

Uloga stanica urođene imunosti u razvoju nealkoholnog steatohepatitisa

Zubčić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:231130>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Marija Zubčić

ULOGA STANICA UROĐENE IMUNOSTI U RAZVOJU NEALKOHOLNOG STEATOHEPATISA

Diplomski rad

Rijeka, 2021

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Marija Zubčić

ULOGA STANICA UROĐENE IMUNOSTI U RAZVOJU NEALKOHOLNOG STEATOHEPATISA

Diplomski rad

Rijeka, 2021

Mentor rada: prof. dr. sc. Bojan Polić

Diplomski rad ocijenjen je dana _____ 2021. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Astrid Krmpotić (predsjednik Povjerenstva)

2. Prof.dr.sc. Ester Pernjak Pugel

3. Izv.prof.dr.sc. Felix Wensveen

Rad sadrži 25 stranica, 9 slika, 0 tablica, 29 literaturnih navoda.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Metabolički uzrokovana bolest masne jetre (MAFLD) i nealkoholni steatohepatitis (NASH)	1
1.2. Dosad poznati patofiziološki mehanizmi.....	1
1.2.1. Steatoza i lipotoksičnost.....	1
1.2.2. Oksidativni stres.....	2
1.2.3. Crijevna barijera.....	3
1.2.4. Fibroza	3
1.2.5. Uloga imunskih stanica	4
1.3. Uloga prehrane.....	7
2. SVRHA RADA.....	8
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Miševi	9
3.3. Stanične linije.....	10
4. REZULTATI.....	11
4.1. Specifične histološke promjene na jetri miševa hranjenih SSD dijetom	11
4.2. Uloga $\gamma\delta$ limfocita T i citokina IL-17A u promicanju upalnog odgovora u jetri	12
4.3. Uloga $\gamma\delta$ limfociti T u nastanku fibroze jetre	13
4.4 Uloga MAIT stanica kao izvora citokina IL-17A	14
5. RASPRAVA	16
6. ZAKLJUČAK.....	19
7.SAŽETAK	20
8. SUMMARY	20
9. LITERATURA:.....	21

POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

cNK stanice- konvencionalne prirodnoubilačke stanice (engl. conventional natural killer cells)

CT- kompjuterizirana tomografija (engl. computed tomography)

CCR6- c-c kemokinski receptor 6 (engl. c-c chemokine receptor 6)

CCL20- c-c kemokinski ligand 20 (engl. c-c chemokine ligand 20)

CXCL6- c-x-1 kemokinski ligand 6 (engl. c-x-c chemokine ligand 6)

CXCR6- c-x-c kemokinski receptor 6 (engl. c-x-c chemokine receptor 6)

DAMP- molekularni obrasci povezani s oštećenjem stanice (engl. damage associated molecular patterns)

HSC- jetrene zvjezdaste stanice (engl. hepatic stellate cells)

ICAM-1- međustanična adhezijska molekula-1 (engl. intercellular adhesion molecule 1)

IFN γ - interferon gama (engl. interferon gamma)

ILC- urođene limfoidne stanice (engl. innate lymphoid cells)

iNKT- invariantne prirodnoubilačke stanice T (engl. invariant natural killer cells)

LrNK- jetrene prirodnoubilačke (engl. liver natural killer cells)

MAFLD- metabolički uzrokovana bolest masne jetre (engl. metabolic associated fatty liver disease)

MAIT- invarijantne stanice T povezane s mukozom (engl. mucosal-associated invariant T cells)

MCD- metionin/kolin deficijentna dijeta (engl. methionine/choline deficient diet)

MCP-1- čimbenik koji privlači makrofage (engl. macrophage chemotactic protein 1)

MMP- matriks metaloproteinaza (engl. matrix metalloproteinase)

MR- magnetna rezonanca (engl. magnetic resonance imaging)

MRE- magnetna rezonanta elastografija (engl. magnetic resonance elastography)

NASH- nealkoholni steatohepatitis (engl. nonalcoholic steatohepatitis)

NCD- normokalorična dijeta (engl. normocaloric diet)

NF- κ B- nuklearni faktor kappa B (engl. nuclear factor kappa B)

NK stanice- prirodno ubilačke stanice (engl. natural killer cells)

NKT stanice- prirodno ubilačke T stanice (engl. natural killer T cells)

PAMP- molekularni obrasci povezani s patogenima (engl. pathogen associated molecular patterns)

PD-1- programirani protein stanične smrti 1 (engl. programmed cell death protein 1)

PDGF- čimbenik rasta trombocita (engl. platelet-derived growth factor)

ROR γ t- (engl. retinoic acid –related orphan receptor gamma t)

ROS- reaktivni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

TLR- (engl. toll like receptor)

TGF β - transformacijskog čimbenika rasta beta (engl. transforming growth factor beta)

TIMP- tkivni inhibitori metaloproteinaza (engl. tissue inhibitor of metalloproteinase)

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor alpha)

VCAM-1- vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1)

α SMA- glatkomišićni aktin alfa (engl. alpha-smooth muscle actin)

$\gamma\delta$ T-stanice- gama delta limfociti T (engl. gamma delta T cells)

1. UVOD

1.1. Metabolički uzrokovana bolest masne jetre (MAFLD) i nealkoholni steatohepatitis (NASH)

Metabolički uzrokovana bolest masne jetre (MAFLD) je najčešća kronična bolest jetre. Povezana je s pretilošću, inzulinskom rezistencijom, šećernom bolesti tipa 2, hiperlipidemijom, hipertenzijom (1). MAFLD podrazumijeva širok spektar bolesti; od steatoze do nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) koji uz steatozu i infiltraciju upalnih stanica može imati određeni stupanj fibroze (2). NASH je dakle progresivni oblik MAFLD-a kojeg uz steatozu prati i oštećenje hepatocita i upala. Zbog porasta prevalencije te rizika od ciroze i hepatocelularnog karcinoma, NASH predstavlja značajan javnozdravstveni problemi (3).

MAFLD uključuje prisutnost makrovezikularne i mikrovezikularne steatoze bez značajne konzumacije alkohola. Za dijagnostiku se najčešće koriste tehnike poput ultrazvuka, kompjuterizirane tomografije (CT) i magnetske rezonance (MR). S obzirom da jetreni enzimi mogu biti urednih vrijednosti, biokemijskom analizom krvi se ne može potvrditi dijagnoza. Biopsija jetre je i dalje zlatni standard za dokazivanje stadija jetrene bolesti, ali se zbog svoje invazivnosti sve više daje prostora laboratorijskim nalazima koji ukazuju na disfunkciju jetre te neinvazivnim slikovnim metodama poput oslikavanja Fibroscanom i magnetnom rezonantnom elastografijom (MRE) (1).

1.2. Dosad poznati patofiziološki mehanizmi

1.2.1. Steatoza i lipotoksičnost

Patogeneza koja dovodi do MAFLD-a nije u potpunosti jasna. Nekoliko je ključnih događaja u patofiziologiji NASH-a; steatoza, lipotoksičnost, oksidativni stres, aktivacija stanica imunskog odgovora, poremećaj intestinalne barijere te nastanak fibroze.

Pretili pacijenti i dijabetičari tipa 2 razvijaju inzulinsku rezistenciju koja dovodi do povećane lipolize i hiperinzulinemije. Lipoliza u masnom tkivu uzrokuje povećanje razine slobodnih masnih kiselina u krvi i njihovog ulaska u hepatocite (4). Inzulin direktno potiče sintezu masnih kiselina putem aktivacije mTORC1-SREBP1 puta i ulaz glukoze koja se onda koristi za metabolizam, sintezu masnih kiselina i sintezu glikogena (5).

