhibira izlučivanje glukagona, usporava pražnjenje želuca te ima anoreksični učinak. Odobren je 2014. godine za liječenje bolesnika s indeksom tjelesne mase većim  $30 \text{ kg/m}^2$  ili većim od  $27 \text{ kg/m}^2$  uz barem jedan komorbiditet (hipertenziju, dislipidemiju ili šećernu bolest tipa 2) (11, 24). Široko se koristi za liječenje šećerne bolesti tipa 2 i primjenjuje se subkutanom injekcijama, a farmakokinetička svojstva liraglutida omogućuju djelovanje od 24 sata sa samo jednom dozom dnevno (43). Siguran je, dobro se podnosi i poboljšava učinak jetrenih enzima (44). To može biti razlog zašto liraglutid značajno poboljšava kontrolu glikemije i smanjuje tjelesnu masu te tako poboljšava kvalitetu života u pretilih pacijenata sa šećernom bolesti (45). Također, liraglutid smanjuje aterosklerozu i upalu bubrega u miševa (46), poboljšava kardio-metaboličke rizične čimbenike u pacijenata s metaboličkim sindromom (47), smanjuje smrtnost od kardiovaskularnih uzroka u pacijenata sa šećernom bolesti (48) te snižava sistolički tlak (49). Najčešće su prijavljene nuspojave kod korištenja liraglutida gastrointestinalne (mučnina, povraćanje i proljev). Najizraženije su tijekom početnog razdoblja terapije dok im kasnije učestalost opada (49). Od ove godine u Americi je, uz empagliflozin, liraglutid preporučan za pacijente s dobro reguliranom šećernom bolesti i uspostavljenom aterosklerotičnom kardiovaskularnom bolesti jer smanjuju smrtnost u takvih pacijenata (50).

## 2. HIPOTEZA

Dijeta bogata mastima i šećerima izaziva pojavu masne steatoze jetre, što se vidi kao povećana količina masti u hepatocitima.

Metformin i liraglutid različito djeluju na mužjake i ženke, što se može kvantificirati s obzirom na količinu i veličinu masnih kapljica u jetri kao i obim upale.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi su ovog istraživanja:

1. Korištenjem histološkog bojenja na masti, kvantificirati broj i veličinu masnih kapljica u hepatocitima te međusobno usporediti životinje hranjene standardnom dijetom i dijetom bogatom mastima i šećerima.
2. Korištenjem histološkog bojenja na masti, kvantificirati broj i veličinu masnih kapljica u hepatocitima te međusobno usporediti životinje tretirane metforminom i liraglutidom s kontrolnom skupinom koja je bila izložena masnoj dijeti bogatoj šećerima, ali netretirana.
3. Korištenjem histološkog bojenja na retikulin po Gomoriju i imunohistokemijskog bojenja na M1 (CD 197) i M2 (CD 206) makrofage, kvantificirati makrofage u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre te perivaskularno; međusobno usporediti 4 skupine životinja s obzirom na stupanj upale.
4. Međusobno usporediti učinak metformina i liraglutida (s obzirom na količinu masti i obim upale) prvo na mužjacima, zatim na ženka i konačno usporediti djelovanje istih lijekova na mužjake u odnosu na ženke.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao studija parova (životinje na standardnoj dijeti prema životinjama na dijeti bogatoj mastima i šećerima; životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima prema životinjama tretiranim metforminom ili liraglutidom nakon dijete bogate mastima i šećerima).

#### 4.2. Materijali

U studiju je uključeno 32 mušjaka i 32 ženke Sprague-Dawley štakora u dobi od 44 tjedna, podijeljenih u 4 skupine po 8 mušjaka odnosno 8 ženki u svakoj skupini. Prva kontrolna skupina (mušjaka i ženki) hranjena je normalnom (standardnom) hranom i nije dobivala terapiju. Druga kontrolna, treća (prva eksperimentalna) i četvrta (druga eksperimentalna) skupina hranjene su hranom bogatom (s visokim postotkom) mastima i šećerima kroz 20 tjedana. Trećoj je skupini u dobi od 50 tjedana uvedena terapija metforminom, a četvrtoj liraglutidom. U dobi od 64 tjedna životinje su žrtvovane, anestezirane ketaminom intramuskularno (Ketanest, Pfizer Corporation, New York City, NY, USA; koncentracija: 30 mg/kg) i dodatno inhalacijskim plinom izofluranom (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Chicago, IL, USA). Jetre su izolirane i fiksirane 4 %-tnim paraformaldehidom u trajanju od 24 sata, krioprotektirane saharozom, smrznute imerzijom u prethodno ohlađenom 2-metilbutanu i spremljene na -80 °C do analize. Ovaj dio studije financiran je od strane RECOOP HST udruženja, a životinje su uzgojene i tretirane na Fakultetu za farmaciju iz Szegeda. Studija je završena 20. studenog 2015. godine. Za studiju je dobiveno etičko dopuštenje Farmaceutskog fakulteta u Szegedu. Nakon toga, skupljeni fiksirani uzorci jetrenog tkiva preneseni su na Medicinski fakultet Osijek, a diplomski je rad napravljen na arhivi ovih uzoraka u sklopu HRZZ projekta "Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi" pod brojem IP-2014-09-2324 čija je voditeljica prof. Heffer.

#### 4.3. Metode

Fiksirana, krioprotektirana i smrznuta 64 uzorka jetre izrezana su pomoću kriostata na rezove debljine 16 µm (za bojenje Sudan Black B bojom) i 20 µm (za ostala bojenja) i obojena histološkim bojama Sudan Black B (za makrolokalizaciju masnih kapljica u jetri) odnosno Oil Red O (za određivanje površine pojedinih masnih kapljica). Rezovi su

dehidrirani i poklopljeni pokrovnim stakalcima te su pod mikroskopom Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) slikani na 100 x (Sudan Black B) i 200 x (Oil Red O) povećanju, Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop. Zatim je u programu ImageJ načinjena kvantifikacija.

### 4.3.1. Makrolokalizacija masnih kapljica

Za makrolokalizaciju masnih kapljica u jetri korišteno je bojenje histološkom bojom Sudan Black B (Merck, Kenilworth, NJ, USA, 1 % u 70 % etanolu). Nakon rezanja, preparati su direktno s mikrotoma prebačeni na želatinom obložena stakalca i sušeni 30 minuta. Prije bojenja stakalca su postavljena na postolja u plastičnoj komori zasićenoj parom etilnog alkohola u trajanju od 5 minuta. Sudan Black B boja potom je nanescena na stakalca i ostavljena na njima 8 minuta u zatvorenoj komori. Nakon toga, boja je nježno isprana destiliranom vodom (dH<sub>2</sub>O) pa 70 %-tnim etanolom 90 sekundi i onda je alkohol ispran destiliranom vodom. Nakon toga nanescena je Nuclear Fast Red (Merck, Kenilworth, NJ, USA, 0,1 % u dH<sub>2</sub>O) boja za bojenje jezgri na 3 minute te zatim isprana 2 puta po 2 minute u destiliranoj vodi. Stakalca su pokrivena Crystal Mountom (Biomedica corp. Foster city, CA). Nakon slikanja površine od 0,03 mm<sup>2</sup> na 100 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ. Kvantifikacija se sastojala od određivanja područja veličine 1000 x 100 piksela (0,0173 mm<sup>2</sup>), jednog u subkapsularnom, a drugog u središnjem dijelu jetre. Subkapsularni je dio jetre određen kao malo područje odmah ispod ruba jetre. Slike su kvantificirane kao postotak tamnog područja unutar 1000 x 100 piksela. Tamno područje određeno je pragom (engl. *threshold*) namještenim na 0 – 100. Određivanje praga metoda je kojom se slika dijeli na dvije (ili više) skupina piksela. U ovom slučaju tamni pikseli predstavljali su masne kapljice, a ostali pikseli druge komponente jetrenog tkiva. Postotci površine koje zauzimaju masne kapljice, zatim su statistički analizirani usporedbom između svake od 4 skupine mužjaka te isto tako između svake od 4 skupine ženki štakora posebno u subkapsularnom, a posebno u središnjem dijelu jetre. Zatim su ti postotci uspoređivani između subkapsularnog i središnjeg dijela jetre ekvivalentnih skupina.

### 4.3.2. Određivanje površine pojedinih masnih kapljica

Za određivanje površine pojedinih masnih kapljica u jetri korišteno je bojenje histološkom bojom Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, otopina u izopropanolu). Nakon rezanja, preparati su prebačeni u 1 x PBS. Potom se koristila slobodno plutajuća

metoda bojenja (engl. *free float*) prema Vacci u trajanju od 5 minuta. Nakon toga preparati su navučeni na stakalca te pokriveni Crystal Mountom (Biomedica corp. Foster city, CA). Nakon slikanja na 200 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ. Kvantifikacija se sastojala od određivanja područja veličine 500 x 500 piksela, 5 u subkapsularnom i 5 u središnjem dijelu jetre. Subkapsularni je dio jetre određen kao malo područje odmah ispod ruba jetre. Slike su kvantificirane kao broj i veličina svake čestice u pikselima koja je više od 50 % kružnog oblika, nijanse boje (engl. *hue*) 240 – 255 te svjetline (engl. *brightness*) 0 – 170. Nijansa i svjetlina boje dio su određivanja praga boje što je metoda kojom se slika dijeli na dvije (ili više) skupina piksela. U ovom slučaju crveni pikseli navedenih karakteristika predstavljali su masne kapljice, a ostali pikseli druge komponente jetrenog tkiva. Prosječne veličine masnih kapljica zatim su statistički analizirane usporedbom svake od 4 skupine mužjaka te isto tako svake od 4 skupine ženki štakora posebno u subkapsularnom, a posebno u središnjem dijelu jetre. Zatim su te veličine uspoređivane između subkapsularnog i središnjeg dijela jetre ekvivalentnih skupina.

#### 4.3.3. Određivanje stupnja upale

Za određivanje stupnja upale korišteno je histološko bojenje na retikulini po Gomoriju i imunohistokemijsko bojenje. Otopine korištene pri bojenju po Gomoriju bile su: srebrov nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Gram-mol, Zagreb, 10 %); amonijev hidroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Gram-mol, Zagreb, 25 %); natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ , 10 %); kalijev permanganat ( $\text{KMnO}_4$ , TTT, Sveta Nedjelja, 1 %); oksalna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1 %); željezna stipsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 2,5 %); formalin (Gram-mol, Zagreb, 5 %); zlatni klorid (Kemika, Zagreb, 0,1 %); natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 5 %). Amonijakalno srebro pripremljeno je na sljedeći način: u 10 mL 10 %-tnog srebrovog nitrata dodano je 2,5 mL 10 %-tnog natrijevog hidroksida; nakon što se talog slegnuo, uklonjen je supernatant; talog je ispran dva puta u destiliranoj vodi čekajući oba puta da se talog nanovo slegne i uklanjajući supernatant pipetom; tijekom vrtnje polako su dodavane kapi amonijevog hidroksida dok se talog nije ponovno otopio nakon toga dodana je kap do dvije 10 %-tnog srebrovog nitrata dok otopina nije postala vrlo slabo opalescentna; na kraju je dodana destilirana voda do ukupnog volumena od 20 mL. Preparati su oksidirani 1 %-tnim kalijevim permanganatom 2 minute te isprani. Zatim su izbijeljeni u oksalnoj kiselini u trajanju od 2 minute te isprani vodom iz slavine. Učinjeni su osjetljivima 2,5 %-tnom željeznom stipsom 1 minutu te ponovno isprani vodom iz slavine. Zatim su dobro isprani destiliranom vodom pa 30 sekundi tretirani amonijakalnim srebrom te dobro isprani destiliranom vodom. Reducirani

su potom u 5 %-tnom formalinu dok nisu potamnili, dobro isprani vodom iz slavine, dobro isprani destiliranom vodom te zatim tonirani 0,1 %-tnom otopinom zlatnog klorida. Ponovno su isprani destiliranom vodom te fiksirani u 5 %-tnom natrijevom tiosulfatu 3 minute. Na kraju su preparati dobro isprani pod mlazom vode iz slavine te stavljani u 1 x PBS. Zatim su navučeni na želatinozna stakla i osušeni. Dehidrirani su 2 puta 10 minuta u 20 %-tnom, po 10 minuta u 50 pa 70 %-tnom, zatim po 5 minuta u 96 i 100 %-tnom te dvije minute u 100 %-tnom etanolu. Nakon toga 2 puta po 2 minute u ksilenu te pokriveni Histamontom. Nakon slikanja na 400 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ, Fiji dodatkom (engl. *plugin*) Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis) Segmentational analysis, gdje program naučen prepoznavati strukture na slici, potom obrađuje slike kroz dodatak pomoću dobivenog skriptnog jezika (engl. *macro language*). Postotci površine koje zauzimaju retikulinska vlakna zatim su statistički analizirani usporedbom između svake od 4 skupine mužjaka te isto tako između svake od 4 skupine ženki štakora.

Imunohistokemija je započeta pretretiranjem rezova u 1 x PBS-u 1 %-tnim goveđim serumom čime je blokirano nespecifično vezanje s primarnim protutijelom. Od svakog uzorka jetre napravljena su dva preparata. Jedni rezovi inkubirani su u monoklonskom žičjem primarnom protutijelu na M1 makrofage, CD 197 (Abcam, ab32527) u razrjeđenju 1 : 1000 preko noći na +4 °C, dok su drugi inkubirani u poliklonskom žičjem primarnom protutijelu na M2 makrofage, CD 206 (Abcam, ab64693). Rezovi su zatim ispirani u 1 x PBS-u 2 puta po 10 minuta i inkubirani u sekundarnom kozjem protužečjem protutijelu (A-11034) u razrjeđenju 1 : 500 konjugiranim s AF 488 na +4 °C kroz 4 sata. Rezovi su nakon toga ispirani u 1 x PBS-u 3 puta po 10 minuta te je nakon navlačenja preparata na stakalca neutralizirana pozadinska fluorescencija jetre sa Sudan Black B bojom da jezgre bojene DAPI (Roth, Karlsruhe, razrjeđenje 1 : 1000) bojom ostanu vidljive. Na kraju su preparati pokriveni Vectashield pokrivalom i pokrovnim staklom te mikroskopirani. Nakon slikanja na 200 x povećanju, kvantifikacija je načinjena u programu ImageJ ručnim prebrojavanjem pojedinih makrofaga u cijelom vidnom polju u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre. Subkapsularni je dio jetre određen kao malo područje odmah ispod ruba jetre, a perivaskularno tkivo jetre kao usko područje oko jetrenih krvnih žila.

