

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Dina Šišljagić

UTJECAJ MASNE I SLATKE PREHRANE NA MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE
ZNAČAJKE MATERNICE I POTKOŽNOG I PERIGONADALNOG MASNOG TKIVA
SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORICA

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Dina Šišljagić

UTJECAJ MASNE I SLATKE PREHRANE NA MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE
ZNAČAJKE MATERNICE I POTKOŽNOG I PERIGONADALNOG MASNOG TKIVA
SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORICA

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Andrijana Muller, dr. med.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Senka Blažetić

Rad ima 84 stranica.

PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija izrađena je na uzorcima prikupljenim u okviru projekta "RECOOP-CMSC SENIOR SCIENTIST (RCSS) GRANT 2018-2020 #012", "The role of obesity-induced low-grade inflammation in the adipokine signaling in pregnant rat uterus", financiranim dijelom od strane RECOOP-CMSC, a dijelom od strane voditelja i partnera na projektu.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Robertu Gasparu, pod čijim vodstvom je na Odjelu za farmakologiju i farmakoterapiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Szegedu, Mađarska, provedena prva faza studije.

Zahvaljujem se voditeljima i djelatnicima Laboratorija za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Laboratorija Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju, Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayer u Osijeku, gdje je u sklopu ove doktorske disertacije provedena druga faza istraživanja koja se odnosi na analizu prikupljenih uzoraka masnog tkiva i uzoraka maternice.

Od srca hvala, mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Andrijani Muller i mojoj komentorici, izv. prof. dr. sc. Senki Blažetić čije su mudrosti, strpljenje i nesebična podrška bili neizostavni vodiči na ovom putu. Njihova posvećenost, ne samo mom radu, već i mom rastu kao istraživača i čovjeka, bila je snaga koja me gurala naprijed čak i u trenucima sumnje. Hvala vam što ste vjerovali u mene čak i onda kada sam ja sumnjala, što ste strpljivo slušale, usmjeravale me i poticale da tražim odgovore tamo gdje ih drugi možda ne bi očekivali. Vaše znanje i iskustvo bili su mi oslonac u svijetu akademskih izazova. Bez vaše podrške ovaj rad ne bi bio isti, još važnije, ni ja ne bih bila ista. Hvala vam što ste primjerom pokazale kako se znanje nosi sa dostojanstvom, kako se znanost gradi sa strašću i kako se mentorstvo živi sa srcem.

Obzirom na sve brojnije probleme vezane uz reproduktivno zdravlje žene, osobito povećan broj operativno dovršenih trudnoća zbog primarne i sekundarne inercije maternice uz istovremeno rastući broj pretilih osoba, ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju biokemijskih mehanizama u podlozi promjena uvjetovanih načinom prehrane u trudnoći, što predstavlja dobar temelj za buduća translacijska i klinička istraživanja.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima, Jadranki i Vladimiru koji su mi od prvog daha bili stup na kojem sam gradila svoje snove, oslonac kada su se koraci kolebali, jedro koje me nosilo naprijed i sidro koje me uvijek vraćalo osnovama - ljubavi, poštenju i znanju. Vaša nesebična potpora, strpljenje i vjera u mene utkali su se u svaku riječ ovog rada. Davidu, suputniku na ovom i svim drugim putovanjima koji je svojim razumijevanjem, strpljenjem i tihom snagom bio moj zaklon u olujnim danima i vjetar u leđa kada su snovi tražili hrabrost. Bez tebe, ovaj put bi bio teži, a ciljevi dalji. Mojim dječacima, Mari i Oskaru koji su mi pokazali da su i najteži putevi lakši kada ih prati ljubav. Vaš osmijeh bio je svjetionik u dugim noćima rada, a Vaša radoznalost podsjetnik da ne odustanem. Ovo je naš zajednički put, siguran i miran jer ste vi bili moj kompas, moje more i moja sigurna luka, oduvijek i zauvijek.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija i patogeneza pretilosti	1
1.2. Pretilost i poremećaj reproduktivne funkcionalnosti	4
1.3. Morfologija i fiziologija masnog tkiva	5
1.3.1. Vrste masnog tkiva	5
1.3.2. Raspodjela masnog tkiva u organizmu	7
1.3.3. Endokrina funkcija masnog tkiva	9
1.4. Metabolički poremećaji	9
1.4.1. Inzulinska rezistencija	9
1.4.2. Leptinska rezistencija	12
1.4.3. Mitohondrijska disfunkcija u pretilosti	17
1.5. Struktura i funkcija maternice: humani i štakorski model	20
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1. Animalni model i dizajn studije	26
4.2. Protokol prikupljanja i pripreme uzoraka tkiva za analizu	28
4.3. Histomorfometrija masnog tkiva i maternice	29
4.3.1. Hematoksilin-eozin bojanje masnog tkiva i maternice	29
4.3.2. Picrosirius red bojanje tkiva maternice	29
4.3.3. PAS bojanje (reakcija s perijodnom kiselinom i Schiffovim reagensom)	30
4.4. Imunohistokemijska analiza leptinskog i inzulinskog receptora, UCP1 i UCP3 proteina u tkivu maternice	30
4.5. Statistička analiza podataka	32
5. REZULTATI	33
5.1. Utjecaj HFHSD na tjelesnu masu, količinu pojedene hrane i masu masnog tkiva i maternice gravidnih Sprague Dawley štakorica	33
5.2. Utjecaj HFHSD na površinu i broj adipocita gravidnih Sprague Dawley štakorica	35
5.3. Utjecaj HFHSD na lumen maternice, miometrij, endometrij i perimetrij gravidnih Sprague Dawley štakorica	40
5.4. Utjecaj HFHSD na količinu kolagena u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica	42
5.5. Utjecaj HFHSD na količinu glikogena u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica	43
5.6. Utjecaj HFHSD na izražaj inzulinskog receptora u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica	44
5.7. Utjecaj HFHSD na izražaj leptinskog receptora u maternici gravidnih Sprague Dawley	

štakorica.....	45
5.8. Utjecaj HFHSD na izražaj UCP1 u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica.....	46
5.9. Utjecaj HFHSD na izražaj UCP3 u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica.....	47
6. RASPRAVA.....	49
7. ZAKLJUČCI.....	56
8. SAŽETAK.....	58
9. SUMMARY.....	60
10. LITERATURA.....	62
11. ŽIVOTOPIS.....	80
12. PRILOZI.....	84

POPIS KRATICA:

ITM	Indeks tjelesne mase (<i>prema engl. Body Mass Index, BMI</i>)
WHR	Mjera omjera opsega struka i bokova (<i>prema engl. Waist hip ratio, WHR</i>)
CNS	Središnji živčani sustav (<i>prema engl. Central nervous system, CNS</i>)
NPY	Neuropeptid Y (<i>prema engl. Neuropeptide Y, NPY</i>)
AgRP	Aguti-srodan peptid (<i>prema engl. Agoutirelated protein, AgRP</i>)
POMC	Proopiomelanokortin (<i>prema engl. Proopiomelanocortin, POMC</i>)
CART	Kokain- i amfetamin-regulirajući transkript (<i>prema engl. Cocaine and amphetamine-regulated transcript</i>)
SHBG	Globulin koji veže spolne hormone (<i>prema engl. Sex-hormone binding globulin, SHBG</i>)
IGFI	Faktor rasta sličan inzulinu 1 (<i>prema engl. Insulin-like growth factor 1, IGF-1</i>)
TGFB	Transformirajući faktor rasta beta (<i>prema engl. Transforming growth factor beta, TGFB</i>)
LH	Luteinizirajući hormon (<i>prema engl. Luteinizing hormon, LH</i>)
ATM	Makrofazi masnoga tkiva (<i>prema engl. Adipose tissue macrophages, ATM</i>)
BAT	Smeđe masno tkivo (<i>prema engl. Brown adipose tissue, BAT</i>)
WAT	Bijelo masno tkivo (<i>prema engl. White adipose tissue, WAT</i>)
UCP1, UCP2 i UCP3	Proteini razdvajanja (<i>prema engl. Uncoupling proteins, UCP</i>)
ATP	Adenozin trifosfat (<i>prema engl. Adenosine triphosphate, ATP</i>)
SVF	Stromalna vaskularna frakcija (<i>prema engl. Stroma-vascular fraction, SVF</i>)
T stanice	T limfociti (<i>prema engl. T lymphocytes, T-ly</i>)
NK-stanice	Prirodne stanice ubojice (<i>prema engl. Natural killer cells, NK</i>)
IR	Inzulinski receptor (<i>prema engl. Insuline receptor, IR</i>)

OB gen	gen za pretilost (<i>prema engl. .Obese gene, OB</i>)
Ob-R	Leptinski receptor (<i>prema engl. Obese receptor, ObR</i>)
DB gen	Gen za dijabetes (<i>prema engl. Diabetes gen, DB</i>)
RNA	Ribonukleinska kiselina (<i>prema engl. Ribonucleic acid, RNA</i>)
JAK/STAT	Janus kinaza signalni put i aktivator transkripcije (<i>prema engl. Janus kinase signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT</i>)
PI3K	Fosfatidilinozitol kinaza (<i>prema engl. Phosphatidyl inositol kinase, PI3K</i>)
PDE3B	Fosfodiesteraza 3B (<i>prema engl. Phosphodiesterase 3B, PDE3B</i>)
C AMP	Ciklički AMP prema (<i>engl. Cyclic adenosine monophosphate, cAMP</i>)
MSH	Hormon stimulacije melanocita (<i>prema engl. Melanocyte stimulation hormon, MSH</i>)
TRH	Tireotropin-oslobađajući hormon (<i>prema engl. Tireotropine realesing hormon, TRH</i>)
GnRH	Gonadotropin oslobađajući hormon (<i>prema engl. Gonadotropin realeasing hormon, GnRH</i>)
MMP	Matriks metaloproteinaze (<i>prema engl. Matrix metalloproteinase, MMP</i>)
BSA	Albumin iz goveđeg seruma (<i>prema engl. Bovine serum albumin, BSA</i>)
PBS	Fiziološka otopina puferirana fosfatom (<i>prema engl. Phosphate buffered saline, PBS</i>)
HRP	Biotinilirana peroksidaza iz hrena (<i>prema engl. Horseradish peroxidase, HRP</i>)
SD	Standardna laboratorijska hrana (<i>prema engl. Standard diet, SD</i>)
HFHSD	Hrana bogata mastima i šećerima (<i>prema engl. High fat high sugar diet, HFHSD</i>)
GF	Perigonadalno masno tkivo (<i>prema engl. Gonadal fat, GF</i>)
VF	Visceralno masno tkivo (<i>prema engl. Visceral fat, VF</i>)
PF	Ružičasto masno tkivo (<i>prema engl. Pink fat</i>)

SF	Potkožno masno tkivo (<i>prema engl. Subcutaneous fat</i>)
W5C5(+)	Matične stanice endometrija koje izražavaju W5C5 marker na svojoj površini (<i>prema engl. W5C5(+) endometrial cells, W5C5(+)</i>)
W5C5(-)	Matične stanice endometrija koje ne izražavaju W5C5 marker na svojoj površini (<i>prema engl. W5C5(-) endometrial cells, W5C5(-)</i>)
MSC	Miometrijske matične stanice (<i>prema engl. Myometrial Stem Cells, MSC</i>)
Wnt/ β -katenin	Wingless/Integration β -katenin signalni put (<i>prema engl. Wingless/Integration β-katenin signaling pathway, Wnt/β-katenin</i>)
TGF- β /SMAD	Transforming Growth Factor-beta/SMAD signalni put (<i>prema engl. Transforming Growth Factor-beta/SMAD signaling pathway, TGF-β/SMAD</i>)

POPIS TABLICA:

Tablica 4.1.1. Sastav hrane standardna dijeta (SD) (1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka) i hrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka).....	27
Tablica 4.4.1. Prikaz primarnih protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi.....	31
Tablica 5.1.1. Promjena tjelesne mase štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) tijekom eksperimenta.....	33
Tablica 5.1.2. Prosječna masa konzumirane hrane tijekom eksperimenta kod štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD).....	34
Tablica 5.1.3. Mase masnih tkiva i maternice kod štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) na zadnji dan trudnoće (u dobi od 12 tjedana).....	35

POPIS SLIKA:

Slika 1.1. Udio osoba s prekomjernom tjelesnom težinom u populaciji.....	2
Slika 1.3.1. Distribucija masnog tkiva kod ljudi i štakorica.....	8
Slika 1.4.1. Uloga prijenosnika inzulina 4 (GLUT4) u inzulinskoj rezistenciji.....	10
Slika 1.4.2. Leptinski signalni put.....	16
Slika 1.4.3. Mehanizam djelovanja UCP1 i UCP3 proteina na stvaranje i oslobađanje energije u mitohondrijima smeđeg masnog tkiva.....	19
Slika 1.5.1. Histološki presjek humane maternice.....	21
Slika 1.5.2. Usporedna ilustracija reproduktivnih sustava kod ljudi i štakora.....	22
Slika 1.5.3. Histološki presjek maternice štakora.....	23
Slika 4.1.1. Eksperimentalne grupe životinja i dizajn eksperimenta.....	28
Slika 5.2.1. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize gonadalnog (GF) i visceralnog (VF) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD).....	36
Slika 5.2.2. Histomorfometrijska analiza gonadalnog (GF) i visceralnog masnog tkiva (VF) Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD).....	37
Slika 5.2.3. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize subkutanog (SF) i ružičastog (PF) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD).....	38
Slika 5.2.4. Histomorfometrijska analiza subkutanog perigonadalnog (SF) i visceralnog ružičastog (PF) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD).....	39
Slika 5.2.5. Histološki prikaz ružičastog masnog tkiva dojke kod SD i HFHSD skupina.....	40

Slika 5.3.1. Usporedba histoloških presjeka maternica grupe štakorica na SD i grupe štakorica na HFHSD.....	41
Slika 5.3.2. Veličina lumena maternice, te debljina miometrija, endometrija i perimetrija.....	42
Slika 5.4.1. Količina kolagena u maternici Sprague Dawley štakorica.....	43
Slika 5.5.1. Količina glikogena u maternici Sprague Dawley štakorica.....	44
Slika 5.6.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za inzulinski receptor (IR) u maternici Sprague Dawley štakorica.....	45
Slika 5.7.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za leptinski receptor (ObR) u maternici Sprague Dawley štakorica.....	46
Slika 5.8.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za UCP1 protein u maternici Sprague Dawley štakorica.....	47
Slika 5.9.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za UCP3 protein u maternici Sprague Dawley štakorica.....	48

1. UVOD

Pretilost i s njom povezane zdravstvene implikacije, predstavljaju temeljne javnozdravstvene probleme na globalnoj razini u suvremenom svijetu. Zbog toga posljednjih nekoliko desetljeća govorimo o pretilosti kao epidemiji koja je zahvatila moderno društvo (1, 2). Višak tjelesne masti smatra se rezultatom takozvanog zapadnog stila života koji je obilježen unosom hrane većim od količine potrošene energije u organizmu. Danas to smatramo jednim od ključnih izazova za suvremenog čovjeka jer su promjene u metabolizmu masnog tkiva prediktivni faktor za razvoj različitih bolesti (3, 4).

1. 1. Epidemiologija i patogeneza pretilosti

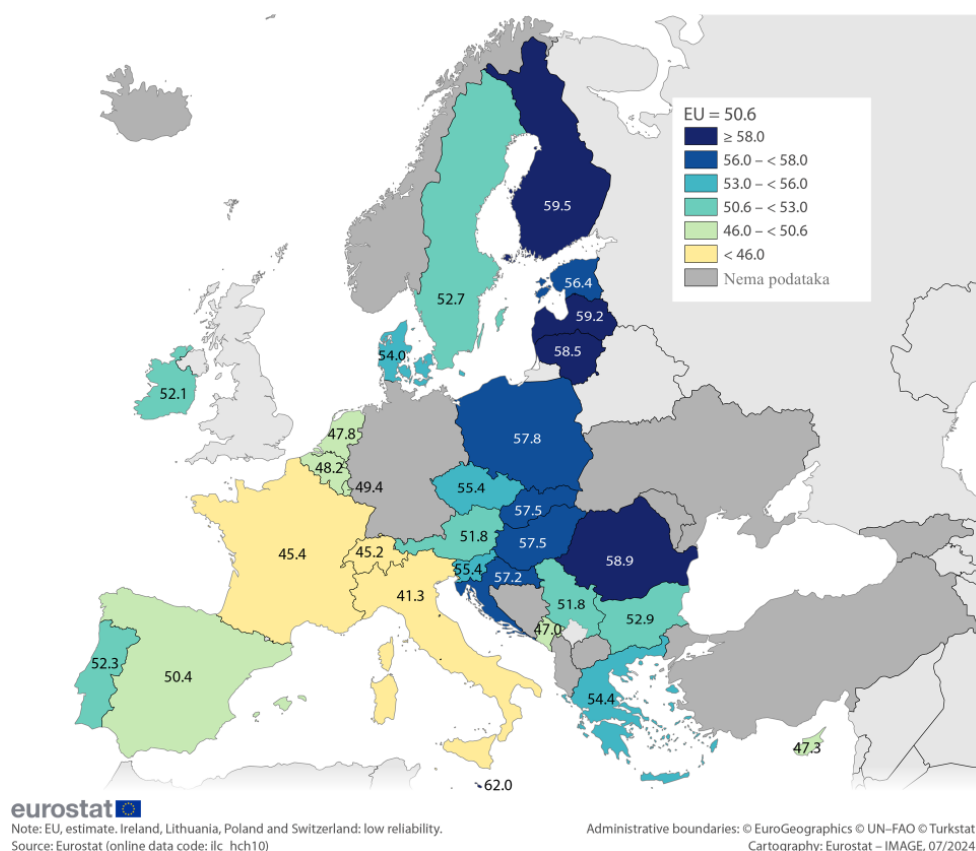
Pretilost je kronična, multifaktorijska, metabolička bolest karakterizirana prekomjernim nakupljanjem masnog tkiva u organizmu. Svjetska zdravstvena organizacija definira pretilost kao bolest u kojoj je višak masnog tkiva u organizmu toliki da ugrožava zdravlje pojedinca i predstavlja globalni zdravstveni problem (5). Regulacija unosa i potrošnje energije u svrhu održavanja energetske homeostaze složena je kaskada biokemijskih reakcija i procesa reguliranih hormonima i neuropeptidima (6, 7, 8).

U kliničkoj praksi za procjenu pretilosti upotrebljavamo indeks tjelesne mase, ITM (*prema engl. Body Mass Index*, BMI), koji dobro korelira s količinom masnog tkiva, a izračunava se na način da se tjelesna masa pojedinca u kilogramima podijeli s tjelesnom visinom u metrima na kvadrat (kg/m^2). Dobivene vrijednosti potom kategoriziramo na sljedeći način: pothranjenost ($<18,5 \text{ kg/m}^2$), normalna tjelesna masa ($18,5\text{--}24,9 \text{ kg/m}^2$), preuhranjenost ($25,0\text{--}29,9 \text{ kg/m}^2$) i debljina ili pretilost ($>30 \text{ kg/m}^2$), koja se može podijeliti u tri stupnja: od $30\text{--}34,9 \text{ kg/m}^2$ debljina prvog stupnja, od $35\text{--}39,9 \text{ kg/m}^2$ drugog stupnja, a iznad 40 kg/m^2 debljina trećeg stupnja (9).

Za dodatnu procjenu nakupljanja visceralnog masnog tkiva koristimo mjeru omjera opsega struka i bokova (*prema engl. waist hip ratio*, WHR). Prekomjerno nakupljanje visceralnog masnog tkiva predstavlja povećan rizik za oboljenje od metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti jer je općeprihvaćen stav da su masne nakupine, smještene između pojedinih visceralnih organa u

trbušnoj šupljini, metabolički aktivnije i predstavljaju značajno veću opasnost za ukupno zdravlje pojedinca od potkožnih masnih nakupina (10). Visceralno masno tkivo rezervoar je različitih upalnih citokina i adipokina koji igraju važnu ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma i inzulinske rezistencije (11, 12).

Prema navodu Eurostata iz 2019. godine, Republika Hrvatska, od svih zemalja Europske unije, imala je najveću prevalenciju osoba s prekomjernom tjelesnom težinom pa je tako istraživanje pokazalo da je 65% odrasle populacije, koji su tada živjeli u Republici Hrvatskoj, bolovalo od pretilosti od čega je udio pojedinaca s debljinom bio 23%, a s preuhranjenošću 42%. Prema najnovijim podacima Eurostata iz 2022. godine uočen je pozitivni trend među populacijom RH u smislu pada prevalencije debljine na 17% i prekomjerne tjelesne mase na 41%. Te brojke su nas smjestile na 9. mjesto u svijetu s udjelom od 58% odraslih osoba koje su imale prekomjernu tjelesnu masu ili debljinu (Slika 1.1.).



Slika 1.1. Udio osoba s prekomjernom tjelesnom težinom u populaciji (Izvor slike: Eurostat, 2022.). Web izvor 1.

Energiju unosimo u obliku hrane, a trošimo je bazalnim metabolizmom, termogenezom, biosintezom masti i fizičkom aktivnošću koja je najpromjenjivija komponenta potrošnje energije i uključuje energiju potrošenu na bilo kakvu tjelesnu aktivnost, pri čemu ukupna potrošnja energije ovisi o količini fizičke aktivnosti i utrošku energije potrebnom za tu aktivnost (13). Kada se unosi veća količina energije nego što organizam troši, dolazi do povećanja tjelesne mase i razvoja pretilosti jer se gotovo sav višak energije pohranjuje u organizmu u obliku masti. Zbog toga pretilost promatramo kao stanje u kojem energetske unos u organizam kontinuirano nadilazi energetske potrošnje. Etiologija pretilosti vrlo je složena jer uključuje interakciju više čimbenika. Unos hrane i energetska potrošnja u ljudskom organizmu pod kontrolom su centara smještenih u hipotalamusu i moždanom deblu (8). Hipotalamus ima ključnu ulogu u kontroli apetita i unosa hrane na način da integrira metaboličke i nutritivne signale prilagođavajući unos hrane i potrošnju energije trenutnim metaboličkim potrebama (6, 7). Građen je od više jezgara koje su osjetljive na nutrijente i hormone. U lateralnim jezgrama hipotalamusa smješten je centar za glad, a u ventromedijalnim jezgrama centar za sitost. Neuroni, koji polaze iz arkuatne jezgre hipotalamusa, dijele se u dvije vrste prema svojoj funkciji, ovisno potiču li ili suprimiraju unos hrane. Neuroni, koji oslobađaju neuropeptid Y (*prema engl. neuropeptide Y, NPY*) i Aguti-srodan peptid (*prema engl. agoutirelated protein, AgRP*), stimuliraju unos hrane, a neuroni koji oslobađaju proopiomelanokortin (*prema engl. proopiomelanocortin, POMC*) te kokain- i amfetamin-regulirajući transkript (*prema engl. cocaine- and amphetamine-regulated transcript, CART*) inhibiraju unos hrane (14). U moždane centre s periferije dolaze različiti podražaji, glukoza, leptin, grelin, adiponektin, rezistin i inzulin, koji utječu na sintezu neuropeptida u hipotalamusu (15). Leptin djeluje na način da aktivira neurone POMC/CART i istovremeno inhibira neurone NPY/AgRP, što u konačnici dovodi do smanjenog unosa hrane i povećanja energetske potrošnje. Grelina, ima suprotno djelovanje od leptina i aktivira neurone NPY/AgRP, što rezultira porastom unosa hrane i smanjenjem energetske potrošnje (14, 15).

1.2. Pretilost i poremećaj reproduktivne funkcionalnosti

Mehanizmi, kojima pretilost utječe na funkcije reproduktivnog sustava, nisu do kraja razjašnjeni, ali uvriježen je stav da važnu ulogu imaju funkcionalni hiperandrogenizam i hiperinzulinemija udružena s inzulinskom rezistencijom (16). Povećana koncentracija inzulina u krvi suprimira jetrenu sintezu globulina koji veže spolne hormone (*prema engl. sex-hormone binding globulin, SHBG*). Zbog smanjenja razine SHBG-a, povećava se razina funkcionalnih androgena, koji prematurne folikule vode u atreziju, što rezultira anovulatornim ciklusima (17). Stoga je nakupljanje androgena glavni čimbenik koji vodi prema disfunkciji ovulacije zbog čega su oplodnja i implantacija otežani ili potpuno onemogućeni (18, 19, 20, 21). Još davne 1934. godine Stein i Leventhal opisali su poveznicu između pretilosti i poremećaja reprodukcije. Nazvali su to sindromom „O“ prema engleskoj skraćenici (*engl. Overnourishment, Overproduction of insulin, Ovarian confusion, Ovulation disruption*) koji podrazumijeva prejedanje, prekomjerno stvaranje inzulina, smetnje jajnika i poremećaj ovulacije (19). Leptin u fiziološkim uvjetima ometa steroidogenezu u teka i granulosa stanicama jajnika simultano djelujući kroz antagonizam stimulacijskih faktora: inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (*prema engl. Insulin like Growth Factor I, IGF1*), transformirajućeg faktora rasta β (*prema engl. Transforming Growth Factor β , TGF- β*), inzulina i luteinizirajućeg hormona (*prema engl. Luteinizing hormone, LH*). Pretilost karakterizira leptinska rezistencija, u sklopu koje dolazi do izostanka fizioloških funkcija leptina, pa se javljaju poteškoće u odabiru dominantnog folikula i maturacije oocite (22, 23, 24). Na razini reproduktivnog sustava povećano nakupljanje masnog tkiva negativno utječe na ovulaciju, ali remeti i ostale funkcije ženskog spolnog sustava: endometrijski ciklus, implantaciju embrija i razvoj ploda (25). Prema dosadašnjim istraživanjima, pretilost tijekom trudnoće smanjuje masu fetusa i posteljice te dovodi do redistribucije masnog tkiva, smanjujući količinu subkutanog, a povećavajući količinu smeđeg, visceralnog i perigonadalnog masnog tkiva (26). Tijekom trudnoće maternica prolazi kroz iznimne promjene, prvenstveno u smislu povećanja. Očuvanje normalne funkcije maternice od iznimne je važnosti za urednu implantaciju, trudnoću i porod. Osim promjena na molekularnoj razini, pretilost uzrokuje i morfološke promjene reproduktivnih organa, primarno maternice, što predstavlja bitan faktor u ograničavanju mogućnosti oplodnje, implantacije i zadržavanja trudnoće (27, 28). Promjene maternice, koje su posljedica pretilosti i dijabetesa, nisu dovoljno proučavane. Najviše istraživanja odnosi se na proučavanje kontraktilnosti

maternice (29, 30, 31) i hipoteze da pretilost uzrokuje promjenu mikrookoliša maternice, odnosno inzulinsku rezistenciju maternice (32). Studije na ljudima ukazuju na to da pretile prvorotkinje imaju čak izraženije kontrakcije, ali češće ne ulaze u aktivnu fazu poroda i porod se završava carskim rezom (30). Iz navedenog, vidljiva je važnost analize utjecaja pretilosti tijekom trudnoće na morfološke promjene i izražajnost biokemijskih markera u maternici i masnom tkivu kako bi se doprinijelo potpunom razumijevanju utjecaja pretilosti na promjenu funkcije i narušavanje homeostaze maternice. Ovo istraživanje, analizirajući povezanost prehrane s morfološkim i funkcionalnim promjenama maternice i masnog tkiva, daje uvid u dosad neistražene korelacije između prehranbenih čimbenika i reproduktivnog zdravlja.