U nastanku steatoze glavnu ulogu ima akumulacija masti u obliku slobodnih masnih kiselina, diacilglicerola, slobodnog kolesterola, ceramida, fosfolipida i triglicerida u hepatocitima (1,3). Prekursori triglicerida; masne kiseline i diacilgliceroli mogu djelovati lipotoksično te oštetiti hepatocite. Iz oštećenih hepatocita se otpuštaju: čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor alpha, TNF- α), razni interleukini (IL-1 β , IL-18, IL-33), čimbenik koji privlači monocite (MCP-1), molekularni obrasci povezani s oštećenjem stanice (engl. damage associated molecular patterns - DAMP) i dr. koji aktiviraju i reguliraju urođeni i stečeni imunski odgovor (3).

1.2.2. Oksidativni stres

Steatoza čini hepatocite osjetljivijima na oksidativni stres, izvor kojeg su mitohondriji u kojima se odvija oksidacija masnih kiselina. Reaktivni kisikovi radikali (ROS) direktno oštećuju stanice putem (per)oksidacije lipida, a indirektno putem indukcije stvaranja proupalnih citokina TNF- α , transformacijskog čimbenika rasta beta (TGF β) i drugih proupalnih citokina te kroz indukciju ekspresije liganda za Fas (FasL) na hepatocitima (4). Faktori oslobođeni iz oštećenih hepatocita kao što su DAMP zajedno sa molekularnim obrascima povezanim s patogenima (engl. pathogen associated molecular patterns- PAMP) putem TLR4 (engl. toll-like receptor 4) aktiviraju zvjezdaste jetrene stanice (Itove stanice) koje proizvodeći kolagen potiču pretjerano cijeljenje i fibrozu jetre (1,2,6).

1.2.3. Crijevna barijera

Crijevna barijera regulira prolaz tvari dobivenih razgradnjom hrane probavnim enzimima i djelovanjem bakterija iz crijeva u portalnu cirkulaciju (2). Pretjerani rast i promjena sastava mikrobiota crijeva opisana je u mišjim modelima MAFLD-a, ali i u ljudi s NASH-om gdje je povezana s povećanim razinama TNF- α i povećanom propusnosti crijevne barijere. TNF- α zajedno s IL-1 β promovira nastanak inzulinske rezistencije (7). Prehrana bogata mastima i fruktozom je vjerojatno odgovorna za promjenu sastava mikrobiote crijeva (8). Povećana permeabilnost crijevne barijere dovodi do translokacije bakterija, njihovih toksina i nusprodukata metabolizma u portalnu cirkulaciju te tako aktivira upalni odgovor u jetri. Promjene u funkcionalnosti crijevne barijere primijećene su kod čak 40% MAFLD pacijenata (2, 21). Smanjena funkcionalnost crijevne barijere zajedno s adipokinima iz masti dovodi do smanjenja inzulinske osjetljivosti (1). Inzulinska rezistencija nadalje dovodi do lipolize u masnom tkivu i oslobađanja masnih kiselina te njihovo širenje u mnoge organe među kojima je i jetra. U jetri se one talože u hepatocitima i stvaraju steatozu te djeluju lipotoksično (9).

1.2.4. Fibroza

Fibroza jetre označava proces cijeljenja koji se gotovo uvijek javlja kao odgovor na ozljedu (10). Iz oštećenih stanica jetre oslobađaju se ROS i sadržaj stanica što aktivira Itove ili zvjezdaste jetrene stanice (engl. hepatic stellate cells - HSC) i privlači makrofage. Makrofazi i HSC luče proupalne medijatore, privlače limfocite T i neutrofile. Iz aktiviranih makrofaga izlučeni TGF β potiče diferencijaciju HSC u miofibroblaste, a čimbenik rasta trombocita (PDGF) potiče proliferaciju miofibroblasta. Miofibroblasti nadalje izražavaju glatkomišićni aktin (α SMA) i kolagen tipa I. Pojačano odlaganje matriksa i fibroza nastaju i zbog lučenja tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) koji inhibiraju matriks metaloproteinaze (MMP); proteolitički enzim iz makrofaga koji razgrađuje komponente ekstracelularnog matriksa. .

1.2.5. Uloga imunskih stanica

Veliku ulogu u patogenezi NASH-a imaju stanice urođene imunosti u čemu najviše sudjeluju prirodnoubilačke stanice (NK), prirodnoubilačke stanice T (NKT), urođene limfoidne stanice (ILC), invarijantne stanice T povezane s mukozom (MAIT) i gama delta limfociti T ($\gamma\delta$ T). U patogenezi NASH-a sudjeluju još i makrofagi (Kupfferove stanice), HSC i hepatociti (3).

NK stanice čine 30-50% limfocita u humanoj jetri, a samo 10% u jetri miševa. Dva su osnovna tipa; LrNK (jetrene prirodnoubilačke) i cNK (konvencionalne prirodnoubilačke) stanice. Pokazano je da pretili ljudi imaju značajno veći broj stanica NK u jetri, a u NASH-u posebice raste brojnost NKG2D⁺ NK stanica (3). Za takve NK stanice je dosad pokazano da zapravo djeluju protektivno i inhibiraju fibrozu jer luče interferon gama (IFN γ) koji inducira apoptozu jetrenih zvjezdastih stanica (11).

NKT stanice čine oko 30% jetrenih limfocita (11). Razlikujemo invarijantne (iNKT) i -neinvarijante podtipove stanica NKT. Na miševima je pokazano da dijeta bogata mastima i saharozom potiče apoptozu stanica NKT te time potiče upalu jetre, što ukazuje na zaštitnu ulogu tih stanica (3). Miševi bez stanica NKT, a hranjeni hranom bogatom mastima imaju veći rizik za razvoj steatoze i porast tjelesne težine. S druge strane, u uznapredovalom NASH-u povećava se broj NKT u jetri (2,11). Ukoliko se miševima podvrgne prehrani s nedostatkom metionina i kolina dolazi do porasta stanica NKT koje stvaraju osteopontin i ligand hedgehog što potiče diferencijaciju miofibroblasta iz jetrenih zvjezdastih stanica (3). Ipak, uloga stanica NKT u fibrogenezi nije još sasvim razjašnjena. Poznato je da su iNKT u zdravoj jetri prisutne i u mirovanju, dok se kod ozljede jetre aktiviraju putem osi CXCR6-CXCL16 te tada luče IFN γ i IL-4. Naime, miševi s nedostatkom receptora CXCR6 imaju smanjeno stvaranje proupalnih citokina, smanjenju akumulaciju makrofaga te su rezistentni na fibrozu što ipak upućuje na to da iste stanice mogu imati i poticajni učinak u procesu fibroze (2,11).

Urođene limfoidne stanice tipa 2 (ILC2) se nalaze u crijevu, koži, plućima, jetri te nekim drugim perifernim tkivima. U fibrotičnoj jetri se nalaze u povećanom broju, ali istog fenotipa kao i u

nefibrotičnoj jetri. Kao reakcija na hepatocelularni stres i ekspresiju IL-33, aktiviraju se i stvaraju IL-13 što aktivira jetrene zvjezdaste stanice i time sudjeluju u procesu nastanka fibroze jetre (3). S druge strane, aktivirane ILC2 stanice smanjuju razinu TNF- α i tako smanjuju oštećenje jetre (11).