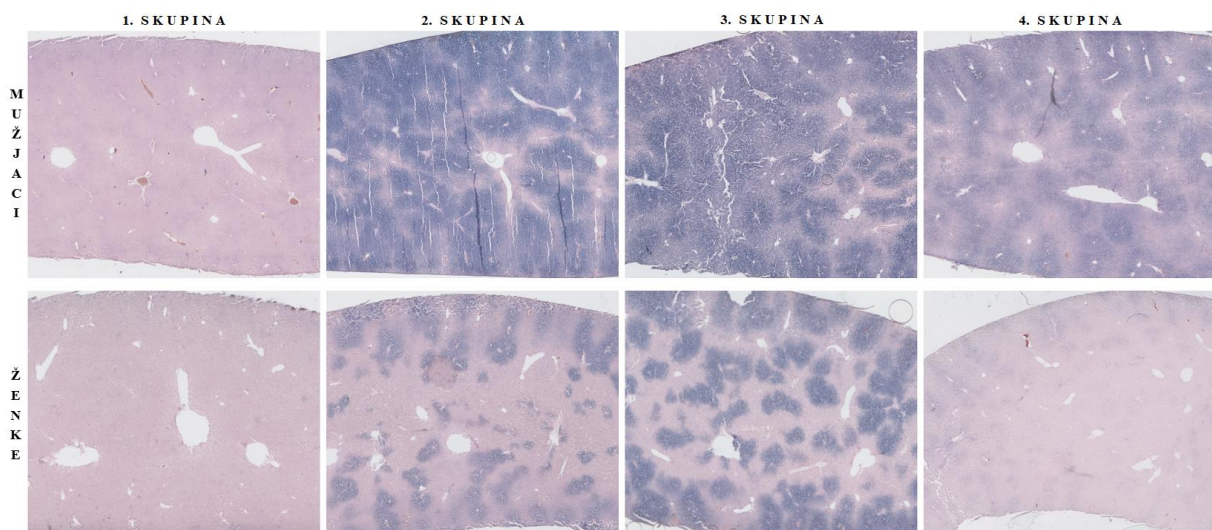
### 4.4. Statističke metode

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Lilieforsovom inačicom Kolmogorov-Smirnovljenovog testa. Numerički podaci koji slijede normalnu raspodjelu opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD).

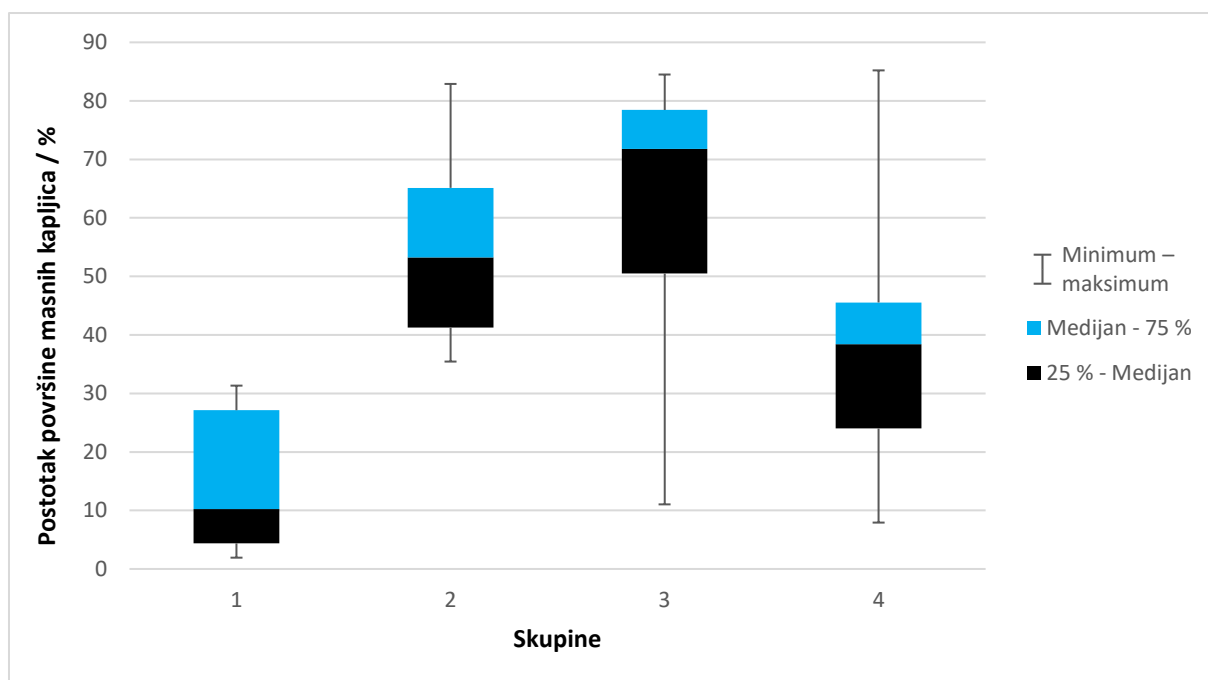
## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati analize makrolokalizacije masnih kapljica u jetri

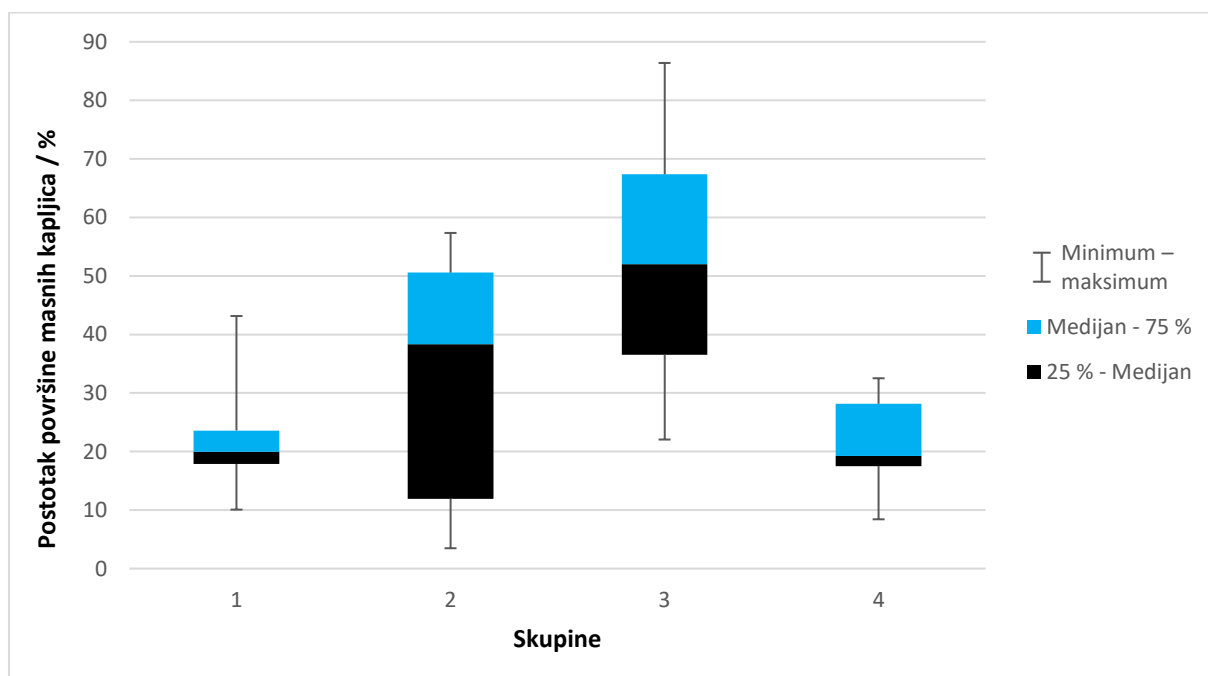
U svakom uzorku nasumično su određena dva područja veličine 1000 x 100 piksela (jedno u subkapsularnom, a drugo u središnjem dijelu jetre) u kojima je izračunat postotak površine koji zauzimaju masne kapljice. Dobiveni rezultati uspoređivani su u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre između svake od 4 skupine štakora kod mužjaka i ženki (Slika 1). Štakori hranjeni masnom i slatkim (eksperimentalnom) hranom (skupine 2m i 2f) imaju veći postotak masnih kapljica u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre od štakora hranjenih normalnom hranom (skupine 1m i 1f). Ta je razlika statistički značajna kod mužjaka, dok kod ženki nije. Štakori tretirani liraglutidom nakon masne i slatke dijeta (skupine 4m i 4f) imaju manji postotak masnih kapljica u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre od štakora tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijeta (skupine 3m i 3f). Ta je razlika statistički značajna kod ženki, dok kod mužjaka nije. Osim u srži jetre mužjaka, ne postoji statistički značajno smanjenje u postotku masnih kapljica nakon tretiranja liraglutidom, iako je razlika vidljiva (Slike 2 – 5, Tablica 1). Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Kod uspoređivanja subkapsularnog i središnjeg dijela jetre, sve su vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane  $\alpha$  granice (Tablica 2).



**Slika 1.** Preparati jetre obojeni histološkom bojom Sudan Black B. Četiri skupine mužjaka i ženki hranjenih standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretiranih metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Skenirao autor pomoću Nikon Supercool 9000.

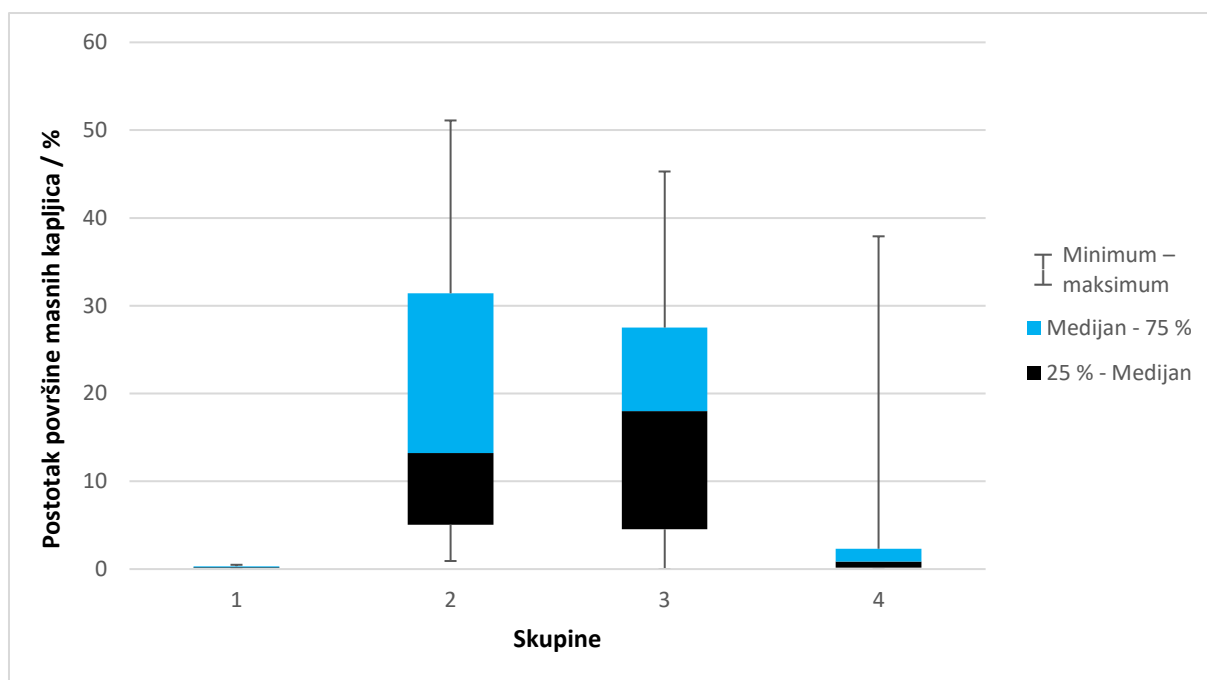


**Slika 2. Mužjaci – subkapsularni dio jetre.** Postotak površine koji zauzimaju masne kapljice u subkapsularnom dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.

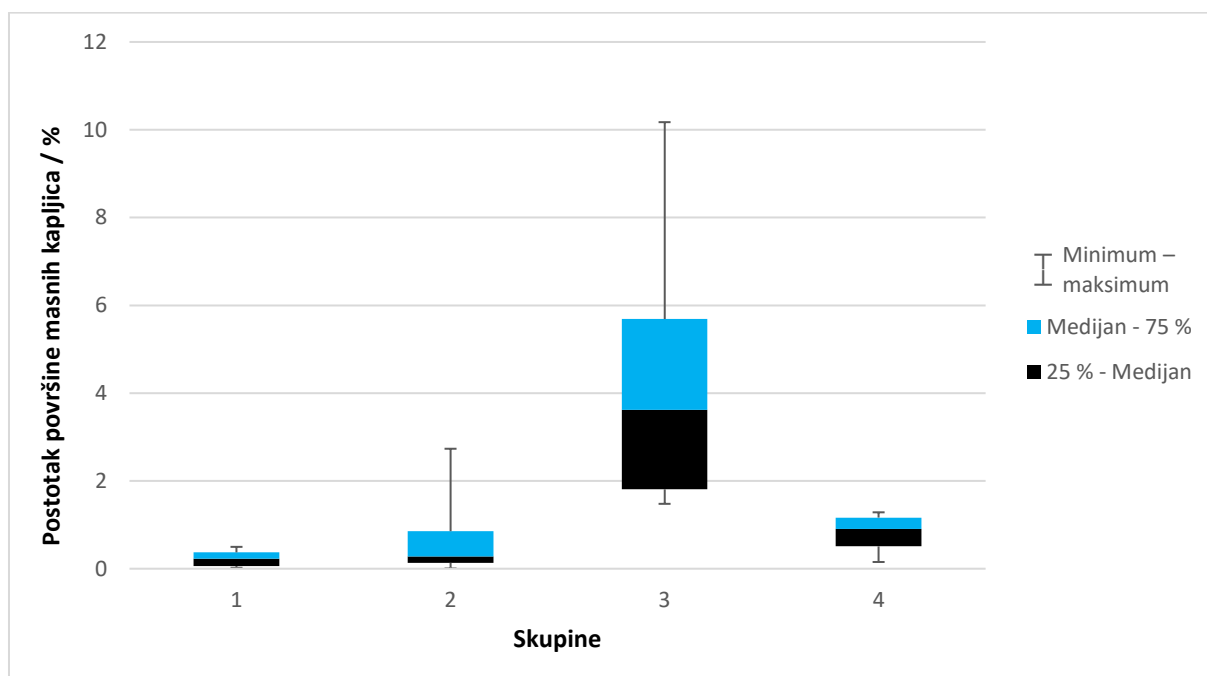


**Slika 3. Ženke – subkapsularni dio jetre.** Postotak površine koji zauzimaju masne kapljice u subkapsularnom dijelu jetre 4 skupine štakora ženki hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.





**Slika 4. Mužjaci – središnji dio jetre.** Postotak površine koji zauzimaju masne kapljice u središnjem dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.



**Slika 5. Ženke – središnji dio jetre.** Postotak površine koji zauzimaju masne kapljice u srži jetre 4 skupine štakora ženki hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.