1. 3. Morfologija i fiziologija masnog tkiva

Masno tkivo je lipidni spremnik koji skladišti trigliceride uslijed povećanog unosa energije i koristi te zalihe u razdobljima smanjenog unosa hrane u organizam (33). Radi se o vrsti vezivnog tkiva koje je građeno većinom od masnih stanica adipocita te u manjem udjelu preadipocita, fibroblasta, endotelnih stanica i mnoštva imunoloških stanica poput makrofaga masnoga tkiva (*prema engl. adipose tissue macrophages*, ATM). Ravnoteža svih stanica, koje grade masno tkivo, usko je povezana s održavanjem energetske homeostaze.

1. 3. 1. Vrste masnog tkiva

S obzirom na smještaj i ulogu u organizmu, razlikujemo nekoliko vrsta masnog tkiva. Smeđe (*prema engl. Brown Adipose Tissue*, BAT), bijelo (*prema engl. White Adipose Tissue*, WAT) i ružičasto masno tkivo (*prema engl. pink fat*, PF) (33, 34, 35).

Smeđe masno tkivo

Smeđe masno tkivo građeno je od mnoštva lipidnih kapljica unutar jednog adipocita i sadrži veliki broj mitohondrija (34, 35), te je vaskularizirano, što mu omogućava visoku razinu proizvodnje topline (36, 37). Naime, smeđe masno tkivo ima značajnu ulogu u termogenezi budući da sadržava termogenin, iz obitelji mitohondrijskih transporterskih proteina lokaliziranih u unutarnjoj

membrani mitohondrija, a koji onemogućuju oksidacijsku fosforilaciju, što u konačnici rezultira izostankom proizvodnje adenozin tri fosfata (prema *engl. adenosine triphosphate*, ATP) (37). Termogenin je zaslužan za proizvodnju i otpuštanje energije u obliku topline (37). Oslobođene masne kiseline unutar adipocita se, uz potrošnju kisika, intenzivno metaboliziraju pri čemu dolazi do proizvodnje topline, koja zagrijava cirkulirajuću krv, i na taj način se prenosi kroz tijelo (36, 37). Količina i aktivnost BAT-a u negativnoj je korelaciji s ITM, odnosno smatra se da bi smanjenje aktivnosti BAT-a moglo biti povezano s povećanim nakupljanjem WAT-a, koje je najvažnije skladište masti, a povezano je s pretilošću i inzulinskom rezistencijom (37, 38).

Bijelo masno tkivo

WAT ima bitnu ulogu u regulaciji metabolizma. Sastoji se od stromalne vaskularne frakcije (*prema engl. stromal vascular fraction*, SVF) koja sadrži visoko potentne, metabolički aktivne i imunološke stanice uklopljene u izvanstanični matriks, zbog čega je to tkivo iznimno plastično i kao takvo vrlo brzo se mijenja i prilagođava, ovisno o prehrambenim navikama, što povezujemo s hipertrofičnim i hiperplastičnim promjenama adipocita (39). Povećani unos hrane uzrokuje povećanje stanica u SVF, što u konačnici negativno djeluje na metabolizam. Ovo je tkivo specijalizirano za skladištenje masti u obliku triglicerida te je kao takvo građeno od velikih stanica, koje sadrže jednu veliku kapljicu ispunjenu mastima, a koja ispunjava gotovo cijelu stanicu, gurajući jezgru i citoplazmatske organele uz samu staničnu membranu (33, 34, 35). Tijekom gladovanja, rezerve energije u obliku masnih kiselina oslobađaju se iz ovog masnog tkiva (40). Bijelo masno tkivo uključeno je u proizvodnju i izlučivanje hormona kao i u arhitekturu tjelesne površine (40). Posredno, sekrecijom mnogih adipokina, hormona i citokina ima važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze (40). Ovisno o položaju u tijelu, razlikujemo visceralno masno tkivo, koje obavlja i podržava unutrašnje organe, i subkutano masno tkivo, koje se nalazi ispod kože i uglavnom je prisutno u području abdomenu, bedara i stražnjice gdje pridonosi toplinskoj izolaciji tijela (33, 34, 35). Povećanjem udjela masnog tkiva povećava se i kapacitet skladištenja lipida. Visceralno masno tkivo rezervoar je velikog broja makrofaga, T-stanica, NK-stanica (*prema engl. natural killer*, NK) i izlučuje više proupalnih citokina u usporedbi sa subkutanim, iz čega proizlazi da se povećanjem mase visceralnog masnog tkiva povećava sklonost upalnoj reakciji, a time raste i rizik od metaboličkih bolesti povezanih s pretilošću (37, 38, 41).

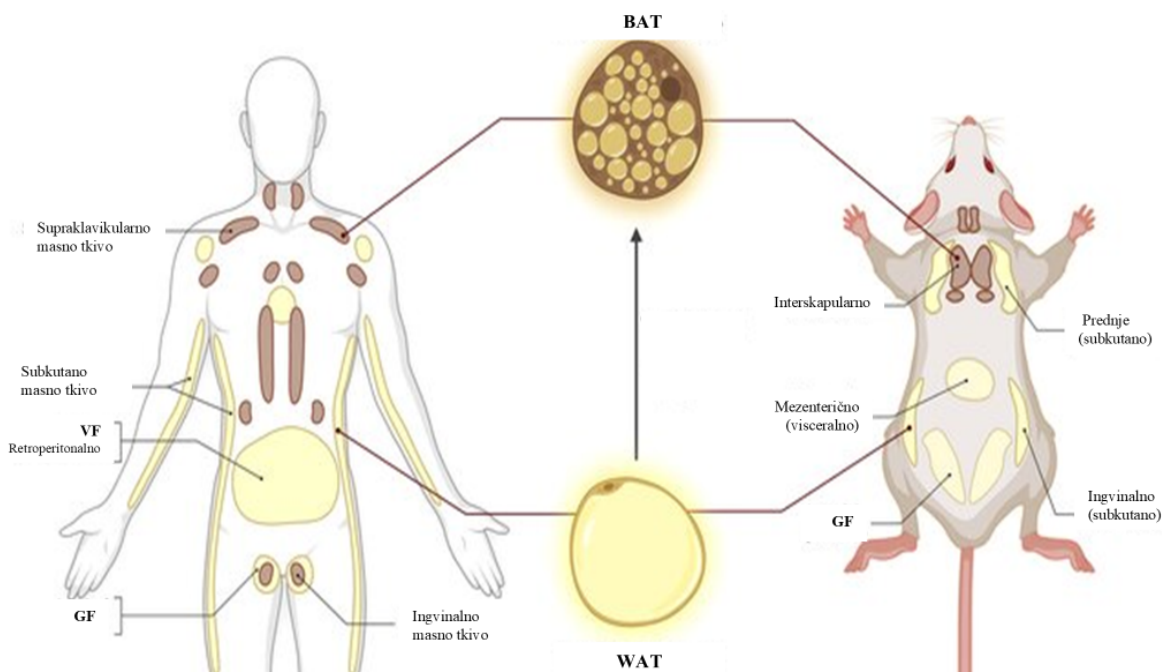
Ružičasto masno tkivo

Ružičasto masno tkivo nalazi se u potkožnom masnom tkivu ženki tijekom trudnoće i faze laktacije. Sastoji se od alveolarnih epitelnih stanica mliječnih žlijezda čija je uloga proizvodnja i izlučivanje mlijeka. Novi dokazi upućuju na to da nastaje transdiferencijacijom potkožnih bijelih adipocita tijekom trudnoće i postpartalno (42). Na taj način masno tkivo sudjeluje u formiranju mliječne žlijezde (43). Ta promjena, koja se naziva alveologeneza, ograničena je na parenhim kroz razvoj lobulo-alveolarnih žljezdanih struktura koje luče mlijeko (44). Tijekom laktacijskog ciklusa, koji obuhvaća trudnoću, laktaciju i involuciju, mliječna žlijezda prolazi kroz značajne morfološke i funkcionalne promjene. Tijekom trudnoće, adipociti se povlače kako bi kreirali prostor za rast mliječnih alveola koje se dodatno povećavaju tijekom laktacije. Za vrijeme involucije, adipociti ponovno postaju vidljivi, a mliječna žlijezda poprima izgled sličan onome prije trudnoće. Pretpostavka je da se tijekom trudnoće adipociti "stanjuju" oslobađanjem lipida u alveole, u svrhu proizvodnje mlijeka, dok ih tijekom involucije ponovno apsorbiraju. Bijeli adipociti mliječne žlijezde mogu se transdiferencirati u epitelne stanice, koje luče mlijeko tijekom trudnoće, a zatim se nakon involucije vraćaju u svoj izvorni adipocitni fenotip, čime pokazuju iznimnu plastičnost. Ključnu ulogu adipocita u remodeliranju mliječne žlijezde tijekom laktacije, potvrđuje nalaz stanica s međufaznim fenotipom između adipocita i alveolarnih struktura, pozitivnih na markere alveogeneze i zrelih adipocita tijekom kasne trudnoće, konkretno 17.–18. dan kod miševa (45). Uz mliječnu komponentu, ružičasto masno tkivo luči citokine (IL-6 i TNF-alfa) te adipocitokine, uključujući i leptin, koji se smatra ključnim faktorom u razvoju pretilosti kod djece, što ukazuje da postoji direktan utjecaj majčine prehrane na potomstvo (46, 47).

1. 3. 2. Raspodjela masnog tkiva u organizmu

Prema lokalizaciji u organizmu opisujemo dvije glavne vrste masnog tkiva. Subkutano masno tkivo podrazumijeva sloj između kože i aponeuroze te fascije mišića. Unutrašnje masno tkivo objedinjuje intratorakalno (uključujući perikardijalno) i intraabdominalno masno tkivo (uključujući intraperitonealno i estraperitonealno). Intraperitonealno masno tkivo sastavljeno je od dva odjeljka koje čine veliki omentum i mezenterij dok je ekstraperitonealno sastavljeno od preperitonealnog i

retroperitonealnog masnog tkiva (33, 34, 35). Pojmom visceralno masno tkivo objedinjeno je omentorno, mezenterično i ekstraperitonealno masno tkivo.



Slika 1.3.1. Distribucija masnog tkiva kod ljudi i štakorica (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz rada Torres Irizarry i sur., 2022.) (48).

Dvije vrste masnog tkiva razlikuju se morfološki i funkcionalno. Visceralno masno tkivo luči više proupalnih citokina, a subkutano masno tkivo rezervoar je leptina, adiponektina i protuupalnih citokina. Osim toga, visceralno masno tkivo građeno je od velikih inzulin-rezistentnih adipocita i ima dobro razvijenu vaskularizaciju i inervaciju. Ovo tkivo je osjetljivije na lipolizu i ima veću sposobnost nakupljanja makrofaga, T-stanica i NK stanica. Subkutano masno tkivo sastoji se od manjih adipocita, dok su vaskularizacija, inervacija i stanična infiltracija u manjoj mjeri razvijene, a služi kao skladište energije koje se drenira sistemnim krvotokom (33, 34, 35). Perigonadalno masno tkivo, kao dio visceralnog masnog tkiva, ima specifičnu ulogu u reproduktivnom i endokrinom sustavu. Smješteno oko gonada (jajnici kod ženki i testisi kod muškaraca), ovo tkivo pokazuje visoku metaboličku aktivnost i ključno je za regulaciju reproduktivnih funkcija. Perigonadalno masno tkivo je značajan izvor leptina, hormona koji ima izravnu ulogu u modulaciji osovine hipotalamus-hipofiza-gonade i utječe na plodnost (49, 50). Osim toga, ovo tkivo ima

visoku sposobnost lipolize, slično drugim oblicima visceralnog masnog tkiva, te je povezano s lučenjem proupalnih citokina i adipokina koji mogu utjecati na lokalnu i sistemsku upalu (51, 52). Studije su pokazale da promjene u volumenu i funkciji gonadalnog masnog tkiva mogu biti povezane s poremećajima reproduktivnog sustava, poput policističnih jajnika, smanjene plodnosti i komplikacija trudnoće (53, 54, 55, 56).

1. 3. 3. Endokrina funkcija masnog tkiva

Masno tkivo, osobito WAT, iznimno je metabolički aktivno tkivo jer stvara i izlučuje mnogobrojne bioaktivne peptide, adipokine, čiji utjecaj možemo promatrati na lokalnoj razini koja podrazumijeva autokrinu i parakrinu signalizaciju i sistemskoj, odnosno endokrinoj razini (39, 40, 41). Stromalna vaskularna frakcija masnog tkiva sadržava nekoliko visoko potentnih stanica, uključujući metabolički aktivne i imunološke stanice (preadipociti, fibroblasti, endotelne stanice, dendritičke stanice, T-stanice, mastocyte, granulocyte i makrofage) koje su umetnute u izvanstanični matriks (33, 34, 35). Pretilost i povećani unos hrane bogate mastima i šećerima uzrokuju povećanje broja stanica u SVF, čime se razvija fenotip koji ima štetne posljedice za metabolizam (36, 37, 38). Osim toga, WAT je jedinstveno tkivo po svojoj plastičnosti, što znači da se vrlo brzo prilagođava prehranbenom manjku, odnosno suvišku. Takva fleksibilnost očituje se hipertrofičnim i hiperplastičnim promjenama u adipocitima, što je od iznimnog značaja za regulaciju metabolizma (44).

1. 4. Metabolički poremećaji

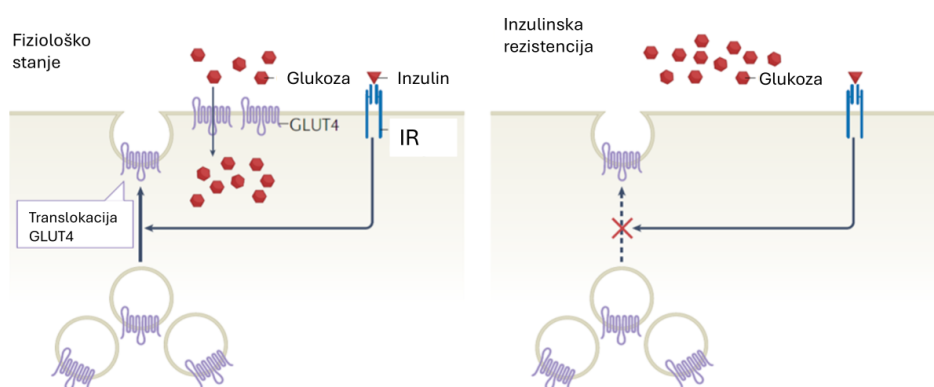
1. 4. 1. Inzulinska rezistencija

Inzulin je hormon kojeg luči gušterača, specifično β -stanice Langerhansovih otočića, a ključna je komponenta u regulaciji metabolizma glukoze, lipida i proteina (57). Njegova glavna funkcija je snižavanje razine glukoze u krvi omogućavanjem ulaska glukoze u stanicu, gdje se koristi kao izvor energije ili skladišti u obliku glikogena (58).

Funkcije inzulina

Inzulin regulira niz metaboličkih procesa, uključujući:

1. Metabolizam ugljikohidrata: Inzulin stimulira unos glukoze u mišićne i masne stanice putem GLUT4 transportera (59). Osim toga, potiskuje glukoneogenezu i glikogenolizu u jetri (60) (Slika 1.4.1.).



Slika 1.4.1. Uloga prijenosnika inzulina 4 (GLUT4) u inzulinskoj rezistenciji (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz rada Stockli i Birnbaum, 2021.) (61).

2. Metabolizam lipida: Inzulin inhibira lipolizu u masnim stanicama, smanjujući oslobađanje slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju te potiče lipogenezu (62).
3. Metabolizam proteina: Potiče sintezu proteina i inhibira njihovu razgradnju, što je ključno za anaboličke procese (63).

Inzulinski receptor

Inzulinski receptor (*prema engl. insulin receptor, IR*) pripada obitelji receptor-tirozin-kinaza i nalazi se na površini većine stanica. Sastoji se od dvije α i dvije β podjedinice povezanih disulfidnim

mostovima (64). Vezanjem inzulina na α -podjedinicu dolazi do autofosforilacije β -podjedinice, što aktivira niz intracelularnih signalnih puteva (65).

Inzulinski signalni put

Inzulinski signalni put uključuje nekoliko ključnih komponenti:

1. PI3K/AKT put: Aktivacija fosfatidilinozitol-3-kinaze (*prema engl. Phosphatidyl 3 kinase, PI3K*) dovodi do fosforilacije i aktivacije protein kinaze B, poznatog i kao protein AKT, a koji regulira glukozni metabolizam, sintezu lipida i proteina te staničnu proliferaciju (65).
2. RAS/MAPK (*prema engl. The Ras/mitogen activated protein kinase*) put: Ovaj put je uključen u stanični rast i diferencijaciju (66).
3. mTOR signalizacija: AKT aktivira mTOR kompleks (*prema engl. Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*) koji je ključan za staničnu sintezu proteina i rast (67).

Inzulinska rezistencija

Inzulinska rezistencija označava stanje u kojem stanice postaju neosjetljive na djelovanje inzulina, što dovodi do poremećaja u metabolizmu glukoze i kompenzatorne hiperinzulinemije (68). Ovaj poremećaj često je povezan s pretilošću, kroničnom upalom i akumulacijom lipida u jetri i mišićima (69). Glavni mehanizmi uključeni u razvoj inzulinske rezistencije uključuju:

1. Kroničnu upalu: Upalni citokini, poput TNF- α i IL-6, mogu poremetiti inzulinsku signalizaciju inhibicijom fosforilacije inzulinskog receptora (70).
2. Mitohondrijsku disfunkciju: Akumulacija reaktivnih kisikovih spojeva može narušiti inzulinski signalni put (71).
3. Poremećaje lipidnog metabolizma: Nakupljanje lipida u tkivima povezuje se sa smanjenom osjetljivošću na inzulin (72).

Terapijski pristupi

U liječenju inzulinske rezistencije ključnu ulogu imaju promjene u životnom stilu, poput redovite tjelesne aktivnosti i uravnotežene prehrane. Farmakološki pristupi uključuju primjenu inzulinskih

senzibilizatora, poput metformina i tiazolidindiona, koji poboljšavaju osjetljivost stanica na inzulin (73).

1. 4. 2. Leptinska rezistencija

Leptin je produkt OB (*prema engl. obese, OB*) gena koji je lociran na sedmom kromosomu, a tvore ga tri egzona i dva introna. To je protein koji se sastoji od 146 aminokiselina, molekularne mase 16 kDa i ne prolazi posttranslacijsku modifikaciju. U literaturi je poznat kao „hormon sitosti“. Građen je od četiri α -uzvojnice (A, B, C i D) koje su raspoređene na način da su uzvojnice A i B paralelne kao i uzvojnice C i D. Paralelne uzvojnice spojene su dugim petljama AB i CD, a antiparalelne uzvojnice B i C spojene su kratkom petljom BC. Duga CD petlja sadrži jednu dodatnu E uzvojnicu. Dva očuvana cisteinska ostatka na C-terminalnom kraju (Cys 96 i Cys 146) tvore disulfidnu vezu koja je ključna za strukturnu stabilnost i biološki učinak leptina (74). Leptin se najvećim dijelom stvara i izlučuje iz adipocita i to iz stanica bijelog masnog tkiva (74). Manje količine leptina proizvode se u smeđem masnom tkivu, epitelu želuca i dojke, posteljici, jajnicima, skeletnom mišiću, srcu, koštanoj srži i hipofizi. Leptin i njegov receptor nalaze se i u želučanoj sluznici ljudi. Leptin je stabilan u želučanom soku jer se ne udružuje s makromolekulama niti se proteolitički razgrađuje (75). Želučani leptin se nakon obroka istovremeno otpušta u krv i u želučani sok.

Funkcije Leptina

Leptin u arkuatnoj jezgri hipotalamusa inhibira sintezu i oslobađanje NPY, jednog od najpotentnijih stimulatora unosa hrane i povećava razinu m-RNA proopiomelanokortina (*POMC*), anoreksigenog neuropeptida čiji produkt, hormon stimulacije melanocita (*prema engl. melanocyte stimulating hormon, MSH*) inhibira apetit te na taj način sudjeluje u održavanju energetske homeostaze (76, 77, 78). Istraživanja provedena na miševima, s nedostatkom NPY zbog mutacija, dokazala su da leptin djeluje na unos hrane i energetske potrošnju i drugim putevima, neovisnim o NPY. Preko autokrinih ili parakrinih puteva, leptin potiče lipolizu u bijelom masnom tkivu. Kontrolor je ekspresije enzima, koji sudjeluju u oksidaciji slobodnih masnih kiselina, te tako regulira i sadržaj triglicerida u adipocitima (79, 80). Ovaj hormon smanjuje razinu inzulina i glukokortikoida, a

povećava oslobađanje hormona rasta, kateholamina i hormona štitnjače. Primjena glukokortikoida u velikim količinama dovodi do porasta ekspresije leptina in vivo i in vitro u ljudi, što upućuje na postojanje negativne povratne sprege između leptina i glukokortikoida (81). Djelujući na hormone štitnjače, leptin povećava energetske potrošnje (82). Istraživanja na glodavcima sugeriraju da je leptin bitan za sintezu tireotropin-oslobađajućeg hormona (*prema engl. tireotropin releasing hormone*, TRH) iz hipotalamusa (83, 84). Stimulacija simpatičke živčane aktivnosti leptinom i porast prometa noradrenalina u smeđem masnom tkivu utječu na energetske potrošnje. Istraživanjem na genetički modificiranim mišjim modelima kojima nedostaje leptin utvrđen je poremećaj u razvoju tipičnog smeđeg masnog tkiva. Umjesto toga razvija se smeđe masno tkivo nalik na bijelo masno tkivo, što upućuje na ulogu leptina u adipogenezi smeđeg masnog tkiva (85). Prisutnost leptina u želucu u malim količinama, upućuje na to da, osim u dugoročnoj regulaciji energetske ravnoteže, sudjeluje s drugim probavnim peptidima i u kratkoročnoj regulaciji veličine obroka (75). Smatra se da leptin povećava sposobnost odabira one hrane koja pruža zadovoljstvo i tako posredno sudjeluje u regulaciji apetita (86). Što se tiče aktivnosti probavnog sustava, efekti leptina se očituju u smanjenju izlučivanja želučane kiseline, pokretljivosti i pražnjenja želuca (86). Leptin je proinflamatorni adipokin, hormon masnog tkiva, koji ima značajnu ulogu u perifernoj i centralnoj regulaciji reproduktivnih procesa, djelujući na razvoj i funkciju posteljice i maternice (87, 88), te regulirajući endokrinološke mehanizme koji utječu na plodnost (89). Leptin preko NPY izravno stimulira otpuštanje gonadotropin oslobađajućeg hormona (*prema engl. Gonadotropin releasing hormone*, GnRH), koji je ključan u reprodukciji, te se njegovi agonisti koriste kao terapija u svrhu smanjenja mioma maternice (90). Muški i ženski spolni hormoni imaju suprotno djelovanje na ekspresiju leptina: estrogen je povećava, a testosteron inhibira. Smatra se da stimulacijski učinak leptina na ekspresiju matriks-metaloproteinaze (*prema engl. matrix metalloproteinase*, MMP), u kulturi humanih placentarnih stanica, ima ključnu ulogu u implantaciji (91). Budući da su leptinski receptori izraženi u maternalnoj decidui, leptin sudjeluje i u blastocisto-endometralnom dijalogu ili održavanju feto-placentarne barijere (27, 92, 93). Uzimajući u obzir značajnu ulogu leptina u ranom embrionalnom razvoju i implantaciji, poremećaji metabolizma i funkcije leptina dovode se u korelaciju s habitualnim pobačajima i posljedično otežanim ostvarivanjem uloge majke (93).