$\gamma\delta$ limfociti T su podskupina CD3⁺ stanica T i čine 15-25% limfocita T te 3-5% svih limfocita u humanoj jetri (3,12). Aktiviraju se putem TLR receptora ili putem citokina (12,13). Najviše ih ima u mukozni crijeva, ali obiluju i u jetri, krvi, dermisu te slezeni (12). Pri dijete bogatoj mastima i ugljikohidratima raste njihov broj pa tako i broj IL-17A-producirajućih stanica što pridonosi razvoju steatohepatitisa, tj. dovodi do oštećenja jetre i poremećaja metabolizma glukoze. $\gamma\delta$ T stanice u masnom tkivu pokreću upalni odgovor preko monocita i smanjuju osjetljivost na inzulin. U steatohepatitisu $\gamma\delta$ limfociti T imaju povećanu ekspresiju PD-1 (programirani protein stanične smrti 1), CD1d i CD36 (3). Međutim, postoje i radovi koji pokazuju protektivan učinak $\gamma\delta$ T. Tako je pokazano da se aktivacijom CCR6-CCL20 kemokinske osi nakupljaju stanice $\gamma\delta$ T IL-17+ IL-22+ u jetri gdje postižu antifibrotični učinak tako što potiču apoptozu jetrenih zvjezdastih stanica (11).

Invarijantne stanice T povezane s mukozom (MAIT stanice), (engl. mucosa associated invariant T cells) čine 20-50% svih limfocita T u humanoj jetri, a samo 0.6% u C57BL-6 miševa (3,14). One su veliki izvor raznih citokina; IFN- γ , TNF- α i IL-17 putem kojeg aktiviraju zvjezdaste jetrene stanice što dovodi do fibroze. Miševi s nedostatkom MAIT stanica su jako podložni bakterijskim i gljivičnim infekcijama, ali razvijaju manji stupanj fibroze što potvrđuje ulogu istih stanica u razvoju fibroze. Djeluju citotoksično, u mirovanju stvaraju granzim A i K, a aktivne stvaraju granzim B i perforin kojima buše i ubijaju bakterije. S progresijom MAFLD-a njihov se broj u perifernoj krvi smanjuje, a u jetri se koncentriraju oko steatotičnih hepatocita što upućuje na translokaciju MAIT stanica u jetru tijekom kronične bolesti jetre, sa trošenjem zaliha istih na periferiji (14). Istraživanja na ovim stanicama također ukazuju na kontradiktorne rezultate. S jedne strane, pokazalo se da one potiču proliferaciju te fibrinogenu i proupalnu ulogu miofibroblasta u jetri, a s druge strane u mišjem NASH-

modelu pri ishrani s nedostatkom metionina i kolina pokazalo se da potiču protuupalne M2 makrofage te posredstvom IL-4 i IL-10 djeluju protektivno na djelovanje upale u jetri (3,14).

U jetri razlikujemo dva tipa **makrofaga**; Kupfferove stanice (koje dominiraju u zdravoj jetri) i makrofage nastale iz monocita. Kupfferove stanice se nalaze u sinusoidama što znači da su u izravnom kontaktu s antigenima iz gastrointestinalnog trakta. Njihov broj pada u upali i fibrozi, dok s druge strane broj makrofaga iz monocita raste kao odgovor na ozljedu. Oni pridonose razvoju fibroze tako što aktiviraju miofibroblaste (2).

Pomagački limfociti T 1 (Th1) stvaraju IFN γ i IL-12; IFN γ smanjuje odlaganje kolagena, a zajedno s IL-12 smanjuje lučenje profibrogenih citokina iz Th2. Za razliku od tog antifibrotičnog djelovanja, pomagački limfociti T 2 (Th2) potiču fibrozu (11).

Pomagačke limfociti T 17 luče interleukin 17 i 22 (IL-17 i IL-22). Receptori za IL-17 se nalaze na mnogobrojnim stanicama u jetri; monociti, Kupfferove, HSC i kolangiocitima. Aktivacijom tih receptora povećava se sekrecija proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF i TGF β). IL-17 direktno povećava sintezu kolagena u HSC. S druge strane, receptori za IL-22 nalaze se samo na hepatocitima i njihovom aktivacijom povećava se preživljavanje i proliferacija hepatocita (11).

Zvezdaste jetrene stanice (HSC) su antigen prezentirajuće stanice koje su izvor slobodnih kisikovih radikala, proupalnih citokina i kemokina te nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze. Pridonose ozljedi jetre i smanjenju protupalnih citokina (IL-10, IFN γ) (11).

1.3. Uloga prehrane

U raznim istraživanjima korišteni su različiti životinjski modeli s prehranom koja bi trebala oponašati nezdrave prehrambene navike ljudi koje dovode do metaboličkog sindroma, steatoze jetre, odnosno MAFLD-a i NASH-a. Neke od najčešće korištenih dijeta su dijeta s visokim udjelom masti, dijeta bez kolina i metionina, dijeta bogata fruktozom i tzv. zapadnjačka dijeta (3,4). Miševi hranjeni HFD-om (engl. high fat diet) su pretili, u krvi imaju visoku razinu triglicerida, alanin-aminotransferaze (ALT-a) te TNF- α , inzulina i neutrofila u jetri te pokazuju fokalnog oštećenje hepatocita u jetri (4). Nedostatak je što se razvija blaga upala i steatoza, te što izostaje fibroza (3,4).

MCD (metionin/kolin deficijentna dijeta) je dijeta siromašna metioninom i kolinom. Metionin i kolin su oboje nužni za beta-oksidaciju i pakiranje triglicerida u VLDL. Ta dijeta pojačava upalni odgovor; aktivira makrofage preko nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B), povećava razine TNF- α , IL-6 i TGF- β te ekspresiju međustanične adhezijske molekule-1 (engl. intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), vaskularne stanične adhezijske molekule-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) i čimbenika koji privlači makrofage-1 (engl. macrophage chemotactic protein - MCP-1) što rezultira nakupljanjem neutrofila i makrofaga u jetru (4,15). Nedostatak ove dijetete je što se bilježe niske razine triglicerida, kolesterola, inzulina, leptina i glukoze što ne ide u prilog ljudskom NASH-u (16).

Zapadnjačka dijeta bogata je mastima, šećerom i soli te kao takva izaziva metabolički sindrom, ali ne dovodi do porasta TNF- α , IL-6, and NF- κ B. Najpovoljniji rezultati su se dobili s Wistar štakorima koji su uz tu dijetu povremeno dobivali i „kafeterijsku hranu“ (krekeri, keksi, procesirano meso..) (4). To je doprinijelo razvoju mikrovezikularne steatoze, steatohepatitisa te kronične upale kod štakora što dobro korelira s razvojem ljudskog MAFLD-a, ali ne i s fibrozom (4,16).

Fruktoza regulira ulaz glukoze i sintezu glikogena. Dijeta bogata fruktozom podiže razinu triglicerida putem povećane lipogeneze te tako u konačnici dovodi do povećanja tjelesne težine, a u jetri miša do steatoze i fibroze (15). S druge strane, mediteranska dijeta koja se temelji na konzumaciji više

namirnicama biljnog podrijetla i ribe, a manje mesa i mliječnih proizvoda te time nudi antioksidativna i protupalna svojstva mogla bi, odnosno trebala bi biti glavni preventivni pristup MAFLD-u (17). Pokazalo se da navedena dijeta može smanjiti akumulaciju i napredovanje fibroze jetre (18).

2. SVRHA RADA

Metabolički uzrokovana bolest masne jetre (MAFLD) danas je najčešća kronična bolest jetre. Ona predstavlja jetrenu manifestaciju metaboličkog sindroma kojeg čine centralna pretilost, hipertenzija, hiperglikemija ili šećerna bolest tip 2 i hiperlipidemija. Ova bolest predstavlja pandemiju današnjeg razvijenog svijeta nastalu kao posljedica nezdravog sjedilačkog načina života. Rastuća prevalencija, nedostatak terapije i mogućnost progresije u karcinom čine ju značajnim javnozdravstvenim problemom. Hepatocelularni karcinom i ciroza jetre uzrokovane MAFLD-om vodeća su indikacija za transplantaciju jetre u svijetu. Inicijacija upale smatra se ključnim korakom za progresiju bolesti. Svrha ovog rada bila je proučiti mehanizme rane aktivacije urođenog imunskog odgovora i onih stanica koje u njemu imaju najvažniju ulogu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Miševi

U svrhu ovog istraživanja korišten je mišji model za NASH, odnosno miševi koji su izloženi SSD-u (engl. steatosis and steatohepatitis diet). Kontrolna skupina miševa je bila na NCD-u (engl. normocaloric diet). SSD sadrži 42% zasićenih masti, 22% fruktoze te 2% kolesterola. Miševi hranjeni sa SSD-om razvijaju steatozu koja progredira u NASH. Navedena dijeta oponaša nezdrave prehrambene navike čovjeka. U pokusima su korišteni knock-out sojevi miševa s nedostatkom receptora TCR δ te kontrolni C57BL/6 miševi. Svi miševi su uzgajani u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) u sklopu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Sva istraživanja na životinjama provedena su sukladno bioetičkim standardima i uz potvrdu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Rijeka.