**Tablica 1.** Statistički značajne razlike u postotku površine koji zauzimaju masne kapljice u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre između 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

Uspoređivane skupine*		P†
1m – središnji dio jetre	2m – središnji dio jetre	0,002
2m – središnji dio jetre	4m – središnji dio jetre	0,04
1m – subkapsularni dio jetre	2m – subkapsularni dio jetre	0,002
1m – subkapsularni dio jetre	3m – subkapsularni dio jetre	0,003
1m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,03
1f – središnji dio jetre	3f – središnji dio jetre	0,001
1f – središnji dio jetre	4f – središnji dio jetre	0,03
2f – središnji dio jetre	3f – središnji dio jetre	0,002
3f – središnji dio jetre	4f – središnji dio jetre	0,003
1f – subkapsularni dio jetre	3f – subkapsularni dio jetre	0,01
3f – subkapsularni dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	0,02

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

† Mann Whitney U test

**Tablica 2.** Usporedba postotka površine koji zauzimaju masne kapljice između subkapsularnog i središnjeg dijela jetre u 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

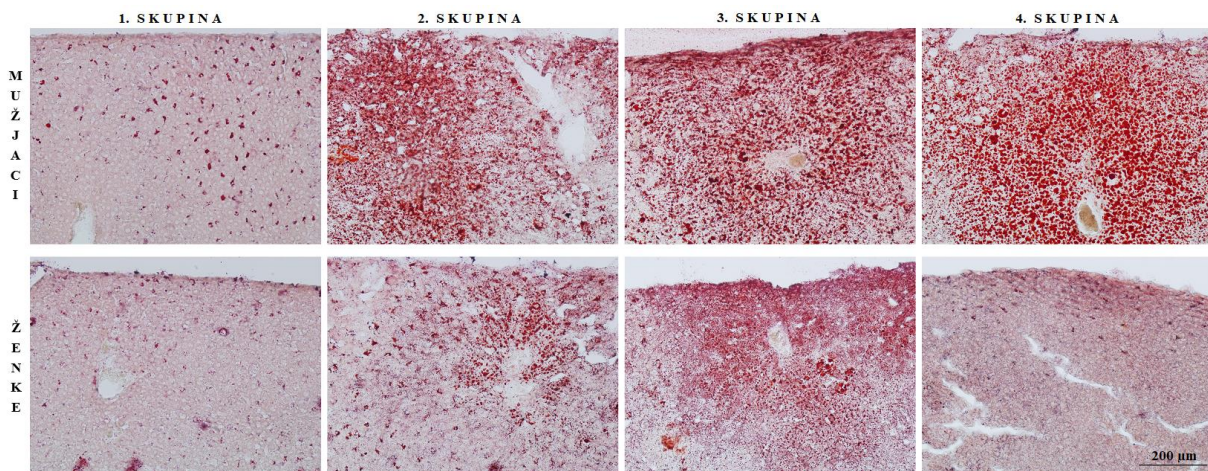
Uspoređivane skupine*		P†
1m – središnji dio jetre	1m – subkapsularni dio jetre	0,002
2m – središnji dio jetre	2m – subkapsularni dio jetre	0,03
3m – središnji dio jetre	3m – subkapsularni dio jetre	0,003
4m – središnji dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,002
1f – središnji dio jetre	1f – subkapsularni dio jetre	0,002
2f – središnji dio jetre	2f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
3f – središnji dio jetre	3f – subkapsularni dio jetre	0,001
4f – središnji dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	0,008

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

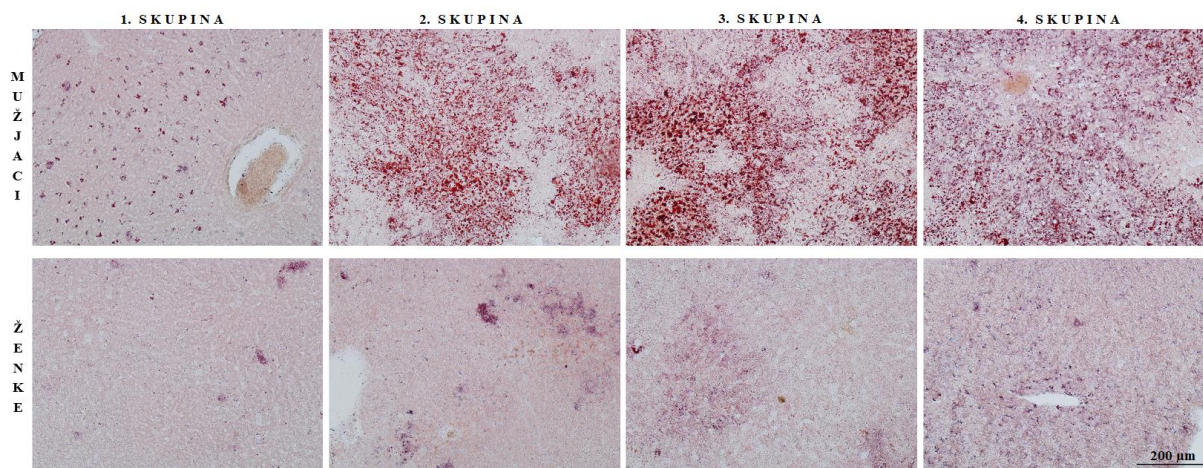
† Mann Whitney U test

## 5.2. Rezultati analize površine pojedinih masnih kapljica

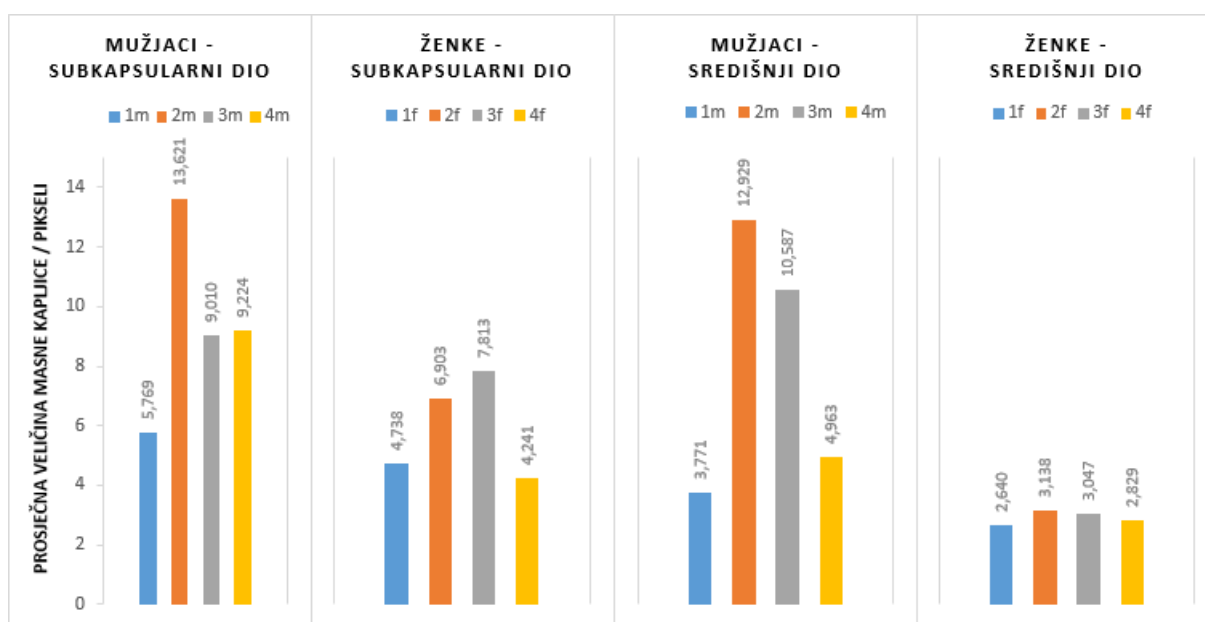
U svakom je preparatu nasumično odabrano 10 područja veličine 500 x 500 piksela (5 u subkapsularnom i 5 u središnjem dijelu jetre) u kojima je izračunata veličina svake masne kapljice u pikselima. Dobiveni rezultati uspoređivani su u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre između svake od 4 skupine (Slike 6 i 7). U štakora hranjenih masnom i slatkom (eksperimentalnom) hranom (skupine 2m i 2f) masne su kapljice u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre veće od onih u štakora hranjenih normalnom (standardnom) hranom (skupine 1m i 1f). Ta je razlika statistički značajna i kod mužjaka i kod ženki. U štakora tretiranih liraglutidom nakon masne i slatke dijeta (skupine 4m i 4f) masne su kapljice u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre manje od onih u štakora tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijeta (skupine 3m i 3f). Ta je razlika statistički značajna i kod mužjaka i kod ženki. Također, postoji statistički značajno smanjenje veličine masnih kapljica nakon tretiranja liraglutidom (Slika 8, Tablica 3). Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Osim u mužjaka hranjenih masnom i slatkom hranom, kod uspoređivanja subkapsularnog i središnjeg dijela jetre, sve su vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane  $\alpha$  granice (Tablica 4). Odnosno, postoji statistički značajna razlika u veličini masnih kapljica između subkapsularnog i središnjeg dijela jetre u svim skupinama mužjaka i ženki.



**Slika 6.** Preparati jetre obojeni histološkom bojom Oil Red O. Rubni (subkapsularni) dijelovi jetre četiri skupine mužjaka i ženki hranjenih standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretiranih metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 7.** Preparati jetre obojeni histološkom bojom Oil Red O. Središnji dijelovi jetre četiri skupine mužjaka i ženki hranjenih standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretiranih metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 8.** Aritmetičke sredine veličine pojedinih masnih kapljica u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.

**Tablica 3.** Statistički značajne razlike u veličini pojedinih masnih kapljica u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre između 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

Uspoređivane skupine*		P†
1m – središnji dio jetre	2m – središnji dio jetre	< 0,001
2m – središnji dio jetre	4m – središnji dio jetre	< 0,001
3m – središnji dio jetre	4m – središnji dio jetre	< 0,001
1m – subkapsularni dio jetre	2m – subkapsularni dio jetre	< 0,001
2m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,01
3m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,02
1f – središnji dio jetre	2f – središnji dio jetre	< 0,001
2f – središnji dio jetre	3f – središnji dio jetre	< 0,001
2f – središnji dio jetre	4f – središnji dio jetre	< 0,001
3f – središnji dio jetre	4f – središnji dio jetre	0,04
1f – subkapsularni dio jetre	2f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
2f – subkapsularni dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
3f – subkapsularni dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	< 0,001

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

† Mann Whitney U test

**Tablica 4.** Statistički značajne razlike u veličini pojedinih masnih kapljica između subkapsularnog i središnjeg dijela jetre 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

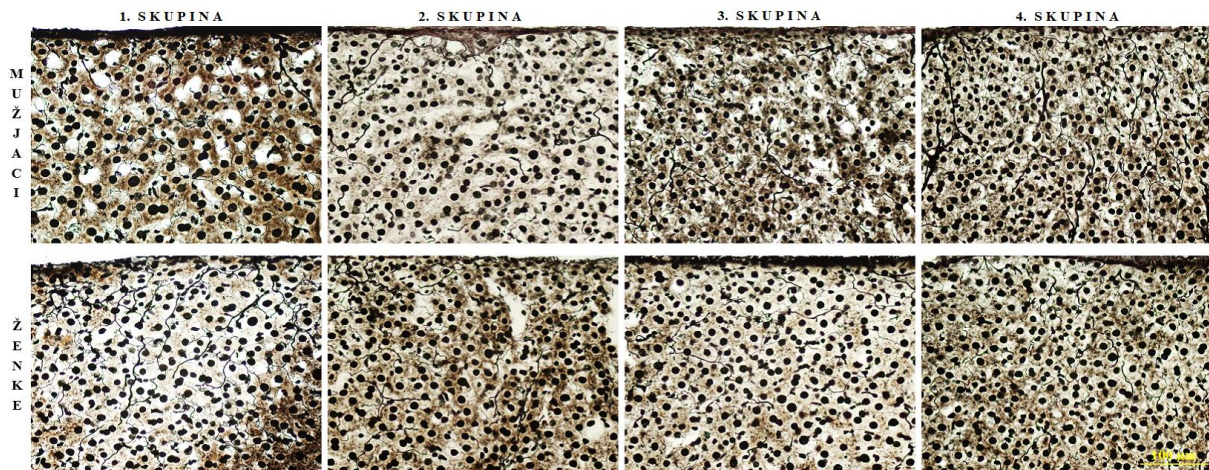
Uspoređivane skupine*		P†
1m – središnji dio jetre	1m – subkapsularni dio jetre	< 0,001
3m – središnji dio jetre	3m – subkapsularni dio jetre	0,01
4m – središnji dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	< 0,001
1f – središnji dio jetre	1f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
2f – središnji dio jetre	2f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
3f – središnji dio jetre	3f – subkapsularni dio jetre	< 0,001
4f – središnji dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	< 0,001

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

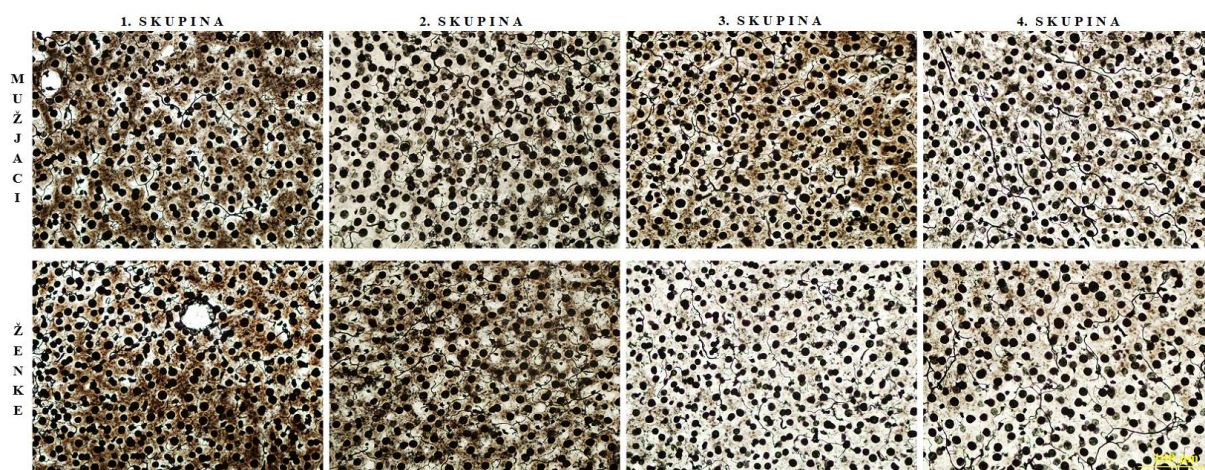
† Mann Whitney U test

### 5.3. Rezultati analize stupnja upale

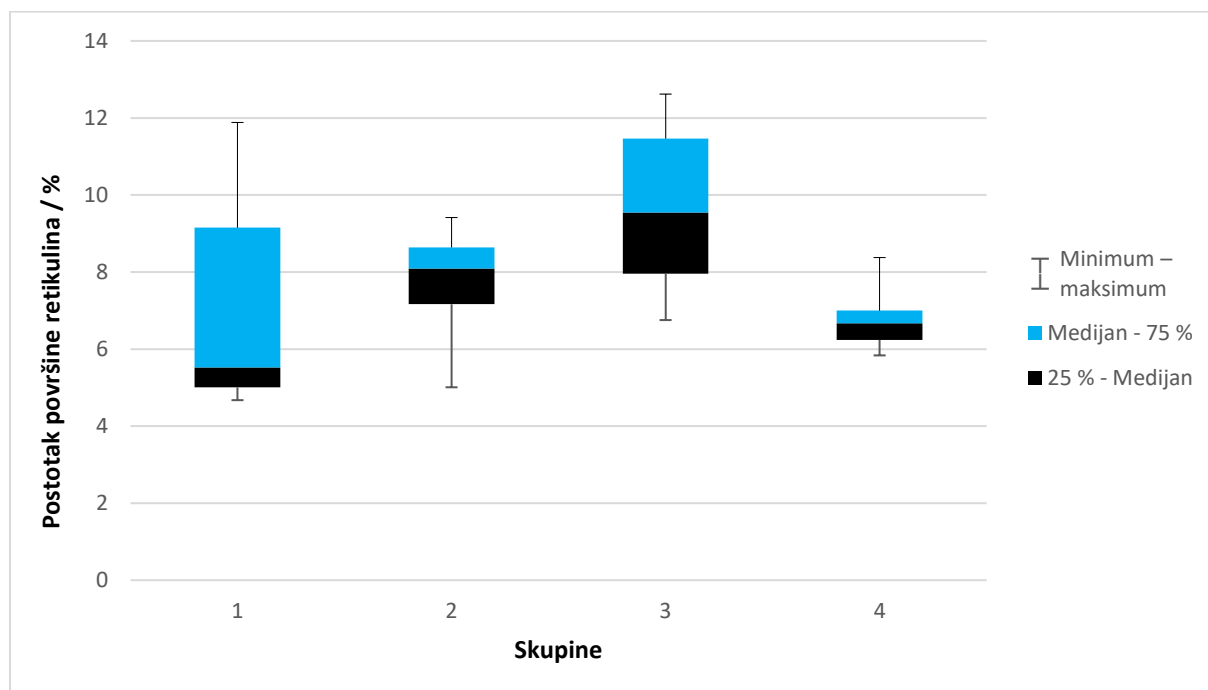
U svakom uzorku jetre izračunat je postotak površine koji zauzimaju retikulinska vlakna. Dobiveni rezultati uspoređivani su između sve 4 skupine štakora u mužjaka i ženki (Slike 9 i 10). Muški štakori hranjeni masnom i slatkom (eksperimentalnom) hranom (skupina 2m) imaju veći postotak retikulinskih vlakana u jetri od štakora hranjenih normalnom hranom (skupina 1m). Ta razlika nije statistički značajna. Muški štakori tretirani liraglutidom nakon masne i slatke dijeta (skupina 4m) imaju statistički značajno manji postotak retikulinskih vlakana u jetri od štakora hranjenih masnom i slatkom hranom te onih tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijeta (skupine 2m i 3m). Ženski štakori hranjeni masnom i slatkom hranom (skupina 2f) kao i oni tretirani liraglutidom nakon masne i slatke dijeta (skupina 4f) imaju statistički značajno manji postotak retikulinskih vlakana u jetri od štakora hranjenih normalnom hranom (skupina 1f) te onih tretiranih metforminom nakon masne i slatke dijeta (skupina 3f). Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane  $\alpha$  granice označuju statistički značajnu razliku između dvije uspoređivane skupine (Slike 11 i 12, Tablica 5).



