

# Izražaj inzulinskog receptora u postpartalnom miometriju ženki Sprague-Dawley štakora nakon unosa hrane bogate mastima i šećerom

---

**Budić, Patricija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:208810>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Patricija Budić**

**IZRAŽAJ INZULINSKOG RECEPTORA**  
**U POSTPARTALNOM MIOMETRIJU**  
**ŽENKI SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**  
**NAKON UNOSA HRANE BOGATE**  
**MASTIMA I ŠEĆERIMA**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Patricija Budić**

**IZRAŽAJ INZULINSKOG RECEPTORA**  
**U POSTPARTALNOM MIOMETRIJU**  
**ŽENKI SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**  
**NAKON UNOSA HRANE BOGATE**  
**MASTIMA I ŠEĆERIMA**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku

Mentor rada: doc. dr. sc. Vedrana Ivić

Neposredni voditelj: Lovro Mihajlović, mag. educ. biol. et chem.

Rad ima 27 stranica i 4 slike.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Gestacijski dijabetes melitus</b> .....	1
<b>1.2. Čimbenici rizika za razvoj gestacijskog dijabetesa melitusa</b> .....	2
<b>1.3. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa</b> .....	3
<b>1.3.1. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa za majku</b> .....	3
<b>1.3.2. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa za dijete</b> .....	3
<b>1.4. Molekularni mehanizam gestacijskog dijabetesa melitusa i inzulinski receptori u miometriju</b> .....	4
<b>1.4.1. Molekularni mehanizam gestacijskog dijabetesa melitusa</b> .....	4
<b>1.4.2. Inzulinski receptor u miometriju</b> .....	6
<b>3. CILJ</b> .....	8
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
<b>4.1. Ustroj studije</b> .....	9
<b>4.2. Materijali</b> .....	9
<b>4.3. Metode</b> .....	9
<b>4.3.1. Deparafinizacija tkiva</b> .....	10
<b>4.3.2. Imunohistokemijsko bojanje</b> .....	10
<b>4.3.3. Analiza mikrofotografija</b> .....	11
<b>4.4. Statističke metode</b> .....	11
<b>5. REZULTATI</b> .....	13
<b>5.1. Imunohistokemija na IR-<math>\alpha</math></b> .....	13
<b>5.2. Usporedba izražaja IR u tkivu miometrija SD i HFHSD skupini</b> .....	14
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>8. SAŽETAK</b> .....	21
<b>9. SUMMARY</b> .....	22
<b>10. LITERATURA</b> .....	23
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	27

## POPIS KRATICA

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

GDM – gestacijski dijabetes melitus (engl. *Gestational diabetes mellitus*)

IDF – Međunarodna dijabetička federacija (engl. *International Diabetes Federation*)

IADPSG – Međunarodna skupina za istraživanje dijabetesa u trudnoći (engl. *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups*)

GLUT4 – transporter glukoze 4 (engl. *Glucose transporter type 4*)

HFHSD – prehrana bogata mastima i šećerima (engl. *High-fat and high-sugar diet*)

hPGH – humani placentarni hormon rasta (engl. *Human placental growth hormone*)

hPL – humani placentarni laktogen (engl. *Human placental lactogen*)

IGF-1 – faktor rasta sličan inzulinu (engl. *Insulin-like growth factor 1*)

IR – inzulinski receptor (engl. *Insulin receptor*)

IRS - supstrata inzulinskog receptora (engl. *Insulin receptor substrate*)

IR- $\alpha$  – inzulinski receptor alfa (engl. *Insulin receptor alpha*)

mTORC2 - mTOR kompleks 2 (engl. *mTOR Complex 2*)

OGTT – oralni test opterećenja glukozom (engl. *Oral glucose tolerance test*)

PCOS – sindrom policističnih jajnika (engl. *Polycystic ovary syndrome*)

PDK - kinazu ovisnu o fosfoinozitudu (engl. *Phosphoinositide-dependent kinase*)

PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-kinases*)

PIP3 - fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (engl. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

SD – standardna prehrana (engl. *Standard diet*)

TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

# 1.UVOD

## 1.1. Gestacijski dijabetes melitus

Gestacijski dijabetes melitus (GDM) vrlo je česta komplikacija za vrijeme trudnoće pri čemu dolazi do spontanog razvoja hiperglikemije. U većini slučajeva, hiperglikemija se razvija zbog smanjene tolerancije glukoze, odnosno zbog disfunkcije  $\beta$ -stanica gušterače (1). Tijekom trudnoće povećavaju se potrebe za inzulinom kao posljedica povećanog unosa kalorija, povećanja tjelesne mase majke, prisutnosti placentalnih hormona te zbog povećanog lučenja prolaktina i hormona rasta. Napredovanjem trudnoće povećava se masa  $\beta$ -stanica gušterače kako bi se zadovoljila povećana potreba za inzulinom. Ukoliko ne dođe do ekspanzije  $\beta$ -stanica te ne dođe do porasta lučenja inzulina, dolazi do razvoja GDM-a (2). Prema najnovijim procjenama (iz 2021.) Međunarodne dijabetičke federacije (engl. *International Diabetes Federation* - IDF), GDM javlja se u približno 16,7 % trudnoća u svijetu, što predstavlja 21,1 milijun poroda godišnje. Do razvoja GDM-a češće dolazi u zemljama s niskim i srednjim dohotkom s ograničenim pristupom zdravstvenoj skrbi trudnice (3). Prema podacima koji se svake godine objavljuju u Hrvatskom zdravstveno-statističkom ljetopisu GDM jedna je od najučestalijih komplikacija u trudnoći. Prevalencija gestacijskog dijabetesa u Hrvatskoj 2014. godine iznosila je 4,7 %, 2016. 7,0 %, 2018. 4,9 % te 2021. 4,1 % (4). Međunarodna skupina za istraživanje dijabetesa u trudnoći (engl. *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* - IADPSG) postavila je kriterije za dijagnozu GDM-a. Ukoliko na prvom pregledu koncentracija glukoze u plazmi natašte iznosi 5,1 - 7,0 mmol/L, postavlja se dijagnoza GDM-a. Međutim, ukoliko koncentracija glukoze u plazmi natašte iznosi manje od 5,1 mmol/L, između 24. i 28. gestacijskog tjedna radi se oralni test opterećenja glukozom (engl. *Oral glucose tolerance test* - OGTT) (5). OGTT traje dva sata, pri čemu se određuje koncentracija glukoze u plazmi natašte, zatim trudnica popije 75 g glukoze otopljene u vodi pri čemu glukoza u plazmi nakon 1 sata treba iznositi manje od 10,0 mmol/L, a nakon 2 sata manje od 8,5 mmol/L (6). Ukoliko koncentracije glukoze u plazmi iznose više od referentnih vrijednosti, postavlja se dijagnoza GDM-a.

## 1.2. Čimbenici rizika za razvoj gestacijskog dijabetesa melitusa

Zbog promjene načina života, odnosno zbog nepravilne prehrane i nedovoljne fizičke aktivnosti, dolazi do porasta broja pretilih osoba, kako muškaraca tako i žena. Kod žena reproduktivne dobi prekomjerna tjelesna masa predstavlja veliki problem jer je jedan od glavnih čimbenika za razvoj GDM-a. Osim prekomjerne mase, rizični faktori za razvoj GDM-a uključuju prekomjerno povećanje mase za vrijeme trudnoće, zapadnjački način prehrane, etničku pripadnost, genetski polimorfizam, intrauterino okruženje (visoka ili niska porođajna masa), obiteljska ili osobna povijest GDM-a te druge bolesti koje uključuju inzulinsku rezistenciju kao što je sindrom policističnih jajnika (engl. *Polycystic ovary syndrome* - PCOS) (1). Starija životna dob majke predstavlja visoki rizik za razvoj različitih komplikacija tijekom trudnoće, isto tako i za razvoj GDM-a te je vidljiv pozitivan odnos između povećanja životne dobi majke i mogućnosti razvoja GDM-a. Nadalje, prekomjerna tjelesna masa majke prije trudnoće (indeks tjelesne mase (engl. *Body mass index* - BMI) 25-29,99 kg/m<sup>2</sup>) ili pretilost (BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>) predstavljaju čimbenik rizika za razvoj GDM-a. Rizik za razvoj GDM-a povećava se 3 do 4 puta u odnosu na žene s normalnim BMI (7). Prehrana s visokim udjelom zasićenih masti, rafiniranih šećera te crvenog i prerađenog mesa povezuje se s povećanim rizikom za razvoj GDM-a, dok se prehrana bogata vlaknima, mikronutrijentima i polinezasićenim mastima povezuje sa smanjenim rizikom za razvoj GDM-a. Zasićene masne kiseline izravno ometaju inzulinsku signalizaciju te djeluju upalno i mogu uzrokovati endotelnu disfunkciju što predstavlja čimbenike za razvoj GDM-a (1). Također, na životinjskim modelima i istraživanjima na ljudima dokazano je da prehrana bogata šećerima smanjuje inzulinsku osjetljivost i izlučivanje inzulina (8). Ostali rizični faktori uključuju blizanačku trudnoću, prethodnu makrosomiju, povijest perinatalnih komplikacija, malo novorođenče u odnosu na gestacijsku dob, tjelesna neaktivnost, prehrana s niskim sadržajem vlakana i visokim glikemijskim indeksom, povećan unos masti i smanjen unos ugljikohidrata te lijekove kao što su glukokortikoidi i antipsihotici (7).