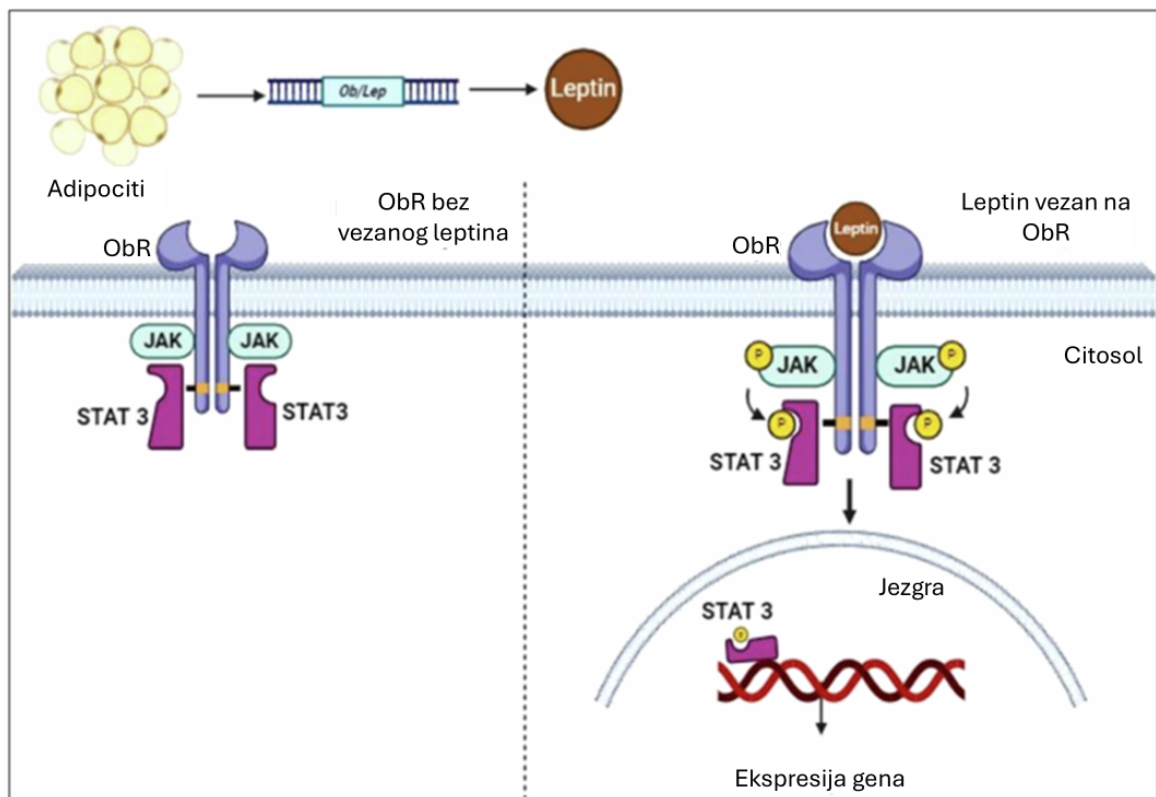
Leptinski receptor

Leptinski receptor (*prema engl. obesity receptor*, Ob-R) je član obitelji citokinskih receptora klase 1 i kodiran je genom DB (*prema engl. diabetes*, DB) koji je smješten na prvom kromosomu, a čine ga 18 egzona i 17 introna i prvi je put identificiran kod miša. To je veliki protein s jednim transmembranskim segmentom i izrazito visokim afinitetom za leptin ($\sim 0.7\text{nM}$). Razlikujemo šest izoformi ovog proteina i svaka je produkt alternativne dorade RNA. Izoforme receptora dijelimo prema njihovim strukturnim razlikama u tri klase: duga, kratka i sekretorna, s tim da svaka izoforma Ob-R receptora ima istu ekstracelularnu domenu koja veže ligand, a nalazi se na N-terminalnom kraju proteina. Domena se sastoji od 816 aminokiselina i sadrži četiri cisteinska ostatka, slijed TrpSer-X-Trp-Ser te različiti broj fibronektin 3 domena. Pet izoformi, uključujući dugu izoformu Ob-Rb i kratke izoforme kao što su Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd i Ob-Rf imaju transmembransku domenu koja se sastoji od 34 aminokiseline. Intracelularna domena duge izoforme sastoji se od 303 aminokiseline na C-terminalnom kraju, a intracelularna domena kratkih izoformi sastoji se od 32-40 aminokiselina. Duge i kratke Ob-R izoforme, osim identične ekstracelularne i transmembranske domene, imaju i identičan slijed prvih 29 aminokiselina koje čine intracelularnu domenu. Duljina daljnjeg slijeda aminokiselina intracelularne domene ovisi o alternativnoj doradi mRNA. Obzirom da Ob-Re izoforma ne sadrži intracelularnu i transmembransku domenu, izlučuje se u krvotok kao topljivi receptor i ona je vjerojatno rezultat alternativne dorade transkripta DB gena ili uništenja transmembranske domene Ob-R receptora. Može vezati leptin 17 i na taj način regulirati njegovu koncentraciju u serumu. Ona služi kao proteinski nosač, koji dostavlja leptin membranskim receptorima, koji potom prenose signal u stanicu. Ob-Ra je najčešća izoforma Ob-R receptora koja se može naći u različitim tkivima poput bubrega, pluća, jetre, slezene i makrofaga. Duga izoforma (Ob-Rb) je uglavnom izražena u hipotalamusu gdje sudjeluje u održavanju energetske homeostaze i regulaciji aktivnosti sekretornih organa. Osim u hipotalamusu, relativno visoke razine mRNA za Ob-Rb su izražene u različitim perifernim tkivima kao što je masno tkivo, skeletni mišići i jetra, što ukazuje na to da leptin vjerojatno ima ulogu u perifernom metabolizmu lipida. Tijekom trudnoće, posteljica je primarno mjesto proizvodnje leptina, ali su njegovi receptori također detektirani u pupčanoj vrpici, fetalnim membranama i tkivu maternice, odnosno endometriju i decidui. U fiziološkim uvjetima većina receptora se nalazi unutar stanice dok je 5-25% prisutno na površini stanice. Vezanjem liganda za

receptore dolazi do njihovog unosa u rane endosome preko vezikula obloženih klatrinom nakon čega se receptor razgrađuje ili se učinkovito reciklira na staničnu membranu (96).

Leptinski signalni put

Leptinski receptori smješteni su na membranama plazma stanica neurona i u interakciji s ganglioizidima prenose informaciju unutar stanice koja potom regulira funkciju neurona. Hipotalamus integrira metaboličke i nutritivne signale prilagođavajući unos hrane i potrošnju energije trenutnim metaboličkim potrebama (97). Receptor Ob-Rb sadrži četiri tirozinska ostatka (Tyr974, Tyr985, Tyr1077 i Tyr1138), koji aktiviraju unutarstanične signalne puteve, kao što je JAK/STAT (*prema engl. Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), zbog čega je jedina potpuno aktivna izoforma receptora koja je u mogućnosti prenijeti aktivacijski signal u stanicu (96). Nakon vezanja leptina za Ob-Rb receptor, dolazi do konformacijske promjene strukture receptora koja dovodi do translokacije enzima Janus kinaza (JAK) iz citoplazme na receptor pri čemu se one aktiviraju i započinju svoju kinaznu aktivnost fosforilirajući tirozinske ostatke drugih JAK proteina i Ob-Rb receptora. Fosforilacija Tyr1138 ostatka omogućuje proteinu STAT3 da se veže za receptor. Proteini STAT (STAT1, STAT3, STAT5, STAT6) postaju supstrat za kinazu JAK2 koja ih fosforilira. Fosforilacija STAT3 dovodi do njegovog otpuštanja s receptora, dimerizacije i translokacije u jezgru gdje ti proteini služe kao transkripcijski faktori koji stimuliraju specifični genski izražaj (97). Opisani su i drugi signalni putevi. Jedan od takvih je PI3K (fosfatidilinozitol-kinaza)/PDE3B (fosfodiesteraza 3B)/cAMP koji u suradnji s JAK2/STAT čini važan element leptinskog prijenosa signala u hipotalamusu (98) (Slika 1.4.2.).



Slika 1.4.2. Leptinski signalni put (Izvor: preuzeto i prilagođeno iz rada Barman i sur., 2024.)

(99)

Kada je ometen signalni put leptina do mozga, poremećen je osjećaj sitosti i dolazi do prekomjernog unosa kalorija. To je fenomen leptinske rezistencije u pretilih koja je posredovana inzulinom (100).

Leptinska rezistencija označava stanje u kojem tjelesne stanice, posebno neuroni u hipotalamusu, postaju neosjetljive na djelovanje leptina, hormona kojeg izlučuju adipociti. Leptin igra ključnu ulogu u regulaciji energetskog balansa putem supresije apetita i stimulacije potrošnje energije. U uvjetima leptinske rezistencije, unatoč povišenim razinama leptina u cirkulaciji, ove fiziološke funkcije su narušene, što može pridonijeti razvoju pretilosti i povezanih metaboličkih poremećaja.

Jedan od glavnih uzroka leptinske rezistencije je kronična upala koja se često povezuje s pretilošću. Upalni citokini, poput interleukina-6 (IL-6) i tumorskog nekroznog faktora-alfa (TNF- α), mogu poremetiti leptinske signalne puteve blokiranjem aktivacije signalnog transdukcijskog puta JAK2-

STAT3 u hipotalamusu (101). Nadalje, prekomjerno nakupljanje slobodnih masnih kiselina u hipotalamusu može izazvati lipotoksičnost, koja dodatno narušava osjetljivost na leptin (102).

Još jedan važan mehanizam uključen u leptinsku rezistenciju je disfunkcija transporta leptina preko krvno-moždane barijere. Studije pokazuju da visoke razine triglicerida u krvi mogu inhibirati ovu prijenosnu funkciju, čime se smanjuje dostupnost leptina hipotalamusu (103).

Povećana aktivacija supresora signalne transdukcije i transkripcije proteina (SOCS3) predstavlja još jedan ključni faktor u razvoju leptinske rezistencije. SOCS3 je induciran leptinskom signalizacijom i djeluje kao negativni regulator JAK2-STAT3 puta, stvarajući povratnu inhibiciju signalizacije (104).

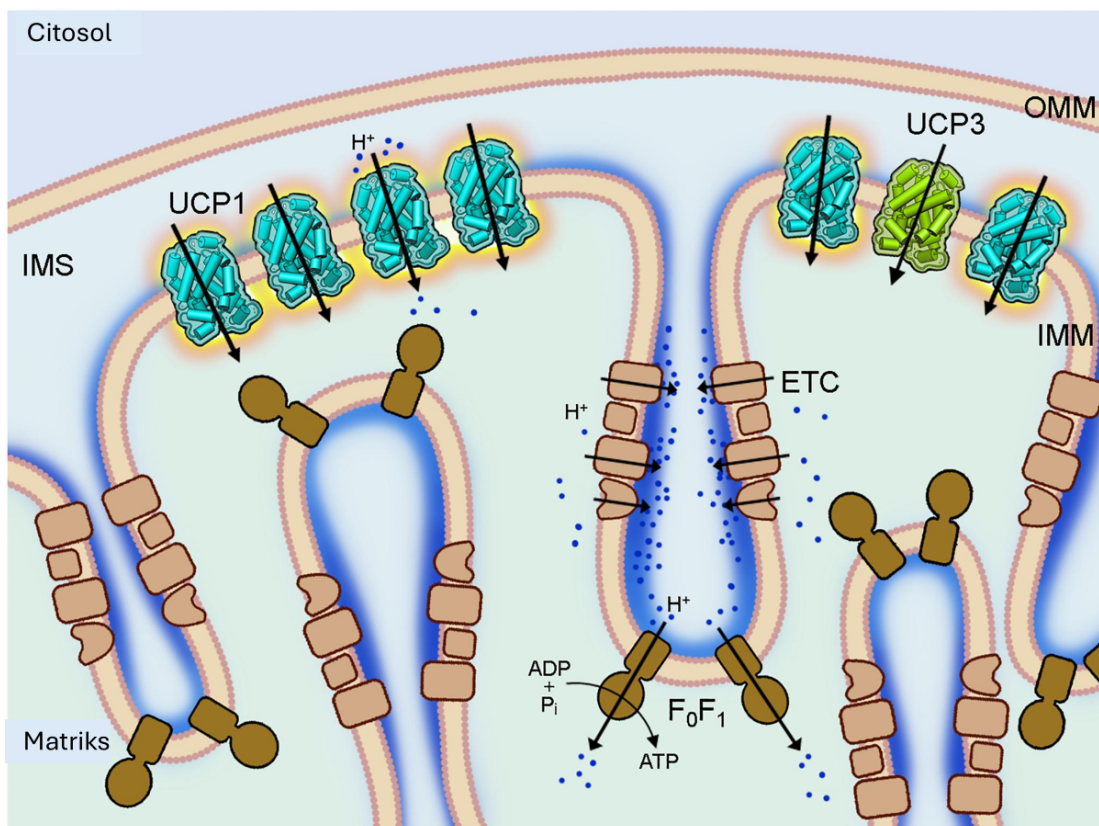
Kronična konzumacija visokokalorične prehrane, bogate mastima i šećerima, značajno doprinosi razvoju leptinske rezistencije. Prehrana ove vrste uzrokuje nakupljanje masnog tkiva i povećanje razine cirkulirajućeg leptina, što vodi do desenzitizacije leptinskih receptora (105).

U terapijskom smislu, potencijalni pristupi za prevenciju ili liječenje leptinske rezistencije uključuju promjenu životnog stila, poput smanjenja tjelesne mase, povećanja tjelesne aktivnosti i unosa prehrane bogate vlaknima (106). Nadalje, farmakološki tretmani usmjereni na poboljšanje prijenosa leptina preko krvno-moždane barijere ili modulaciju SOCS3 signalnog puta pokazuju obećavajuće rezultate u predkliničkim istraživanjima (107).

1. 4. 3. Mitohondrijska disfunkcija u pretilosti

Mitohondrijska disfunkcija ima ključnu ulogu u razvoju pretilosti i povezanih metaboličkih poremećaja. Mitohondriji su odgovorni za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP) putem oksidativne fosforilacije, a njihova disfunkcija može dovesti do smanjenja energetske učinkovitosti i povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), što doprinosi razvoju inzulinske rezistencije i pretilosti (108). U kontekstu pretilosti, proteini razdvajanja (*prema engl. uncoupling proteins*, UCP) imaju značajnu ulogu u regulaciji energetskog metabolizma, prvenstveno modulirajući učinkovitost mitohondrijske oksidativne fosforilacije i potrošnju energije. Njihova funkcija je prekid veze između prijenosa elektrona i sinteze ATP-a, omogućujući protonsko curenje preko unutarnje mitohondrijske membrane i time raspršivanje energije u obliku topline umjesto

njenog skladištenja kao ATP-a. Ovaj proces je ključan za termoregulaciju i metaboličku fleksibilnost te može utjecati na potrošnju energije i otpornost na pretilost. U smeđem masnom tkivu, mitohondriji imaju jedinstvenu ulogu u proizvodnji topline, što se odvija kroz aktivnost UCP1. Ovaj protein omogućuje zaobilazanje ATP sintaze (F₀F₁), čime se protonski gradijent ne koristi za sintezu ATP-a, već se energija oslobađa kao topline (109). To je ključno za adaptivnu termogenezu, posebno kod novorođenčadi i tijekom hladne adaptacije. UCP3, koji se također nalazi na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, dijeli slične funkcionalne karakteristike s UCP1, ali je prisutnost UCP3 u BAT-u znatno manja, a njegova točna biološka uloga još uvijek nije potpuno razjašnjena (110). Pretpostavlja se da UCP3 ima zaštitnu funkciju u sprječavanju oksidativnog stresa, regulaciji masnih kiselina i metaboličke fleksibilnosti (111, 112). Kod pretilosti, smanjena aktivnost UCP-a može dovesti do smanjene potrošnje energije i povećanog skladištenja lipida, što pogoduje razvoju metaboličkih poremećaja (113). S druge strane, povećana ekspresija UCP1 i UCP3 mogla bi predstavljati terapijski cilj za povećanje energetske potrošnje i smanjenje masnog tkiva (114), čime bi se moglo utjecati na prevenciju i liječenje pretilosti. (Slika 1.4.3).



Slika 1.4.3. Mehanizam djelovanja UCP1 i UCP3 proteina na stvaranje i oslobađanje energije u mitohondrijima smeđeg masnog tkiva. Izvor: preuzeto i prilagođeno iz rada Pohl i sur., 2019. (109). Legenda: OMM vanjska membrana mitohondrija (*prema engl. outer membrane of mitochondria*), IMS međumembranski prostor (*prema engl. intermembrane space*), IMM unutarnja mitohondrijska membrana (*prema engl. inner mitochondrial membrane*), ETC kompleksi lanca prijenosa elektrona (*prema engl. electron transport chain complexes*).

UCP1 je prvenstveno izražen u smeđem masnom tkivu i odgovoran je za termogenezu bez drhtanja, proces kojim se energija iz hranjivih tvari pretvara u toplinu umjesto u ATP, čime se povećava potrošnja energije i smanjuje nakupljanje masnog tkiva, što je ključno u prevenciji pretilost (115). Studije su pokazale da je ekspresija UCP1 regulirana hladnoćom i hormonima štitnjače, što ukazuje na njegovu ulogu u prilagodbi na niske temperature i metabolizmu energije (116, 117). Smanjena aktivnost ili ekspresija UCP1 smanjujući termogenezu, može dovesti do smanjenja energetske potrošnje, što rezultira povećanom akumulacijom masti i pridonosi razvoju pretilosti (118, 119).

UCP3 se uglavnom nalazi u skeletnim mišićima i, u manjoj mjeri, u smeđem masnom tkivu (120). Iako njegova točna funkcija nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da UCP3 sudjeluje u regulaciji

oksidacije masnih kiselina i smanjenju stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (*prema engl. reactive oxygene compounds*, ROS) unutar mitohondrija pa tako poremećaji u funkciji UCP3 mogu rezultirati smanjenom oksidacijom masnih kiselina i povećanom proizvodnjom ROS-a, što doprinosi razvoju inzulinske rezistencije i pretilosti (109). Povećana ekspresija UCP3 zabilježena je tijekom gladovanja i nakon vježbanja, što sugerira njegovu ulogu u prilagodbi na povećanu dostupnost masnih kiselina i energetske potrebe te se smatra da može poboljšati oksidaciju masnih kiselina i smanjiti nakupljanje lipida u mišićima, što doprinosi boljoj osjetljivosti na inzulin i smanjenju rizika od pretilosti (109).

Nedavne studije sugeriraju da modulacija aktivnosti UCP1 i UCP3 može biti potencijalna terapijska strategija za liječenje pretilosti i povezanih metaboličkih poremećaja. Na primjer, aktivacija UCP1 u smeđem masnom tkivu može povećati potrošnju energije i smanjiti tjelesnu masu, dok povećanje ekspresije UCP3 u skeletnim mišićima može poboljšati metabolizam lipida i osjetljivost na inzulin (119, 109).

1. 5. Struktura i funkcija maternice: humani i štakorski model

Maternica je šuplji, mišićni organ u obliku kruške koji se nalazi unutar zdjelice žena. Sastoji se od trokutastog tijela (*corpus uteri*), čiji je gornji dio poznat kao *fundus uteri*, kratkog prijelaznog područja, koje se naziva *isthmus uteri* i vrata maternice, koji se obično naziva *cervix uteri*. Sa svake strane tijela maternice nalaze se rogovi koji funkcionalno povezuju maternicu s jajovodima (121). Primarna uloga maternice je čuvanje oplodjenog jajašca i tijekom trudnoće značajno se povećava kako bi podržala normalan razvoj fetusa. Ljudska maternica organizirana je u nekoliko različitih slojeva, od kojih svaki ima svoju jedinstvenu strukturu i funkciju: unutarnji sloj sluznice ili endometrij, mišićni sloj poznat kao miometrij i serozni sloj, odnosno perimetrij. Endometrij sadrži funkcionalni sloj (*stratum functionalis*) u kojem se nalaze cjevaste žlijezde (*glandulae uterinae*) i sloj vezivnog tkiva (*lamina propria*). Epitel, unutar endometrija, je jednoslojni cilindrični epitel i sastoji se od trepetljivih i žljezdanih stanica. Uz miometrij je bazalni sloj (*stratum basalis*) koji ostaje nepromijenjen tijekom cijelog menstrualnog ciklusa. Miometrij je najdeblji sloj, karakteriziran snopovima glatkih mišićnih stanica, koji sadrže unutarnje

kružne i vanjske uzdužne slojeve glatkih mišića, a odvojeni su vezivnim tkivom. Perimetrij je serozna membrana koja obavija vanjski dio maternice (34, 35.) (Slika 1.5.1.).

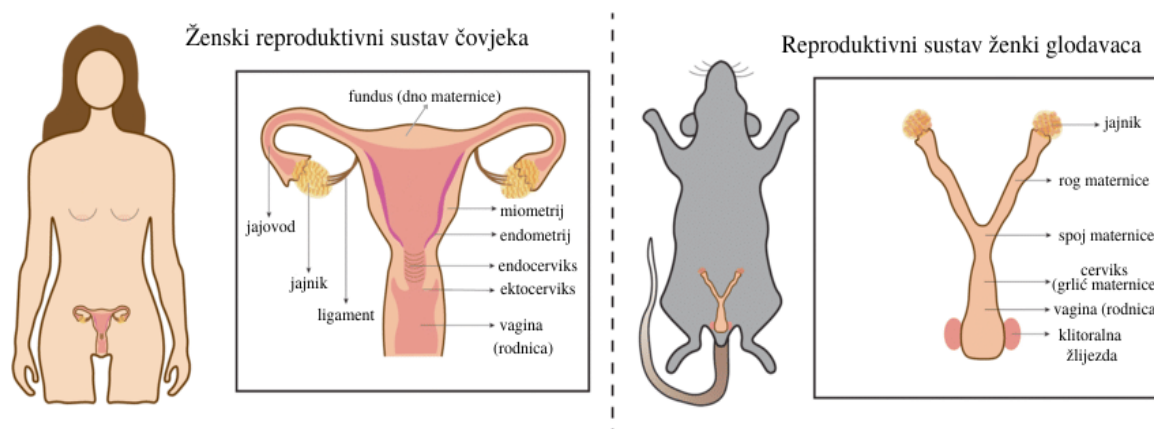


Slika 1.5.1. Histološki presjek humane maternice obojene hematoksilin-eozin bojom. Legenda: P - perimetrij, M - miometrij, 1 - vanjski sloj miometrija, 2 - unutarnji sloj miometrija, E - endometrij.

Ženke Sprague Dawley štakorica postaju spolno zrele sa 65 dana starosti te su plodne tijekom cijele godine. Trajanje gestacije u ovih životinja je 21 do 22 dana, a sposobni su okotiti do 12 mladunčadi (122). Period laktacije traje tri tjedna nakon čega mladunci prelaze na standardnu prehranu. Tri do četiri dana nakon toga perioda, ženke ponovo započinju s reproduktivnim ciklusom. Reproductivni ciklus ženke štakora naziva se estrusom i sastoji se od četiri faze: estrusa, metestrusa, diestrusa i proestrusa. Srednja duljina trajanja ciklusa je četiri dana i tako kratak ciklus čini štakora idealnim životinjskim modelom za istraživanje poremećaja reproduktivnog ciklusa (123). Za određivanje etape reproduktivnog ciklusa u štakora najčešće se upotrebljava metoda vaginalnih briseva, koja se temelji na odnosima između tri tipa stanica, koje se promatraju u vaginalnim brisevima: orožnjele stanice, epitelne stanice i leukociti. Procjena poremećaja reproduktivnog ciklusa također se temelji na pregledu vaginalnih briseva (124).

U usporedbi morfologije maternice ljudi i glodavaca očite su sličnosti, što štakore čini vrijednim modelima za proučavanje molekularnih karakteristika ženskog reproduktivnog sustava. Unatoč tome, bitno je uočiti neke primarne razlike, kao što je dvorogi oblik maternice štakora i izostanak menstruacije kod štakora (125). Osim toga, normalni ciklus glodavaca je poliestrusni, traje 4-5 dana i obuhvaća četiri faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (123) što se razlikuje od ljudskog menstrualnog ciklusa koji traje 28 dana i uključuje izmjenične folikularne i lutealne faze.

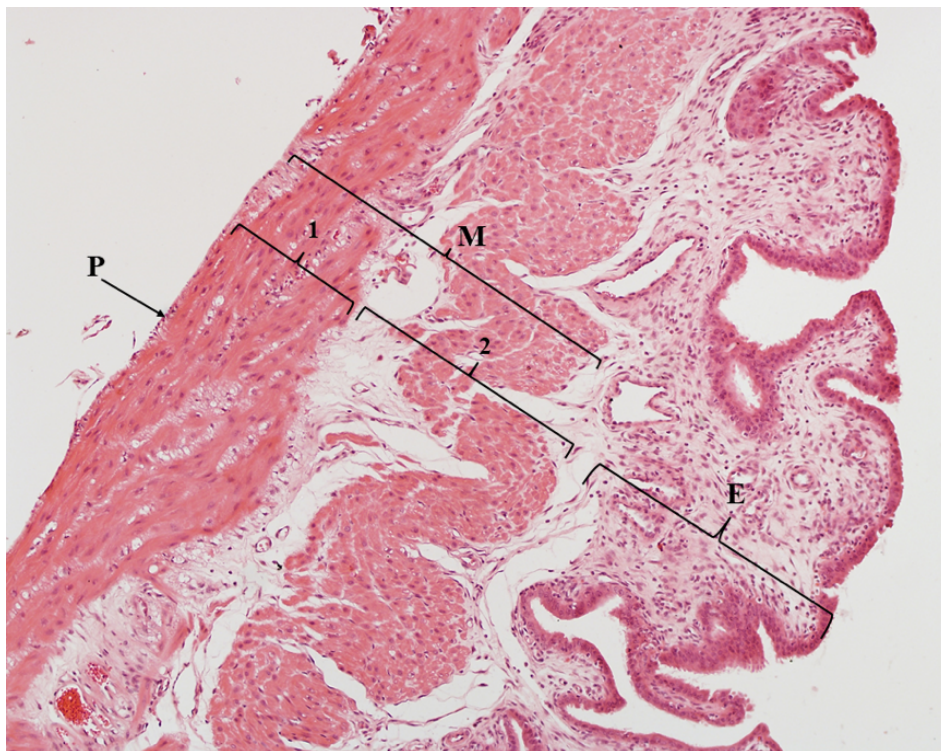
Makroskopski, maternica štakora podijeljena je na dva izdužena roga maternice, koji se spajaju u cerviks, koji se sastoji od dva kanala (po jedan za svaki rog), a oba se nastavljaju u lumen maternice. Histološki pregled maternice štakora jasno otkriva podjelu njenog tkiva u tri sloja, što odražava strukturu viđenu kod ljudi. Međutim, značajne histološke razlike između maternice štakora i čovjeka primarno se uočavaju u tijelu maternice (*corpus uteri*) i supravaginalnom dijelu cerviksa (125) (Slika 1.5.2.).



Slika 1.5.2. Usporedna ilustracija reproduktivnih sustava kod ljudi i štakora, Preuzeto i prilagođeno iz rada Chumduri i Turco, 2021. (126).

Endometrij maternice štakora sastoji se od unutarnjeg sloja epitelnog tkiva, smještenog iznad lamine proprije, osjetljivog sloja vezivnog tkiva. Endometrijski epitel sastoji se od sekretornih i trepetljivikavih stanica, koje karakteriziraju jezgre smještene u njihovim bazalnim regijama, koje okružuju lumen maternice stvarajući nabore. Tijekom različitih faza estrusnog ciklusa, struktura

endometrija prolazi kroz promjene, uključujući varijacije u debljini, rastezljivosti, sekretornoj i mitotičkoj aktivnosti i različitim hormonalnim reakcijama. Miometrij unutar stijenke maternice sastoji se od unutarnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih vlakana, prošaranih vezivnim tkivom i zamršenom mrežom krvnih žila. Na vanjskoj strani maternice perimetrij tvori seroznu ovojnicu (125, 127) (Slika 1.5.3.).



Slika 1.5.3. Histološki presjek maternice štakora obojene hematoksilin-eozin bojom. Legenda: P - perimetrij, M - miometrij, 1 - vanjski sloj miometrija, 2 - unutarnji sloj miometrija, E - endometrij.