3.2. Histološki preparati

Tkiva su fiksirana u formalinu te uklopljena u parafin. U svrhu imunohistološke analize tkivo jetre je podvrgnuto procesu razotkrivanja antigena sa puferom Tris-EDTA (pH=9) u vodenoj kupelji pri temperaturi od 97°C kroz 20 minuta. Za blokadu tkiva korišteni su goveđi serumski albumini (bovin serum albumin). Nadalje je materijal podvrgnut indirektnoj metodi imunohistokemijskog bojanja. U tu svrhu korištena su primarna protutijela; mišje anti-ljudsko protutijelo specifično za ljudski TCR δ -stanični receptore; (klon H-41 od tvrtke Santa Cruz, K2320) i magareće anti-ljudsko protutijelo specifično za ljudski citokin IL-17A; (od tvrtke R&D, AF-317-NA). Nakon toga napravljen je blok endogene peroksidaze komercijalnim kitom (proizvođač Dako) te inkubacija sa sekundarnim protutijelima: poliklonsko zečje anti-mišje IgG konjugirano s Alexa fluor 488 (od tvrtke Abcam, ab150125) i poliklonsko kozje anti-magareće IgG konjugirano s Alexa Fluor 647 (od tvrtke Abcam, ab150135). Za kvantitativnu analizu fibroze jetre odnosno depozita kolagena, materijal je obojen pikrosirius crvenilom. Kako bismo prika-

zali specifične promjene na jetri napravljene su histološke analize jetrenih preparata bojanih hemato-ksilin-eozin (HE) bojilom nakon 4, 8, 12 i 16. tjedna od početka SSD dijete. Imunoflorescentnim bojanjem označeni su i vizualizirani $\gamma\delta$ limfociti T te najzastupljeniji citokin IL-17A.

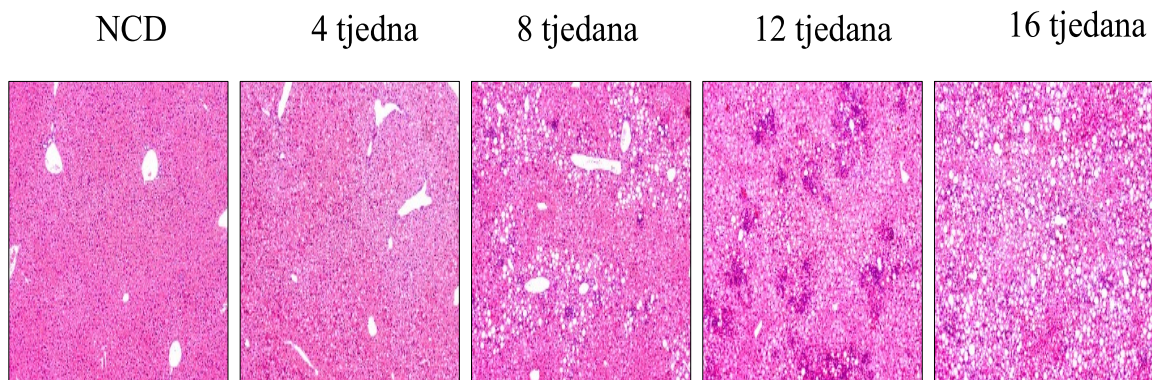
3.3. Stanične linije

Iz jetre su različitim vremenskim razmacima od početka primjene SSD dijete izolirani ukupni jetreni limfociti gradijentom na perkolu. Stanice su stimulirane s PMA i ionomicinom *in vitro* kroz 4 sata te je određena učestalost stanica koje proizvode citokine. Protočnom citometrijom izdvojene su i analizirane stanice od najvećeg interesa; $\gamma\delta$ limfociti T i MAIT stanice.

4. REZULTATI

4.1. Specifične histološke promjene na jetri miševa hranjenih SSD-om

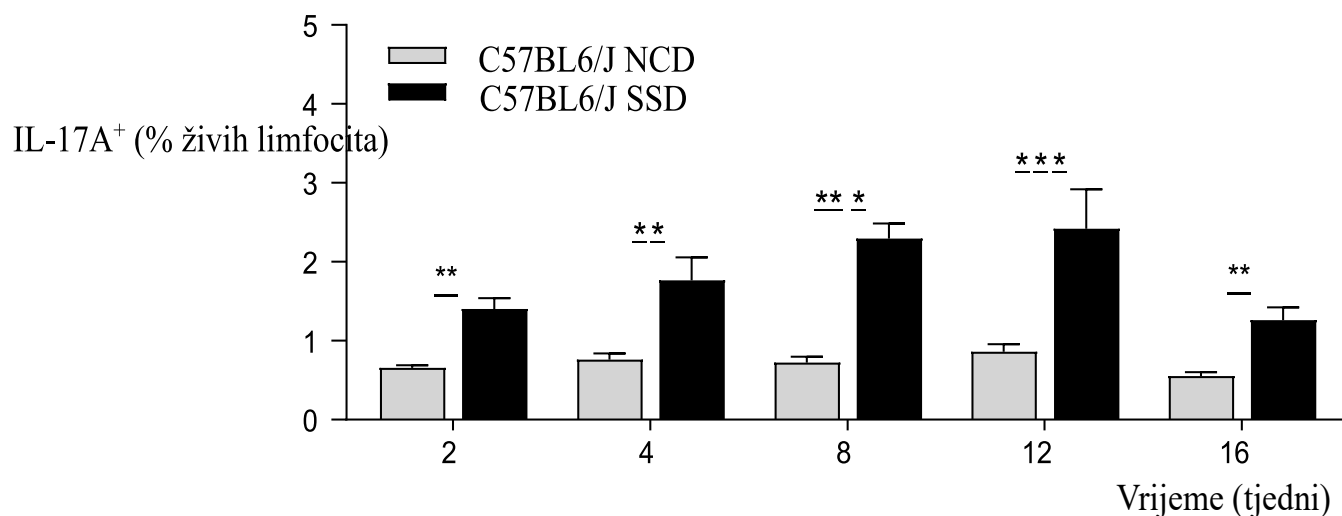
Analizirala sam histološke preparate mišje jetre u različitim razmacima (4, 8, 12 i 16 tjedana) od početka SSD-a. SSD je dijeta bogata mastima, fruktozom i kolesterolom, a koristila se kako bi oponašala nezdrave prehrambene navike u ljudi. Makroskopskim pregledom jetre utvrdila sam promjene boje u žućkastu što upućuje na nastanak steatoze. Histološkom analizom jetrenih preparata bojanih hematoksilin-eozin bojanjem uočila sam specifične promjene koje su odgovarale razvoju MAFLD-a odnosno NASH-a. Nakon 4 tjedna primjene SSD-a uočene su prve promjene na hepatocitima u smislu povećanja njihove veličine. Nakon osam tjedana počelo je nakupljanje lipidnih kapljica u istim stanicama što odgovara steatozi. Kasniji stadiji (nakon 12 tjedana) obilježeni su infiltracijom imunskih stanica i nastankom upale. U zadnjem stadiju proučavanja histoloških preparata jetre (nakon 16 tjedana) razvila se fibroza između jetrenih stanica, prije svega periportalno (**Slika 1**).