### **1.3. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa**

#### **1.3.1. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa za majku**

Žene koje tijekom trudnoće razviju GDM izložene su povećanom riziku od opstetričkih intervencija uključujući indukciju porođaja, carski rez i komplikacijama povezane s porodom, a koje uključuju perinealne laceracije i rupturu maternice, najčešće povezane s fetalnom makrosomijom i polihidramnionom (7). Nadalje, žene koje razviju GDM najčešće imaju visok BMI i loš metabolički profil i prije trudnoće, što uključuje visoki ukupni kolesterol, trigliceride te nisku razinu HDL kolesterola. Također, kod većine žena koje razviju GDM dolazi do porasta indekse tjelesne mase i razvoja pretilosti, povećanja krvnog tlaka i ukupnog kolesterola. Kao rezultat toga, žene s prethodnom poviješću GDM-a imaju povećane koncentracije kalcija u koronarnim arterijama i zadebljanu intimu i mediju karotide, koji predstavljaju podlogu za razvoj ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti nakon poroda (9). Iako se hiperglikemija koja nastaje za vrijeme trudnoće povlači nakon poroda, kod žena s prethodno dijagnosticiranim GDM-om postoji povećan rizik od 50 % za razvoj dijabetesa melitusa tip 2 kasnije u životu (10). Također, postoji povećan rizik od dodatnih komplikacija u trudnoći, uključujući prijevremeni porod i preeklampsiju (1). Prisutnost GDM-a, zajedno s drugim čimbenicima rizika kao što su hipertenzija i pretilost tijekom trudnoće, također može dovesti do prijevremenog poroda (7). Osim toga, konzumacija velikih količina šećera tijekom trudnoće povezuje se s ranim prijevremenim porodom, jer što je fetus nezreliji to je veća njegova osjetljivost na koncentracije interleukina koje su povezane s prijevremenim porodom (11). Preeklampsija je definirana kao stanje u kojem sistolički krvni tlak iznosi  $\geq 140$  mm Hg ili dijastolički krvni tlak iznosi  $\geq 90$  mm Hg u dva navrata u razmaku od najmanje 4 sata, te se povišeni krvni tlak javlja zajedno s proteinurijom, trombocitopenijom, bubrežnom insuficijencijom, oštećenom funkcijom bubrega, plućnim edemom te cerebralnim ili vidnim simptomima, a koji se javljaju nakon 20. gestacijskog tjedna (12).

#### **1.3.2. Posljedice gestacijskog dijabetesa melitusa za dijete**

Tijekom trudnoće u kojoj se javlja GDM dolazi do povećanog placentarnog transporta glukoze, aminokiselina i masnih kiselina koje stimuliraju fetus na endogenu proizvodnju