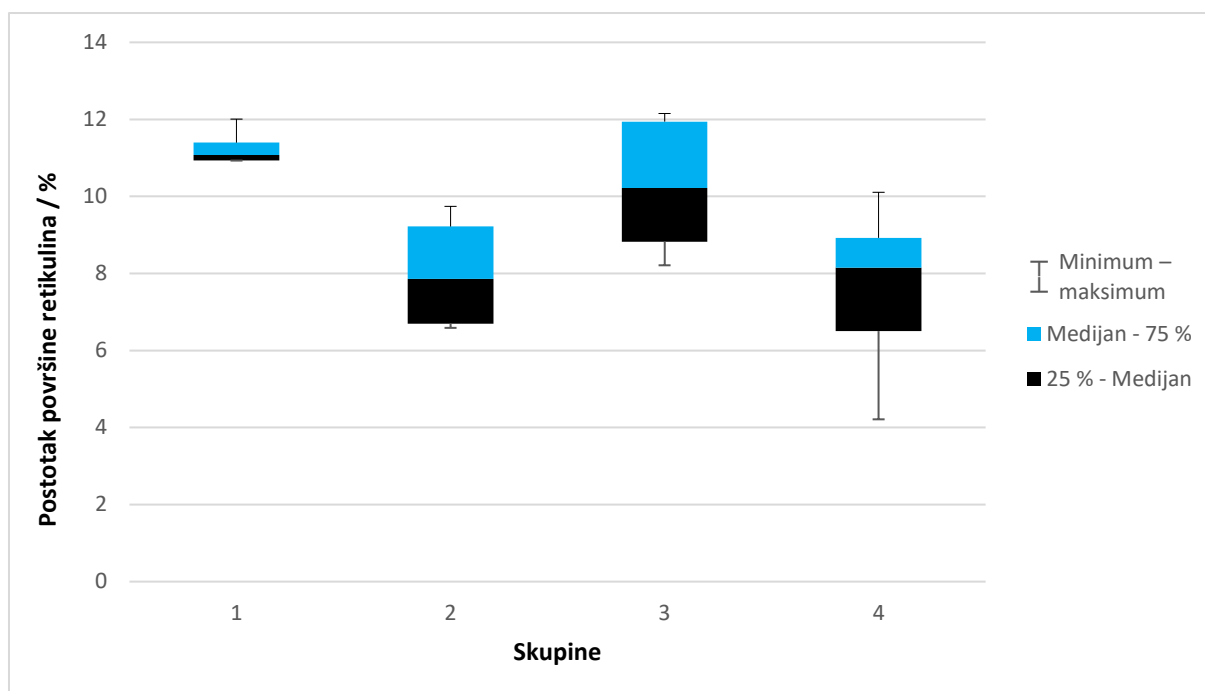
**Slika 9.** Preparati jetre obojeni po Gomoriju. Rubni (subkapsularni) dijelovi jetre četiri skupine mužjaka i ženki hranjenih standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretiranih metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 10.** Preparati jetre obojeni po Gomoriju. Središnji dijelovi jetre četiri skupine mužjaka i ženki hranjenih standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretiranih metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 11. Mužjaci – cijela jetra.** Postotak površine koji zauzimaju retikulinska vlakna u jetri 4 skupine štakora mužjaka hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.



**Slika 12. Ženke – cijela jetra.** Postotak površine koji zauzimaju retikulinska vlakna u jetri 4 skupine štakora mužjaka hranjenih standardnom (1), eksperimentalnom (2) hranom te tretiranih metforminom (3), odnosno liraglutidom (4) nakon eksperimentalne prehrane.

**Tablica 5.** Statistički značajne razlike u postotku površine koji zauzimaju retikulinska vlakna između 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

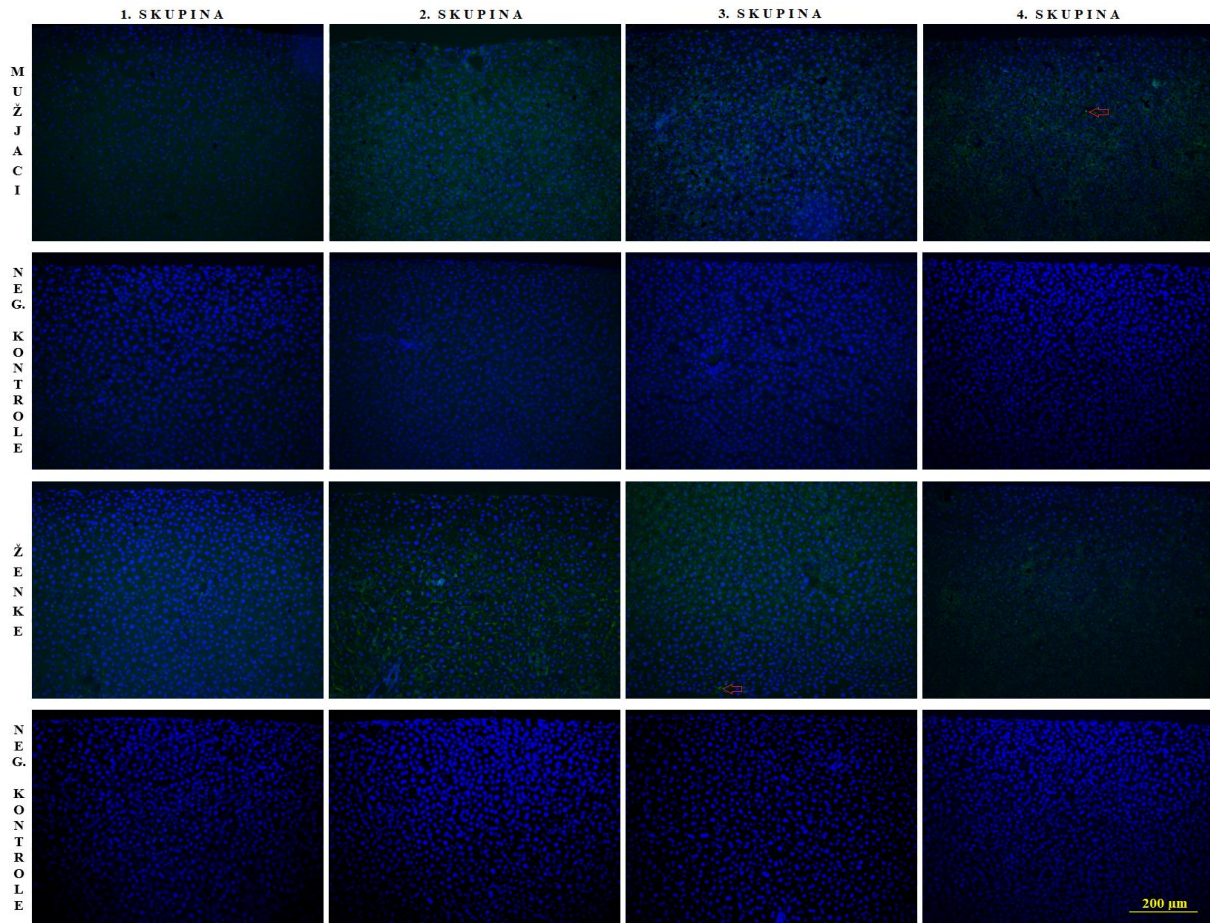
Uspoređivane skupine*		P†
2m	4m	0,04
3m	4m	0,001
1f	2f	0,005
1f	4f	0,006
2f	3f	0,04
3f	4f	0,02