2. HIPOTEZA

Masna i slatka dijeta tijekom trudnoće utječe na morfološke karakteristike adipocita i maternice Sprague Dawley štakorica u terminu poroda te uzrokuje značajne promjene u izražaju leptinskog receptora i mitohondrijskih proteina razdvajanja u tkivu maternice.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su usporedbom eksperimentalne (štakori na standardnoj prehrani bogatoj mastima i šećerima) i kontrolne (štakori na standardnoj dijeti) skupine ženki Sprague Dawley štakorica tijekom trudnoće utvrditi:

1. histološke karakteristike i promjene (površinu, broj i klase) adipocita perigonadalnog, visceralnog, smeđeg i ružičastog masnog tkiva kao posljedica masne i slatke prehrane tijekom trudnoće.
2. histološke karakteristike i promjene maternice (debljinu endometrija, miometrija i perimetrija, stupanj fibroze) kao posljedica masne i slatke prehrane tijekom trudnoće.
3. distribuciju i promjene glikogenskih depozita u maternici .
4. distribuciju i promjene u izražajnosti leptinskog i inzulinskog receptora te mitohondrijskih proteina razdvajanja UCP1 i UCP3 u maternici štakorica u terminu poroda, kao posljedica masne i slatke prehrane tijekom trudnoće.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Animalni model i dizajn studije

Studija predstavlja opazajno istraživanje parova, a provela se na uzorcima prikupljenim u okviru projekta "REECOP-CMSC SENIOR SCIENTIST (RCSS) GRANT 2018-2020 #012", "The role of obesity-induced low-grade inflammation in the adipokine signaling in pregnant rat uterus", financiranim dijelom od strane REECOP-CSMC, a dijelom od strane voditelja i partnera na projektu (Prilog 1).

Prva faza ove studije, u trajanju od devet tjedana, provedena je u cijelosti na Odjelu za farmakologiju i farmakoterapiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Szegedu, u Mađarskoj. Svi postupci, koji su uključivali životinje, provedeni su u strogom skladu s Direktivom Vijeća europskih zajednica (2010/63/EU) i mađarskim Zakonom o zaštiti životinja u istraživanju (članak 32. Zakona XXVIII). Istraživanje je provedeno uz službeno odobrenje Nacionalnog znanstvenog etičkog povjerenstva za pokuse na životinjama (uredni broj: IV./3071/2016., 15. kolovoz 2016.) (Prilog 2).

Rezultati ove disertacije dio su druge faze istraživanja i odnose se na analizu prikupljenih uzoraka masnog tkiva i uzoraka maternice koja je provedena u laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku i u laboratoriju Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju i Odjela za biologiju na sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku.

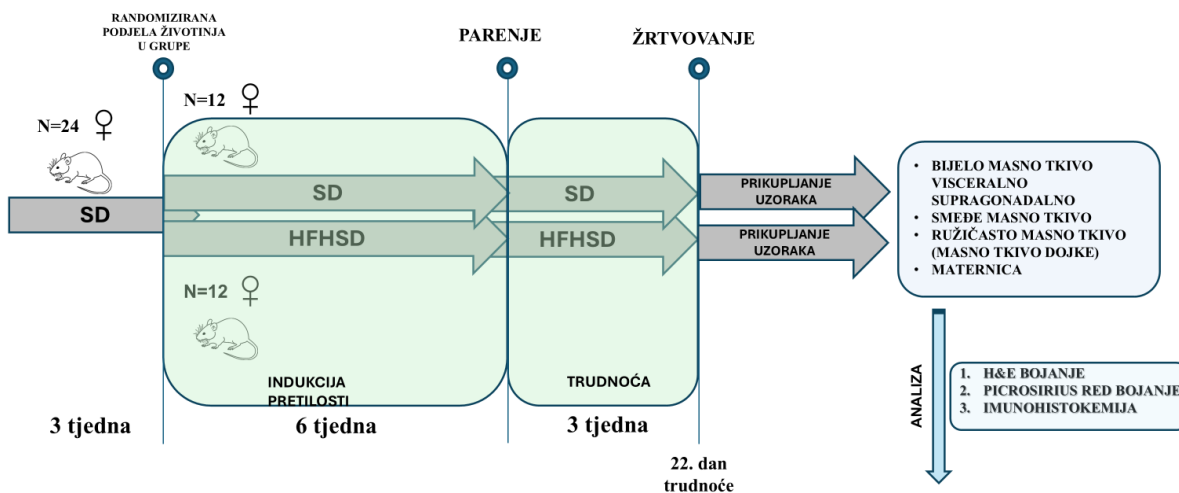
Ženke štakora Sprague Dawley (Animalab Ltd., Vác, Mađarska) stare 3 tjedna podijeljene su u dvije skupine (n = 12 po skupini). Eksperimentalna skupina hranjena je hranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka), dok je druga, kontrolna skupina, bila na standardnoj prehrani (SD) (1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka) (Tablica 4.1.1., Prilog 3., Prilog 4.). Navedeni način prehrane nastavljen je do kraja eksperimenta, počevši od četiri tjedna starosti do dana žrtvovanja.

Tablica 4.1.1. Sastav hrane standardna dijeta (SD) (1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka) i hrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka)

Sastojak	Standardna dijeta (Altromin 1314)	Dijeta bogata ugljikohidratima i mastima (Altromin C1011)
Energija (kcal/kg)	~3,339	~3,902
Proteini (%)	27	16
Masti (%)	14	28
Ugljikohidrati (%)	59	56
Voda (%)	11,1	7,0
Sirovi pepeo (%)	6,1	5,4
Sirova vlakna (%)	4,5	3,1
Sirove masti (%)	5,1	12,1
Sirovi proteini (%)	22,5	15,2
Bezdušični ekstrakti (%)	50,7	57,2

Nakon šest tjedana posebne prehrane, zrele (9 tjedana stare) Sprague Dawley (SD) ženke štakora (tjelesne mase 200-250g), koje su bile ili na standardnoj prehrani (SD) ili na prehrani s visokim udjelom masti i šećera, (HFSD) parene su sa zrelim mužjacima štakora Sprague Dawley (tjelesne mase 240-260g) hranjenih SD-om. Parenje je potvrđeno prisutnošću kopulacijskog čepa ili vaginalnim razmazima. U slučajevima gdje je došlo do uspješnog parenja, ženke štakora su odvojene od mužjaka, što je označilo početak njihove trudnoće. Tijekom istraživanja životinje su boravile u kontroliranim uvjetima, uključujući temperaturni raspon od 20–23°C, vlažnost između 40% i 60% i 12-satni ciklus svjetlo/tama. Tijekom cijele trudnoće, štakori su se hranili istom hranom kao i prije trudnoće te su hrana i voda bi dostupne ad libitum. Na tjednoj bazi je praćena njihova tjelesna težina i potrošnja hrane. U terminu okota (22. dan trudnoće, 12 tjedana starosti ženki) životinje su humano eutanazirane pod anestezijom izofluranom pomoću prijenosnog stroja za anesteziju malih životinja (R550, RWD, Shenzhen, Kina). Nakon toga, prikupljeni su uzorci

krvi punkcijom srca, prikupljeni su organi (masno tkivo i maternica) te je izmjerena težina mokrih organa (Slika 4.1.1.).



Slika 4.1.1. Eksperimentalne grupe životinja i dizajn eksperimenta

4. 2. Protokol prikupljanja i pripreme uzoraka tkiva za analizu

Neposredno nakon žrtvovanja životinja, prikupljeni uzorci odmah su fiksirani u 4% paraformaldehidu i potom pohranjeni na -80°C do analize. Uzorci bijelog (potkožnog, visceralnog i perigonadalnog) i ružičastog masnog tkiva umetnuti su u parafinske blokove. Isti postupak ponovljen je na uzorcima maternica. Potom su ti blokovi izrezani na rezove debljine 6 mikrometara pomoću mikrotoma Leica RM 550 (Leica, Beč, Austrija) na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Svaki 10. rez je pažljivo odabran i prikupljen na silanizirana stakalca. Ovako pripremljena stakalca korištena su za rutinsko histološko bojanje i za imunohistokemijsku analizu.

4. 3. Histomorfometrija masnog tkiva i maternice

4. 3. 1. Hematoksilin-eozin bojanje masnog tkiva i maternice

Vizualizacija i analiza morfoloških razlika između tkiva postignuta je bojanjem hematoksilinom i eozinom prema standardnom protokolu. Na uzorcima masnog tkiva, analizirani su broj, površina i raspodjela adipocita po klasama. Istim bojanjem utvrđene su morfološke karakteristike i promjene maternice, uključujući površinu šupljine maternice, miometriju, endometriju i perimetriju.

Uzorci (parafinske sekcije tkiva debljine 5 μm) su deparafinizirani uranjanjem u ksilen na 10 minuta. Nakon toga su rehidrirani kroz sekvencijalne serije etanolskih otopina — dva puta u 100%, zatim u 96% i na kraju u 70% etanolu, po 5 minuta u svakom. Nakon tretmana etanolom, uzorci su isprani u destiliranoj vodi kroz 5 minuta. Bojenje je izvedeno sljedećim redoslijedom: Mayerov hematoksilin na 10 minuta, destilirana voda na 1 minutu, voda iz slavine na 10 minuta, destilirana voda na 1 minutu. Bojenje eozinom provedeno je na sljedeći način: eozin Y na 30 sekundi; destilirana voda na 5 sekundi; 70%, 96% i 100% etanol – po 5 uranjanja u svaki, 100%-tni etanol na 3 minute; te ksilol na 5 minuta, nakon čega su sekcije osušene na zraku na sobnoj temperaturi, prekrivene medijem za montiranje (Histomount, Histological Mount Medium, National Diagnostics, Cat. No.: HS-103) i pokrovnim stakalcem.

4. 3. 2. Picrosirius red bojanje tkiva maternice

Bojanje PicroSirius crvenim bojilom provedeno je radi procjene taloženja kolagena u uzorcima tkiva maternice. Parafinske sekcije maternice (debljine 4–5 μm) deparafinizirane su u ksilolu, potom su rehidrirane kroz niz razrijeđenih etanolskih otopina (100%, 95%, 70% i 50%) i konačno isprane u destiliranoj vodi za pripremu za bojenje. Stakalca su inkubirana u PicroSirius crvenoj otopini (0,1% Sirius crveno otopljeno u zasićenoj vodenoj pikrinskoj kiselini) na 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, stakalca su isprana u 0,5%-tnoj octenoj kiselini kako bi se uklonio višak boje, potom su dehidrirana u rastućem nizu etanolskih otopina i očišćena ksilolom te montirana smolastim medijem za montiranje ispod pokrovnog stakalca.

4. 3. 3. PAS bojanje (reakcija s perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom)

Reakcija perjodne kiseline i Schiffovog reagensa s dijastazom (PAS-D) korištena je za analizu taloženja glikogena u maternici. Uzorci tkiva maternice prvo su deparafinizirani i rehidrirani. Sekcije su prethodno tretirane dijastaznom otopinom na 1 sat pri 37°C i isprane. Bojenje je izvedeno sljedećim redoslijedom: periodična kiselina na 5 minuta, voda iz slavine na 2 minute, Schiffov reagens u mraku na 10 minuta, voda iz slavine na 10 minuta, modificirani Mayerov hematoksilin na 30 sekundi, voda iz slavine na 2 minute. Nakon ispiranja, sekcije su dehidrirane u alkoholu (70%, 80%, 95% i 100%) po 2 minute u svakom, zatim osušene u ksilolu i montirane s DPX medijem za montiranje (Biognost Ltd., Zagreb, Hrvatska; Cat. No.: BM-500).

4. 4. Imunohistokemijska analiza leptinskog i inzulinskog receptora, UCP1 i UCP3 proteina u tkivu maternice

Priprema za imunohistokemiju podrazumijevala je deparafinizaciju i rehidriraciju rezova istim protokolom koji su korišteni za hemalaun-eozin bojanje. U svrhu oporavka epitopa, uzorci su 40 minuta inkubirani u citratnom puferu (pH=6.0) u vodenoj kupelji na temperaturi od 95°C nakon čega su hlađeni i isprani prvo u 1xPBS-u (prema *engl. phosphate buffered saline*, PBS), zatim u destiliranoj vodi. Nakon oporavka epitopa uslijedio je predtretman peroksidom (1 %-tni H₂O₂), u trajanju od 30 minuta na +4°C, kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza. Rezovi su potom inkubirani u blokirajućoj otopini (5 % kozji serum i 1 %-to BSA, albumin iz goveđeg seruma (prema *engl. bovine serum albumin*, BSA), u 1x PBS-u) na 2 sata. Nakon blokiranja, u svrhu sprječavanja vezivanja nespecifičnih protutijela, rezovi su tijekom noći na temperaturi od + 4 °C u vlažnoj komorici inkubirani u otopini sa specifičnim primarnim protutijelima: mišje anti-ObR antitijelo razrijeđeno 1:50 (Santa Cruz, SC, Dallas, TX, SAD, Cat. No.: 8391); zečje anti-IR antitijelo razrijeđeno 1:250 (IR- α ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; Cat. No.: SC-710); zečje anti-UCP1 antitijelo razrijeđeno 1:1000 (Abcam, Cat. No.: ab10983) i zečje anti-UCP3 antitijelo razrijeđeno 1:3000 (Invitrogen, Cat. No.: PA1-24895) (Tablica 4.4.1.).

Tablica 4.4.1. Prikaz primarnih protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi

Primarno protutijelo	Vrsta protutijela	Proizvođač	Razrjeđenje	Kataloški broj
ObR (anti-leptin receptor)	Mišje IgG	Santa Cruz, Dallas, TX, SAD	1:50	SC-8391
IR- α (insulin receptor)	Zečje IgG	Santa Cruz, Dallas, TX, SAD	1:250	SC-710
UCP1 (uncoupling protein 1)	Zečje IgG	Abcam	1:1000	ab10983
UCP3 (uncoupling protein 3)	Zečje IgG	Invitrogen	1:3000	PA1-24895

Uzorci su zatim isprani u 1x PBS-u 3 puta po 10 minuta s ciljem odstranjivanja nevezanog protutijela. Nakon ispiranja uslijedila je inkubacija tijekom 4 sata u otopini sa sekundarnim protutijelima: biotinizirano kozje anti-mišje IgG razrijeđeno 1:1000 (Santa Cruz, SC, Dallas, TX, USA, Cat. No.: SC-2039) za ObR i biotinizirano kozje anti-zečje IgG razrijeđeno 1:1000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA; Cat. No.: 115-067-003), nakon čega su ponovno isprani u 1x PBS-u 3 puta po 10 minuta na +4°C i prebačeni u otopinu tercijarnog kompleksa. Tercijarni kompleks sastojao se od avidina i biotinizirane peroksidaze iz hrena (prema *engl. horseradish peroxidase*, HRP), a pripremljen je u 1x PBS-u u razrjeđenju 1:250. Rezovi su inkubirani s otopinom tercijarnog kompleksa na +4°C tijekom jednog sata nakon čega je uslijedilo ispiranje 3 puta u trajanju od po 10 minuta u 1x PBS-u. Vizualizacija specifičnog kompleksa epitop-protutijelo napravljena je u DAB otopini (3,3'-diaminobenzidin), koja je pripremljena prema priloženom protokolu proizvođača (Carl Roth DAB komplet, Karlsruhe, Germany, kat. br.: 9202.1). Trajanje inkubacije je bilo do 10 minuta, ovisno o brzini razvijanja reakcije. Potom je reakcija zaustavljena premiještanjem rezova u destiliranu vodu. Obojeni preparati ostavljeni su da se osuše na sobnoj temperaturi tijekom minimalno 48 sati. Nakon što su se osušili, preparati su prekriveni medijem za pokrivanje Vectamoun. Svi histološki preparati i uzorci dobiveni imunohistokemijom pregledani su svjetlosnim mikroskopom Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss

Microscopy, Thornwood, NY, SAD) spojenim na kameru Olympus D70 (Olympus, Hamburg, Njemačka) te su analizirani pomoću softvera CellProfiler (v. 4.2.6) ili ImageJ.

4. 5. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu podataka korišten je softver Statistica 13 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA), uz $p < 0,05$ kao razinu statističke značajnosti. Usporedbe između skupina radi određivanja utjecaja HFHSD na morfologiju adipocita izračunate su koristeći t-test za nezavisne uzorke nakon Shapiro-Wilkovog testa normalnosti i Leveneovog testa za procjenu jednakosti varijanci. Za analizu razlika u morfološkim promjenama maternice korišten je Mann-Whitney U test, dok je za sve receptore u maternici provedena ANOVA, praćena Bonferronijevim post-hoc testom.

5. REZULTATI

5. 1. Utjecaj HFHSD na tjelesnu masu, količinu pojedene hrane i masu masnog tkiva i maternice gravidnih Sprague Dawley štakorica

Prehrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) dovela je do značajnog povećanja tjelesne mase ženki štakora za vrijeme indukcije pretilosti u trajanju od 6 tjedana. Povećanje je bilo vidljivo već nakon 3 HFHSD prehrane ($p < 0,001$), a razlika je bila značajna i nakon 6 tjedana HFHSD ($p < 0,001$) u vrijeme parenja. Na kraju trudnoće (22 dana gestacije, u 12 tjedana starosti), razlika u tjelesnoj težini između SD i HFHSD skupina nije bila statistički značajna (Tablica 5.1.1.).

Tablica 5.1.1. Promjena tjelesne mase štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) tijekom eksperimenta. Rezultati prikazuju prosječnu masu štakorica u određenoj dobi $\pm$ standardna devijacija. Statistička značajnost označava razlike između SD i HFHSD skupina u istim tjednima starosti.

Dob štakorica (tjedni)	Standardna prehrana (SD)	Prehrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD)	Statistička značajnost
3	100 ± 5 g	100 ± 5 g	Nije značajno
6	180 ± 10 g	200 ± 12 g	***
9	220 ± 15 g	250 ± 18 g	***
10	240 ± 20 g	260 ± 22 g	***
12	300 ± 25 g	310 ± 28 g	Nije značajno

*** $p < 0,001$

Konzumacija hrane mjerena je u obliku tro tjednih prosjeka, te nije uočena statistički značajna razlika između grupe štakorica hranjenih SD i grupe štakorica hranjenih HFHSD (Tablica 5.1.2.).

Tablica 5.1.2. Prosječna masa konzumirane hrane tijekom eksperimenta kod štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD). Rezultati prikazuju prosječnu masu konzumirane hrane u periodima od tri tjedna $\pm$ standardna devijacija.

Razdoblje	Standardna prehrana (SD)	Prehrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD)
1.–3. tjedan	20 $\pm$ 2 g/dan	19 $\pm$ 2 g/dan
4.–6. tjedan	22 $\pm$ 3 g/dan	21 $\pm$ 3 g/dan
7.–9. tjedan	24 $\pm$ 2 g/dan	23 $\pm$ 2 g/dan
10.–12. tjedan	26 $\pm$ 3 g/dan	25 $\pm$ 3 g/dan

Dijeta s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) utjecala je značajno na povećanje ukupne količine masnog tkiva, uključujući perigonadalno ($p < 0,05$), visceralno ($p < 0,05$), ružičasto ($p < 0,05$) i smeđe masno tkivo ($p < 0,01$). Na kraju trudnoće kod Sprague Dawley štakorica ružičasto masno tkivo dominantno je u obje analizirane grupe, dok je očekivano najmanja količina smeđeg masnog tkiva. Najveći porast mase vidljiv je kod visceralnog masnog tkiva. U HFHSD grupi vidljiva je promjena u omjeru ružičastog masnog tkiva. Iako apsolutna masa ružičastog masnog tkiva raste kod HFHSD štakorica, njegov udio u ukupnoj masi se smanjuje na 60,34%, u odnosu na grupu štakorica hranjenih standardnom dijetom gdje je udio ružičastog masnog tkiva u odnosu na ukupnu masu masnog tkiva bio 78,15%. U SD grupi VF čini 11,8% ukupne mase masnog tkiva dok u HFHSD grupi udio VF u ukupnoj masi masnog tkiva te grupe čini 25,56%. Povećava se i udio GF u HFHSD grupi na 9,88% u usporedbi sa grupom SD gdje je udio GF 6,65% dok udio smeđeg masnog tkiva ostaje gotovo isti u obje skupine: SD 4,13% i HFHSD 4,22%. U odnosu na SD grupu kod HFHSD došlo je do značajnog smanjenja mase maternice ($p < 0,05$) (Tablica 5.1.3.).

Tablica 5.1.3. Mase masnih tkiva i maternice kod štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) na zadnji dan trudnoće (u dobi od 12 tjedana). Rezultati su izražene kao prosječna masa $\pm$ standardna devijacija.

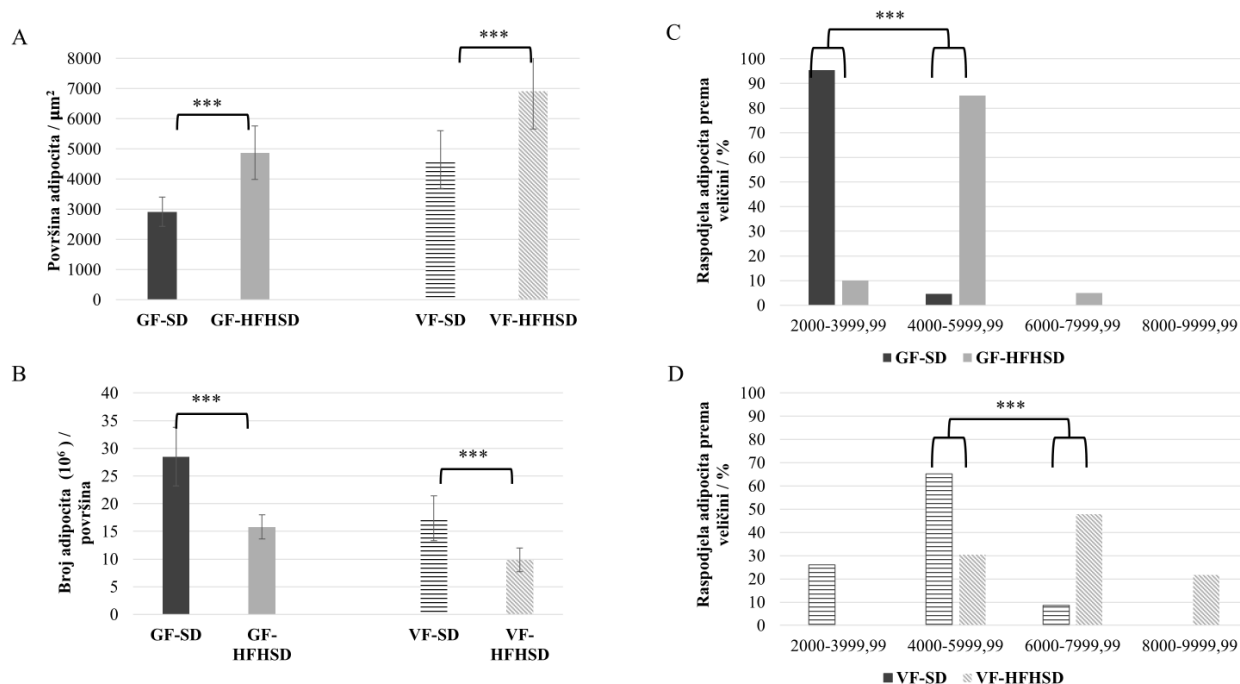
Vrsta masnog tkiva	Standardna prehrana (SD)	Prehrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD)	Statistička značajnost
Ružičasto masno tkivo	7,76 $\pm$ 0,94 g	9,16 $\pm$ 1,13 g	*
BAT	0,41 $\pm$ 0,02 g	0,64 $\pm$ 0,07 g	**
VF	1,10 $\pm$ 0,12 g	3,88 $\pm$ 1,77 g	*
GF	0,66 $\pm$ 0,07 g	1,50 $\pm$ 0,14 g	*
Ukupna težina masnog tkiva	9,93 $\pm$ 1,12 g	15,18 $\pm$ 3,27 g	**
Maternica	4,22 $\pm$ 0,13 g	3,65 $\pm$ 0,15 g	*

*p < 0,05; ** p < 0,01

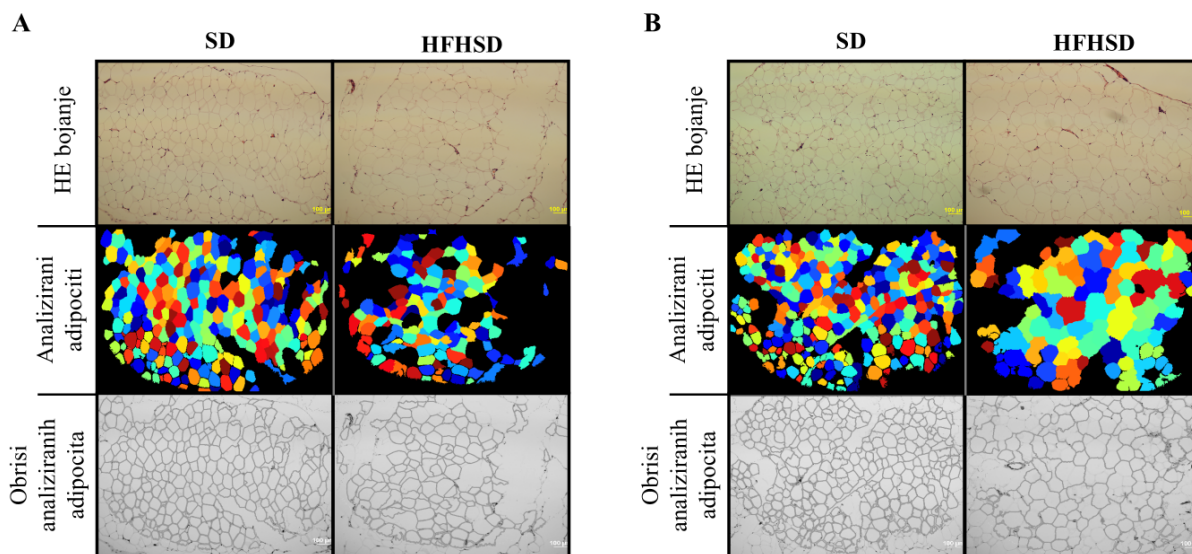
5. 2. Utjecaj HFHSD na površinu i broj adipocita gravidnih Sprague Dawley štakorica

Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, imaju statistički značajno povećanje površine adipocita perigonadalnog ($p < 0,001$) i visceralnog ($p < 0,001$) masnog tkiva (Slika 5.2.1.A i Slika 5.2.2.). Srednja vrijednost površine adipocita GF kod SD skupine iznosi 2 911,63 μm^2 , dok je HFHSD povećana prosječna površina na 4 872,12 μm^2 . Površina adipocita visceralnog masnog tkiva također je veća nego kod perigonadalnog. Srednja vrijednost površine kod VF kod SD skupine iznosi 4 640,34 μm^2 , a kod HFHSD skupine 6917,06 μm^2 . Sukladno povećanju površine adipocita, kod oba tipa masnog tkiva, došlo je do statistički značajnog smanjenja broja adipocita po jedinici površine ($p < 0,001$) (Slika 5.2.1.B i Slika 5.2.2.). Prosječan broj adipocita GF po jedinici površine kod SD skupine je 28.5, a kod HFHSD 15.8. U VF kod SD skupine utvrđeno je prosječno 17.37 adipocita po jedinici površine, a kod HFHSD skupine 9.83. Površine adipocita perigonadalnog i visceralnog masnog tkiva dodatno su analizirane raspodjelom adipocita u 6 klasa, ovisno o njihovoj površini: klasa 1 ($< 2\,000\mu\text{m}^2$), klasa 2 (2 000 – 3 999,99 μm^2), klasa 3 (4 000 – 5 999,99 μm^2), klasa 4 (6 000 – 7 999,99 μm^2), klasa 5 (8000-9 999,99 μm^2), klasa 6 ($>10\,000\mu\text{m}^2$). Dijeta, bogata šećerima i mastima, značajno je utjecala na promjenu zastupljenosti različitih klasa adipocita u perigonadalnog i visceralnog masnom tkivu. Pri standardnoj prehrani u perigonadalnog masnom tkivu prevladavaju adipociti

klase 2 s 95,5%, dok u visceralnom masnom tkivu većina adipocita (65,21%) pripada klasi 3. Kao posljedica HFHSD dolazi do statistički značajnog povećanja adipocita pri čemu 85% adipocita perigonadalnog masnog tkiva pripada u klasi 3, a 47,82% adipocita visceralnog masnog tkiva pripada klasi 4 ($p < 0,001$), a 30,43 i dalje zauzima klasa 3. Skupine SD oba masna tkiva nemaju adipocit u klasi 5, dok kod VF-HFHSD oni čine 21,73% (Slika 5.2.1.C i 5.2.1.D).