inzulina i faktora rasta sličnog inzulinu (engl. *Insulin-like growth factor 1* - IGF-1). Pojačano lučenje navedenih faktora može uzrokovati prekomjerni rast fetusa, što često rezultira makrosomijom pri rođenju (1). Makrosomija se obično definira kao porođajna masa iznad 90. percentile za gestacijsku dob ili > 4000 g (13). Distocija ramena, ozljeda brahijalnog pleksusa, ozljede kostura, aspiracija mekonija, perinatalna asfiksija, hipoglikemija i smrt fetusa komplikacije su koje mogu nastati kao posljedica makrosomije (14). Nadalje, makrosomska novorođenčad izložena su povećanom riziku za razvoj dijabetesa melitusa tip 2, hipertenzije te pretilosti u odrasloj dobi (15). Smanjena kontrola glikemije za vrijeme začeća i tijekom prvog tromjesečja povezana je s višim stopama kongenitalnih anomalija (16). Provedeno je istraživanje kako bi se usporedio rizik za razvoj kongenitalnih anomalija kod trudnica s pregestacijskim dijabetesom, GDM-om i kod trudnica bez dijabetesa. Istraživanje je pokazalo da u trudnoćama s GDM-om isto kao i u trudnoćama s pregestacijskim dijabetesom postoji povećan rizik za razvoj nekih kongenitalnih anomalija kao što su kongenitalne srčane bolesti, hipospadija, rascjep usne s ili bez rascjepa nepca, Downov sindrom, spina bifida te povećana mogućnost razvoja kromosomskih poremećaja (17). Također, uočen je povećan razvoj pretilosti kod potomaka majki s GDM-om koji je povezan s povećanim rizikom za razvoj metaboličkih poremećaja uključujući kardiovaskularne bolesti i inzulinsku rezistenciju (10). Istraživanje je dokazalo da je GDM povezan s povišenim stopama razvoja specifičnih psihijatrijskih poremećaja kao što su shizofrenija, anksiozni poremećaj, intelektualne poteškoće te poremećaji u razvoju i ponašanju, međutim nije povezan s raspoloženjem, upotrebom supstanci ovisnosti ili poremećajima u prehrani. Navedeni poremećaji uočeni su od djetinjstva nadalje kod potomaka koji su bili izloženi GDM-u (18). Nadalje, hiperglikemija tijekom trudnoće značajno je povezana s razvojem hiperglikemije i inzulinske rezistencije kod potomaka u njihovoj odrasloj dobi što dovodi do povećanja rizika za razvoj dijabetesa (10).

## **1.4. Molekularni mehanizam gestacijskog dijabetesa melitusa i inzulinski receptori u miometriju**

### **1.4.1. Molekularni mehanizam gestacijskog dijabetesa melitusa**

GDM obično je rezultat disfunkcije  $\beta$ -stanica na pozadini kronične inzulinske rezistencije tijekom trudnoće, stoga i oštećenja  $\beta$ -stanica i inzulinska rezistencija tkiva

predstavljaju uzroke razvoja GDM-a (1). Inzulinska rezistencija definira se kao neuspjeh ciljnih organa da normalno odgovore na djelovanje inzulina. Uzrokuje nepotpunu supresiju izlučivanja glukoze iz jetre i smanjen unos glukoze posredovan inzulinom na periferiji (skeletalni mišići, masno tkivo), što dovodi do povećane potrebe za inzulinom (19). Vezanjem inzulina za inzulinski receptor dolazi do aktivacije kaskade fosforilacije proteina koji reguliraju stanični metabolizam. Kinaza Akt nalazi se u središtu kaskade te do njene aktivacije dolazi „prokismalnim inzulinskim signaliziranjem“ (20). Nakon vezanja inzulina, aktivira se tirozin kinaza inzulinskog receptora (IR) te dovodi do tirozinske fosforilacije IR-a i supstrata inzulinskog receptora (engl. *Insulin receptor substrate* - IRS). Fosfotirozinska mjesta na IRS-u omogućuju vezanje lipidne fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) koja sintetizira fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) na staničnoj membrani. PIP3 regrutira kinazu ovisnu o fosfoinozitudu (engl. *Phosphoinositide-dependent kinase* - PDK) koji izravno fosforilira treoninski ostatak Akt kinaze. Nakon toga dolazi do druge fosforilacije Akt kinaze pri čemu fosforilaciju provodi mTOR kompleks 2 (mTORC2) na ostatku serina. Fosforilacija dovodi do aktivacije Akt koja nastavlja fosforilirati niz supstrata na serinskim i treoninskim ostacima (21). U „distalnom inzulinskom signaliziranju“ Akt fosforilira više proteina kako bi pokrenuo složene stanične promjene. Akt dovodi do fosforilacije TBC1D4 supstrata koji vezanjem za vezikule za pohranu transportera glukoze 4 (engl. *Glucose transporter type 4* - GLUT4) omogućuje translokaciju GLUT4 na staničnu membranu (20). Mogući mehanizmi nastanka inzulinske rezistencije uključuju smanjenu regulaciju, nedostatke ili genetske polimorfizme fosforilacije inzulinskih receptora, IRS-a ili PIP-3 kinaze ili može nastati zbog abnormalnosti GLUT4 (22). Smanjenje fosforilacije tirozin kinaze IR-a i aktivnosti receptorske tirozin kinaze uočeno je i kod trudnica s normalnom tolerancijom glukoze i kod onih s GDM-om, međutim kod žena s normalnom tolerancijom nakon poroda dolazi do nestanka navedenih smanjenja, dok kod žena s GDM-om ne dolazi do značajnog poboljšanja (23). Također, tijekom trudnoće postoji ravnomjerno smanjenje inzulinske osjetljivosti od 50 – 60 % s odmakom trudnoće koje se javlja i kod normalne tolerancije glukoze i kod GDM-a (24). Tijekom inzulinske rezistencije dolazi do smanjenog inzulinom stimuliranog unosa glukoze što dodatno doprinosi razvoju hiperglikemije, dovodeći do preopterećenja  $\beta$ -stanica koje moraju proizvesti dodatan inzulin kao odgovor na hiperglikemiju (1). Dugotrajno izlaganje hiperglikemiji može dovesti do glukotoksičnosti koja izaziva disregulaciju  $\beta$ -stanica i konačno smrt stanice (25). Dakle, GDM razvija se kada funkcija gušterače ne uspijeva prevladati inzulinsku rezistenciju. Nadalje, inzulinska rezistencija tijekom trudnoće razvija se kao rezultat povišene razine hormona rasta i kortizola, prisutnosti humanog placentalnog