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

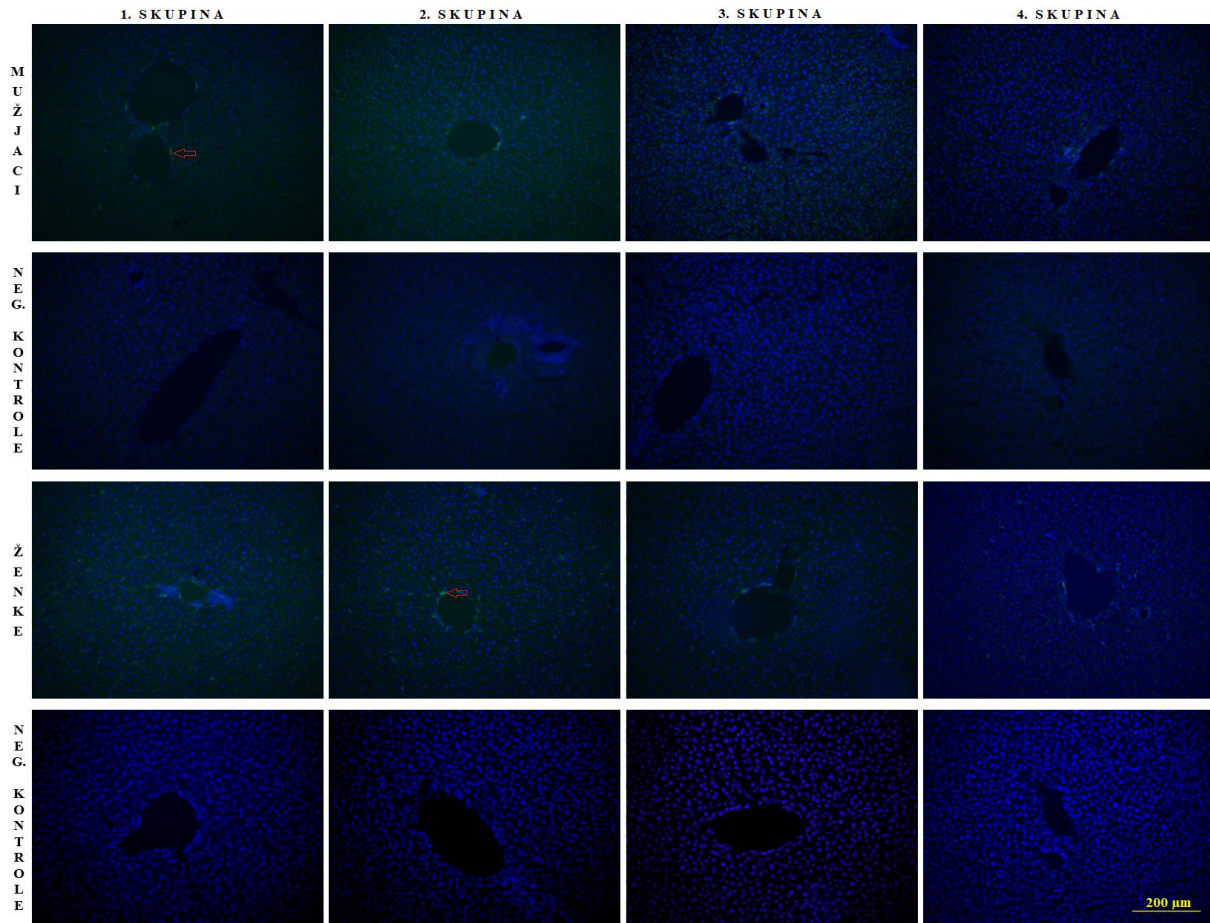
† Mann Whitney U test



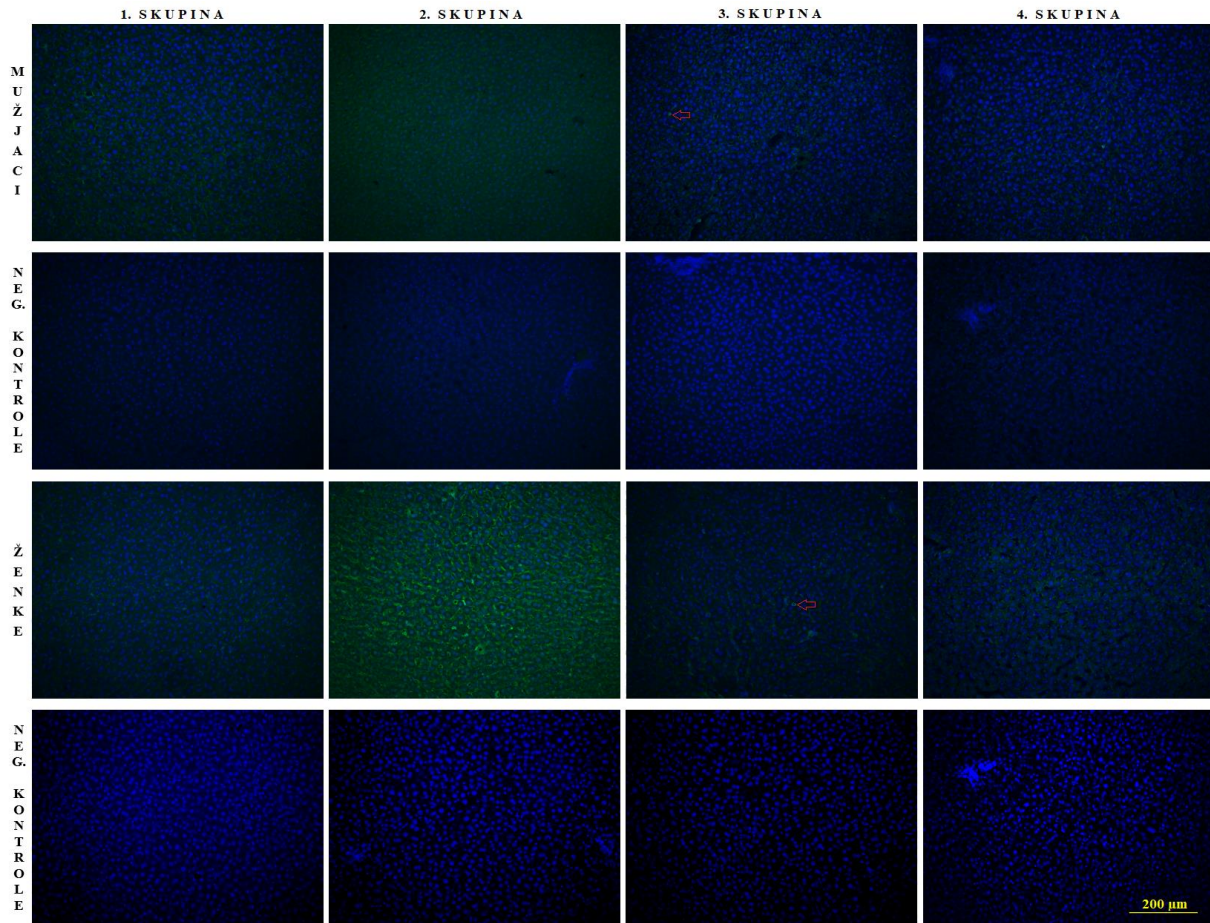
U svakom uzorku u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre mužjaka i ženki izbrojani su M1 i M2 makrofazi. Dobiveni rezultati uspoređivani su između sve 4 skupine štakora u mužjaka i ženki (Slike 13 – 15; 19 – 21). Broj M1 i M2 makrofaga veći je u ženki nego u mužjaka u gotovo svim skupinama, ali statistički značajna razlika u smanjenju stupnja upale između mužjaka i ženki ne postoji. Kod mužjaka je liraglutid, iako ne u svakoj skupini statistički značajno, smanjio stupanj upale u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre (Slike 16 – 18; 22 – 24, Tablice 6 i 7). Zanimljivo je to što je broj M1 i M2 makrofaga kod ženki hranjenih normalnom (standardnom) hranom (skupina 1f) gotovo svugdje veći nego u ženki tretiranih metforminom i liraglutidom nakon masne i slatke dijeta (skupine 3f i 4f), a negdje čak i od ženki hranjenih masnom i slatkom (eksperimentalnom) hranom bez tretiranja lijekovima (skupina 2f). Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . U perivaskularnom tkivu jetre ženki, osim između prve i treće skupine, razlike u broju M2 makrofaga između svih skupina statistički su značajne, odnosno sve su vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane  $\alpha$  granice (Tablica 7).



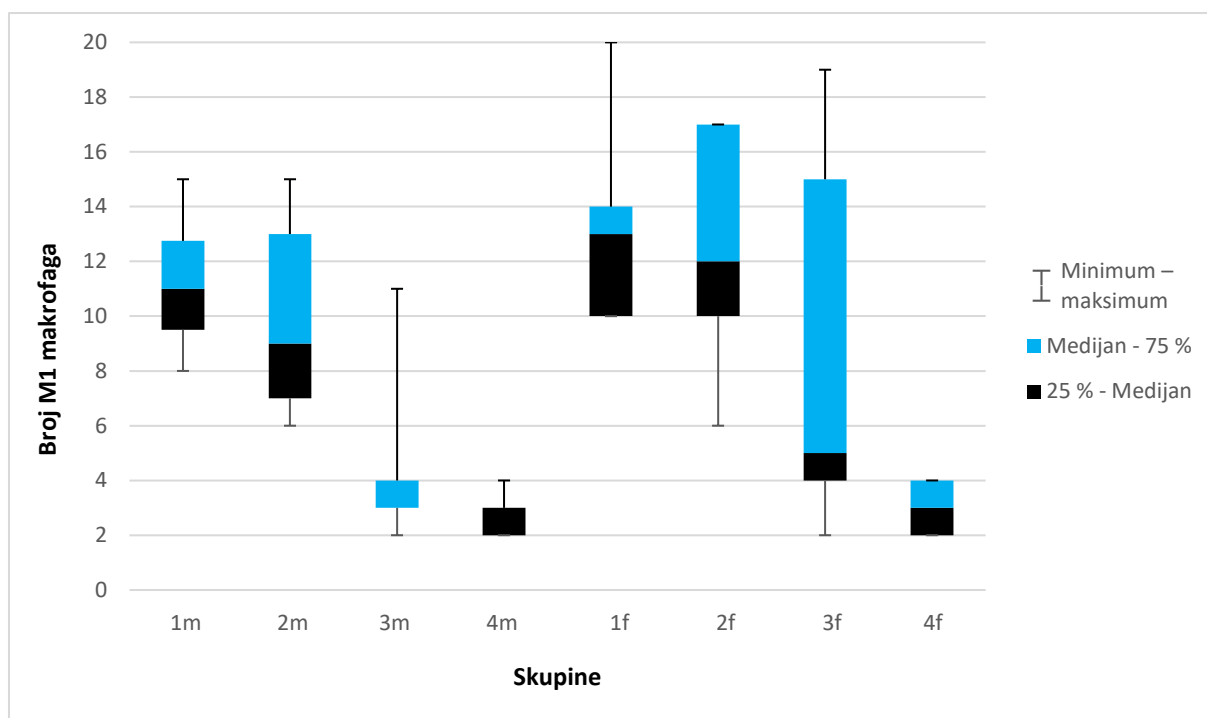
**Slika 13.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M1 makrofage (CD 197, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu rubni (subkapsularni) dijelovi jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem rubni (subkapsularni) dijelovi jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



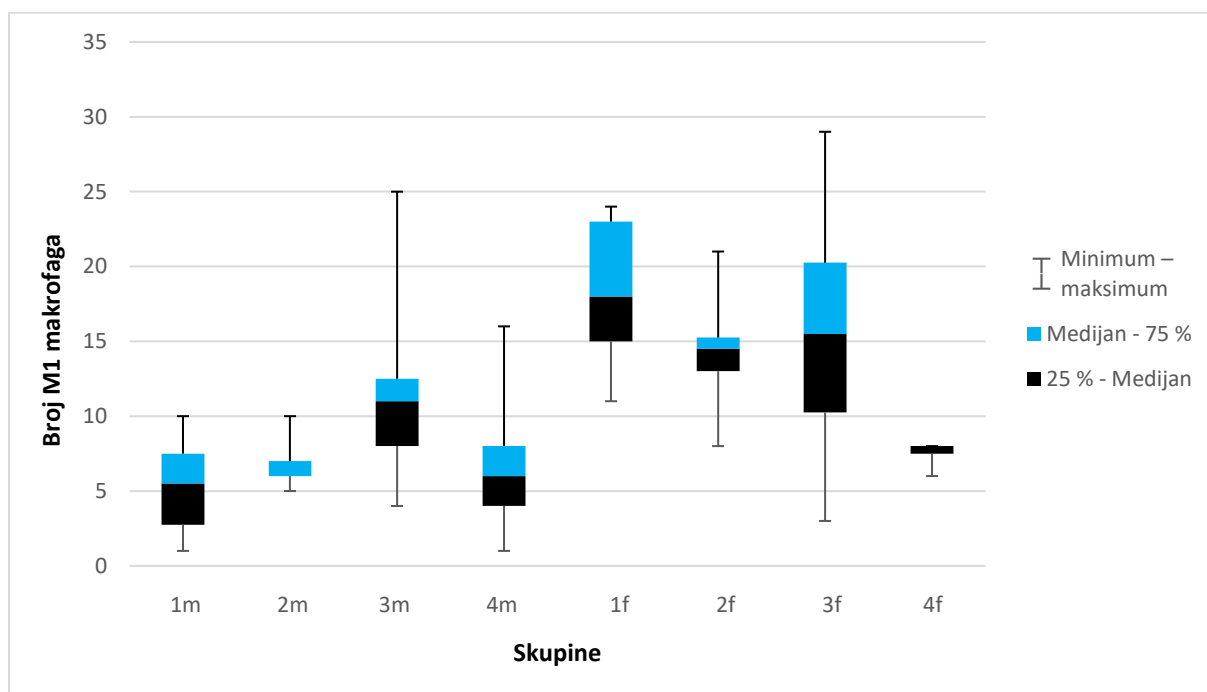
**Slika 14.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M1 makrofage (CD 197, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu područja oko krvnih žila (perivaskularna tkiva) jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem područja oko krvnih žila (perivaskularna tkiva) jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



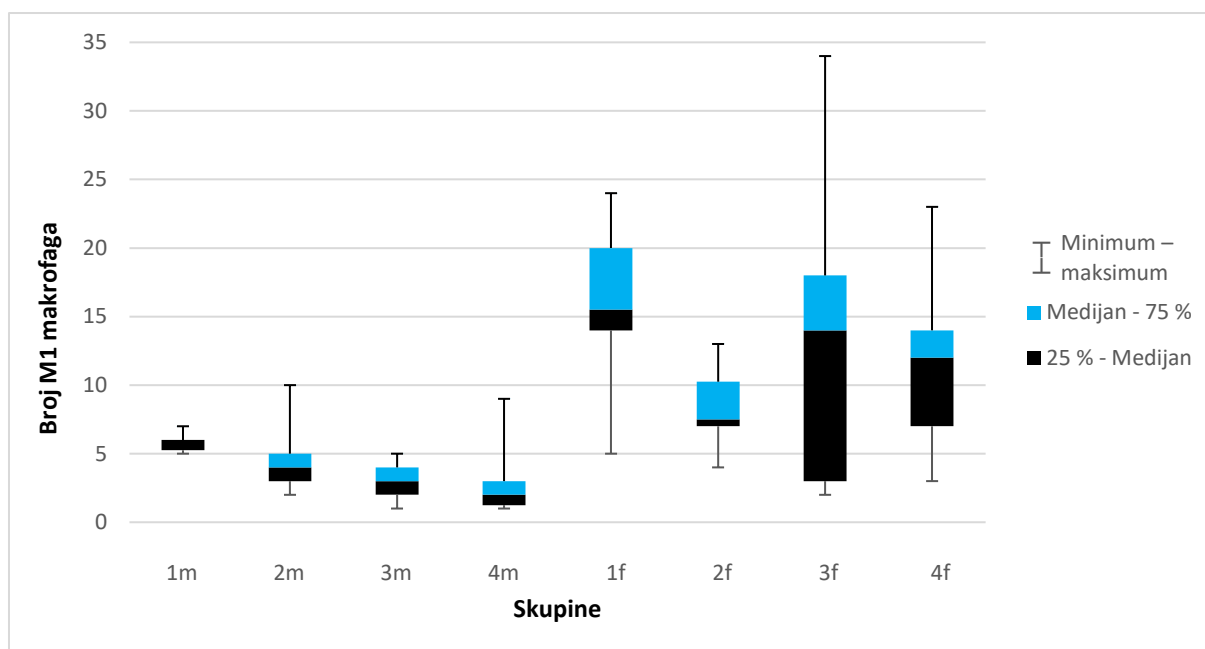
**Slika 15.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M1 makrofage (CD 197, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu središnji dijelovi jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem središnji dijelovi jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 16. Subkapsularni dio jetre – M1 makrofazi.** Broj M1 makrofaga u subkapsularnom dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.



**Slika 17. Perivaskularno tkivo jetre – M1 makrofazi.** Broj M1 makrofaga u perivaskularnom tkivu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.



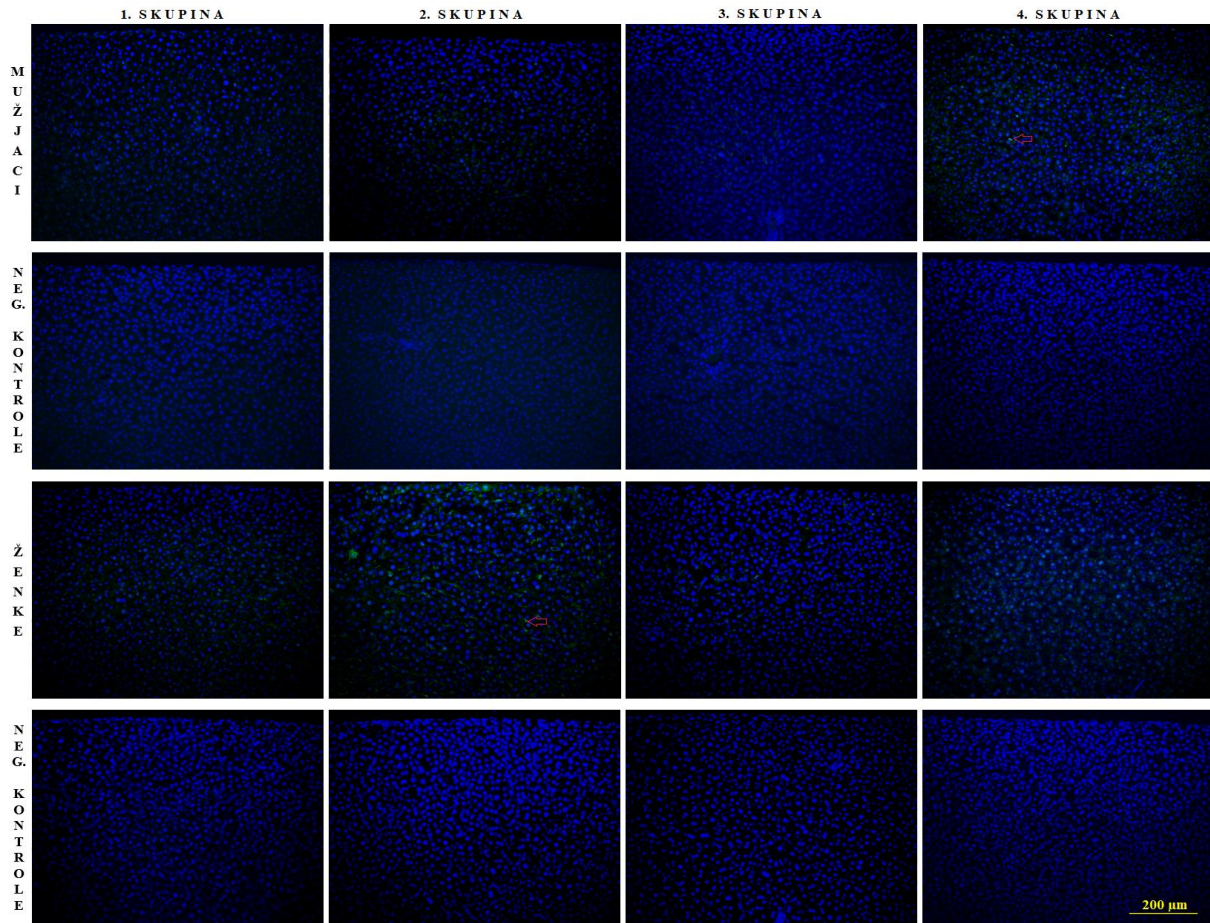
**Slika 18. Središnji dio jetre – M1 makrofazi.** Broj M1 makrofaga u središnjem dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.