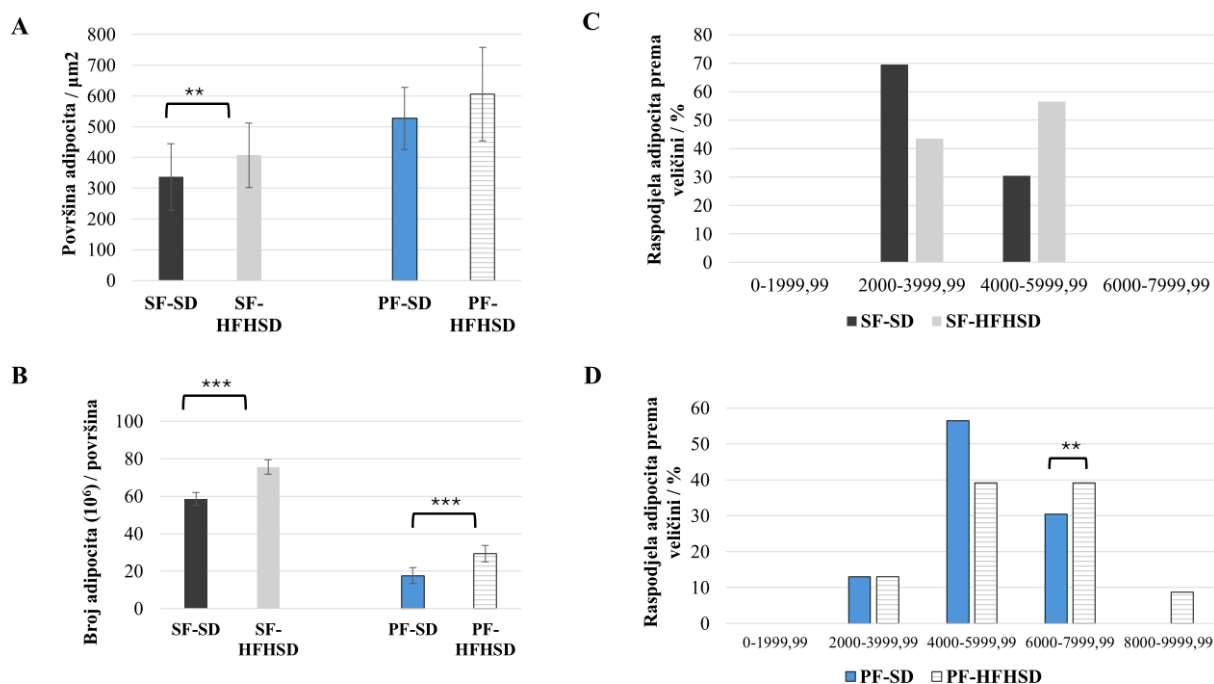
Slika 5.2.1. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize perigonadalnog (GF) i visceralnog (VF) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). (A) Površina adipocita; (B) Broj adipocita; (C, D) Raspodjela adipocita u klase na temelju površine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Razlike između skupina testirane su t-testom za nezavisne uzorke na razini značajnosti $\alpha = 0,05$. *** $p < 0,001$



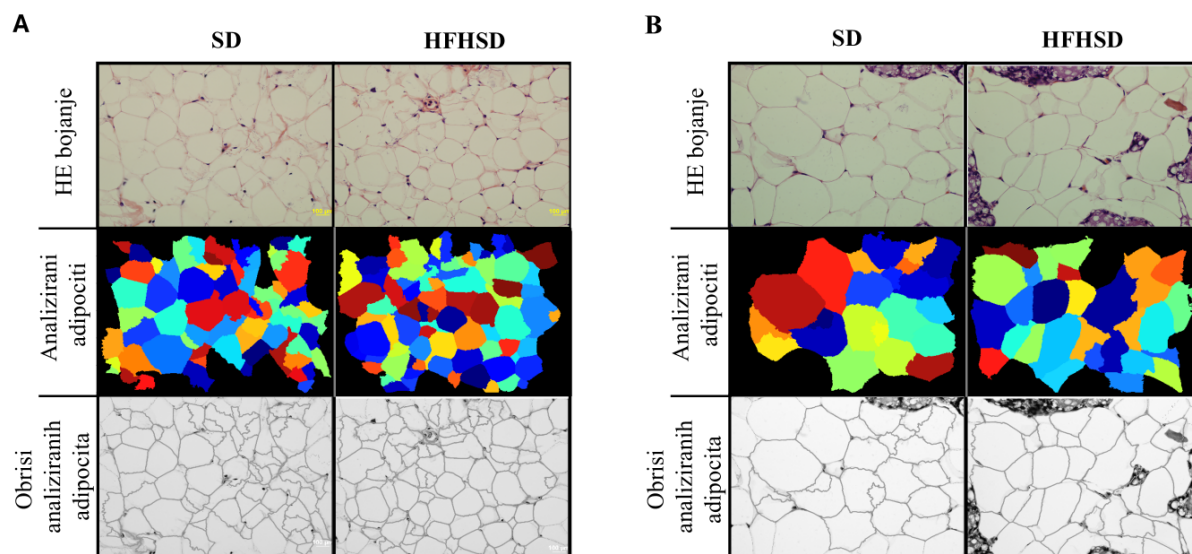
Slika 5.2.2. Histomorfometrijska analiza perigonadalnog (A) i visceralnog (B) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Gornji red – hemalaun i eozin bojanje masnog tkiva; Srednji i donji red - analiza i segmentacija adipocita u programu CellProfiler v.4.2.6.

Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkim hranom, imaju statistički značajno povećanje površine adipocita potkožnog ($p < 0,011$) i ružičastog ($p < 0,001$) masnog tkiva (Slika 5.2.3.A i Slika 5.2.4.). Srednja vrijednost površine adipocita SF SD skupine iznosi $336,50\mu\text{m}^2$, dok je kod HFHSD skupine povećana na $407,00\mu\text{m}^2$. Prosječna površina adipocita ružičastog masnog tkiva također je veća nego kod potkožnog. Srednja vrijednost površine PF kod SD skupine iznosi $527,13\mu\text{m}^2$, a kod HFHSD skupine $606,04\mu\text{m}^2$. Unatoč povećanju površine adipocita, kod oba tipa masnog tkiva, došlo je i do statistički značajnog povećanja broja adipocita po jedinici površine ($p < 0,001$) (Slika 5.2.3.B i Slika 5.2.4.). Prosječan broj adipocita SF po jedinici površine kod SD skupine je 58,48, a kod HFHSD skupine 75,62. Broj adipocita u PF kod SD skupine u prosjeku iznosi 17,62 adipocita po jedinici površine, a kod HFHSD skupine 29,29. Površine adipocita subkutanog i ružičastog masnog tkiva dodatno su analizirane raspodjelom adipocita u 6 klasa ovisno o njihovoj površini: klasa 1 ($< 2\,000\mu\text{m}^2$), klasa 2 ($2\,000 - 3\,999,99\mu\text{m}^2$), klasa 3 ($4\,000 - 5\,999,9\mu\text{m}^2$), klasa 4 ($6\,000 - 7\,999,9\mu\text{m}^2$), klasa 5 ($8\,000 - 9999,99\mu\text{m}^2$), klasa 6 ($>10\,000\mu\text{m}^2$). Dijeta, bogata šećerima i mastima, značajno je utjecala na

promjenu zastupljenosti različitih klasa adipocita u ružičastom masnom tkivu, dok je kod potkožnog masnog tkiva vidljiva tendencija povećanja adipocita u klasi 3, ali razlika nije statistički značajna. Pri standardnoj prehrani u potkožnom masnom tkivu prevladavaju adipociti klase 2 s 69,57%, dok u ružičastom masnom tkivu većina adipocita (56,52%) pripada klasi 3. Kao posljedica HFHSD kod ružičastog masnog tkiva dolazi do statistički značajnog povećanja površine adipocita koji pripadaju klasi 4 ($p < 0,001$) (Slika 5.2.3.C i Slika 5.2.3.D).

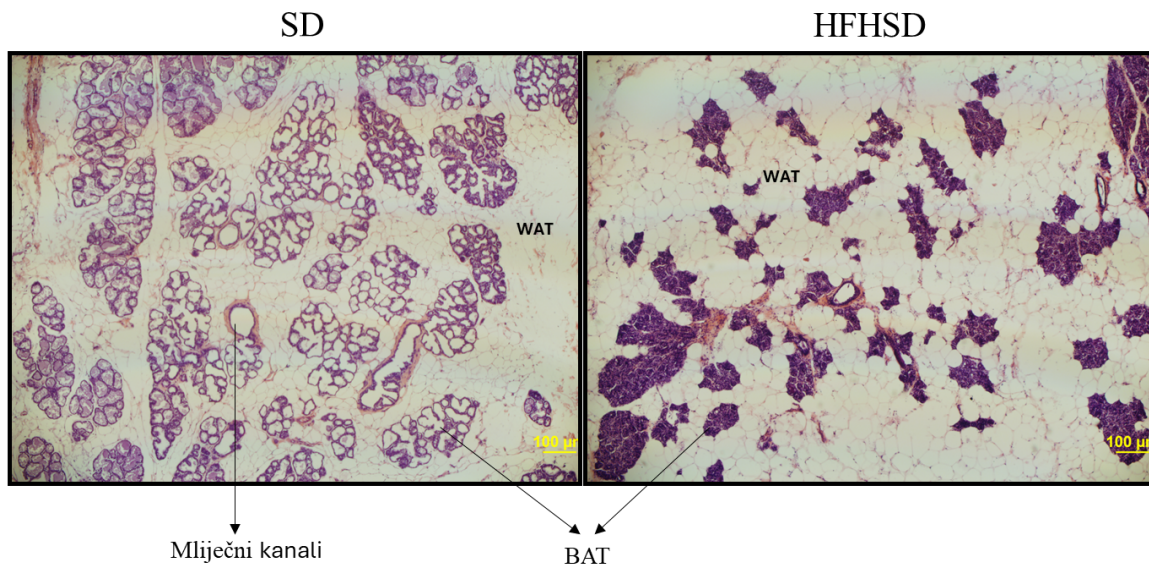


Slika 5.2.3. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize subkutanog (SF) i ružičastog (PF) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). (A) Površina adipocita; (B) Broj adipocita; (C, D) Raspodjela adipocita u klase na temelju površine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Razlike između skupina testirane su t-testom za nezavisne uzorke na razini značajnosti $\alpha = 0,05$. *** $p < 0,001$.



Slika 5.2.4. Histomorfometrijska analiza subkutanog perigonadalnog (SF) (A) i visceralnog ružičastog (PF) (B) masnog tkiva Sprague Dawley štakorica hranjenih standardnom dijetom (SD) i štakorica hranjenih dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Gornji red – hemalaun i eozin bojanje masnog tkiva; Srednji i donji red - analiza i segmentacija adipocita u programu CellProfiler v.4.2.6.

Usporedbom histoloških presjeka ružičastog masnog tkiva dojke Sprague Dawley štakorica, obojanih hemalaun eozin bojom, uočene su bitne razlike. Kod HFHSD mliječni kanalići su puno uži, a dominantno je bijelo masno tkivo na račun smeđeg masnog tkiva (Slika 5.2.5.).

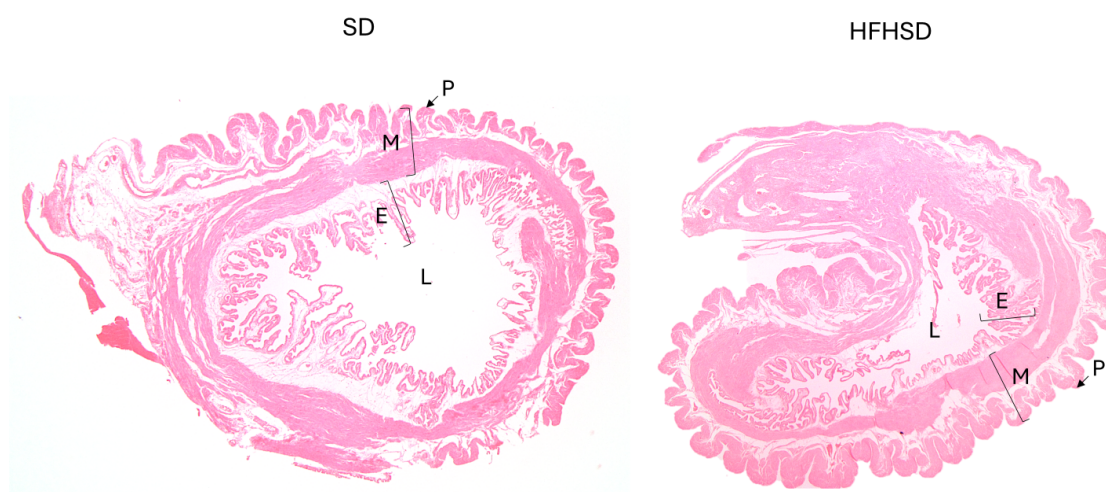


Slika 5.2.5. Histološki prikaz ružičastog masnog tkiva dojke kod SD i HFHSD skupina. Kratice: BAT - smeđe masno tkivo, WAT - ružičasto masno tkivo, SD - standardna dijeta, HFHSD - dijeta bogata mastima i šećerom.

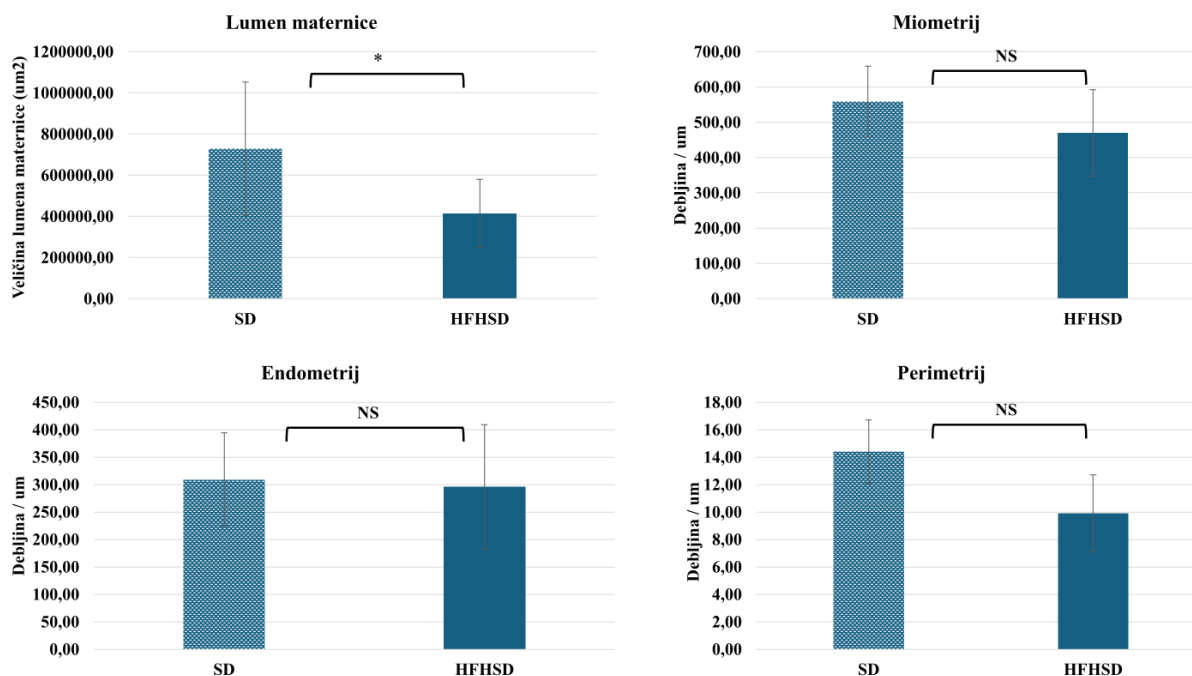
5. 3. Utjecaj HFHSD na lumen maternice, miometrij, endometrij i perimetrij gravidnih Sprague Dawley štakorica

Histološke analize pokazale su značajne promjene u strukturi maternice između analiziranih skupina. Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, imaju statistički značajno smanjenje površine uterinog lumena ($p < 0,005$) u usporedbi sa štakoricama hranjenima standardnom prehranom (Slika 5.3.1.). Srednja vrijednost veličine uterinog lumena kod skupine SD iznosi $728,487\mu\text{m}^2$, dok je kod skupine HFHSD smanjena na prosječnu vrijednost od $414,831\mu\text{m}^2$. Smanjenje lumena maternice praćeno je vidljivom tendencijom smanjenja debljine svih slojeva maternice, uključujući miometrij (SD $558,68\mu\text{m}^2$;

HFHSD $469,48\mu\text{m}^2$), endometrij (SD $309,96\mu\text{m}^2$; HFHSD $296,05\mu\text{m}^2$) i perimetrij (SD $14,40\mu\text{m}^2$; HFHSD $9,92\mu\text{m}^2$), no te razlike nisu statistički značajne (Slika 5.3.2.).



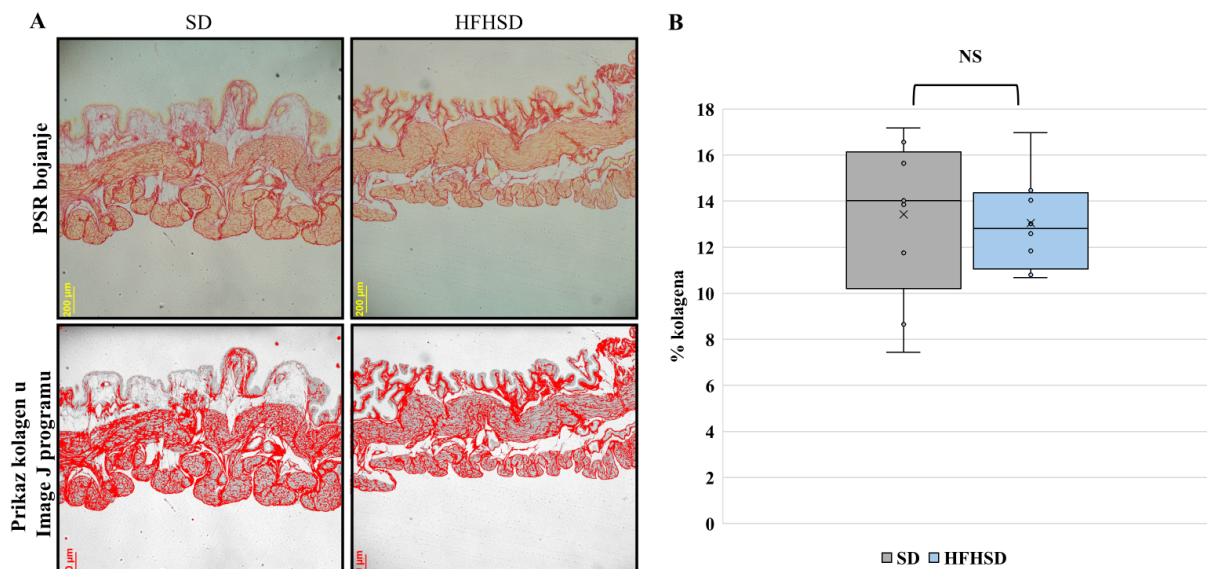
Slika 5.3.1. Usporedba histoloških presjeka maternica grupe štakorica na SD i grupe štakorica na HFHSD obojen hematoksilin eozin bojom, povećanje 5x. Kratice: SD - standardna prehrana, HFHSD – prehrana bogata mastima i šećerom; L - lumen maternice; E - endometrij; M - miometrij.



Slika 5.3.2. Veličina lumena maternice te debljina miometrija, endometrija i perimetrija. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; NS - nema statističke značajnosti. Mann-Whitney test, *** $p < 0,005$, $U = 27\ 000$.

5. 4. Utjecaj HFHSD na količinu kolagena u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

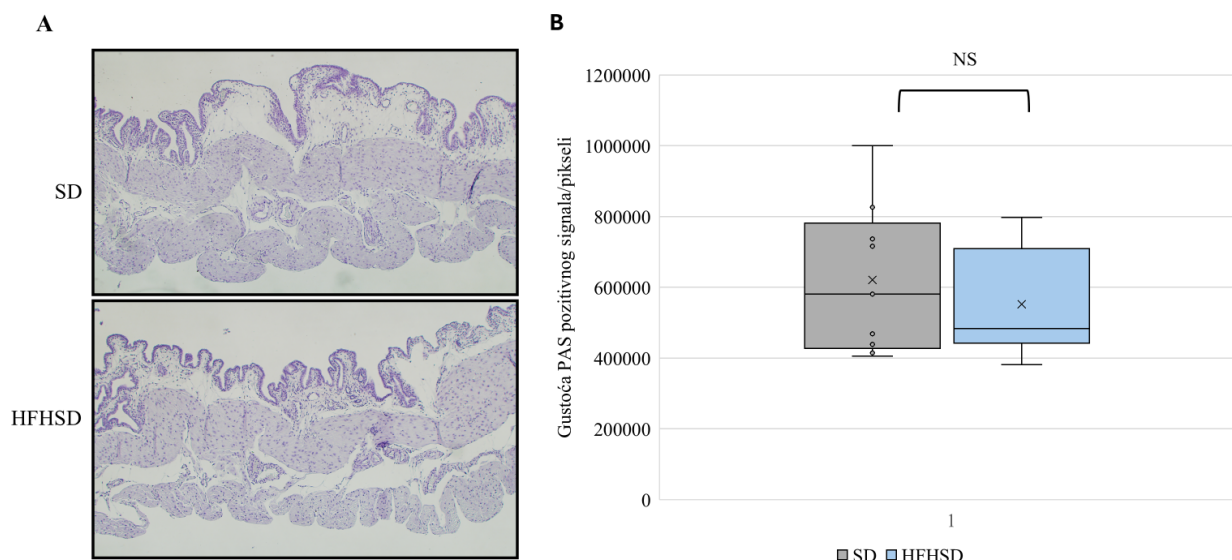
Metodom Picrosirius Red bojanjem (PSR) analizirana je količina kolagena u maternici Sprague Dawley štakorica (Slika 5.4.1. A). Statističkom analizom (Mann-Whitney U test) nije utvrđena značajna razlika između SD i HFHSD skupina u količini kolagena ($U = 31\ 000$, $Z = -0,481$, $p = 0,630$). Unatoč vidljivoj tendenciji smanjenja količine kolagena u HFHSD skupini, razlike nisu statistički značajne (Slika 5.4.1. B).



Slika 5.4.1. Količina kolagena u maternici Sprague Dawley štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike i analizirane slike, obojene Picrosirius Red metodom, povećanje 5x. (B) Rezultati su prikazani kao postotak kolagena u maternici štakorica. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; NS - nema statističke značajnosti. *** $p < 0,001$.

5. 5. Utjecaj HFHSD na količinu glikogena u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

Taloženje glikogena u maternici Sprague Dawley štakorica, hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom bogatom mastima i šećerom, (HFHSD) analizirano je metodom Periodic Acid-Schiff (PAS) (Slika 5.5.1.A). U maternicama Sprague Dawley štakorica hranjenih, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, (HFHSD) vidljiva je tendencija blagog smanjenja taloženja količine glikogena u tkivu maternice u usporedbi sa štakoricama hranjenima standardnom prehranom (SD), ali razlika nije statistički značajna ($U = 32\ 000$, $Z = -0,385$, $p = 0,700$) (Slika 6B). Srednja vrijednost površine taloženja glikogena u maternici iznosila je $588\ 667,47 \pm 182\ 685,75\ \mu\text{m}^2$, s rasponom od $381\ 509,00\ \mu\text{m}^2$ do $1\ 000\ 455,00\ \mu\text{m}^2$. Medijan vrijednosti iznosio je $489\ 049,00\ \mu\text{m}^2$, dok je 25% vrijednosti bilo ispod $435\ 477,00\ \mu\text{m}^2$, a 75% vrijednosti ispod $735\ 072,50\ \mu\text{m}^2$ (Slika 5.5.1.B).