laktogena (hPL), te zbog oslobađanja inzulina iz posteljice i visokih razina estrogena i progesterona (26). hPL povećava se do 30 puta tijekom trudnoće i potiče oslobađanje inzulina iz gušterače u trudnoći te može utjecati na razvoj inzulinske rezistencije. Nadalje, tijekom trudnoće dolazi do lučenja humanog placentarnog hormona rasta (hPGH), koji zamjenjuje hormon rasta hipofize, te se njegovo lučenje povećava 6 – 8 puta tijekom trudnoće. Prekomjerni izražaj hPGH može dovesti do razvoja inzulinske rezistencije (27). Činjenica da se inzulinska osjetljivost majke vraća na razinu prije trudnoće već nekoliko dana nakon poroda, pokazuje važnost placentarnih hormona u razvoju inzulinske rezistencije (1). Također, čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha* - TNF- $\alpha$ ), kojeg proizvode monociti i makrofagi, smanjuje osjetljivost inzulina pri visokim koncentracijama, neizravno razvijajući hiperglikemiju, što dovodi do razvoja GDM-a kod trudnica (28). Ključna uloga ovog citokina je slabljenje izražaja GLUT4 u masnom tkivu, skeletnim mišićima i srčanom mišiću. Pretpostavlja se da više TNF- $\alpha$  luči placenta nego masno tkivo (29).

#### **1.4.2. Inzulinski receptor u miometriju**

Maternica je organ čija je stijenka građena od tri sloja tkiva. Prvi sloj čini endometrij koji reagira na reproduktivne hormone, zatim miometrij koji je mišićni sloj i sastoji se od glatkih mišićnih stanica te seroze ili perimetrija (30). Miometrij je najdeblji sloj maternice te ga čine snopovi glatkih mišićnih stanica odijeljenih vezivnim tkivom i raspoređeni u četiri neoštro ograničena sloja. Nadalje, tijekom trudnoće miometrij prolazi kroz razdoblje intenzivnog rasta koji je posljedica hiperplazije i hipertrofije (31). U istraživanju koje je provedeno kako bi se ispitaio izražaj IR-a, IGF-1 receptora i glukokortikoidnih receptora u maternici štakorica, dokazano je postojanje IR-a u glatkim mišićima miometrija te je uočeno da se njegov izražaj mijenja tijekom različitih tjedana gestacije (32). Inzulinski receptori imaju ključnu ulogu u plodnosti i implantaciji te nedostatak dovodi do smanjene plodnosti, implantacije te neuspjeha decidualizacije. Nedostatak IR-a dovodi do smanjena proliferacije epitela maternice i strome. Također, IR zajedno s IGF1 receptorom ima bitnu ulogu u prevođenju signala ovisnih o hormonima koji upravljaju proliferacijom maternice (33).

## 2. HIPOTEZA

Izlaganje prehrani bogatom mastima i šećerima prije i tijekom trudnoće smanjuje izražaj inzulinskog receptora alfa u mišiću maternice Sprague-Dawley štakorica.

### 3. CILJ

Imunohistokemijskim metodama, uz pomoć protutijela na inzulinski receptor alfa (IR- $\alpha$ ), obojiti tkiva maternice štakorica hranjenih standardnom ili prehranom bogatom mastima i šećerima od 3. tjedna starosti te usporediti izražaj inzulinskih receptora alfa u tkivu miometrija štakorica hranjenih standardnom i prehranom bogatom mastima i šećerima.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na animalnom modelu – studija parova.