**Tablica 6.** Statistički značajne razlike u broju M1 makrofaga u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre između 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

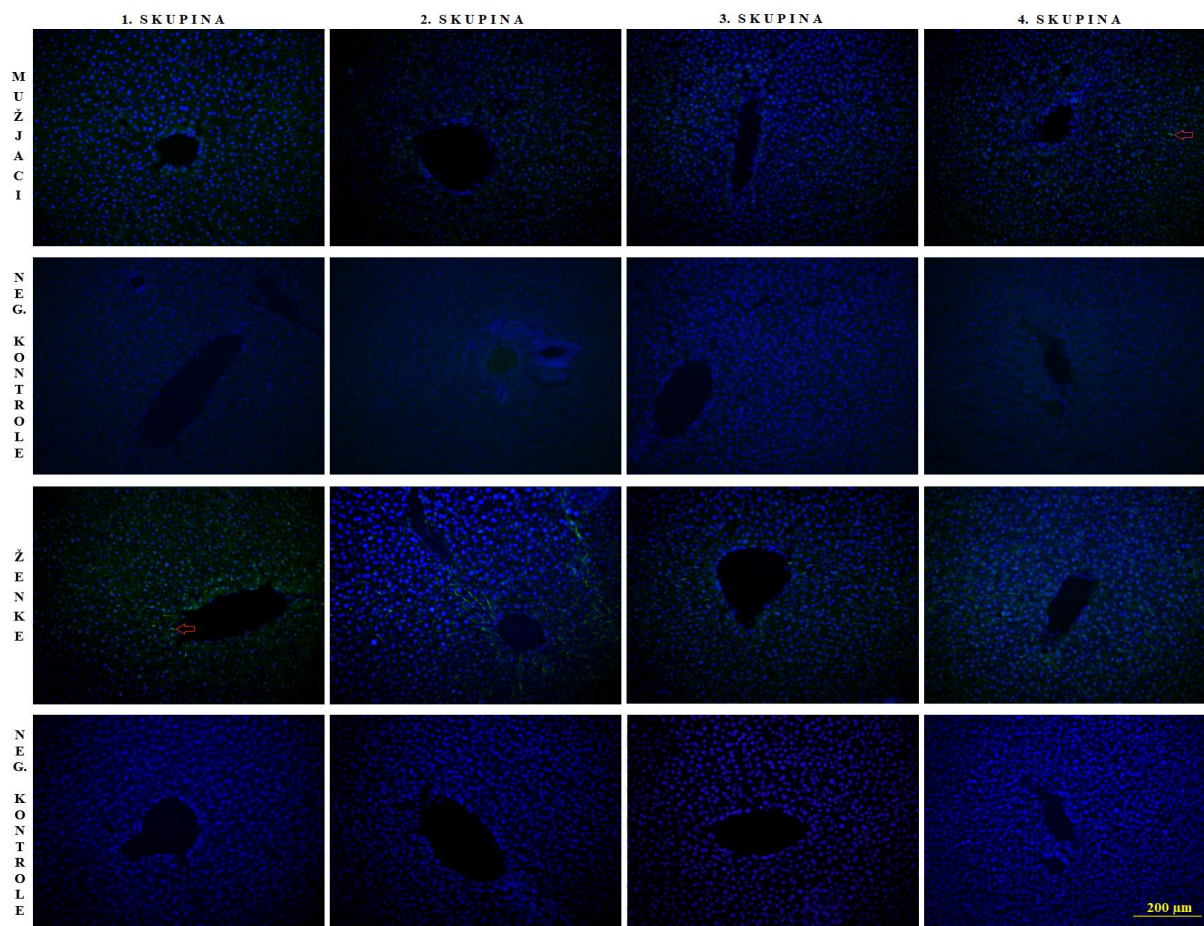
Uspoređivane skupine*		P†
1m – središnji dio jetre	3m – središnji dio jetre	0,04
1m – središnji dio jetre	4m – središnji dio jetre	0,01
2m – središnji dio jetre	4m – središnji dio jetre	0,003
1m – perivaskularno tkivo jetre	3m – perivaskularno tkivo jetre	0,01
2m – perivaskularno tkivo jetre	3m – perivaskularno tkivo jetre	0,02
1m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,02
2m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,008
1f – središnji dio jetre	2f – središnji dio jetre	0,003
2f – perivaskularno tkivo jetre	3f – perivaskularno tkivo jetre	0,04
1f – subkapsularni dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	0,008
2f – subkapsularni dio jetre	4f – subkapsularni dio jetre	0,008

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

† Mann Whitney U test

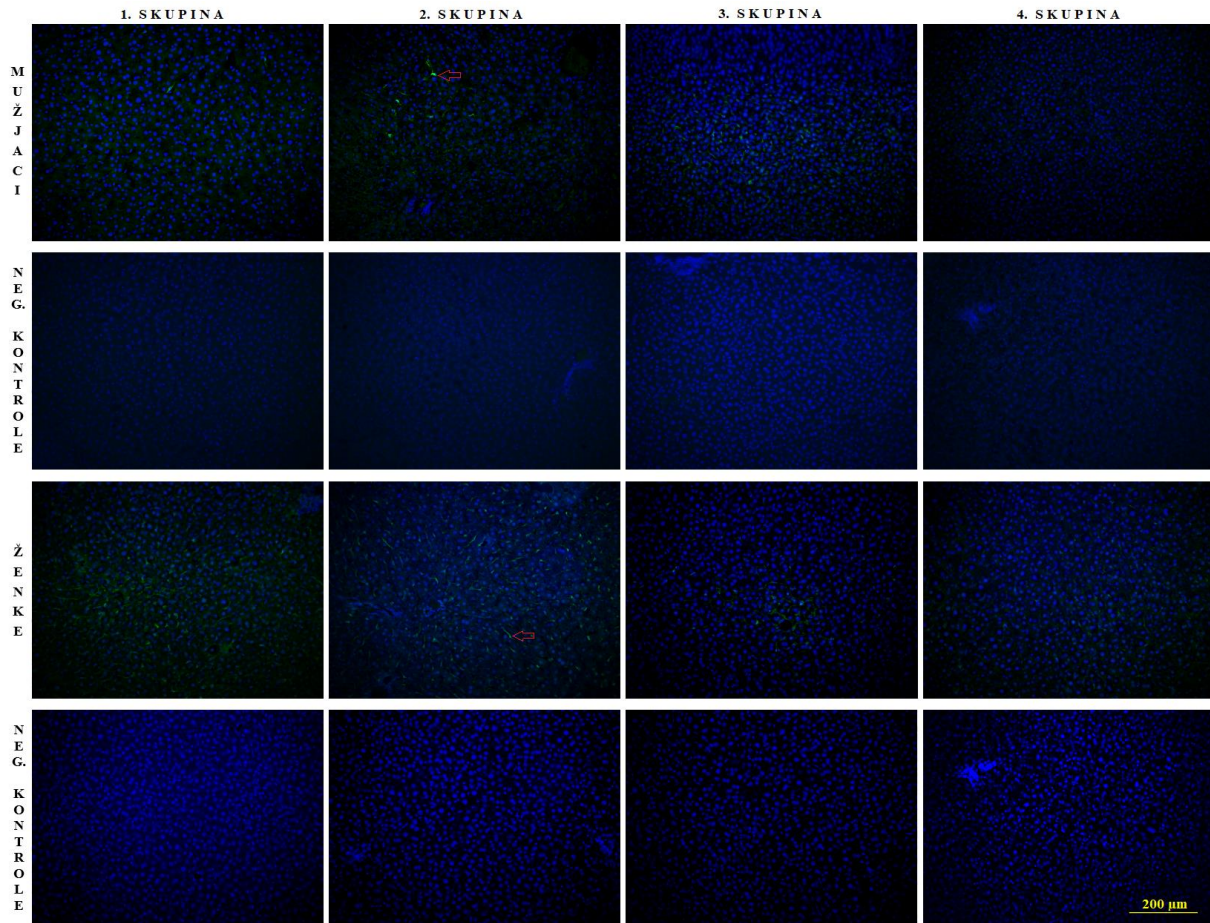


**Slika 19.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M2 makrofage (CD 206, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu rubni (subkapsularni) dijelovi jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem rubni (subkapsularni) dijelovi jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.

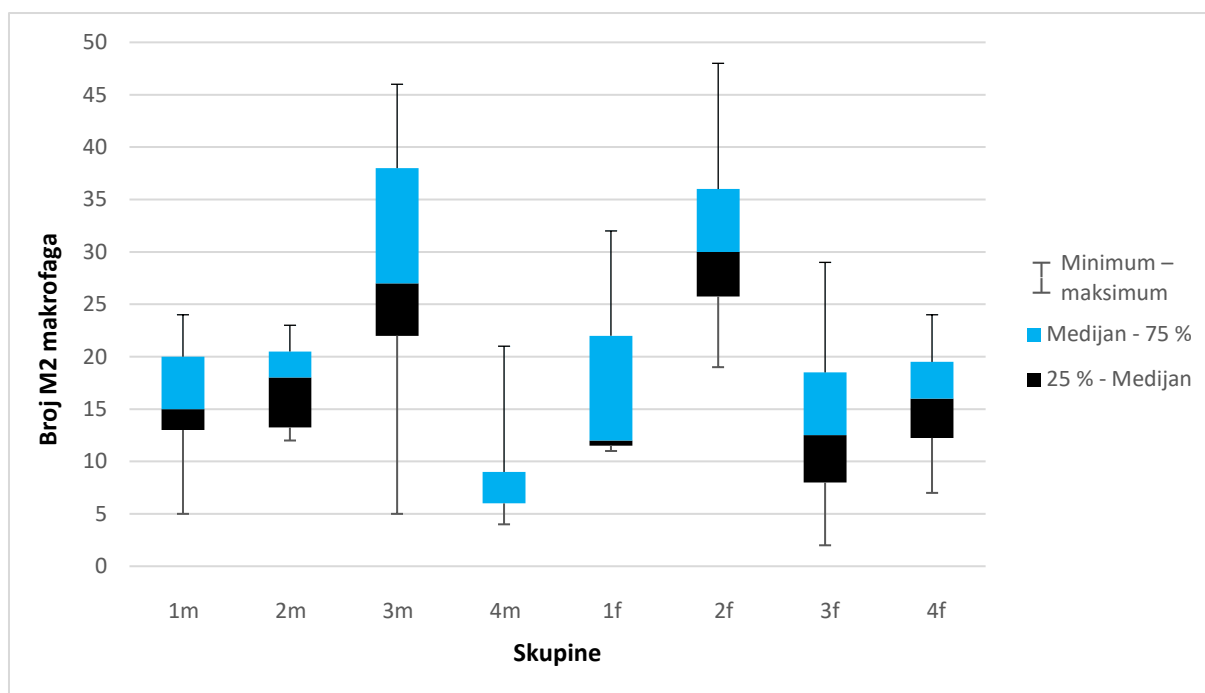


**Slika 20.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M2 makrofage (CD 206, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu područja oko krvnih žila (perivaskularna tkiva) jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem područja oko krvnih žila (perivaskularna tkiva) jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.

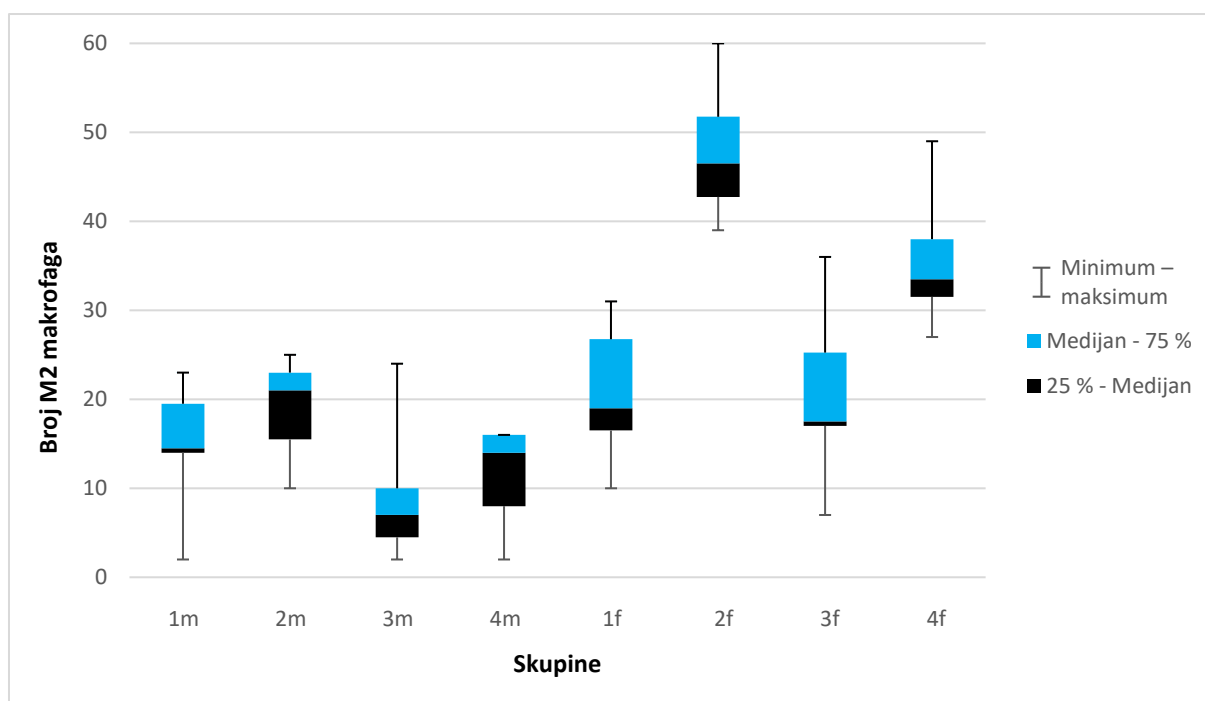




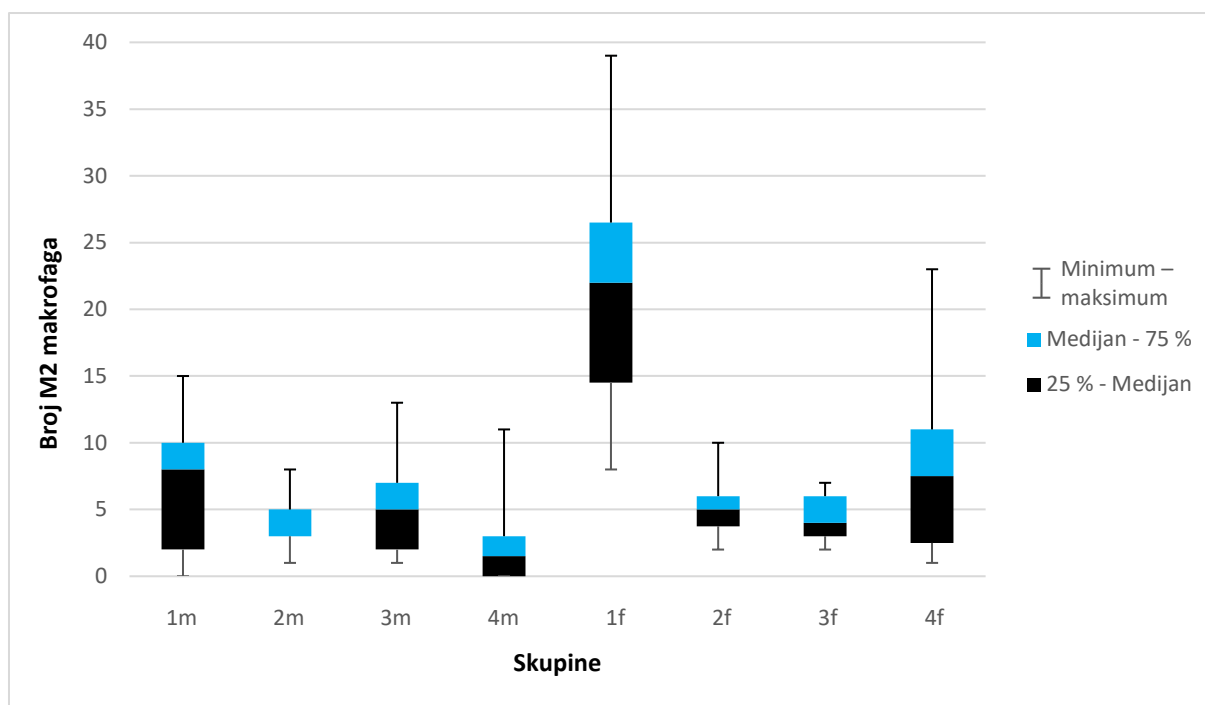
**Slika 21.** Preparati jetre s učinjenom imunohistokemijom na M2 makrofage (CD 206, primjeri su prikazani strelicama). U prvom su redu središnji dijelovi jetre mužjaka, u drugom negativne kontrole za mužjake, u trećem središnji dijelovi jetre ženki, a u četvrtom negativne kontrole za ženke. Štakori su hranjeni standardnom (1. skupina), eksperimentalnom (2. skupina) hranom te tretirani metforminom (3. skupina), odnosno liraglutidom (4. skupina) nakon eksperimentalne prehrane. Fotografirao autor Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



**Slika 22. Subkapsularni dio jetre – M2 makrofazi.** Broj M2 makrofaga u subkapsularnom dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.