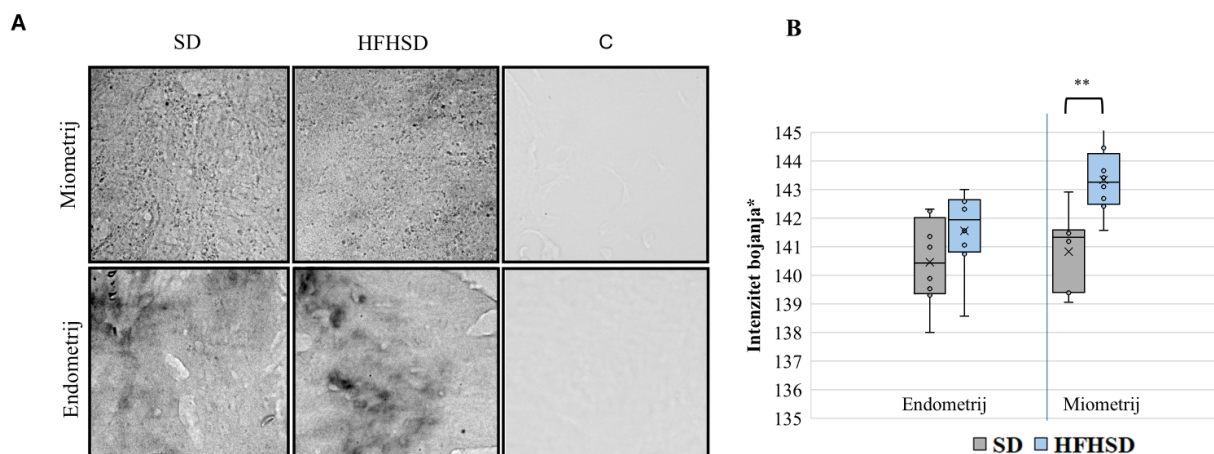


Slika 5.5.1. Količina glikogena u maternici Sprague Dawley štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike i analizirane slike, obojene PAS metodom, povećanje 5x. (B) Količina glikogena mjerena je preko intenziteta obojenja. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; NS - nema statističke značajnosti. *** $p < 0,001$.

5. 6. Utjecaj HFHSD na izražaj inzulinskog receptora u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, (HFHSD) pokazuju statistički značajno smanjenje izraženosti inzulinskog receptora (IR) u miometriju u usporedbi s endometrijem i miometrijem grupe na standardnoj prehrani (SD grupom) ($p < 0,01$, $p = 0.007$) (Slika 5.6.1.A).

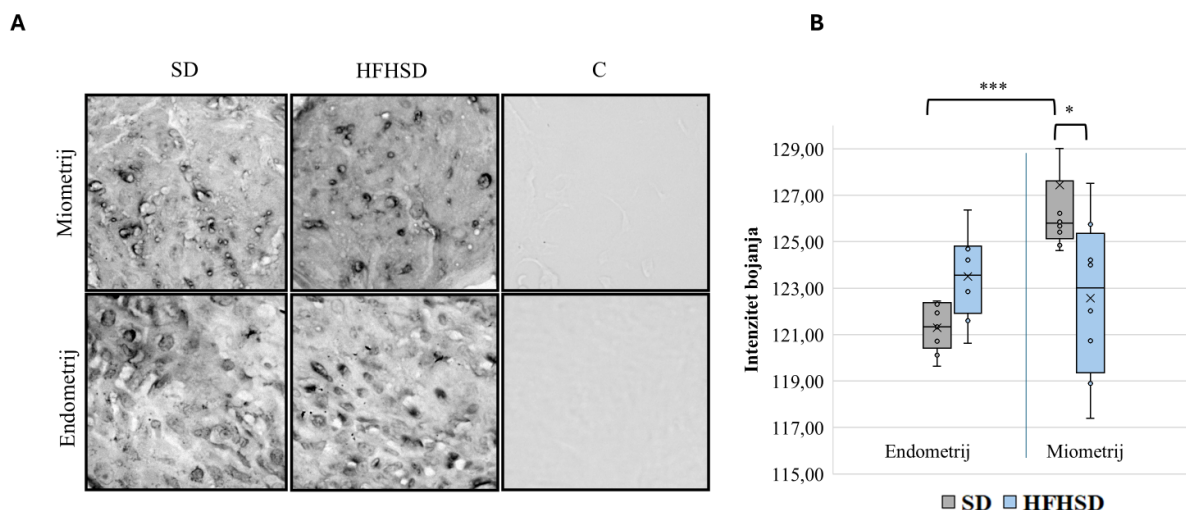
Srednja vrijednost intenziteta obojenja IR-a u endometrij SD skupine iznosi $140,45 \pm 1,52$, dok je kod HFHSD skupine blago povišena na $141,56 \pm 1,45$. Razlika između skupina u endometrij nije statistički značajna (NS). Srednja vrijednost intenziteta obojenja izraženosti IR-a u miometriju kod SD skupine iznosi $140,82 \pm 1,37$, dok je kod HFHSD skupine značajno veća i iznosi $143,35 \pm 1,22$, što predstavlja statistički značajno smanjenje ekspresije IR-a ($p < 0,01$). Ovi rezultati i nalazi ukazuju na izraženiji utjecaj HFHSD prehrane na miometrij nego na endometrij (Slika 5.6.1.B).



Slika 5.6.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za inzulinski receptor (IR) u maternici Sprague Dawley štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike imunohistokemije, povećanje 40x. (B) Ekspresija IR-a u maternici štakorice. *0 = najveći intenzitet; 255 = bez bojenja. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; K - kontrola. ** $p < 0,01$.

5. 7. Utjecaj HFHSD na izražaj leptinskog receptora u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

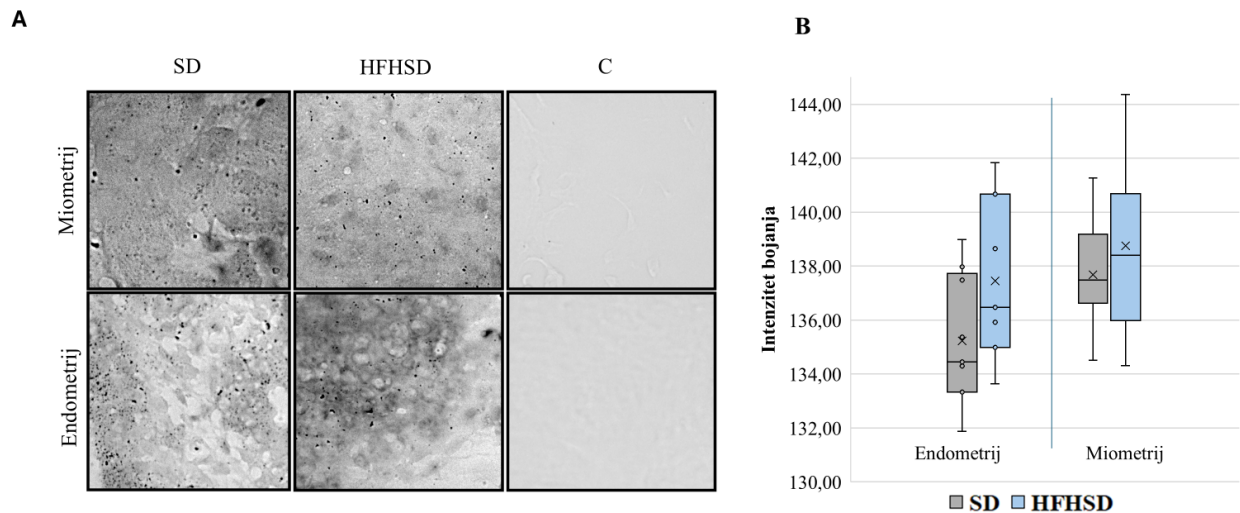
Štakorice hranjene standardnom hranom imaju statistički značajno manju ekspresiju ObR-a u miometriju nego u endometriju ($p = 0,001$). Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, (HFHSD) pokazuju promjene u ekspresiji intenziteta imunoreaktivnog bojanja za leptinski receptor (ObR) u miometriju, dok u endometriju nema značajne promjene. U miometriju je srednja vrijednost intenziteta obojenja ObR-a za SD skupinu značajno veća i iznosi $127,44 \pm 4,69$ u odnosu na HFHSD skupinu, kod koje je srednja vrijednost izraženosti $122,57 \pm 3,45$, što predstavlja statistički značajno povećanje ekspresije ObR-a ($p = 0,019$). Ova razlika potvrđena je Welchovim testom: $F(3,14.467) = 6.570$, $p = 0,005$ (Slika 5.7.1.B). Srednja vrijednost intenziteta obojenja ObR-a u endometriju SD skupine iznosi $121,30 \pm 1,05$, dok je u HFHSD skupini povišena na $123,51 \pm 1,88$, ali navedena razlika nije statistički značajna (Slika 5.7.1.A). Ove promjene sugeriraju različit odgovor slojeva maternice na prehranu bogatu mastima i šećerima.



Slika 5.7.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za leptinski receptor (ObR) u maternici Sprague Dawly štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike imunohistokemije, povećanje 40x. (B) Ekspresija ObR-a u maternici štakorice. *0 = najveći intenzitet; 255 = bez bojenja. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; C - kontrola (*prema engl.control*). *** $p \leq 0,001$.

5. 8. Utjecaj HFHSD na izražaj UCP1 u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

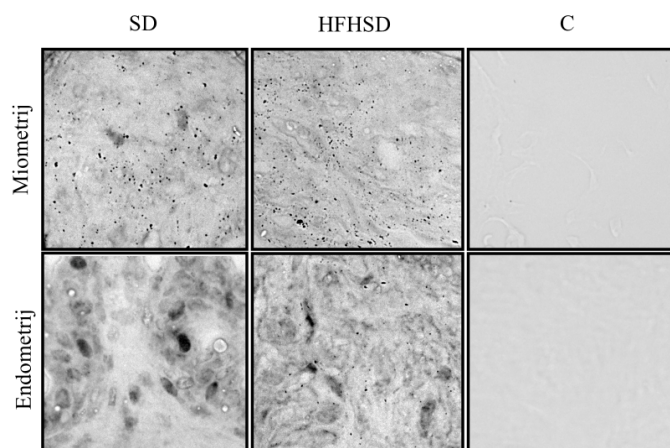
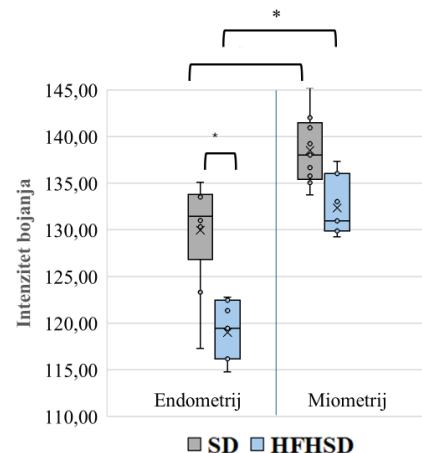
Sprague Dawley štakorice, koje su tijekom trudnoće hranjene masnom i slatkom hranom, (HFHSD) nemaju statistički značajnu razliku u izražajnosti UCP1 proteina u maternici, u usporedbi s kontrolnim skupinama. Kvantitativna analiza intenziteta bojanja UCP1 prikazana je na Slici 5.8.1.B, dok su reprezentativne mikroskopske slike prikazane na Slici 5.8.1.A. Srednja vrijednost intenziteta obojenja izraženosti UCP1 u endometriju SD skupine iznosi $135,23 \pm 2,41$, dok je u HFHSD skupini blago povišena i iznosi $137,93 \pm 3,11$. U miometriju je srednja vrijednost intenziteta obojenja UCP1 za SD skupinu $137,62 \pm 1,90$, dok je u HFHSD skupini dodatno povećana i iznosi $138,43 \pm 3,44$. Navedene razlike nisu statistički značajne ($F = 2,301$, $p = 0,099$), ali prisutna tendencija smanjenja ekspresije UCP1 proteina u miometriju i endometriju upućuju na mogući utjecaj prehrane na regulaciju UCP1 u materničnom tkivu.



Slika 5.8.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojenja za UCP1 protein u maternici Sprague Dawley štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike imunohistokemije, povećanje 40x. (B) Ekspresija UCP1 u maternici štakorice. *0 = najveći intenzitet; 255 = bez bojenja. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; K - kontrola. *** $p < 0,001$.

5. 9. Utjecaj HFHSD na izražaj UCP3 u maternici gravidnih Sprague Dawley štakorica

Sprague Dawley štakorice, hranjene hranom bogatom mastima i šećerima, (HFHSD) imaju značajno povišenu izražajnost UCP3 proteina u endometriju u usporedbi s SD grupom ($p = 0,036$). U miometriju, izraženost UCP3 kod SD skupine je najviša i iznosi $138,12 \pm 3,60$, dok je kod HFHSD skupine smanjena na $131,51 \pm 2,59$. Kvantitativna analiza intenziteta bojanja UCP1 prikazana je na Slici 5.9.1.B, dok su reprezentativne mikroskopske slike prikazane na Slici 5.9.1.A. Srednja vrijednost intenziteta obojenja UCP3 proteina u endometriju kod SD skupine iznosi $129,95 \pm 5,89$, dok je u HFHSD skupini smanjena na $121,76 \pm 8,34$. Analiza intenziteta obojenja UCP3 proteina unutar skupina pokazala je statistički značajno povećanu izražajnost UCP3 proteina u miometriju u odnosu na endometrij kod SD ($p = 0,029$) i HFHSD ($p = 0,021$) grupe.

A**B**

Slika 5.9.1. Relativni intenzitet imunoreaktivnog bojanja za UCP3 protein u maternici Sprague Dawley štakorica. (A) Reprezentativne mikroskopske slike imunohistokemije, povećanje 40x. (B) Ekspresija UCP3 u maternici štakorice. *0 = najveći intenzitet; 255 = bez bojenja. Kratice: SD - standardna prehrana; HFHSD - prehrana bogata mastima i šećerom; K - kontrola. * $p < 0,005$.

6. RASPRAVA

Prehrana bogata mastima i šećerom značajno mijenja metaboličke puteve u tijelu, često dovodeći do poremećaja kao što su pretilost, inzulinska rezistencija i kronične upale, čije posljedice značajno utječu na različite organske sustave, uključujući reproduktivni sustav i masno tkivo. Metaboličke promjene u maternici, kao glavnom organu reproduktivnog sustava, dovode do promjena u strukturi i funkciji, što može utjecati na plodnost i ishod trudnoće. Isto tako, promjene u masnom tkivu, posebno u potkožnom i perigonadalmom, utječu na očuvanje metaboličke homeostaze i na hormonalnu regulaciju. Ženke štakora Sprague Dawley koriste se kao jedan od osnovnih modela u biomedicinskim istraživanjima jer dijele određene fiziološke i metaboličke sličnosti s ljudima. Njihov odgovor na prehranu bogatu mastima i šećerom nudi značajan uvid u moguće rizike i mehanizme djelovanja pretilosti. Prethodne studije pokazale su da prehrana bogata mastima i šećerom može uzrokovati promjene u morfologiji maternice.

Cilj ove studije bio je istražiti učinke visokokalorične prehrane bogate mastima i šećerom (HFHSD) na strukturu i funkciju maternice i masnog tkiva kod gravidnih Sprague Dawley štakora. Rezultati ukazuju na značajne promjene uzrokovane HFHSD-om, koje mogu imati utjecaj na metaboličke procese i reproduktivne funkcije.

Utjecaj HFHSD-a na masno tkivo

Jedan od ključnih rezultata istraživanja bio je hipertrofija adipocita u potkožnom, perigonadalmom i visceralnom masnom tkivu kao posljedica prehrane bogate mastima i šećerima. Potkožno masno tkivo predstavlja primarno mjesto u kojem se skladište masti uz nizak rizik za razvoj metaboličkih poremećaja (128), dok visceralno masno tkivo, s višim nivoom metaboličke aktivnosti, pokazuje izraženiji utjecaj na razvoj sistemskih upalnih procesa i inzulinske rezistencije, čime ima potencijalno ozbiljniji učinak na opće zdravlje (129, 130). Perigonadalmno masno tkivo ima važnu reproduktivnu funkciju. Hipertrofija adipocita, u analiziranim tipovima masnih tkiva, signalizira povećano skladištenje energije u obliku masti, što ne predstavlja samo morfološke već i značajne funkcionalne promjene, a može imati negativan utjecaj na metaboličke odgovore, hormonsku ravnotežu i reproduktivno zdravlje. Ove promjene, uzrokovane prekomjernim nakupljanjem lipida, pridonose razvoju različitih sistemskih metaboličkih poremećaja, kao što su inzulinska i leptinska

rezistencija, povećanoj proizvodnji upalnih citokina i metaboličkoj disfunkciji. Hipertrofija adipocita u visceralnom masnom tkivu povećava rizik od metaboličkih poremećaja, uključujući dijabetes tipa 2 i kardiovaskularne bolesti (131). Studija objavljena u časopisu *Scientific Reports* pokazuje da hipertrofija adipocita u visceralnom masnom tkivu dovodi do dislipidemije i inzulinske rezistencije, naglašavajući ulogu veličine adipocita u razvoju metaboličkih poremećaja (132). Također, istraživanje u časopisu *Frontiers in Physiology* ističe da kronična upala u masnom tkivu, potaknuta hipertrofijom adipocita, predstavlja ključni čimbenik rizika za razvoj inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 kod pretilih osoba (133). Dodatno, pregledni članak u časopisu *Endocrine Reviews* raspravlja o razlikama između potkožnog i visceralnog masnog tkiva te njihovoj povezanosti s metaboličkim sindromom, naglašavajući da je hipertrofija adipocita u visceralnom masnom tkivu posebno štetna za metaboličko zdravlje djelovanjem na metabolizam lipida, glukoze i proteina te na inzulinsku osjetljivost (11).

Za razliku od hipertrofije, koja se odnosi na povećanje površine adipocita, hiperplazija predstavlja dodatni mehanizam rasta masnog tkiva koji se odnosi na povećanje broja adipocita. Tijekom trudnoće, žensko tijelo prolazi kroz niz fizioloških promjena u smislu hipertrofije i hiperplazije kako bi podržalo rast i razvoj fetusa (134). Jedna od tih promjena uključuje prilagodbe u masnom tkivu koje služe kao energetska rezerva za majku i fetus u svrhu pripreme tijela za porod i laktaciju. Istraživanja su pokazala da tijekom trudnoće dolazi do anaboličkih promjena koje uključuju povećanje masnih zaliha, što je posljedica hiperplazije adipocita i pojačane lipogeneze u masnom tkivu, što rezultira povećanjem broja i veličine adipocita, posebno u potkožnom masnom tkivu (135). Ove promjene omogućuju adekvatnu pohranu energije potrebne za podršku fetusa i pripremu za dojenje. Fiziološki odgovor ružičastog masnog tkiva u smislu hiperplazije bijelog masnog tkiva, odnosno povećanja adipocita unutar mliječne žlijezde, osigurava prilagodbu mliječne žlijezde povećanim metaboličkim zahtjevima i adekvatnu pripremu za laktaciju (136). Rezultati studije pokazali su da različiti tipovi masnog tkiva imaju drugačije mehanizme regulacije skladištenja masti. Kod potkožnog masnog tkiva uz hipertrofiju prisutna je i hiperplazija, što je karakteristika teške pretilosti i dodatno povećava rizik od razvoja metaboličkih poremećaja (137). Kod perigonadalnog i visceralnog masnog tkiva dominira hipertrofija, dok je kod ružičastog masnog tkiva dominantna hiperplazija. Dobiveni rezultati upućuju na učinak HFHSD, kao čimbenika koji ometa ravnotežu između adipogeneze i hipertrofije adipocita, preusmjeravajući ravnotežu od

adaptivne hiperplazije, koja predstavlja zaštitni mehanizam, prema hipertrofiji (137, 138, 139). Mehanizmi, koji utječu na ove promjene, su kronični upalni odgovor i promjene u signalnim putevima diferencijacije adipocita, kao posljedica epigenetskih promjena, čime mogu utjecati na trajnu modifikaciju ekspresije gena važnih za adipogenezu, metabolizam lipida i inzulinsku osjetljivost, što u konačnici, kroz transgeneracijske epigenetske mehanizme, može imati dugoročne posljedice jer povećava rizik za pretilost i metaboličke bolesti (140). Sve ove promjene dovode do fibroze i smanjene funkcionalnosti masnog tkiva koja se može očitovati kao lipotoksičnost u drugim organima (141). Smanjen broj adipocita može se objasniti povećanom stopom stanične smrti, izazvanom mehaničkim stresom, upalom ili razvojem fibroze masnog tkiva. Fibrozu masnog tkiva karakterizira nakupljanje i povećana proizvodnja proteina izvanstaničnog matriksa (ECM) koji u zdravom masnom tkivu ima sposobnost preoblikovanja radi prilagodbe fiziološkim fluktuacijama veličine adipocita. Međutim, u fibrotičnom masnom tkivu, kruti ECM gubi sposobnost dinamičke remodelacije (142) što dodatno narušava prilagodljivost masnog tkiva povećanom energetsom unosu i negativno utječe na njegovu funkciju.

Utjecaj HFHSD na maternicu

U skupini Sprague Dawley štakorica, koje su podvrgnute prehrani s visokim udjelom masti i šećera, (HFHSD) uočeno je značajno smanjenje površine uterinog lumena, bez promjena u debljini miometrija i endometrija. Ova specifična promjena sugerira možebitni utjecaj prehrane na unutarnju strukturu maternice, potencijalno narušavajući implantaciju embrija i održavanje trudnoće. Smanjenje površine uterinog lumena kod HFHSD skupine može se povezati s učincima prehrane na sustavnu upalu, hormonsku ravnotežu i metabolizam. Prethodne studije pokazale su da visok unos masnoća i šećera može uzrokovati inzulinsku rezistenciju i hiperinzulinemiju, što nepovoljno utječe na regulaciju estrogena i progesterona – ključnih hormona za normalnu funkciju maternice tijekom trudnoće (143). Također, upalni procesi inducirani HFHSD prehranom mogu uzrokovati promjene u vaskularizaciji ili tkivnoj remodelaciji, što posljedično utječe na veličinu lumena (144). Promjene u strukturi maternice, u vidu smanjenja lumena maternice utvrđene u ovom istraživanju, povezujemo s mogućim kliničkim implikacijama koje posredno mogu predstavljati ograničavajući čimbenik za transport spermija, implantaciju oplođenog jajašca, te rast i razvoj embrija. Mehanizme, koji dovode do smanjenja veličine lumena maternice, za sada

možemo samo pretpostaviti, ali najvjerojatnije je rezultat promijenjene regeneracije i remodulacije endometrija, što je od ključne važnosti za uspješnu trudnoću. Murakama i sur., istražujući brojnost i učinkovitost kloniranja mezenhimalnih matičnih stanica endometrija W5C5(+) i W5C5(-) u odnosu na indeks tjelesne mase (BMI), dob i reproduktivni ishod, dokazali su da je regenerativna sposobnost i plastičnost endometrija kod pretilih žena suboptimalna, što objašnjava povećani rizik od reproduktivnih komplikacija povezanih s pretilošću (145).

Iako HFHSD nije značajno utjecala na debljinu tkiva maternice, rezultati pokazuju smanjenu izražajnost inzulinskih i povećanu izražajnost leptinskih receptora u miometriju. Ovi rezultati naglašavaju osjetljivost mišićnog sloja maternice na metaboličke promjene izazvane visokokaloričnom prehranom. Smanjena izražajnost IR-a u miometriju kod HFHSD skupine povezuje se s metaboličkim promjenama, u smislu povećanja inzulinske rezistencije uzrokovane HFHSD. Prethodne studije su pokazale da visokokalorična prehrana može dovesti do promjena u osjetljivosti na inzulin, što može rezultirati promjenama u regulaciji inzulinskim receptorima u specifičnim tkivima, uključujući maternicu (146). Miometrij, kao sloj maternice koji ima ključnu ulogu u kontrakcijama i održavanju trudnoće, osobito je osjetljiv na metaboličke promjene (25), što objašnjava izraženiji učinak HFHSD prehrane u ovom sloju u odnosu na ostale slojeve maternice. Povećana ekspresija ObR-a u HFHSD skupini predstavlja metabolički odgovor na prehranu bogatu mastima i šećerima. Leptinski receptor ima ključnu ulogu u regulaciji apetita i metabolizma, a njegova povećana ekspresija upućuje na odgovor materničnog tkiva na promjene u dostupnosti nutrijenata (147, 148). Trenutno nema dostupnih studija, koje izravno povezuju prehranu bogatu mastima i šećerom s povećanom ekspresijom ObR-a u endometriju, ali dosadašnje studije pokazale su da visoka razina leptina, koja je karakteristična za pretilost i visokokaloričnu prehranu, može modulirati izraženost ObR-a u perifernim tkivima, uključujući maternicu. Afrin i sur., dokazali su da adipociti izravno komuniciraju s matičnim stanicama u miometriju maternice, koje izražavaju leptinske receptore i povećavaju njihovu ekspresiju pod utjecajem leptina i adiponektina, što u konačnici rezultira proliferacijom miometrijskih matičnih stanica (*prema engl.myometrial stem cells*, MSC) posredovanom putem Wnt/ β -katenin i TGF- β /SMAD signalnih puteva te proizvodnjom kolagena (149). Ovi rezultati dodatno potvrđuju povezanost između HFHSD prehrane i metaboličkih prilagodbi u reproduktivnim organima.

Rezultati ukazuju na značajno manju izražajnost ObR-a u miometriju u usporedbi s endometrijem SD. Endometrij ima ključnu ulogu u implantaciji i razvoju fetusa te je poznato da leptin modulira procese poput angiogeneze i imunološkog odgovora u ovom sloju (150).

Za razliku od endometrija, miometrij pokazuje povećanu izražajnost ObR-a u HFHSD skupini u usporedbi s SD, što implicira na veću osjetljivost miometrija na metaboličke promjene, vjerojatno zbog njegove uloge u kontrakcijama i energetske zahtjevima tijekom trudnoće. Manji broj ObR-a u miometriju može utjecati na kontraktilnu funkciju maternice ili signalne puteve povezane s leptinom, što potencijalno može imati implikacije za ishod trudnoće (31).