### 4.2. Materijali

Studija je napravljena na arhivi tkiva maternica prikupljenih u sklopu studije 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*“ koju je odobrilo Mađarsko etičko povjerenstvo za pokuse na životinjama, br. IV./3071/2016 i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek 27. lipnja 2023., klasa: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-114. U istraživanju su korištene ženke Sprague-Dawley štakora koje su od 3. tjedna starosti hranjene standardnom prehranom (SD) ili prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) (Altromin Spezialfutter GmbH & Co., Lage, Njemačka, kat. br. C-1101). Hranjene su 6 tjedana te se navedena prehrana nastavila primjenjivati od parenja do poroda. Nakon poroda štakorice su eutanazirane te je od svake životinje prikupljeno šest vrsta tkiva. Za potrebe izrade ovog završnog rada upotrijebljena su tkiva maternice 5 štakorica hranjenih sa SD koje predstavljaju kontrolnu skupinu te tkiva maternice 5 štakorica hranjenih s HFHSD te one predstavljaju eksperimentalnu skupinu.

### 4.3. Metode

Prisutnost IR- $\alpha$  u tkivu maternice analizirana je imunohistokemijskom metodom. Nakon fiksacije u 4 %-tnoj puferiranoj otopini formaldehida tijekom 24 sata, tkiva su uklopljena u parafinske blokove standardnim postupkom. Uslijedilo je rezanje na rezove debljine 5  $\mu\text{m}$  pomoću mikrotoma (Leica SM2000R, Nussloch, Njemačka). Rezovi su deparafinizirani te je provedeno imunohistokemijsko bojanje tkiva koristeći protutijelo na IR- $\alpha$ .

#### 4.3.1. Deparafinizacija tkiva

Proces deparafinizacije započet je uranjanjem preparata dva puta u ksilol po 5 minuta. Nakon toga izvršena je rehidratacija u silaznom nizu alkohola. Preparat je prvo uronjen u 100 %-tni etanol, zatim u 96 %-tni etanol, u 70 %-tni etanol te na kraju u destiliranu vodu, sve u trajanju od 5 minuta.

#### 4.3.2. Imunohistokemijsko bojanje

Imunohistokemijsko bojanje je učinjeno prema sljedećem protokolu:

1. Predtretman rezova u svrhu zasićenja endogenih peroksidaza koji podrazumijeva inkubaciju u 1 %-tnoj otopini vodikovog peroksida (Kemika, Zagreb) pripremljenog u puferu  $1 \times$  PBS (pH 7,4; 137 mM NaCl (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 2,7 mM KCl (VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD), 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u trajanju od ukupno 40 minuta.
2. Inkubacija rezova s otopinom za blokiranje u svrhu sprječavanja nespecifičnih reakcija u trajanju od 2 sata pri 4 °C. Otopina za blokiranje je bila 1 %-tni albumin iz seruma goveda (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i 5 %-tni kozji serum (Gibco, Invitrogen, Auckland, Novi Zeland) pripremljeni u  $1 \times$  PBS-u.
3. Inkubacija rezova u otopini primarnog protutijela, zečjem protu-IR- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; SC-710), pripremljenog u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1 : 250. Inkubacija je trajala preko noći pri 4 °C.
4. Ispiranje rezova tri puta po 10 minuta u  $1 \times$  PBS-u.
5. Inkubacija rezova u otopini sekundarnog protutijela, biotiniranog protu-zečjem IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA), pripremljenog u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1 : 1000. Inkubacija je trajala 4 sata pri 4 °C.
6. Ispiranje rezova tri puta po 10 minuta u  $1 \times$  PBS-u.
7. Inkubacija rezova u otopini kompleksa avidin – biotin s peroksidazom hrena (HRP) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) pripremljenog prema uputama proizvođača, u trajanju od 2 sata pri 4 °C.



8. Inspiranje rezova tri puta po 10 minuta u  $1 \times$  PBS-u.
9. Vizualizacija kompleksa antigen-protutijelo korištenjem otopine diaminobenzidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD), supstrata za HRP, pripremljene prema uputama proizvođača.
10. Pokrivanje stakalaca s rezovima medijem za pokrivanje i pokrovnim stakalcem.