**Slika 23. Perivaskularno tkivo jetre – M2 makrofazi.** Broj M2 makrofaga u perivaskularnom tkivu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.



**Slika 24. Središnji dio jetre – M2 makrofazi.** Broj M2 makrofaga u središnjem dijelu jetre 4 skupine štakora mužjaka (1m, 2m, 3m i 4m) i ženki (1f, 2f, 3f i 4f) hranjenih standardnom (1m i 1f), eksperimentalnom (2m i 2f) hranom te tretiranih metforminom (3m i 3f), odnosno liraglutidom (4m i 4f) nakon eksperimentalne prehrane.

**Tablica 7.** Statistički značajne razlike u broju makrofaga M2 u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre između 4 skupine štakora mužjaka i ženki.

Uspoređivane skupine*		P†
2m – subkapsularni dio jetre	4m – subkapsularni dio jetre	0,03
1f – središnji dio jetre	2f – središnji dio jetre	< 0,001
1f – središnji dio jetre	3f – središnji dio jetre	< 0,001
1f – središnji dio jetre	4f – središnji dio jetre	0,006
1f – perivaskularno tkivo jetre	2f – perivaskularno tkivo jetre	0,01
1f – perivaskularno tkivo jetre	4f – perivaskularno tkivo jetre	0,005
2f – perivaskularno tkivo jetre	3f – perivaskularno tkivo jetre	0,01
2f – perivaskularno tkivo jetre	4f – perivaskularno tkivo jetre	0,02
3f – perivaskularno tkivo jetre	4f – perivaskularno tkivo jetre	0,006

\* Broj označava skupinu štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni eksperimentalnom hranom; 3 – tretirani metforminom nakon eksperimentalne prehrane; 4 – tretirani liraglutidom nakon eksperimentalne prehrane. Slovo označava spol štakora: m – mužjaci; f – ženke.

† Mann Whitney U test

## 6. RASPRAVA

Svrha ovog istraživanja bila je istražiti promjene u količini i veličini masnih kapljica te stupnju upale pri promjeni prehrane s normalne na prehranu bogatu mastima i šećerima te promjene nakon tretiranja metforminom, odnosno liraglutidom.

Nealkoholna masna bolest jetre najčešća je bolest jetre na svijetu, a pretilo je do 80 % osoba koje boluju od te bolesti (51). To je stanje taloženja masti u jetri u odsutnosti alkohola koje je povezano s pretilosti i prekomjernom težinom (52). Masna jetra prekursor je nealkoholnog steatohepatitisa koji u do 25 % slučajeva može progredirati u cirozu jetre (53). Povećani unos masti i dijeta bogata šećerima povezani su s mnogim komponentama metaboličkog sindroma pa tako i masne jetre (54). Osnova svakog terapijskog režima za pacijente s nealkoholnom masnom bolesti jetre promjena je životnog stila usmjerena na gubitak težine i vježbanje (55). Osim do metaboličkog sindroma i masne jetre, prehrana bogata mastima i šećerima može dovesti do šećerne bolesti. I promjena načina života i liječenje metforminom smanjuju učestalost dijabetesa kod osoba s visokim rizikom, no promjena je životnih navika učinkovitija (56). Iako je učinkovitija, promjena životnih navika nekada nije dovoljna za smanjenje razine glukoze i masti, a tada se u terapiju dodaju lijekovi među kojima su i metformin i liraglutid (11). Iako se jetra općenito smatra homogenim organom, poznato je da postoje različite zone jetre koje pokazuju različit metabolizam. Zonacija jetre sklona je promjenama u fiziološkim i patofiziološkim stanjima jetre (57). Stoga je u ovom radu jetra podijeljena na subkapsularni dio, perivaskularno tkivo i središnji dio da bi se istražile razlike u nakupljanju masnih kapljica i stupnju upale između tih područja jetrenog tkiva.

Ganz, Bukong i suradnici 2015. su godine 49 tjedana hranili miševе dijetom bogatom mastima i šećerima. Dijeta je inducirala cijeli spektar patofizioloških promjena jetre koji karakterizira napredovanje nealkoholne masne bolesti jetre u ljudi (58). Ishimoto, Lanaspа i suradnici u svom istraživanju iz 2013. godine zaključuju da se tjelesna težina jetre povećavala postupno u miševa divljeg tipа kao odgovor na dijetu bogatu mastima i šećerima, а to je bilo povezano sa značajnim postupnim povećanjem nakupljanja triglicerida i razvojem makro- i mikrovezikularne steatoze jetre (59). Yang i Miyahara 2012. godine mjerenjem jetrenih triglicerida i Oil Red bojenjem dokazuju povećano nakupljanje masti u miševa nakon samo 2 tjedna dijete bogate mastima i šećerima (60). U ovom je istraživanju dijeta bogata mastima i šećerima kod mužjaka dovela do statistički značajnog povećanja količine masnih kapljica u

subkapsularnom i središnjem dijelu jetre, a kod mužjaka i ženki do povećanja prosječne veličine pojedinih masnih kapljica.

Ganz, Csak i Szabo 2014. su godine spolno specifično istraživali učinak dijeta bogate mastima na masnu jetru i upalu. Zaključili su da postoji razlika između ženki i mužjaka te da mužjaci na takvoj dijeti pokazuju steatohepatitis i upalu, dok ženke masnu jetru bez upale (61). U ovom istraživanju nisu primijećene razlike između mužjaka i ženki u povećanju količine nakupljene masti i upale. Međutim, razlike u ekvivalentnim skupinama postoje i pokazuju da se više masti nakuplja u jetri mužjaka u sve 4 skupine te da su masne kapljice kod mužjaka veće nego kod ženki.

Nijedan lijek trenutno nije dostupan kao specifičan tretman za masnu jetru i nijedan lijek ne može zamijeniti promjene životnog stila. No, metformin zbog metaboličkih učinaka i njegove sigurnosti korištenja ostaje obećavajući lijek u terapiji masne jetre (62). Kim, Lee i suradnici 2016. su godine 14 tjedana svakodnevno tretirali pretile miševe metforminom. Nakupljanje masti mjerili su Oil Red bojenjem. Prikazali su da metformin liječi pretilost uzrokovanu dijetom bogatom mastima i šećerima i s njom povezan upalni odgovor te da bi se mogao koristiti kao uspješna terapija protiv pretilosti (63). Song, Lee, Kim i suradnici godinu ranije prikazali su rezultate svog istraživanja iz kojeg su također izvukli zaključak da metformin ublažava steatozu jetre (64). Zheng i suradnici zaključuju da metformin ima direktan učinak na suzbijanje upalnih reakcija hepatocita i makrofaga tijekom upale jetre inhibirajući proupalne čimbenike poput TNF- $\alpha$  i IL-6 (65). Međutim, Haukeland i suradnici u rezultatima svog istraživanja prikazuju kako liječenje metforminom u trajanju od 6 mjeseci nije poboljšalo histološko stanje jetre u pacijenata s masnom jetrom (66), a Shields i Thompson da metformin ima samo malo bolji učinak od placeba (67). U ovom istraživanju metformin nije poboljšao histološko stanje jetre, nego je povećao postotak površine kojeg zauzimaju masne kapljice u jetri štakora nakon dijeta bogate mastima i šećerima. Također, smanjio je, iako ne statistički značajno, veličine pojedinih masnih kapljica.

Gao, Zeng i suradnici 2015. godine prikazali su kako liraglutid su ima antioksidativne i protuupalne učinke u jetri i posljedično ublažava steatozu jetre i otpornost na inzulin (68). Iako liraglutid ima teže neželjene učinke od metformina, Armstrong i Houlihan u svojem istraživanju zaključuju da je tretiranje liraglutidom od 1,8 mg kroz 26 tjedana sigurno, dobro podnosivo od strane pacijenata te da poboljšava učinak jetrenih enzima smanjujući težinu i kontrolirajući glukozu u krvi (44). Ohki i Isogawa 2012. su godine uspoređivali liraglutid sa sitagliptinom i pioglitazonom, druga dva lijeka korištena u liječenju šećerne bolesti. Rezultati

iz njihove studije pokazuju da je primjena liraglutida dovela ne samo do bolje kontrole šećerne bolesti tipa 2 već i do smanjenja upale i fibroze jetre te tjelesne težine (69). U novijoj studiji iz 2016. godine Armstrong i Gaunt, biopsijama jetri pacijenata koji su imali nealkoholni steatohepatitis i koji su liječeni liraglutidom, dokazali su da liraglutid dovodi do smanjenja histoloških obilježja nealkoholnog steatohepatitisa (70). Eguchi i suradnici također su iznijeli rezultate o smanjenju indeksa tjelesne mase, akumulacije visceralnih masnoća, aminotransferaza i hiperglikemije u 19 bolesnika s biopsijom dokazanim nealkoholnim steatohepatitisom tretiranim liraglutidom tijekom 24 tjedna (71). U jednogodišnjoj retrospektivnoj studiji 2015. godine Cotugno, Nosso i suradnici uspoređivali su učinke operacije želuca s tretmanom liraglutidom u pacijenata sa šećernom bolesti tipa 2, a veći je učinak imala operacija (72). Međutim, nisu svi pacijenti kandidati za operaciju, a imaju koristi od neinvazivnog liječenja. Ellen E Ladenheim u svojem pregledu podataka povezanih s liraglutidom i pretilosti prikazuje da liraglutid dovodi do značajnog gubitka težine kod ljudi, s prisutnim i bez prisutnog dijabetesa tipa 2, uz minimalne nuspojave i stoga je zanimljiv kao mogućnost liječenja, kako šećerne bolesti, tako i masne jetre (73). Buse, Rosenstock i suradnici 2009. su godine uspoređivali tretiranje liraglutidom jednom dnevno i tretiranje eksenatidom dva puta dnevno pacijenata s nekontroliranom šećernom bolesti unatoč maksimalnoj dozi metformina. Rezultati su pokazali da liraglutid u jednoj dozi dnevno daje znatno veća poboljšanja u kontroli glikemije nego eksenatid dva puta dnevno, a još se uz jednostavniju primjenu bolje tolerira (74). Kao u spomenutim istraživanjima, i u ovom je istraživanju liraglutid pokazao najbolje učinke u tretiranju posljedica prehrane bogate mastima i šećerima. U svim je skupinama količina masnih kapljica manja nakon tretiranja liraglutidom u usporedbi s metforminom. Razlika je statistički značajna kod ženki. Smanjenje veličine masnih kapljica statistički je značajno uspješnije tretiranjem štakora liraglutidom nego metforminom i kod mužjaka i kod ženki nakon indukcije pretilosti dijetom bogatom mastima i šećerima. Što se tiče upale, iako je upala nakon tretiranja liraglutidom manjeg intenziteta nego nakon tretiranja metforminom, ne postoji statistički značajna razlika u broju makrofaga, dok je statistički značajno manji postotak površine kojeg zauzimaju retikulinska vlakna.

Prednosti ove studije kao istraživanja parova svakako su brzo provođenje i niska cijena te mogućnost istraživanja učinaka više čimbenika na rezultat. Ograničenja ove studije su ta što može istraživati samo jedan ishod i nema čvrsto uporište za procjenu uzročne povezanosti. Teže je oblikovati valjanu kontrolnu skupinu i događaju se česti otkloni.

U moru studija i istraživanja teško je rezultate dobivene od različitih autora, u različitim zemljama i različitim vremenima u različitim uvjetima svesti na jedan zaključak. Sva su istraživanja, uključujući i ovo, potvrdila davno prepoznatu posljedicu dijete bogate mastima i šećerima, a to je nakupljanje masnih kapljica, kako u ostalim tkivima tako i u jetri, te pojavu stanja zvanog masna jetra koje može prijeći u steatohepatitis ili upalu masne jetre te kasnije u jetrenu cirozu. Metformin kao lijek prvog izbora u liječenju šećerne bolesti pokazao je mnoge pozitivne učinke u smanjenju količine masti i upale u jetri, ali rezultati nekih studija, kao i ove na Sprague-Dawley štakorima pokazuju da metformin nema učinka i u nekim slučajevima čak povećava količinu masnih kapljica u jetri i upalu jetrenog tkiva. S druge strane, studije o liraglutidu pokazuju veću korist u smanjenju indeksa tjelesne mase, nakupljanja masti i poboljšanju hiperglikemije i steatohepatitisa. U ovoj je studiji također dokazana veća učinkovitost liraglutida od metformina u smanjenju količine i veličine masnih kapljica te stupnja upale u jetri. Iako u nekim studijama razlike između mužjaka i ženki postoje, u ovom istraživanju nema statistički značajne razlike u promjeni karakteristika masne jetre i steatohepatitisa. Međutim, među ekvivalentnim skupinama, masne su kapljice veće te ih je više kao i M1 i M2 makrofaga u jetri mužjaka nego u jetri ženki.

Kao nastavak ove studije trebalo bi napraviti imunohistokemiju s panmakrofagnim primarnim protutijelom CD 68 radi određivanja distribucije svih makrofaga te s primarnim protutijelom CD 163 za prepoznavanje M1 makrofaga u cijelom jetrenom tkivu. Nakon toga, trebalo bi sve metode ponoviti na ostalim tkivima, a svakako na masnom tkivu koje je glavni organ za skladištenje masti.

### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- količina nakupljenih masnih kapljica te veličina pojedinih masnih kapljica veće su u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre štakora koji su hranjeni dijetom bogatom mastima i šećerima nego štakora hranjenih normalnom dijetom;
- liraglutid je smanjio stupanj upale u subkapsularnom i središnjem dijelu te perivaskularnom tkivu jetre štakora hranjenih masnom i slatkom hranom;
- količina i veličina nakupljenih masnih kapljica te stupanj upale manji su u subkapsularnom i središnjem dijelu jetre štakora koji su tretirani liraglutidom nego u onih tretiranih metforminom;
- količina i veličina nakupljenih masnih kapljica veće su u subkapsularnom nego u središnjem dijelu jetre u sve 4 skupine štakora mužjaka i ženki.