Stabilnost kolagena u ovisnosti o HFHSD

Utjecaj HFHSD na depozite kolagena u maternici do sada nije istraživao. U ovom istraživanju uočeno je da kolagenski depozit u maternici nije bio značajno izmijenjen između HFHSD i kontrolnih skupina. Međutim, blaga tendencija smanjenja kolagena ukazuje na potencijalne dugoročne posljedice koje zahtijevaju dodatna morfološka i funkcionalna istraživanja. Kolagen je ključan za održavanje strukturalnog integriteta i biomehaničkih karakteristika maternice, a njegova stabilnost sugerira otpornost tkiva na kratkotrajne nutritivne promjene (151). Međutim, blago smanjenje ukupne količine kolagena kod HFHSD skupine moglo bi upućivati na potencijalne dugoročne posljedice koje nisu uočljive u kratkom razdoblju analize. Tijekom kasne faze trudnoće, maternica prolazi kroz brojne promjene kako bi se pripremila za porod. Jedna od ključnih promjena je remodeliranje vezivnog tkiva, osobito smanjenje količine kolagena u vratu maternice u svrhu njegovog omekšavanja i skraćivanja s ciljem omogućavanja dilatacije tijekom poroda (152, 153, 154). Iako se glavna istraživanja fokusira na cerviks, slični procesi mogu se odvijati u miometriju radi osiguravanja fleksibilnosti i pravilne kontraktilnosti tijekom poroda. Hormoni poput relaksina i estrogena igraju ključnu ulogu u regulaciji ovih promjena, potičući razgradnju kolagena i povećavajući elastičnost tkiva. Ovi procesi su neophodni za uspješan vaginalni porod. S obzirom na važnu ulogu kolagena u osiguravanju strukture i funkcije maternice tijekom trudnoće, buduće studije trebale bi istražiti utjecaj HFHSD prehrane na druge aspekte remodeliranja tkiva maternice, poput enzima uključenih u razgradnju kolagena (npr. metaloproteinaze) ili promjena u drugim komponentama izvanstaničnog matriksa.

Metaboličke promjene i glikogen

Prehrana bogata mastima i šećerima (HFHSD) nije značajno utjecala na ukupnu količinu glikogena u maternici, unatoč vidljivoj blagoj tendenciji smanjenja u HFHSD skupini. Glikogen, kao ključni energetske izvor tijekom trudnoće, može reflektirati rane znakove metaboličkih poremećaja, osobito u uvjetima kroničnog energetskeg viška (155, 156). Ranija istraživanja sugeriraju da visokokalorična prehrana može utjecati na razinu inzulina i osjetljivost na inzulin, što posljedično može mijenjati skladištenje glikogena. Prilikom konzumacije visokokalorične prehrane, kratkoročno dolazi do pojačane sekrecije inzulina koji potiče ulazak glukoze u jetru i mišiće gdje se ona pohranjuje kao glikogen. Dugoročna izloženost prehrani s visokim udjelom masti i šećera dovodi do inzulinske rezistencije, stanja u kojem jetra i mišića postanu otporni na inzulin, te se glikogeneza preusmjerava u lipogenezu (157). Iako istraživanja o skladištenju glikogena u maternici tijekom visokokalorične prehrane ne postoje, ovi podaci sugeriraju da inzulinska rezistencija može smanjiti razinu glikogena, što može utjecati na energetske potrebe maternice tijekom trudnoće. Rezultati ove studije također podržavaju ove tvrdnje. Tendencija smanjenja količine glikogena mogla bi biti povezana s promjenama u lokalnoj regulaciji metabolizma ugljikohidrata ili smanjenjem dostupnosti potrebnih nutrijenata za sintezu glikogena zbog prehrane bogate mastima i šećerima. Iako ne postoje statistički značajne između skupina, razlike u varijabilnosti unutar skupina, s većom varijabilnošću u SD skupini, upućuju na individualne razlike u metabolizmu glikogena, što dodatno otežava interpretaciju rezultata. Manja varijabilnost u HFHSD skupini može biti rezultat homogenijeg odgovora na prehrane promjene ili ograničenja u mogućnosti metabolizma glikogena zbog prehrane.

Utjecaj HFHSD na izražajnost UCP proteina

U endometriju i miometriju su vidljive tendencije smanjenja izražajnosti UCP1 proteina kod HFHSD, bez statističke značajnosti. Ovi nalazi ukazuju na moguću ulogu HFHSD prehrane u moduliranju metaboličkih procesa maternice, ali zahtijevaju daljnju potvrdu. UCP1 poznat je po svojoj ulozi u regulaciji termogeneze i metaboličke aktivnosti (158), a njegova prisutnost u maternici može ukazivati na specifične prilagodbe tkiva na energetske višak uzrokovan HFHSD prehranom. U ranije provedenim studijama dokazano je da se koncentracija UCP1 receptora u

trudnoći tranzitorno povećava (159), što u našoj studiji nije dokazana promjena. Iako su razlike između skupina u endometriju bile manje izražene, u smislu varijabilnosti podataka unutar grupa, mogle bi odražavati prilagodbu ovog sloja na HFHSD prehranu, osobito s obzirom na njegovu ulogu u implantaciji i održavanju trudnoće. Nepostojanje statistički značajnih razlika između skupina ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem kako bi se razumjele molekularne i funkcionalne implikacije ovih nalaza. Osim kvantitativne analize, buduće studije trebale bi uključiti detaljne funkcionalne analize UCP1 u kontekstu maternice kako bi se istražila njegova uloga u metaboličkom odgovoru na HFHSD prehranu. HFHSD uzrokovala je povećanje izražajnosti UCP3 proteina u endometriju, što je u konačnici rezultiralo značajnom razlikom između endometrija i miometrija, koja kod SD skupine nije uočena. Ove promjene mogu utjecati na funkciju endometrija tijekom trudnoće, uključujući procese kao što su implantacija i održavanje fetusa, dok vidljiva tendencija povećanja izražajnosti UCP3 proteina u miometriju implicira visoku energetske potrošnje i funkcionalnu spremnost ovog sloja. Povećana potreba za energijom u miometriju tijekom trudnoće može činiti ovaj sloj osjetljivijim na promjene u prehrani. Navedeni rezultati ukazuju na značajne promjene u mitohondrijskoj funkciji i energetskeg metabolizma maternice. Povećanje izražaja UCP3 proteina u maternici može imati i zaštitne i štetne učinke, ovisno o fiziološkom kontekstu u kojem ga promatramo. Na povećanu ekspresiju UCP3 u maternici trudnica s metaboličkim poremećajima gledamo kao na prilagodbu na oksidativni stres (160). S druge strane, povišena ekspresija UCP3 dovodi do smanjene proizvodnje ATP-a, što utječe na implantaciju embrija i rast fetusa, a povezuje se i s disfunkcijom posteljice te potencijalno povećava rizik od metaboličkih poremećaja tijekom trudnoće poput gestacijskog dijabetesa i preeklampsije. Dodatno, smanjena dostupnost ATP-a, može utjecati na funkciju glatkih mišića maternice kao i na promjene u sintezi prostaglandina koji utječu na tonus maternice tijekom trudnoće i poroda (161). Energetski disbalans ovih proteina može reflektirati disfunkciju mitohondrija, potencijalno povezanu s inzulinskom rezistencijom i upalnim procesima (162, 163, 164).

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedene studije možemo zaključiti da prehrana bogata mastima i šećerima (HFHSD) tijekom trudnoće značajno utječe na funkcionalnost i strukturu maternice te masnog tkiva gravidnih Sprague Dawley štakorica. Specifični zaključci koji proizlaze iz rezultata studije su:

1. HFHSD dovodi do povećanja potkožnog, visceralnog, perigonadalnog i ružičastog masnog tkiva, kao i ukupne težine masnog tkiva gravidnih Sprague Dawley štakorica.
2. HFHSD uzrokuje hipertrofiju adipocita u potkožnom, perigonadalmom i visceralnom masnom tkivu te hiperplaziju u ružičastom masnom tkivu.
3. HFHSD uzrokuje smanjenje površine lumena maternice.
4. HFHSD ne utječe na količinu kolagena i glikogena u maternici.
5. HFHSD uzrokuje smanjenje izražajnost IR-a u miometriju.
6. HFHSD uzrokuje povećanje izražajnosti ObR-a u miometriju.
7. HFHSD ne utječe na izražaj UCP1 proteina u maternici, ali uzrokuje značajno povećanje izražajnosti UCP3 proteina u endometriju.

Otpornost materničnog tkiva na promjene u taloženju kolagena i glikogena, u kombinaciji s lokalnim promjenama u metaboličkoj regulaciji, ukazuje na prilagodljivost maternice u kratkom vremenskom razdoblju. Međutim, zabilježeni učinci HFHSD-a, poput smanjenja izražajnosti inzulinskog receptora i povećanja izražajnosti leptinskog receptora u miometriju, kao i povećanje izražajnosti UCP3 proteina u endometriju, upućuju da postoje posebni mehanizmi regulacije izražaja receptora u maternici kao odgovor na metaboličke disfunkcije. Ovo istraživanje pruža temelj za razumijevanje mehanizama kojima prehrana utječe na reproduktivno zdravlje i metabolizam tijekom trudnoće. Nadalje, rezultati podržavaju potrebu za uvođenjem preciznijih mjernih metoda za procjenu pretilosti, uključujući parametre poput omjera struka i visine, kako bi se unaprijedila istraživanja i terapijske strategije. Zaključno, pravilna prehrana i rana intervencija ključni su za očuvanje reproduktivnog zdravlja i prevenciju metaboličkih bolesti, dok su daljnja istraživanja potrebna za dublje razumijevanje molekularnih mehanizama, koji reguliraju ove promjene, i njihov utjecaj na dugoročne ishode trudnoće. Istraživanjima na animalnim modelima

moguće je dobiti sveobuhvatnije razumijevanje učinaka visokokalorične prehrane na zdravlje maternice, što bi moglo doprinijeti razvoju novih terapijskih pristupa u liječenju metaboličkih i reproduktivnih poremećaja.

8. SAŽETAK

Uvod: Održavanje energetske ravnoteže reguliranjem unosa i potrošnje energije složeno je međudjelovanje biokemijskih reakcija i hormonske kontrole. U slučajevima pretilosti, masno tkivo preuzima značajnu ulogu endokrinog organa. Međutim, dostupni su ograničeni podaci o utjecaju pretilosti na histopatološke i biokemijske promjene u maternici. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj pretilosti na maternicu na kraju trudnoće, pri čemu je korišten animalni model Sprague Dawley štakora.

Metode: Pretilost je inducirana prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD) u trajanju od 9 tjedana i tijekom razdoblja trudnoće. Nakon žrtvovanja životinja, analizirano je pet različitih tkiva: bijelo masno tkivo (potkožno, visceralno i perigonadalno), ružičasto masno tkivo (tkivo dojke) i maternica s osvrtnom na histopatološku analizu. Dodatno, u maternici je analizirana količina kolagena i glikogena te izražaj inzulinskog (IR) i leptinskog receptora (ObR) kao i mitohondrijskih proteina razdvajanja (UCP1 i UCP3).

Rezultati: Tijekom eksperimenta, u grupi štakorica na HFHSD, došlo je do značajnog povećanja površine adipocita u potkožnom, visceralnom, perigonadalmom i ružičastom masnom tkivu. Prehrana bogata mastima i šećerima (HFHSD) tijekom trudnoće uzrokuje značajno smanjenje veličine lumena maternice Sprague Dawley štakorica, dok debljina slojeva maternice, endometrija i miometrija ostaje nepromijenjena. Iako nije zabilježeno statistički značajno smanjenje količine kolagena i glikogena, vidljiva tendencija smanjenja ukazuje na moguće metaboličke prilagodbe maternice na HFHSD prehranu. HFHSD prehrana značajno smanjuje izraženost inzulinskog (IR) i povećava izražajnost leptinskog receptora (ObR) u miometriju, što ukazuje na njegovu osjetljivost na metaboličke promjene. Nasuprot tome, izraženost UCP1 receptora ostaje stabilna, dok je izraženost UCP3 receptora značajno smanjena u oba sloja maternice ($p < 0,005$), sugerirajući potencijalne disfunkcije u mitohondrijskom metabolizmu. Rezultati ukazuju na moguće dugoročne negativne posljedice HFHSD prehrane na reproduktivno zdravlje.

Zaključci: Prehrana bogata mastima i šećerima (HFHSD) tijekom trudnoće značajno utječe na strukturne i funkcionalne promjene maternice te masnog tkiva gravidnih Sprague Dawley štakorica. Iako se masa štakorica na kraju trudnoće ne razlikuje, HFHSD dovodi do povećanja

potkožnog, visceralnog, perigonadalnog i ružičastog masnog tkiva, kao i ukupne mase masnog tkiva. Uočena je hipertrofija adipocita u potkožnom, perigonadalnog i visceralnom masnom tkivu te hiperplazija u ružičastom masnom tkivu, što ukazuje na prilagodbu masnog tkiva na metaboličke promjene uzrokovane prehranom. HFHSD uzrokuje smanjenje lumena maternice, dok ne mijenja količinu kolagena i glikogena u materničnom tkivu, što upućuje na očuvanje strukturnog integriteta maternice unatoč metaboličkim izazovima. Međutim, dolazi do smanjenja izraženosti inzulinskog receptora (IR) i povećanja izraženosti leptinskog receptora (ObR) u miometriju, što sugerira poremećenu hormonsku signalizaciju u maternici tijekom trudnoće. Također, HFHSD ne utječe na izražaj UCP1 proteina, ali značajno povećava ekspresiju UCP3 u endometriju, što može imati posljedice na lokalnu energetska regulaciju i oksidativni stres. Ovi rezultati ističu povezanost nezdrave prehrane s metaboličkim disfunkcijama, upalnim procesima i reproduktivnim poremećajima. Otpornost maternice na promjene u taloženju kolagena i glikogena, uz istodobne metaboličke prilagodbe, upućuje na mogućnost kratkoročne kompenzacije nepovoljnih uvjeta. Ipak, identificirani učinci, poput smanjene izraženosti IR-a i povećane ekspresije UCP3, mogu imati dugoročne posljedice na funkciju maternice i ishod trudnoće. Pravilna prehrana i rana intervencija ključni su za očuvanje reproduktivnog zdravlja i prevenciju metaboličkih bolesti, dok su daljnja istraživanja potrebna za dublje razumijevanje molekularnih mehanizama koji reguliraju ove promjene i njihov utjecaj na dugoročne ishode trudnoće.

Ključne riječi: masno tkivo; maternica; prehrana; štakori; trudnoća.

The effects of high-fat, high-sugar diet on morphological and functional characteristics of uterus and subcutaneous and perigonadal adipose tissue in Sprague Dawley rats

9. SUMMARY

Background: Maintaining energy balance between the regulation of energy intake and expenditure is a complex interplay of biochemical reactions and hormonal control. In case of obesity, adipose tissue takes on the significant role of an endocrine organ, producing various molecules known as adipokines, including leptin, adiponectin, and kisspeptin. However, limited data are available on how these adipokines influence histopathological changes in the uteri of obese pregnant rats. This study aims to investigate the impact of obesity on the adipose tissue, as well as on the gravid uterus in Sprague Dawley rat model.

Material and Methods: Obesity was induced by a high-fat, high-sugar diet (HFHSD) for nine weeks, including the pregnancy period. Five different tissues of the euthanised animals were analyzed: white adipose tissue (subcutaneous, visceral, and perigonadal), pink adipose tissue (mammary gland tissue) and the uterus which was histopathologically analysed. Additionally, collagen and glycogen content, as well as the expression of insulin receptor (IR), leptin receptor (ObR), and mitochondrial uncoupling proteins (UCP1 and UCP3) were examined in the uterus.

Results: In the course of the experiment, the HFHSD group showed a significant increase in adipocyte area in subcutaneous, visceral, perigonadal, and pink adipose tissues. HFHSD during pregnancy significantly reduced the uterine lumen size in Sprague Dawley rats, while the thickness of the uterine layers, including the endometrium and myometrium, remained unchanged. Although no statistically significant reduction in collagen and glycogen levels was noticed, an observed decreasing trend suggests potential metabolic adaptations of the uterus to HFHSD. HFHSD significantly reduced IR expression and increased ObR expression in the myometrium, indicating its sensitivity to metabolic changes. Conversely, UCP1 expression remained stable, whereas UCP3 expression was significantly reduced in both uterine layers ($p < 0.005$), suggesting potential dysfunctions in mitochondrial metabolism. These findings indicate possible long-term adverse effects of HFHSD on reproductive health.

Conclusions: HFHSD during pregnancy significantly impacts structural and functional changes in the uterus and adipose tissue in the pregnant Sprague Dawley rats. While body weight at the end of pregnancy remains unchanged, HFHSD leads to an increase in subcutaneous, visceral, gonadal, and pink adipose tissues, along with an overall increase in adipose tissue mass. The observed adipocyte hypertrophy in subcutaneous, perigonadal, and visceral fat and hyperplasia in pink adipose tissue suggest an adaptive response of adipose tissue to metabolic changes induced by diet. HFHSD reduces uterine lumen size, but does not alter collagen and glycogen content in uterus, indicating preserved uterine structural integrity despite metabolic challenges. However, the reduced IR expression and increased ObR expression in the myometrium suggest altered hormonal signaling in the uterus during pregnancy. Furthermore, HFHSD does not affect UCP1 protein expression, but significantly increases UCP3 expression in the endometrium, which may impact local energy regulation and oxidative stress. These findings emphasize the link between unhealthy dietary patterns, metabolic dysfunctions, inflammation, and reproductive disorders. The uterus resistance to changes in collagen and glycogen deposition, along with simultaneous metabolic adaptations, suggests short-term compensation for adverse conditions. However, the identified effects, such as reduced IR expression and increased UCP3 expression, could have long-term consequences on uterine function and pregnancy outcomes. Proper nutrition and early intervention are essential for maintaining reproductive health and preventing metabolic diseases. Nevertheless, further research is needed to gain a deeper understanding of molecular mechanisms regulating these changes and their impact on long-term pregnancy outcomes.

Key words: adipose tissue; uterus; diet; rats; pregnancy.

10. LITERATURA

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557–67. doi:10.1016/S0140-6736(10)62037-5
2. Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: A big picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673–89. doi:10.1007/s40273-014-0243-x
3. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull*. 1997;53(2):307–21.
4. An SM, Kim J, Oh M, et al. Adipose tissue and metabolic health. *Diabetes Metab J*. 2023;47(5):595–611. doi:10.4093/dmj.2023.0011
5. Chan RS, Woo J. Prevention of overweight and obesity: how effective is the current public health approach. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(3):765–83. doi:10.3390/ijerph7030765
6. Sainsbury A, Schwarzer C, Couzens M, et al. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16(4):623–37. doi:10.1053/beem.2002.0230
7. Tran LT, Park S, Kim SK, et al. Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Exp Mol Med*. 2022;54(4):358–69. doi:10.1038/s12276-022-00741-z
8. Roh E, Song D, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med*. 2016;48:e216. doi:10.1038/emm.2016.4
9. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obes Res*. 2002;10(Suppl 2):105S–15S.

10. Kaess BM, Enserro DM, McManus DD, et al. The ratio of visceral to subcutaneous fat, a metric of body fat distribution, is a unique correlate of cardiometabolic risk. *Diabetologia*. 2012;55(10):2622–30. doi:10.1007/s00125-012-2639-5
11. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21(6):697–738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415
12. Kwon H, Kim D, Kim JS. Body fat distribution and the risk of incident metabolic syndrome: a longitudinal cohort study. *Sci Rep*. 2017;7:10955. doi:10.1038/s41598-017-09723-y
13. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126(1):126–32. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213
14. Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin WA, Galic S, et al. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(3):125–35. doi:10.1016/j.tem.2015.01.003
15. Diéguez C, Vázquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R. Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin, and melanocortins. *Neuroendocrinology*. 2011;94(1):1–11. doi:10.1159/000328226
16. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(5):447–55. doi:10.1016/S1359-6101(03)00052-2
17. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*. 1999;20(4):535–82. doi:10.1210/edrv.20.4.0374
18. Brewer CJ, Balen AH. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*. 2010;140(3):347–64. doi:10.1530/REP-09-0568

19. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):359–72. doi:10.1093/humupd/dmg024
20. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2015;149(5):R219–27. doi:10.1530/REP-14-0514
21. Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*. 2006;54(4):363–71. doi:10.1016/j.maturitas.2006.04.006
22. Wołodko K, Włodarczyk M, Lewczuk A, Suchocki Ł, Górka K, Czerniecki J, et al. Revisiting the impact of local leptin signaling in folliculogenesis and oocyte maturation in obese mothers. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4270. doi:10.3390/ijms22084270
23. Snider AP, Wood JR. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction*. 2019;158(3):R79–90. doi:10.1530/REP-18-0583
24. Adamowski M, Sharma Y, Molcan T, Voisin V, Vorburger SA, Makowski D, et al. Leptin signalling regulates transcriptional differences in granulosa cells from genetically obese mice but not the activation of NLRP3 inflammasome. *Sci Rep*. 2024;14:8070. doi:10.1038/s41598-024-58181-w
25. Šišljagić D, Blažetić S, Heffer M, Vranješ Delać M, Muller A. The interplay of uterine health and obesity: a comprehensive review. *Biomedicines*. 2024;12(12):2801. doi:10.3390/biomedicines12122801
26. Bielczyk-Maczyńska E. White adipocyte plasticity in physiology and disease. *Cells*. 2019;8(12):1507. doi:10.3390/cells8121507
27. Gao X, Li Y, Ma Z, Jing J, Zhang Z, Liu Y, et al. Obesity induces morphological and functional changes in female reproductive system through increases in NF-κB and MAPK signaling in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19(1):148. doi:10.1186/s12958-021-00833-x

28. Ahmad R, Haque M. Obesity: a doorway to a molecular path leading to infertility. *Cureus*. 2022;14(10):e30770. doi:10.7759/cureus.30770
29. Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Vári S, Gáspár R. Obesity in pregnancy: a novel concept on the roles of adipokines in uterine contractility. *RECOOP for Common Mechanisms of Diseases. Croat Med J*. 2017;58:96–104. doi:10.3325/cmj.2017.58.96
30. Hautakangas T, Uotila J, Kontiainen J, Huhtala H, Palomäki O. Impact of obesity on uterine contractile activity during labour: a blinded analysis of a randomised controlled trial cohort. *BJOG*. 2022;129(10):1790–7. doi:10.1111/1471-0528.17128
31. Gaspar R, Hajagos-Tóth J, Schaffer A, Kothencz A, Siska-Szabo L, Ducza E, et al. High fat high sucrose diet modifies uterine contractility and cervical resistance in pregnant rats: the roles of sex hormones, adipokines and cytokines. *Life (Basel)*. 2022;12(6):794. doi:10.3390/life12060794
32. Bazzano MV, Sarrible GB, Martínez N, Berón de Astrada M, Elía EM. Obesity alters the uterine environment before pregnancy. *J Nutr Biochem*. 2018;62:181–91. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.09.009
33. Amer P. Fat tissue growth and development in humans. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2018;89:37–45. doi:10.1159/1000486491
34. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 16th ed. New York: McGraw Hill Education; 2021.
35. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije: udžbenik i atlas. Masno tkivo*. Zagreb: Školska knjiga d.d.; 2005.
36. Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(4):195–213. doi:10.1038/nrendo.2010.1
37. Maliszewska K, Kretowski A. Brown adipose tissue and its role in insulin and glucose homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1530. doi:10.3390/ijms22041530

38. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 2014;63(12):4089–99. doi:10.2337/db14-0746
39. Kwok K, Lam K, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e215. doi:10.1038/emm.2016.5
40. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001;60(3):329–39. doi:10.1079/PNS200194
41. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as an endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*. 2008;39(8):715–28. doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005
42. Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, Kahn BB, et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(48):16801–6. doi:10.1073/pnas.0407581101
43. Ercan C, van Diest PJ, Vooijs M. Mammary development and breast cancer: the role of stem cells. *Curr Mol Med*. 2011;11(4):270–85.
44. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R159–71. doi:10.1530/EJE-13-0945
45. Colleluori G, Perugini J, Barbatelli G, et al. Mammary gland adipocytes in lactation cycle, obesity and breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*. 2021;22(2):241–55. doi:10.1007/s11154-021-09633-5
46. Oliver P, Pico C, De Matteis R, Cinti S, Palou A. Perinatal expression of leptin in rat stomach. *Dev Dyn*. 2002;223(1):148–54. doi:10.1002/dvdy.10039

47. Palou A, Sanchez J, Pico C. Nutrient-gene interactions in early life programming: leptin in breast milk prevents obesity later on in life. *Adv Exp Med Biol.* 2009;646:95–104. doi:10.1007/978-1-4020-9173-5_11
48. Torres Irizarry VC, Jiang Y, He Y, Xu P. Hypothalamic estrogen signaling and adipose tissue metabolism in energy homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:898139. doi:10.3389/fendo.2022.898139
49. Smith JT, Waddell BJ. Leptin as a regulator of reproduction: actions on the HPG axis. *Reproduction.* 2013;145(3):R1–8. doi:10.1530/REP-12-0487
50. Tena-Sempere M. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis. *Horm Metab Res.* 2013;45(13):919–27. doi:10.1055/s-0033-1358489
51. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007;56(4):1010–3. doi:10.2337/db06-1656
52. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(1):58–66. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01488.x
53. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):618–37. doi:10.1093/humupd/dms030
54. Carmina E, Bucchieri S, Esposito A, Del Puente A, Mansueto P, Orio F, et al. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2500–5. doi:10.1210/jc.2006-2725

55. Crespo RP, Bachega TA, Mendonca BB, Gomes LG. An update of genetic basis of PCOS pathogenesis. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62(3):352–61. doi:10.20945/2359-3997000000040
56. Palomba S, de Wilde MA, Falbo A, Koster MP, La Sala GB, Fauser BC. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2015;21(5):575–92. doi:10.1093/humupd/dmv029
57. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e219. doi:10.1038/emm.2016.6
58. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):193–205. doi:10.1038/nrm2327
59. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 2007;5(4):237–52. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.006
60. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852–71. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017
61. James DE, Stöckli J, Birnbaum MJ. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(11):751–71. doi:10.1038/s41580-021-00390-6
62. Perry RJ, Peng L, Abulizi A, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell.* 2015;160(4):745–58. doi:10.1016/j.cell.2015.01.012
63. Wolfe RR. Effects of insulin on muscle tissue. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000;3(1):67–71. doi:10.1097/00075197-200001000-00011
64. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling in health and disease. *Cell.* 2002;111(7):919–33. doi:10.1016/S0092-8674(02)01209-9

65. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1):a009191. doi:10.1101/cshperspect.a009191
66. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153–83. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
67. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.* 2017;168(6):960–76. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
68. Shulman GI. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med.* 2014;371(12):1131–41. doi:10.1056/NEJMra1011035
69. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860–7. doi:10.1038/nature05485
70. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793–801. doi:10.1172/JCI29069
71. Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2010;31(3):364–95. doi:10.1210/er.2009-0027
72. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):635–46. doi:10.1016/j.ecl.2008.06.007
73. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 2017;60(9):1566–76. doi:10.1007/s00125-017-4318-z
74. Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(5):841–62. doi:10.1007/s00018-012-1095-1
75. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut.* 2000;47(2):178–83.