### 4.3.3. Analiza mikrofotografija

Preparati su mikroskopirani i fotografirani koristeći svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Njemačka) spojen na kameru (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) te su dobivene fotografije analizirane. Fotografiranje je napravljeno na povećanju objektiva  $40\times$ . Na svakom tkivu fotografirano je 6 fotografija; 3 fotografije vanjskog miometrija i 3 fotografije unutarnjeg miometrija. Nakon toga kvantificiran je izražaj IR- $\alpha$  u računalnom programu ImageJ 1.53k, dodatak Fiji (34). Postupak navedene analize u Fiji-ju podrazumijeva odabir sljedećih naredbi pri pregledu odabrane mikrofotografije:

1. *Image*  $\rightarrow$  *Type*  $\rightarrow$  8-bit
2. *Image*  $\rightarrow$  *Adjust*  $\rightarrow$  *Brightness / Contrast*  $\rightarrow$  *auto*
3. *Edit*  $\rightarrow$  *Selection*  $\rightarrow$  *Specify* (za svaku fotografiju korišten je jedan kvadrat veličine  $900 \times 900$  piksela)
4. *Analyze*  $\rightarrow$  *Measure*

Kao mjerni parametar korištena je srednja vrijednost intenziteta sive boje (*mean*) i standardna devijacija. Podatci su uneseni u tablice i iskorišteni za statističku obradu.

## 4.4. Statističke metode

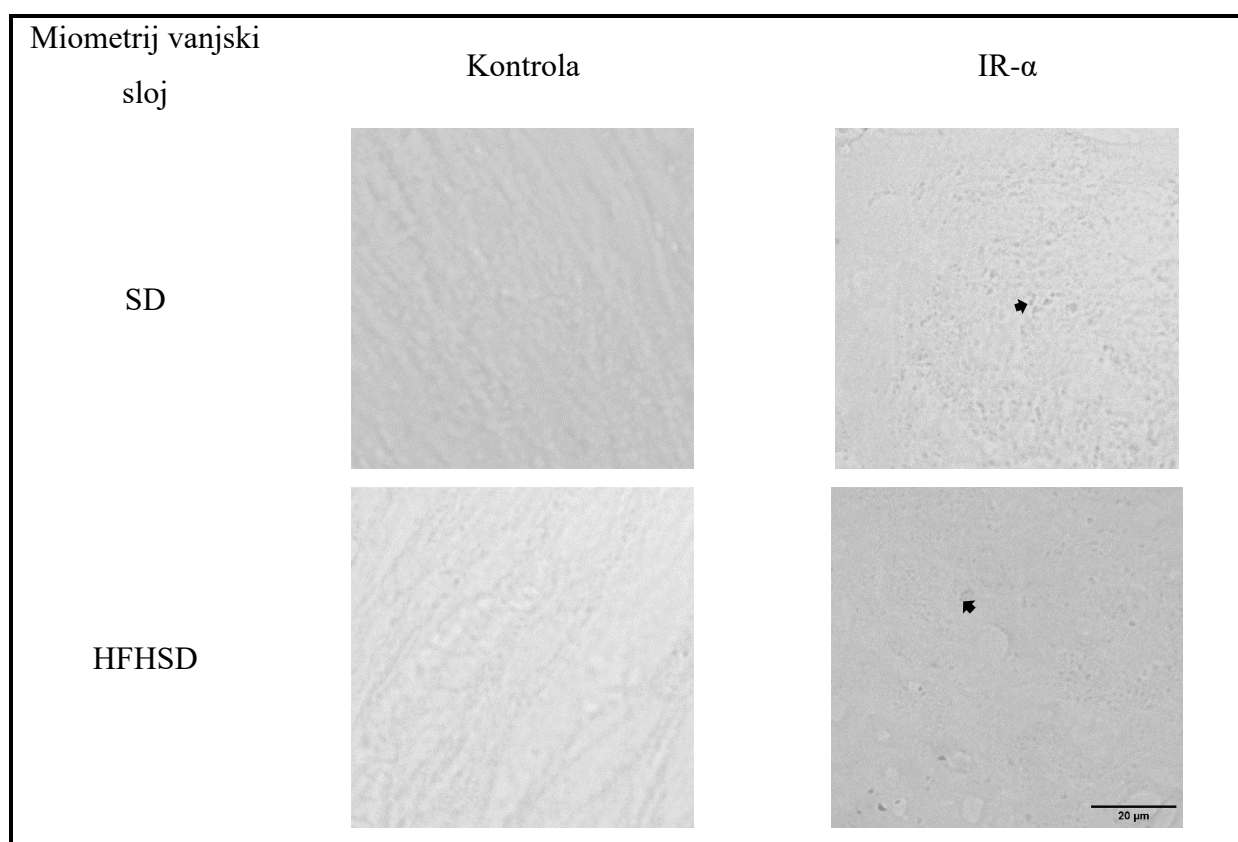
Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjele koja slijedi normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve *p* vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti

je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism, inačica 9.5.1 (GraphPad Software, Boston, MA, SAD).