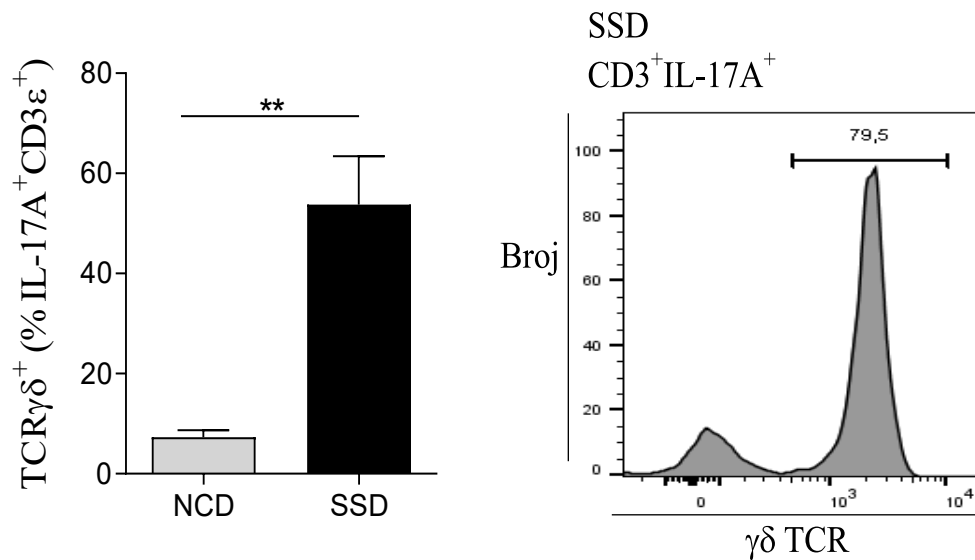
Slika 1. Histološki preparat jetre bojan hematoksilin-eozin bojilom (HE). Prikazan je učinak SSD-a na jetru miša. Nakon 4 tjedna prisutno je uvećanje hepatocita, nakon 8 tjedana steatoza, nakon 12 tjedana upala i nakon 16 tjedana fibroza.

4.2. Uloga $\gamma\delta$ limfocita T i citokina IL-17A u promicanju upalnog odgovora u jetri

Iz jetre sam u različitim vremenskim razmacima od početka primjene SSD-a (2, 4, 8, 12 i 16 tjedana) izolirala ukupne jetrene limfocite centrifugiranjem s perkolom po principu odvajanja na gradijentu gustoće. Stanice sam potom stimulirala *in vitro* s PMA i ionomicinom kroz 4 sata te odredila učestalost stanica koje proizvode citokine. Najzastupljeniji citokin među izoliranim limfocitima bio je IL-17A. Specifično povećanje proizvodnje citokina IL-17A po SSD-u pokazali su samo jetreni limfociti (Slika 2). Protočnom citometrijom sam potom identificirala stanice koje su najveći izvor citokina IL-17A; $\gamma\delta$ limfociti T (Slika 3a). Uočila sam da je zastupljenost tih stanica puno veća u miševa koji su primali SSD nego u onih na NCD-u (Slika 3b).



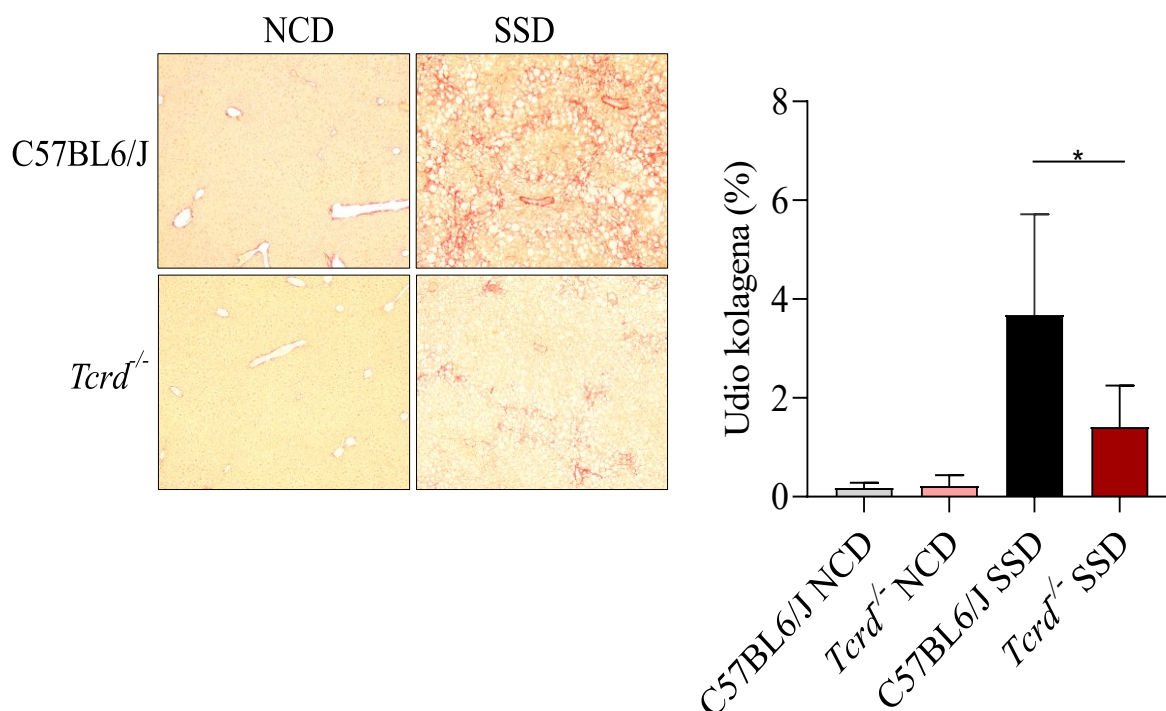
Slika 2. Razlika u zastupljenosti citokina IL-17A u miševa na NCD-u i miševa hranjenih SSD-om. Vidljiv je progresivan rast razine citokina IL-17A u miševa na SSD-u, u odnosu na miševe na NCD-u gdje su te razine manje, većinom stalne i ne pokazuju značajan rast kroz vrijeme.



Slika 3a i 3b. Razlika udjela stanica $\gamma\delta$ limfocita T između kontrolne skupine miševa na NCD-u i miševa na SSD-u te zastupljenosti istih unutar IL-17A producirajućih stanica.

4.3. Uloga $\gamma\delta$ limfociti T u nastanku fibroze jetre

Kako bih potvrdila hipotezu da su $\gamma\delta$ limfociti T važni za pokretanje fibroze u jetri, usporedila sam miševe s nedostatkom receptora TCRd (*TCRd $^{-/-}$* miševi) sa kontrolnim C57BL/6 miševima. Obje vrste miševa hranjene su SSD-om u trajanju od 16 tjedana. Histološki preparati su analizirani metodom bojanja pikrosirijus crvenilom, a dobivene promjene su kvantificirane (Image J software). Analiza je pokazala statistički značajno smanjenu prisutnost fibroze u tkivu jetre *TCRd $^{-/-}$* miševa što potvrdilo našu hipotezu da su $\gamma\delta$ limfociti T izrazito bitni u mehanizmu inicijacije i progresije NASH-a (**Slika 4a i 4b**).