76. Chowen JA, Frago LM, Fernandez-Alfonso MS. Physiological and pathophysiological roles of hypothalamic astrocytes in metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2019;31(5):e12671. doi:10.1111/jne.12671
77. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*. 2007;8:21–34.
78. Friedman JM, Halaas JJ. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763–70.
79. Wang Q, et al. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes*. 1997;46(3):335–41. doi:10.2337/diab.46.3.335
80. Perakakis N, et al. Leptin in leanness and obesity: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(6):745–60. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.069
81. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrère B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr*. 2000;130(12):3127S–3131S. doi:10.1093/jn/130.12.3127S
82. Somogyi V, Gyorffy A, Scalise TJ, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, et al. Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen, and insulin. *Nutr Res Rev*. 2011;24:132–54.
83. Guo F, et al. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology*. 2004;145(5):2221–7. doi:10.1210/en.2003-1312
84. Nillni EA, et al. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(46):36124–33. doi:10.1074/jbc.M003549200
85. Rodríguez A. Novel molecular aspects of ghrelin and leptin in the control of adipobiology and cardiovascular system. *Obes Facts*. 2014;7:82–95.

86. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J*. 2004;18:439–56.
87. Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM. The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology*. 2021;162(2):bqaa204. doi:10.1210/endo/bqaa204
88. Balogh O, Staub LP, Gram A, Boos A, Kowalewski MP, Reichler IM. Leptin in the canine uterus and placenta: possible implications in pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:13. doi:10.1186/s12958-015-0003-6
89. Catteau A, Caillon H, Barrière P, Denis MG, Masson D, Fréour T. Leptin and its potential interest in assisted reproduction cycles. *Hum Reprod Update*. 2016;22(3):320–41. doi:10.1093/humupd/dmv057
90. Al-Hendy A, Lukes AS, Poindexter AN, Venturella R, Villarroel C, Critchley H, et al. Treatment of uterine fibroid symptoms with relugolix combination therapy. *Obstet Gynecol Surv*. 2021;76(6):334–6.
91. Pantos K, Grigoriadis S, Maziotis E, Pistola K, Xystra P, Pantou A, et al. The role of interleukins in recurrent implantation failure: a comprehensive review of the literature. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2198. doi:10.3390/ijms23042198
92. Perez-Perez A, Toro A, Vilarino-Garcia T, Maymo J, Guadix P, Duenas JL, et al. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *J Cell Mol Med*. 2018;22(2):716–27. doi:10.1111/jcmm.13369
93. Muller A, Wagner J, Hodžić A, Maver A, Škrlec I, Heffer M, et al. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes is a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Croat Med J*. 2016;57(6):566–71. doi:10.3325/cmj.2016.57.566
94. Gao X, Li Y, Ma Z, Jing J, Zhang Z, Liu Y, et al. Obesity induces morphological and functional changes in female reproductive system through increases in NF- κ B and MAPK

- signaling in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19(1):148. doi:10.1186/s12958-021-00833-x.
95. Muller A, Wagner J, Hodžić A, Maver A, Škrlec I, Heffer M, et al. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes is a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Croat Med J*. 2016;57(6):566-571. doi:10.3325/cmj.2016.57.566
 96. Gorska E, Popko K, Stelmaszczyk-Emmel A, Ciepiela O, Kucharska A, Wasik M. Leptin receptors. *Eur J Med Res*. 2010;15:50–4.
 97. Peelman F, Zabeau L, Moharana K, Savvides SN, Tavernier J. Insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J Endocrinol*. 2014;223:T9–23.
 98. Sahu A. Intracellular leptin-signaling pathways in hypothalamic neurons: the emerging role of phosphatidylinositol-3 kinase-phosphodiesterase-3B-cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 2011;93(4):201–10. doi:10.1159/000326785
 99. Barman M, Giribabu N, Bin Salleh N. Roles of thyroid and leptin hormones and their crosstalk in male reproductive functions: an updated review. *Endocrine*. 2024 Oct. doi:10.1007/s12020-024-04069-8
 100. Ivić V, Blažetić S, Labak I, Balog M, Vondrak L, Blažeković R, et al. Ovariectomy and chronic stress lead toward leptin resistance in the satiety centers and insulin resistance in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. *Croat Med J*. 2016;57(2):194–206. doi:10.3325/cmj.2016.57.194
 101. Myers MG, Cowley MA, Müller TD. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:765–81. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105339
 102. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012;122(1):153–62. doi:10.1172/JCI59660
 103. Banks WA. Role of the blood-brain barrier in the evolution of feeding and cognition. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1264:13–9. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06555.x

104. Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(9):365–71. doi:10.1016/j.tem.2006.09.005
105. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22(5):353–9. doi:10.1097/MED.0000000000000188
106. Rosenbaum M, Leibel RL. Models of energy homeostasis in response to maintenance of reduced body weight. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(8):1620–9. doi:10.1002/oby.21538
107. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425–32. doi:10.1038/372425a0
108. Kusminski CM, et al. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue: a key player in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2012;61(12):3065–73.
109. Pohl EE, Rupprecht A, Macher G, Hilse KE. Important trends in UCP3 investigation. *Front Physiol.* 2019;10:470. doi:10.3389/fphys.2019.00470
110. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(1):79–82. doi:10.1006/bbrc.1997.6740
111. Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, et al. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle: a protective mechanism against oxidative stress. *FEBS Lett.* 1999;462(3):403–6. doi:10.1016/s0014-5793(99)01566-5
112. Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24129–32. doi:10.1074/jbc.272.39.24129

113. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997;408(1):39–42. doi:10.1016/s0014-5793(97)00350-7
114. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.* 2000;406(6794):415–8. doi:10.1038/35019000
115. Betz MJ, Enerbäck S. Human brown adipose tissue: what we have learned so far. *Diabetes.* 2015;64(7):2352–60.
116. López M, et al. Thyroid hormone and the interplay of hypothalamic neurons in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(9):441–8.
117. Zaninovich AA. Role of uncoupling proteins UCP1, UCP2, and UCP3 in energy balance, type 2 diabetes, and obesity. Synergism with the thyroid. *Medicina.* 2005;65(2):163–9.
118. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009;9(2):203–9.
119. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1837(7):1075–82.
120. Hilse KE, Rupprecht A, Egerbacher M, Bardakji S, Zimmermann L, Pohl EE. The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2016;1857(1):72–83.
121. Sobotta Atlas of Anatomy, Vol.1. General anatomy and musculoskeletal system. 16th ed. English/Latin. Munich: Elsevier; 2018.
122. Rat Guide: A Layman's Guide to Health, Medication Use, Breeding, and Responsible Care of Pet Rats. *RatGuide.com.* 2000.

123. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4a):609–14.
124. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp.* 2012;(67):e4389.
125. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. 2nd ed. Academic Press; 2017.
126. Chumduri C, Turco MY. Organoids of the female reproductive tract. *J Mol Med.* 2021;99(4):531–53.
127. Johnson J, DelGiudice B, Peterson E, Ulinski G, et al. *The Laboratory Mouse: A Guide to the Location and Orientation of Tissues for Optimal Histological Evaluation*. 1st ed. CRC Press; 2012.
128. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ, Fox CS. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care.* 2009;32(3):1068–75.
129. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010;11(1):11–8.
130. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolic function of adipose tissue: role in obesity. *Compr Physiol.* 2019;9(1):239–61.
131. Neeland IJ, Ross R, Després JP, et al. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(8):715–25.
132. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge P, Fontaine-Bisson B, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes.* 2011;60(5):1504–11. doi:10.2337/db10-1039

133. Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, et al. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Front Physiol.* 2020;10:1607. doi:10.3389/fphys.2019.01607
134. Rojas-Rodriguez R, Lifshitz LM, Bellve KD, et al. Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2015;58(9):2106–14. doi:10.1007/s00125-015-3662-0
135. Trivett C, Lees ZJ, Freeman DJ. Adipose tissue function in healthy pregnancy, gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Eur J Clin Nutr.* 2021;75(12):1745–56. doi:10.1038/s41430-021-00948-9
136. Zwick RK, Rudolph MC, Shook BA, et al. Adipocyte hypertrophy and lipid dynamics underlie mammary gland remodeling after lactation. *Nat Commun.* 2018;9:3592. doi:10.1038/s41467-018-05911-0
137. Horwitz A, Birk R. Adipose tissue hyperplasia and hypertrophy in common and syndromic obesity—the case of BBS obesity. *Nutrients.* 2023;15(15):3445. doi:10.3390/nu15153445
138. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094–101. doi:10.1172/JCI45887
139. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324. doi:10.1371/journal.pcbi.1000324
140. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiol Rev.* 2018;98(4):1911–41. doi:10.1152/physrev.00034.2017
141. Smith JD, Kahn BB, Shulman GI. High-fat high-sucrose diet induces dysregulation of adipogenesis and hypertrophy of adipocytes in rats: role of chronic inflammation and fibrosis in adipose tissue dysfunction. *J Metab Res.* 2023;15(4):123–35.

142. Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes*. 2015;6(4):548–53. doi:10.4239/wjd.v6.i4.548
143. Ezeh U, Pisarska MD, Azziz R. Association of severity of menstrual dysfunction with hyperinsulinemia and dysglycemia in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2022;37(3):553–64. doi:10.1093/humrep/deac001
144. Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(3):135–52. doi:10.1093/molehr/gap095
145. Murakami K, Bhandari H, Lucas ES, Takeda S, Gargett CE, et al. Deficiency in clonogenic endometrial mesenchymal stem cells in obese women with reproductive failure – a pilot study. *PLoS One*. 2013;8(12):e82582. doi:10.1371/journal.pone.0082582
146. Chen Z, Watanabe RM, Stram DO, Buchanan TA, Xiang AH. High calorie intake is associated with worsening insulin resistance and β -cell function in Hispanic women after gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(12):3294–300. doi:10.2337/dc14-1433
147. Mazzucco MB, Fortino AE, Izquierdo VG, Soñez CA, Sinner D, Jawerbaum A, et al. Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas. *J Endocrinol*. 2013;217(3):303–15. doi:10.1530/JOE-13-0021
148. Wilson MR, Skalski H, Reske JJ, Liu Y, Nguyen P, Spencer TE, et al. Obesity alters the mouse endometrial transcriptome in a cell context-dependent manner. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022;20(1):163. doi:10.1186/s12958-022-01030-0
149. Afrin S, Kirschen GW, Borahay MA. Obesity contributes to transformation of myometrial stem-cell niche to leiomyoma via inducing oxidative stress, DNA damage, proliferation, and extracellular matrix deposition. *Genes*. 2023;14(8):1625. doi:10.3390/genes14081625

150. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996;137(7):3144–7. doi:10.1210/endo.137.7.8770941
151. Taggart MJ, Word RA. Current perspectives in uterine research: reviews from the Society for Gynecologic Investigation Myometrium and Parturition Satellite symposia. *Reprod Sci*. 2013;20(2):138–9. doi:10.1177/1933719112468833
152. Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol*. 1995;38(2):267–79. doi:10.1097/00003081-199506000-00007
153. Read CP, Word RA, Ruscheinsky MA, Timmons BC, Mahendroo MS. Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction*. 2007;134(2):327–40. doi:10.1530/REP-07-0058
154. Word RA, Li XH, Hnat M, Carrick K. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. *Semin Reprod Med*. 2007;25(1):69–79. doi:10.1055/s-2006-956777
155. Dean M. Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biol Reprod*. 2019;101(2):297–305. doi:10.1093/biolre/iox102
156. Flannery A, Choe GH, Cooke KM, Fleming AG, Radford CC, Kodaman PH, et al. Insulin regulates glycogen synthesis in human endometrial glands through increased GYS2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(8):2843–50. doi:10.1210/jc.2017-01759
157. Jiang W, Guo S. Regulation of macronutrients in insulin resistance and glucose homeostasis during type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2023;15(21):4671. doi:10.3390/nu15214671
158. Gong D, Lei J, He X, Li Y, Wang Z, Zhang Y, et al. Keys to the switch of fat burning: stimuli that trigger the uncoupling protein 1 (UCP1) activation in adipose tissue. *Lipids Health Dis*. 2024;23:322. doi:10.1186/s12944-024-02300-z

159. Nibbelink M, Moulin K, Arnaud E, Duval C, Pénicaud L, Casteilla L. Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47291–5. doi:10.1074/jbc.M106410200
160. Lappas M. Uterine oxidative stress and regulation of uncoupling proteins in obese pregnant women. *Placenta*. 2014;35(9):718-726. doi:10.1016/j.placenta.2014.06.362
161. Arrowsmith S, Wray S. Oxidative stress and smooth muscle function in the human uterus. *Reproduction*. 2014;148(5):R169-R178. doi:10.1530/REP-14-0244.
162. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, et al. Mitochondrial (dys)function and insulin resistance: from pathophysiological molecular mechanisms to the impact of diet. *Front Physiol*. 2019;10:532. doi:10.3389/fphys.2019.00532
163. Sangwung K, Petersen KF, Shulman GI, Knowles JW. Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and potential genetic implications: potential role of alterations in mitochondrial function in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2020;161(4):bqaa017. doi:10.1210/endocr/bqaa017
164. Tsilingiris D, Tzeravini E, Koliaki C, et al. The role of mitochondrial adaptation and metabolic flexibility in the pathophysiology of obesity and insulin resistance: an updated overview. *Curr Obes Rep*. 2021;10:191–213. doi:10.1007/s13679-021-00434-0

WEB IZVOR:

1. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/a/a2/Share_of_overweight_people_aged_16_years_or_over%2C_2022_%28%25%29_Health2024.png

11. ŽIVOTOPIS

Dina Šišljagić, rođena je 14. travnja 1985. godine u Osijeku. Nakon završene II. gimnazije u Osijeku, 2004. godine upisuje sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci te se 2007. godine prebacuje na Medicinski fakultet, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku gdje je 2010. godine diplomirala i stekla zvanje doktora medicine. Pripravnički staž je obavila u Kliničkom bolničkom centru Osijek gdje je od veljače 2012. godine na specijalističkom usavršavanju iz ginekologije i opstetricije u Klinici za ginekologiju i opstetriciju Kliničkog bolničkog centra Osijek. U studenom iste godine upisuje Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. U ak. god. 2014./2015. pohađala je i završila poslijediplomski specijalistički studij „Ultrazvuk u ginekologiji i porodništvu“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji stekla naziv sveučilišna magistra ultrazvuka u ginekologiji i opstetriciji. U ak. god. 2016./2017. pohađala je i završila poslijediplomski specijalistički studij Ginekologija i opstetricija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit iz Ginekologije i opstetricije polaže 02. ožujka 2018. godine te stječe naziv specijalist ginekologije i opstetricije. Od rujna 2019. godine je na usavršavanju iz uže specijalizacije iz humane reprodukcije. U svibnju 2021. godine izabrana je u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti (znanstvene grane ginekologija i opstetricija) na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku. Program pedagoško-psihološko-didaktičko-metodičke izobrazbe pri Filozofskom fakultetu Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku završila je ak. god. 2020/2021. Ispit iz uže specijalizacije Humana reprodukcija polaže 15. ožujka 2023. godine te stječe naziv subspecijalist humane reprodukcije. Autor je i koautor stručnih i znanstvenih radova iz svog područja djelovanja, objavljenih u domaćim i međunarodnim indeksiranim časopisima i prezentiranih na simpozijima i kongresima. Koautor je sveučilišnog udžbenika „Ginekologija i perinatologija“, 2024., čiji je glavni urednik izv. prof. prim. dr. sc. Rajko Fureš, a nakladnik Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

1. Šišljagić D, Blažetić S, Heffer M, Vranješ Delać M, Muller A. The interplay of uterine health and obesity: a comprehensive review. *Biomedicines*. 2024;12(12):2801. doi:10.3390/biomedicines12122801
2. Homeliuk T, Klein V, Šišljagić D, Zjalić M, Labak I, Ivić V, Hajagos-Toth J, Gaspar R, Ducza E, Vari SG, et al. High fat high sugar diet affects expression of leptin receptor in uterus of pregnant rats. In: 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences Book of Abstracts. Budimpešta: RECOOP HST Association; 2023. p. 94.
3. Šišljagić D, Jurić M, Radić B, Zjalić M, Ivić V, Blažetić S, et al. Morphological changes in adipocytes of pregnant rats on high fat-high sugar diet. *4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences*. Prague: RECOOP HST Association; 2022. p. 90.
4. Samardžija M, Drenjančević D, Samardžija M, Šišljagić D, Marijanović M, Perković D. Customer satisfaction models of stem cells donor as service users of a Regional transfusion center Osijek. *24th Congress of the European Association of Tissue Banks, EATB 2015*. Split, Croatia; 2015.
5. Müller A, Šišljagić D, Vulin M, Marić P. Pregnancy outcome on the low-molecular-weight heparin, University Hospital Center Osijek, Croatia. *XXXVII Alpe Adria Meeting of Perinatal Medicine. Program and Books of Abstract*. Bassano del Grappa, Italy; 2015.
6. Müller A, Šišljagić D, Vulin M, Marić P. Ishodi trudnoća na niskomolekularnom heparinu, KBC Osijek. *Gynecol Perinatol*. 2015;24(supp2):S86.
7. Müller A, Šišljagić D, Vulin M. Forecast pregnancy in women diagnosed with hereditary thrombophilia-review of the clinical practice. *6th Congress of the South-East European Society of Perinatal Medicine. Books of Abstract*. Zagreb, Croatia; 2015.

8. Šišljagić Kuduz D, Vulin M, Muller A. Pregnancy in women diagnosed with hereditary thrombophilia—review of clinical practice. *8th RECOOP Annual Project Review Meeting. Book of Abstracts*. Zagreb, Croatia; 2017.
9. Kokeza R, Kasač Z, Selthofer R, Šišljagić D. Kirurško zbrinjavanje defekata zdjeličnog dna—iskustva iz KBC Osijek. *Knjiga sažetaka 12. osječki urološki dani, 5. osječki nefrološki dani, 4. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije*. Osijek, Croatia; 2017.
10. Kasač Z, Kokeza R, Lovrić-Pavošević A, Selthofer R, Šišljagić D. Liječenje statičke inkontinencije urina kod žena—iskustva iz KBC Osijek. *Knjiga sažetaka 12. osječki urološki dani, 5. osječki nefrološki dani, 4. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije*. Osijek, Croatia; 2017.
11. Selthofer R, Kasač Z, Lovrić-Pavošević A, Kokeza R, Šišljagić D. Urinarna inkontinencija—liječenje funkcionalnom elektrostimulacijom. *Knjiga sažetaka 12. osječki urološki dani, 5. osječki nefrološki dani, 4. sekcija medicinskih sestara i tehničara urologije i nefrologije*. Osijek, Croatia; 2017.
12. Müller A, Šišljagić D, Mandić Petrović V, Vulin M, Masle D. Miomi maternice u porodu. *Gynaecol Perinatol*. 2014;23(supp2):S104.
13. Müller A, Šišljagić D. Hipotireoza kao uzrok habitualnih pobačaja—prikaz slučaja. *Gynaecol Perinatol*. 2014;23(supp2):S108.
14. Šišljagić D, Müller A. Što je danas na trudničkom jelovniku i zašto? *Gynaecol Perinatol*. 2014;23(supp2):S109.
15. Rubin M, Rubin O, Šišljagić D, Rupčić V, Rubin J. Trudnoća kao okidač progresije pritajenog ekspanzivnog procesa—prikaz slučaja. *Gynaecologia et Perinatologia. XXVIII Perinatalni dani Ante Dražančić*. p. 107.

16. Rubin M, Rubin O, Šišljagić D, Čuržik D, Rupčić V, Šišljagić D. Trudnoća nakon embolizacije mioma maternice. *Gynaecologia et Perinatologia. XXVIII Perinatalni dani Ante Dražančić.* p. 106.
17. Rubin O, Rupčić V, Šišljagić D, Rubin J. Ekspektativni postupak kod prolabiranog vodenjaka—prikaz slučaja. *Gynaecologia et Perinatologia. XXVIII Perinatalni dani Ante Dražančić.* p. 145.
18. Štimac M, Sipl M, Milas V, Šišljagić D. Zbrinjavanje novorođenčadi i nedonoščadi nakon krvarenja u trudnoći i porodu. *Gynaecologia et Perinatologia.* 2013;1(1):11–3.
19. Glasnović M, Bošnjak I, Šram M, Vranješ Ž, Včev A, Sinčić-Petričević J, et al. Clinical characteristics of patients with spondyloarthritides and HLA–B27 positive antigen. *Collegium Antropologicum.* 2011;35(2):397–402.

12. PRILOZI

1. Izjava o suglasnosti za uporabu uzoraka u svrhu znanstveno-istraživačkog rada, prof. dr. sc.
Robert Gaspar, 23. lipanj 2017. godine
2. Odobrenje mađarskog Nacionalnog znanstvenog etičkog povjerenstva za pokuse na
životinjama (uredni broj: IV/3071/2016., 15. kolovoz 2016.)
3. Sastav hrane HFHSD (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka)
4. Sastav hrane SD (1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka)

1. Prilog

Izjava o suglasnosti za uporabu uzoraka u svrhu znanstveno-istraživačkog rada, prof. dr. sc.
Robert Gaspar, 23. lipanj 2017. godine



Department of Pharmacodynamics and Biopharmacy
Faculty of Pharmacy
University of Szeged
Head: habil. Robert Gaspar, PharmD, PhD
Hungary
6720 Szeged, Eötvös u. 6. Tel/Fax.: (62) 545-567



DECLARATION

To Whom It May Concern

Hereby I declare that I allow and consent the use of rat samples from my laboratory for research of **Martina Vulin, Zrinka Romić and Dina Sisljagic** (Josip Juraj Strossmayer University of Osijek) to achieve PhD qualification. The samples are the part of our cooperative activity in the framework of RECOOP HST. The title of the project is **Obesity and pregnant uterine contractility: molecular and functional investigation of the roles of leptin, adiponectin and kisspeptin in rats**. The live phase of this project has been completed in our department by the ethical permission of Hungarian Ethical Committee for Animal Research (registration number: IV/3071/2016).

Szeged, June 23, 2017.


Robert Gaspar, PhD
Head of Department



2. Prilog

Odobrenje madžarskog Nacionalnog znanstvenog etičkog povjerenstva za pokuse na životinjama



CSONGRÁD MEGYEI
KORMÁNYHIVATAL

Ügyiratszám: CSI/01/3071- ⁶ /2016
Ügyintéző: dr. Makayné dr. Pálfi Tímea
Tel.: 62/680-800

Tárgy: projekt engedély
Hiv. szám: -
Melléklet: -

Határozat

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet (6720 Szeged, Eötvös u. 6.) részére az

„Az obezitás hatása a vemhes uterus kontraktilitásra és a cervix rezisztenciára: a leptin, adiponektin és kisspeptin szerepének molekuláris és funkcionális vizsgálata patkányban”
megnevezésű munkaprogram végzését

engedélyezem,

és azt a **IV./3071/2016. engedélyszámon** nyilvántartásba veszem. Az engedély a határozat kiállításának napjától számítva **5 évig**, illetve visszavonásig érvényes.

Az engedélyezett tevékenységet az alábbi kikötésekkel végezheti:

- A tevékenység végzése során köteles betartani az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény-; az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet-; valamint az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről vonatkozó előírásait.
- A tevékenységre jogosító engedélyt köteles, az engedélyezett állatkísérleti tevékenység végzésének helyén tartani és azt ellenőrzés során bemutatni

A munkaprogram végrehajtásának helyüül szolgáló létesítmény: **Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet (6720 Szeged, Eötvös u. 6.)**

A munkaprogram általános megvalósításáért, valamint jelen engedélyben foglaltak végrehajtásért felelős személy: **Dr. Habil. Gáspár Róbert, intézetvezető egyetemi docens (6720 Szeged, Eötvös u. 6.)**

Postacím: Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Földművelésügyi Főosztály

☎ 6724 Szeged, Vasas Szent Péter u. 9. ☎ 6701 Szeged, Pf.: 446

☎ +36 (62) 680-800 ☎ +36 (62) 680-801

🌐 www.csmkh.hu

✉ csongrad-elelmiszer@nebih.gov.hu

3. Prilog

Sastav hrane HFHSD (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka)

altromin

C 1011 - product data sheet

C 1011

carbohydrate & fat rich diet

Metabolized energy

Content		Value	unit
Fat	1,086	(28%)	kcal/kg
Protein	606	(16%)	kcal/kg
Carbohydrates	2,210	(56%)	kcal/kg

crude nutrients and moisture

Content		Value	unit
Moisture	69,537	(7.0%)	mg/kg
Crude Ash	54,267	(5.4%)	mg/kg
Crude Fibre	30,573	(3.1%)	mg/kg
Crude Fat	120,664	(12.1%)	mg/kg
Crude Protein	151,575	(15.2%)	mg/kg
Nitrogenfree extractives	573,384	(57.2%)	mg/kg

Carbonhydrates

Content		Value	unit
Monosaccharides	0		mg/kg
Disaccharides	176,505		mg/kg
Polysaccharides	356,027		mg/kg

Minerals

Content		Value	unit
Calcium	9,215		mg/kg
Potassium	7,076		mg/kg
Magnesium	681		mg/kg
Sodium	2,473		mg/kg
Phosphorus	7,326		mg/kg

4. Prilog

Sastav hrane SD (1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka)

altromin

1310 - product data sheet

1310

Breeding diet for rats and mice

The 1310 formula is a cereal-based (soy, wheat, corn) fixed formula which is free of alfalfa and fish/animal meal and deficient in nitrosamines. This breeding diet was designed as complete feedingstuff for ad libitum feeding, recommended for breeding adult rats/mice and young rats/mice up to an age of 8 weeks.

Available as

1311 - Powder 1314 - 10mm pellets 1318 - Hybridpellet 1319 - Extrudate

Product variations

The 1310 formula is optionally also available in one or a combination of the following variants.

Variant P

deficient in phytoestrogens

Variant Fortified

autoclavable, increased vitamin content, coated on request

Variant Irradiated

irradiated with 5 to 50kGy

Variant TPF

total pathogen free

The contents may vary for these variants.

Metabolized energy

Content	Value	unit
Fat	463 (14%)	kcal/kg
Protein	901 (27%)	kcal/kg
Carbonhydrates	1,976 (59%)	kcal/kg

crude nutrients and moisture

Content	Value	unit
Moisture	111,241 (11.1%)	mg/kg
Crude Ash	61,128 (6.1%)	mg/kg
Crude Fibre	45,480 (4.5%)	mg/kg
Crude Fat	51,398 (5.1%)	mg/kg
Crude Protein	225,155 (22.5%)	mg/kg
Nitrogenfree extractives	505,599 (50.7%)	mg/kg