## 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Utvrditi postoje li razlike u nakupljanju masnih kapljica, veličini masnih kapljica te stupnju upale u jetri između štakora hranjenih normalnom hranom, hranom bogatom mastima i šećerima bez tretmana, te nakon prehrane bogate mastima i šećerima tretiranih metforminom i liraglutidom.

**Nacrt studije:** Istraživanje je provedeno kao studija parova.

**Materijali i metode:** U studiju je uključeno 32 mušjaka i 32 ženke Sprague-Dawley štakora, podijeljenih na 4 skupine po 8 u svakoj skupini. Prva skupina hranjena je normalnom (standardnom) hranom i nije dobivala terapiju. Druga, treća i četvrta skupina hranjene su hranom bogatom mastima i šećerima kroz 20 tjedana. Trećoj je skupini u dobi od 50 tjedana uvedena terapija metforminom, a četvrtoj liraglutidom. Fiksirana, krioprotektirana i smrznuta 64 uzorka jetre izrezana su kriostatom na rezove debljine 20 µm i obojena histološkim bojama Sudan Black (za makrolokaciju masnih kapljica u jetri) odnosno Oil Red (za određivanje površine pojedinih masnih kapljica), a imunohistokemija i bojenje na retikulin po Gomoriju rađeni su za određivanje stupnja upale. Rezovi su dehidrirani i poklopljeni pokrovnim stakalcima te su pod mikroskopom fotografirani da bi se načinila kvantifikacija.

**Rezultati:** Druga skupina štakora ima više masnih kapljica u jetri i one su statistički značajno veće nego u prvoj i četvrtoj skupini. Također, masnih je kapljica više i veće su u subkapsularnom dijelu nego u središnjem dijelu jetre.

**Zaključak:** Masna i slatka hrana uzrokuje masnu promjenu jetre, a liraglutid je učinkovitiji od metformina u liječenju masne jetre i nealkoholnog steatohepatitisa.

**Ključne riječi:** jetra; štakori; masne kapljice; metformin; liraglutid; upala

## 9. SUMMARY

### **Changes in fatty liver degeneration in response to metformin and liraglutide therapy in rats on high fat high sugar diet**

**Objectives:** The aim of this study is to determine whether there are differences in the accumulation of fatty droplets, the size of fatty droplets and the rate of liver inflammation between rats fed with normal food, food rich in fats and sugar, and after a diet rich in fat and sugar treated with metformin and liraglutide.

**Study design:** The study was conducted as a matched pair study.

**Materials and Methods:** The study included 32 males and 32 females of Sprague-Dawley rats, divided into 4 groups, 8 rats in each group. The first group was fed with normal (standard) food and did not get any therapy. The second, third, and fourth group were fed with food rich in fats and sugar for over 20 weeks. At the age of 50 weeks the third group underwent metformin therapy, and the fourth liraglutide. Fixed, cryoprotected and frozen 64 liver samples were cut by cryostat in 20 µm thick cuts and stained with Sudan Black (for macrolocalization of fatty droplets in the liver) or Oil Red (for determining the surface area of individual fatty droplets), and immunohistochemistry and staining on reticulin according to Gomori were used to determine the rate of the inflammation. The cuts were dehydrated and covered with cover slides and photographed under a microscope to form quantification.

**Results:** The second group of rats indicated more fatty droplets in the liver and they are statistically significantly larger than in the first and the fourth group. Also, fatty droplets are more and they are larger in the subcapsular part than in the central part of liver.

**Conclusion:** Fatty and sweet food cause fatty liver changes. Liraglutide is more effective than metformin in the treatment of fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis.

**Keywords:** liver; rats; fatty droplets; metformin; liraglutide; inflammation

**10. LITERATURA**

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naknada; 2007.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
3. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
4. Ginès P, Kamath PS, Arroyo V. Chronic liver failure: Mechanisms and Management. 18. izd. New York: Springer; 2011.
5. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
6. Sučić M, Metelko Ž, Vuletić LJ, Škrabalo Z. Zagreb: Zadrušna štampa; 1987.
7. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
8. Živković R. Praktična gastroenterologija. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1993.
9. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
10. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
11. Vrhovac B i sur. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak, 2008.
12. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci.* 2014;10(5):520-529.
13. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6166-73.
14. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
15. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445-455.

16. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-969.
17. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar 1;122(3):787-795.
18. Liew PL, Lee WJ, Lee YC, Wang HH, Wang W, Lin YC. Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obes Surg.* 2006 Dec;16(12):1584-93.
19. Jaskiewicz K, Rzepko R, Sledzinski Z. Fibrogenesis in fatty liver associated with obesity and diabetes mellitus type 2. *Dig Dis Sci.* 2008 Mar;53(3):785-8. Epub 2007 Sep 12.
20. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007 Nov;139(3):351-62.
21. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A-S, White L.E. *Neuroznanost. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2016.*
22. Jacobson BH, Cook D, Redus B. Correlation between body mass index and percent body fat of trained body builders. *Percept Mot Skills.* 2003 Jun;96(3 Pt 1):931-2.
23. Gippini A, Mato A, Peino R, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Effect of resistance exercise (body building) training on serum leptin levels in young men. Implications for relationship between body mass index and serum leptin. *J Endocrinol Invest.* 1999 Dec;22(11):824-8.
24. Katzung B, Masters B, Trevor A. *Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.*
25. Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jun;13(6):465-76.
26. Pok EH, Lee WJ. Gastrointestinal metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 21;20(39):14315-28.
27. Fanin A, Benetti A, Ceriani V, Pontiroli AE. Bariatric surgery versus medications in the treatment of type 2 diabetes. *Minerva Endocrinol.* 2015 Dec;40(4):297-306.

28. Meier JJ. Treatment of type 2 diabetes. *Internist (Berl)*. 2016 Feb;57(2):153-65.
29. Chacra AR. Evolving metformin treatment strategies in type-2 diabetes: from immediate-release metformin monotherapy to extended-release combination therapy. *Am J Ther*. 2014 May-Jun;21(3):198-210.
30. Chen K, Qian W, Jiang Z, Cheng L, Li J, Sun L i sur. Metformin suppresses cancer initiation and progression in genetic mouse models of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2017 Jul 24;16(1):131.
31. Zhou PT, Li B, Liu FR, Zhang MC, Wang Q, Li YY i sur. Metformin is associated with survival benefit in pancreatic cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):25242-25250.
32. Tseng CH. Metformin and lung cancer risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):41132-41142.
33. Tseng CH. Diabetes, metformin use, and colon cancer: a population-based cohort study in Taiwan. *Eur J Endocrinol*. 2012 Sep;167(3):409-16.
34. Tseng CH. Use of metformin and risk of kidney cancer in patients with type 2 diabetes. *Eur J Cancer*. 2016 Jan;52:19-25.
35. Tseng CH. Metformin may reduce bladder cancer risk in Taiwanese patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014 Apr;51(2):295-303.
36. Tseng CH. Metformin significantly reduces incident prostate cancer risk in Taiwanese men with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cancer*. 2014 Nov;50(16):2831-7.
37. Tseng CH. Metformin and endometrial cancer risk in Chinese women with type 2 diabetes mellitus in Taiwan. *Gynecol Oncol*. 2015 Jul;138(1):147-53.
38. Tseng CH. Metformin reduces ovarian cancer risk in Taiwanese women with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015 Sep;31(6):619-26.
39. Tseng CH. Metformin use and cervical cancer risk in female patients with type 2 diabetes. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):59548-59555.
40. Tseng CH. Metformin reduces thyroid cancer risk in Taiwanese patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014 Oct 10;9(10):e109852.

41. Kim AJ, Chang JY, Shi L, Chang RC, Ko ML, Ko GY. The Effects of Metformin on Obesity-Induced Dysfunctional Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Jan 1;58(1):106-118.
42. Maruthur NM, Tseng E, Hutflless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z i sur. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2016 Jun 7;164(11):740-51.
43. Jacobsen LV, Flint A, Olsen AK, Ingwersen SH. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55: 657-672.
44. Armstrong MJ, Houlihan DD, Rowe IA, Clausen WH, Elbrønd B, Gough SC i sur. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Jan;37(2):234-42.
45. Ishii H, Niiya T, Ono Y, Inaba N, Jinnouchi H, Watada H. Improvement of quality of life through glycemic control by liraglutide, a GLP-1 analog, in insulin-naive patients with type 2 diabetes mellitus: the PAGE1 study. *Diabetol Metab Syndr.* 2017 Jan 7;9:3.
46. Bisgaard LS, Bosteen MH, Fink LN, Sørensen CM, Rosendahl A, Mogensen CK i sur. Liraglutide Reduces Both Atherosclerosis and Kidney Inflammation in Moderately Uremic LDLr<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS One.* 2016 Dec 16;11(12):e0168396.
47. Rizzo M, Rizvi AA, Patti AM, Nikolic D, Giglio RV, Castellino G i sur. Liraglutide improves metabolic parameters and carotid intima-media thickness in diabetic patients with the metabolic syndrome: an 18-month prospective study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016 Dec 3;15(1):162.
48. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016 Jul 28;375(4):311-22.
49. Deacon CF. Potential of liraglutide in the treatment of patients with type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5: 199–211.

50. Thrasher J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. *Am J Cardiol.* 2017 Jul 1;120(1S):S4-S16.
51. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014 Jul 28;20(28):9330-7.
52. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 28; 20(44): 16452-16463.
53. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-1351.
54. Sofi F, Casini A. Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: New therapeutic option around the corner? *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21; 20(23): 7339-7346.
55. McCarthy EM, Rinella ME. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease. *J Acad Nutr Diet.* 2012 Mar;112(3):401-9.
56. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA i sur. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393-403.
57. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 2014;96:121-129.
58. Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A i sur. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med.* 2015 Jun 16;13:193.
59. Ishimoto T, Lanaspá MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C i sur. High Fat and High Sucrose (Western) Diet Induce Steatohepatitis that is Dependent on Fructokinase. *Hepatology.* 2013 Nov; 58(5): 1632-1643.
60. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of

- genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr*. 2012; 4: 32.
61. Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8525-34.
62. Mazza A, Fruci B, Garinis GA, Giuliano S, Malaguarnera R, Belfiore A. The role of metformin in the management of NAFLD. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:716404.
63. Kim EK, Lee SH, Jhun JY, Byun JK, Jeong JH, Lee SY i sur. Metformin Prevents Fatty Liver and Improves Balance of White/Brown Adipose in an Obesity Mouse Model by Inducing FGF21. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5813030.
64. Song YM, Lee YH, Kim JW, Ham DS, Kang ES, Cha BS. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*. 2015;11(1):46-59.
65. Zheng J, Woo SL, Hu X, Botchlett R, Chen L, Huo Y. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med*. 2015 Jun;9(2):173-186.
66. Haukeland JW, Konopski Z, Eggesbø HB, von Volkmann HL, Raschpichler G, Bjørø K. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(7):853-60.
67. Shields WW, Thompson KE, Grice GA, Harrison SA, Coyle WJ. The Effect of Metformin and Standard Therapy versus Standard Therapy alone in Nondiabetic Patients with Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): A Pilot Trial. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009 May;2(3):157-163.
68. Gao H, Zeng Z, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W i sur. The Glucagon-Like Peptide-1 Analogue Liraglutide Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(5):694-702.
69. Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N i sur. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:496453.



70. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R i sur. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016 Feb 13;387(10019):679-90.
71. Eguchi Y, Kitajima Y, Hyogo H, Takahashi H, Kojima M, Ono M i sur. Pilot study of liraglutide effects in non-alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic fatty liver disease with glucose intolerance in Japanese patients (LEAN-J). *Hepatol Res*. 2015 Mar;45(3):269-78.
72. Cotugno M, Nosso G, Saldamacchia G, Vitagliano G, Griffo E, Lupoli R i sur. Clinical efficacy of bariatric surgery versus liraglutide in patients with type 2 diabetes and severe obesity: a 12-month retrospective evaluation. *Acta Diabetol*. 2015 Apr;52(2):331-6.
73. Ladenheim EE. Liraglutide and obesity: a review of the data so far. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 1867-1875.
74. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH i sur. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet*. 2009 Jul 4;374(9683):39-47.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI:

- Ime i prezime: Alen Imširović
- Datum i mjesto rođenja: 7. rujna 1992, Osijek
- Adresa stanovanja: Sljemenska 98, 31000 Osijek
- Kontakt: 092/507 0992
- E-mail: aimsirovic@mefos.hr

### OBRAZOVANJE:

- 1999. – 2007. Osnovna škola „Tin Ujević“, Osijek
- 2007. – 2011. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- 2011. – 2017. Medicinski fakultet Osijek, integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine

### AKTIVNOSTI:

- Pomoćni sam urednik obvezne stručne literature iz kolegija Neuroznanost: Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A-S, White L.E. Neuroznanost. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2016.
- Aktivan sam član dviju studentskih udruga Medicinskog fakulteta: EMSA-e (European Medical Students' Association) i CroMSIC-a (Croatian Medical Students' International Committee).

Projekti u kojima sam sudjelovao:

1. 2013. – 2017. **Bolnica za medvjediće** – organizator projekta; cilj je projekta smanjivanje straha djece od odlaska liječniku
2. 2014. **Znanje i vještine** – promicanje i vježbanje osnovnih medicinskih i kliničkih vještina
3. 2015. **mRAK kampanja** – edukacija učenika srednjih škola o važnosti prevencije i ranog otkrivanja najčešćih vrsta karcinoma

- Aktivna sudjelovanja na kongresima:
  1. 2015. **12<sup>th</sup> BANTAO Congress 2015 - DiaTransplant**
  2. 2016. **Summer School on Stress**
  
- Objavljeni radovi:

**BANTAO Journal 2016:** Mirela Jozicic, **Alen Imsirovic**, Lea Katalinic, Branimir Krtalic i Nikolina Basic Jukic - Rak pluća u primatelja bubrežnih transplantata.
  
- Položeni tečajevi (**Coursera, Sveučilište Duke**):
  1. Foundational Neuroscience for Perception and Action
  2. The Brain and Space
  3. Visual Perception and the Brain
  
- Demonstrature:
  1. 2015. – 2017. Katedra za Internu medicinu, Obiteljsku medicinu i Povijest medicine – kolegij **Klinička propedeutika**
  2. 2016. Katedra za Anatomiju i Neuroznanost – kolegij **Anatomija**
  
- Sportska natjecanja:
  1. 2012. 3. mjesto na Sveučilišnom **šahovskom** prvenstvu i 2. mjesto na Državnom sveučilišnom šahovskom prvenstvu
  2. 2013. 1. mjesto na Sveučilišnom šahovskom prvenstvu i 2. mjesto na Državnom sveučilišnom šahovskom prvenstvu
  3. 2014. 3. mjesto na Državnom sveučilišnom šahovskom prvenstvu i 3. mjesto na 50m leptir na Sveučilišnom prvenstvu u **plivanju**
  4. 2015. 1. mjesto na Sveučilišnom šahovskom prvenstvu i 3. mjesto u štafeti 4x50m slobodno na Sveučilišnom prvenstvu u plivanju
  5. 2016. Istrčan **maraton** u Zagrebu i **ultramaraton** Apatin – Osijek
  6. 2017. 1. mjesto na Sveučilišnom šahovskom prvenstvu, istrčan maraton u Beogradu i najbolji strijelac Katoličke **malonogometne** lige Osijek