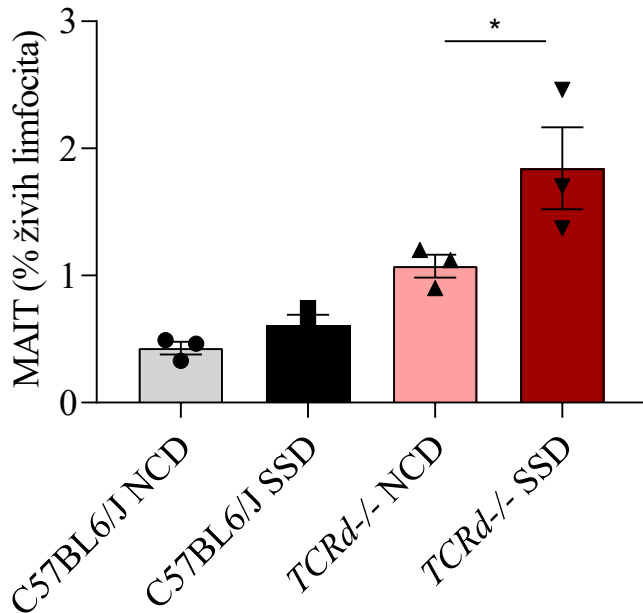
Slika 4a. Histološki preparati jetre bojani pikrosirius crvenilom u *TCRd*^{-/-} i C57BL/6 miševa. Vidljiva je značajno veća količina odloženog kolagena u kontrolnih C57BL/6 u odnosu na *TCRd*^{-/-} miševе hranjenih SSD-om. Obje vrste miševa hranjene NCD-om ne razvijaju fibrozu.

Slika 4b. Razlika u udjelu kolagena u jetri između C57BL/6 miševa i *TCRd*^{-/-} miševa. Veći postotak kolagena prisutan je u C57BL/6 miševa

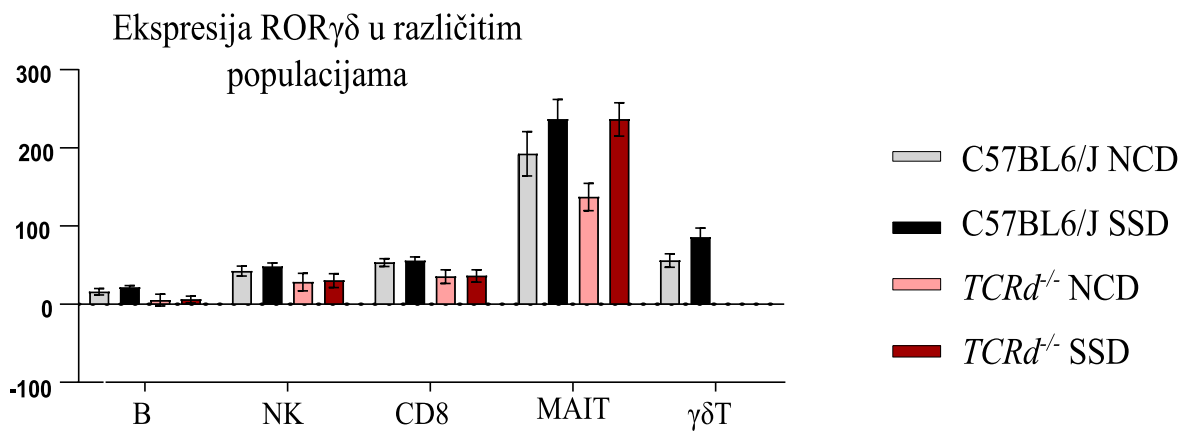
4.4. Uloga MAIT stanica kao izvora citokina IL-17A

MAIT stanice su uz $\gamma\delta$ limfocite T također vrlo važan izvor citokina IL-17A te pripadaju skupini limfocita T sa svojstvima urođene imunosti. Ispostavilo se da je zastupljenost MAIT stanica veća u *TCRd*^{-/-} miševima u odnosu na C57BL/6. Također, MAIT stanica je nađeno značajno više u *TCRd*^{-/-} miševima hranjenih SSD-om nego NCD-om (**Slika 5**). Daljnim istraživanjem ispitano je potencijal ovih stanica za lučenje citokina IL-17A tako što je obojen transkripcijski faktor ROR γ t (engl. retinoic acid-related orphan receptor gamma t) koji predstavlja regulator za ovaj citokin. Analizom uz pomoć pro- točne citometrije ispostavilo se da MAIT stanice čine većinu stanica koje posjeduju navedeni transkripcijski faktor (**Slika 6**). Da bi napravili korelaciju razvoja NASH-a u miševa s razvojem NASH-a u ljudi i da bi mogli utvrditi koje su stanice odgovorne za imunopatologiju progresije MAFLD-a u NASH

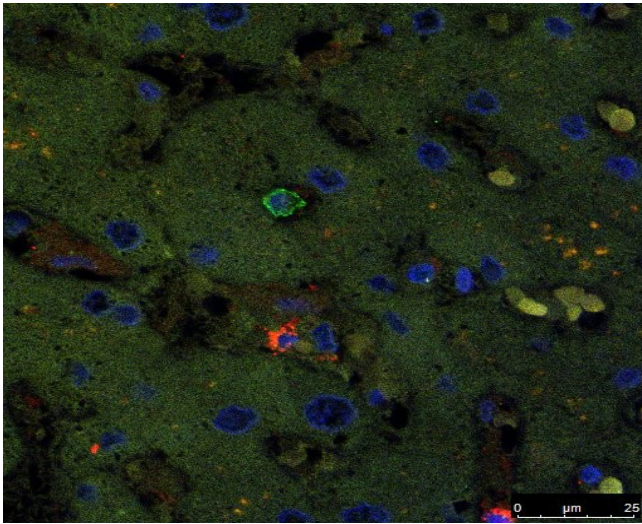
u ljudi, histološki sam analizirala ljudsku jetru. Ispostavilo se da u ljudskoj jetri nema znakova kolokalizacije stanica $\gamma\delta T$ i IL-17⁺ stanica. (Slika 7).



Slika 5. Zastupljenost MAIT stanica u jetri. Više je istoimenih stanica u $TCRd^{-/-}$ miševa u odnosu na C57B ali isto tako ih je više u onih $TCRd^{-/-}$ miševima na SSD-u u odnosu na NCD-u.



Slika 6. Zastupljenost stanica koje izražavaju transkripcijski faktora ROR γt u jetri. ROR γt je najviše prisutan u MAIT stanicama.



Slika 7. Histološki preparat ljudske jetre bojane imunoflorescentnim bojanjem. Vidljive su jezgre stanica (plavo) od kojih $\gamma\delta$ limfociti T (zeleno) ne pokazuju kolokalizaciju sa stanicama koje luče citokin IL-17A (crveno).

5. RASPRAVA

MAFLD je gorući javnozdravstveni problem današnjice jer zahvaća sve veći broj ljudi te nosi potencijal za razvoj ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma koji nadalje predstavljaju indikaciju za transplataciju jetre (19). Veliku ulogu u nastanku MAFLD-a ima nezdrava prehrana koja je u ovom radu imitirana SSD-om koja je izazvala promjene u vidu uvećanja hepatocita, steatoze, upale i fibroze kao kod ljudi. Miševi su na SSD-u imali više $\gamma\delta$ limfocita T i MAIT stanica već nakon samo 2 tjedna od početka dijete, veće razine IL-17A te značajnije odlaganje kolagena. Citokin IL-17A koji je značajno rastao u ovoj studiji tijekom progresije bolesti potiče lipolizu i infiltraciju neutrofila u masnom tkivu te progresiju steatohepatitisa u karcinom (12). Mi smo ustvrdili da je većina stanica koje proizvode ovaj citokin upravo $\gamma\delta$ limfocit T. $\gamma\delta$ limfociti T zajedno s $\alpha\beta$ T stanicama i neutrofilima stvarajući IL-17 aktiviraju Kupfferove i HSC stanice te tako djeluju poticajno na nastanak fibroze (12,13). S druge strane, oni $\gamma\delta$ limfociti T koji izražavaju CCR6, putem CCR6-CCL20 kemokinske osi koji se aktivira nakon ozljede jetre, lučenjem IL-17 i IL-22 potiču apoptozu HSC putem Fas/Fas liganda i tako djeluju antifibrogeno (11,12,13). Da se zaključiti, da učinak $\gamma\delta$ limfocita T nije uvijek isti te da ovisi prije

svega o njihovom fenotipu i citokinima koje luče. Tako $\gamma\delta$ limfociti T koji luče IL-17 mogu suprimirati imunostanice, a one koje luče IFN γ mogu dovesti do apoptoze hepatocita (13).

Njihovo djelovanje na upalu ponovno može biti zaštitno, ali i proupalno (3,12,13,20). IL-17 stimulirajući upalne stanice na proizvodnju upalnih kemokina i citokina indirektno izaziva upalu. Antagonističkim djelovanjem na IL-17 smanjuje se upala i progresija MAFLD-a u HCC (20,21). FGF21 (faktor rasta fibroblasta 21) koji se stvara u jetri kao posljedica metaboličkog stresa, pretilosti, šećerne bolesti i sl. putem negativne povratne sprege djeluje na TLR4 signal iz hepatocita i tako inhibira stvaranje IL-17A. FGF21 bi stoga mogao postati terapijska metoda koja bi mogla zaustaviti progresiju NASH-a u HCC (21).

Nadalje, ova studija istražuje važnost MAIT stanica u patogenezi NASH-a u ljudi. Zastupljenost navedenih stanica je veća u *TCR δ ^{-/-}* miševa hranjenih SSD-om nego istih miševa na NCD-u kako pokazuje ovo istraživanje. Mogu poticati proliferaciju te fibrogenu funkciju miofibroblasta putem MR1 (molekula povezana s MHC 1), a proupalnu funkciju istih stanica potiču lučenjem TNF i IL-17A (3,14,22). Međutim, u miševa na MCD-u se pokazalo da MAIT stanice (kojih je ponovno više nego na NCD-u) potiču protuupalne M2 makrofage te da posredstvom IL-4 i IL-10 djeluju protektivno na nastanak upale u jetri (3,14,23). To se protuupalno svojstvo MAIT stanica potvrdilo na *Mr^{-/-}* miševima (s manjkom MAIT stanica) koji su na istoj dijeti pokazali sklonost nastanku upale jetre (veća ekspresija TNF α , nakupljanje M1 proupalnih makrofaga) i steatoze (22,23). Poticajno djelovanje na fibrozu dokazano je isto u miševa s deficijencijom MAIT stanica koji su bili otporni na fibrozu (24,25). Fibroza nastaje tako što one potiču proliferaciju HSC putem IL-17A i direktnog međustaničnog kontakta (24,25,26). Njihov učinak u različitim imunološkim bolestima može dakle biti i štetan i zaštitan.

Broj MAIT stanica u krvi se također u većini kroničnih upalnih i autoimunskih bolesti smanjuje što može biti posljedica njihove migracije u zahvaćena tkiva ili povećane stanične smrti (22). U cirotičnoj jetri je također smanjen broj MAIT stanica, ali dolazi do promjene njihovog fenotipa (postaju CTLA4⁺, PD-1⁺ i IL-17⁺) te do njihove redistribucije u fibrotične septe (3,22,23,25). U pacijenata s

MAFLD-om je manje cirkulirajućih MAIT stanica, ali ih je više u jetri u odnosu na zdrave kontrolne skupine te se nakupljaju oko steatotičnih hepatocita (22,23,26). Broj istih stanica raste u akutnoj fazi nakon ozljede ili infekcije, ali prijelazom u kroničnu fazu njihov broj opada. Isto tako u MAFLD-u jetra obiluje imunosnim stanicama i ta upala doseže vrhunac u NASH-u, da bi se u HCC ista suprimirala (28).

U pretilih ljudi MAIT stanice pokazuju proupalno djelovanje u masnom tkivu i ileumu (29). U masnom tkivu luče IL-17 što izaziva inzulinsku rezistenciju (22). Dovode do promjena crijevne mikrobiote ileuma što potiče upalu i tako remeti integritet crijevne barijere s posljedičnom endotoksemijom koja dalje inducira inzulinsku rezistenciju (28, 29). MAIT stanice su u ovom radu pokazale veliki potencijal za proizvodnju IL-17 što se dokazalo bojanjem transkripcijskog faktora ROR γ t čime se dobilo da su većina stanica koja sadrže taj faktor upravo MAIT stanice. Navedeni faktor regulira ekspresiju citokina IL-17 i razvoj TH17 stanica. Ekspresija ROR γ t mRNA raste u uznapredovalom HCC i to u korelaciji s veličinom tumora. ROR γ t bi stoga mogao poslužiti kao prognostički faktor za uznapredovalu cirozu i razvoj HCC (24). S obzirom da je ljudska jetra, za razliku od mišje, bogata MAIT stanicama (20-50% limfocita jetre), a siromašna $\gamma\delta$ limfocitima T (3-5 % limfocita jetre) smatramo da bi upravo one mogle biti odgovorne za inicijaciju upale u jetri i progresiju MAFLD-a u NASH, što bi koreliralo sa ulogom $\gamma\delta$ limfocitima T u miševa (3,14). Više različitih istraživanja je prepoznalo važnost MAIT stanica i njihovu moguću terapijsku svrhu (27, 28, 29).

6. ZAKLJUČAK

Inicijacija upalnog odgovora ključni je događaj u progresiji MAFLD-a u NASH, cirozu i HCC. Ovim istraživanjem ističe se centralna uloga $\gamma\delta$ limfocita T u miševa, odnosno MAIT stanica u ljudi, u razvoju i daljnjem napredovanju MAFLD-a. Rezultati istraživanja ukazuju na dvojak funkciju obiju stanica; ona može biti u određenom dijelu i zaštitna i štetna. Obje stanice sadrže sposobnost lučenja citokina IL-17A, koji djeluje poticajno na stvaranje upale i fibroze, a progresivno raste tijekom primjene SSD-a u ovom radu. MAIT stanice i $\gamma\delta$ limfociti T direktno ili putem IL-17A potiču proliferaciju HSC i tako dovode do fibroze (12,13,23,25,26). Uz njih fibrozu potiču i neke druge stanice poput NKT, ILC2, Th2, Th17 i dr. Početak patogeneze ove bolesti je pretilost. U pretilih pacijenata dolazi do promjena sastava crijevne mikrobiote (u čemu sudjeluju i MAIT stanice) što narušava integritet crijevne barijere te je povezano s većim razinama TNF- α koji zajedno s IL-1 β promovira nastanak inzulinske rezistencije. Inzulinska rezistencija začetak je metaboličkog sindroma čija je jetrena manifestacija NASH. Ona potiče lipolizu koja posljedično dovodi do širenja i odlaganja masnih kiselina u hepatocite jetre odnosno nastanak steatoze. Povećana propusnost crijeva dovodi do translokacije bakterija, endotoksina i štetnih metabolita koji mogu izazvati upalu jetre. Zbog složene patofiziologije pristup ovoj bolesti zahtjeva multidisciplinarnost. Uz rani probir i dijagnostiku potrebna su i daljnja istraživanja koja bi nam omogućila daljnje razumijevanje patogeneze i otkrivanje više terapijskih mogućnosti. Zaključno, djelovanje MAIT stanica je široko te nije štetno samo na razini jetre već i crijeva te cijelog metaboličkog sustava. Stoga se može pretpostaviti da će one predstavljati u budućnosti novu terapijsku metu u liječenju MAFLD-a.

7. SAŽETAK

Nealkoholni steatohepatitis je najčešća bolest jetre. Važnost u proučavanju mehanizama nastanka ove bolesti leži u rastućoj prevalenciji, mogućoj malignoj progresiji i nedostatnoj terapiji. Ključni patofiziološki događaji u nastanku NASH-a su steatoza i lipotoksično djelovanje masnih kiselina, oksidativni stres koji oštećuje hepatocite, povećana propusnost crijevne barijere, upala koju čine pridodane stanice urođenog i stečenog imuniteta te odlaganje kolagena koje dovodi do fibroze. U progresiji bolesti najvažniju ulogu imaju $\gamma\delta$ limfociti T u miševa, što najvjerojatnije odgovara MAIT stanicama u čovjeka. Obje vrste stanica stvaraju citokin IL-17A čiji udio u jetri tijekom vremena progresivno raste, a čije je djelovanje dominantno poticajno na nastanak upale i fibroze.

Ključne riječi: fibroza, upala, imunost, steatohepatitis

8. SUMMARY

Non-alcoholic steatohepatitis is the most common liver disease. The importance in studying mechanisms of this disease lies in the growing prevalence, possible malignant progression and insufficient therapy. The key pathophysiological events in the development of NASH are steatosis and lipotoxicity of fatty acids, oxidative stress that damages hepatocytes, increased permeability of intestinal barriers, inflammation made by innate and adaptive immune cells and collagen deposition leading to fibrosis. The most important role in disease progression is played by $\gamma\delta$ T cells in mice, which most likely corresponds to MAIT cells in humans. Both cell types produce cytokine IL-17A that increases progressively over time and acts predominantly negative on the development of inflammation and fibrosis.

Key words: fibrosis, immunity, inflammation, steatohepatitis

9. LITERATURA

1. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 20.izd. McGraw-Hill; 2018.
2. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. 2016; 61(5):1294-303.
3. Chen Y, Tian Z. Roles of Hepatic Innate and Innate-Like Lymphocytes in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Front Immunol* [Internet]. 16.7.2020. [citirano 27.4.2021]; 2020;11:1500. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01500/full>
4. Sanches SC, Ramalho LN, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int* [Internet]. 3.5.2015 [citirano 27.4.2021]; 2015:574832. Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/574832/>
5. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7): 2043.
6. Alisi A, Carsetti R, Nobili V. Pathogen- or damage-associated molecular patterns during nonalcoholic fatty liver disease development. *Hepatology*. 2011;11(5):1500-2.
7. Vajro P, Paoletta G, Fasano A. Microbiota and gut-liver axis: A mini-review on their influences on obesity and obesity related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 1.5.2013. [citirano 14.5.2021]; 2013;56(5):461-8. Dostupno na: https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2013/05000/Microbiota_and_Gut_Liver_Axis_Their_Influences_on.2.aspx
8. Bieghs V, Trautwein C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(6):377-85.
9. Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis*. 2015;14:121.
10. Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol*. 2018;29(1):14-21.

11. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3):181-94.
12. Zhou QH, Wu FT, Pang LT, Zhang TB, Chen Z. Role of $\gamma\delta$ T cells in liver diseases and its relationship with intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2020;26(20):2559-69.
13. Hammerich L, Tacke F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(2):107-13.
14. Bertrand L, Lehuen A. MAIT cells in metabolic diseases. *Mol Metab.* 2019;27(Suppl):114-21.
15. Mokhtari Z, Gibson DL, Hekmatdoost A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. *Adv Nutr [Internet].* 10.3.2017. [citirano 28.4.2021]; 2017;8(2):240-52. Dostupno na: <https://academic.oup.com/advances/article/8/2/240/4558033>
16. Tsuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol.* 2018;69(2):385-95.
17. Abenavoli L, Boccuto L, Federico A, Dallio M, Loguercio C, Di Renzo L, De Lorenzo A. Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Mediterranean Way. *Int J Environ Res Public Health [Internet].* 21.8.2019. [citirano 29.4.2021]; 2019;16(17):3011. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/17/3011/htm>
18. Abenavoli L, Greco M, Milic N, Accattato F, Foti D, Gulletta E, Luzzza F. Effect of Mediterranean Diet and Antioxidant Formulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Study. *Nutrients [Internet].* 12.8.2017. [citirano 30.4.2021]; 2017;12(9):870. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/8/870/htm>

19. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Mijic M, Jakopcic I, Milic S, Hrstic I, Sobocan N, Stimac D, Burra P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation - Where do we stand? *World J Gastroenterol.* 2018;24(14):1491-506.
20. Klemann C, Schröder A, Dreier A, Möhn N, Dippel S, Winterberg T et al. Interleukin 17, Produced by $\gamma\delta$ T Cells, Contributes to Hepatic Inflammation in a Mouse Model of Biliary Atresia and Is Increased in Livers of Patients. *Gastroenterology* [Internet]. 25.9.2015. [citirano 3.5.2021]; 2015;150(1):229-41. Dostupno na: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(15\)01352-9/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fwww.gastrojournal.org%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(15)01352-9/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fwww.gastrojournal.org%2F)
21. Zheng Q, Martin RC, Shi X, Pandit H, Yu Y, Liu X, Guo W, Tan M, Bai O, Meng X, Li Y. Lack of FGF21 promotes NASH-HCC transition *via* hepatocyte-TLR4-IL-17A signaling. *Theranostics.* 2020;10(22):9923-36.
22. Toubal A, Nel I, Lotersztajn S, Lehuen A. Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;19:643–57.
23. Li Y, Huang B, Jiang X, Chen W, Thang J, Wei Y et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Regulating Macrophage Polarization. *Front Immunol* [Internet]. 4.9.2018. [citirano 7.6.2021.]; 2018;9:1994. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01994/full>
24. El Bassuoni MA, Soliman MA, El Megeed NA, Al Gazar A. IL-17 Producing Cells and ROR γ t mRNA Transcriptional Factor in Cirrhotic and HCC Egyptian Patients. *Egypt J Immunol.* 2015;22(1):59-68.
25. Hegde P, Weiss E, Paradis V, Wan J, Mabire M, Sukriti S et al. Mucosal-associated invariant T cells are a profibrogenic immune cell population in the liver. *Nat Commun.* 2018; 9(1):2146.

26. Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, Roccarina D, Rosselli M, Hall A et al. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. *Hepatology*. 2018; 68(1):172-86.
27. Zeng F, Zhang Y, Han X, Zeng M, Gao Y, Weng J. Predicting Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression and Immune Deregulations by Specific Gene Expression Patterns. *Front Immunol* [Internet]. 26.1.2021. [citirano 7.6.2021]; 2021;11:3568. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.609900/full#h4>
28. Toubal A, Kiaf B, Beaudoin L, Cagninacci L, Rhimi M, Fruchet B et al. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and intestinal dysbiosis leading to metabolic dysfunction during obesity. *Nat Commun*. 2020;11(1):3755.
29. Hinks TSC, Marchi E, Jabeen M, Olshansky M, Kurioka A, Pediongco TJ et al. Activation and *In Vivo* Evolution of the MAIT Cell Transcriptome in Mice and Humans Reveals Tissue Repair Functionality. *Cell Rep* [Internet]. 7.9.2019. [citirano 7.6.2021]; 2019;28(12):3249-62. Dostupno na: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(19\)309362?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124719309362%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(19)309362?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124719309362%3Fshowall%3Dtrue)

10. ŽIVOTOPIS

Marija Zubčić rođena je 10. srpnja 1996. u Zadru. Nakon završetka Osnovne škole Šimuna Kožičića Benje 2011. upisuje Gimnaziju Vladimira Nazora u Zadru, opći smjer. Akademske godine 2015/2016. upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Na fakultetu sudjeluje u radu udruge CroMSIC kao aktivni član. Također je član pjevačkog zbora Medicinskog fakulteta u Rijeci, AXIS. Tijekom pandemije COVID-19 volontira na OHBP Sušak i na COVID intenzivnom odjelu. Aktivno se služi engleskim jezikom.