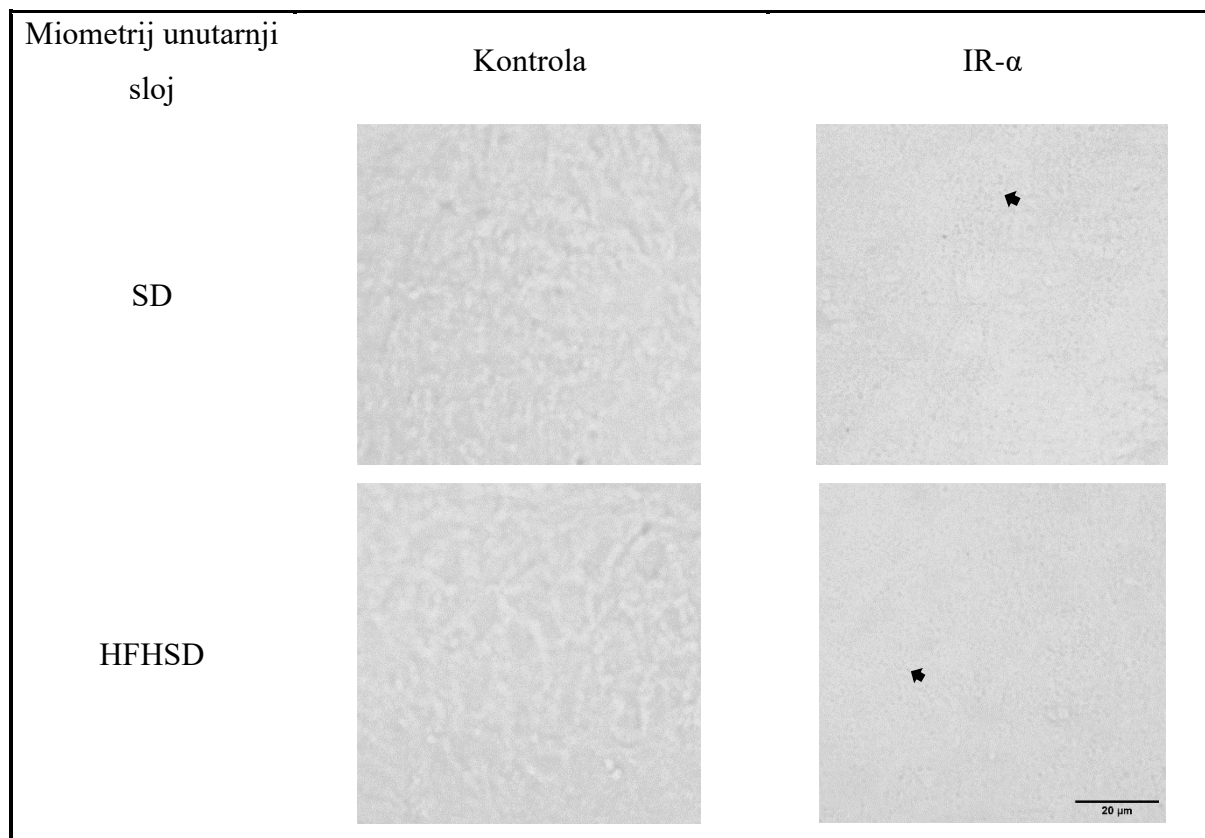
## 5. REZULTATI

### 5.1. Imunohistokemija na IR- $\alpha$

Imunohistokemijskom metodom, uz pomoć protutijela na IR- $\alpha$ , obojana su tkiva maternice štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) ili prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) od 3. tjedna starosti. Zabilježeno je da je IR- $\alpha$  izražen u vanjskom (Slika 1) i unutarnjem miometriju maternica u obje analizirane skupine (Slika 2).



Slika 1. Imunohistokemijsko obojenje vanjskog sloja miometrija maternice na inzulinski receptor IR- $\alpha$ . Prikaz usporedbe dvaju skupina štakorica s obzirom na način prehrane te u odnosu na kontrolu. Fotografirano na 400 $\times$  povećanju mikroskopa. Mjerilo: 20  $\mu$ m.  $\rightarrow$  - imunopozitivna reakcija, HFHSD – prehrana bogata mastima i šećerima, IR- $\alpha$  – inzulinski receptor alfa, SD – standardna prehrana. Autor fotografije: Patricija Budić.



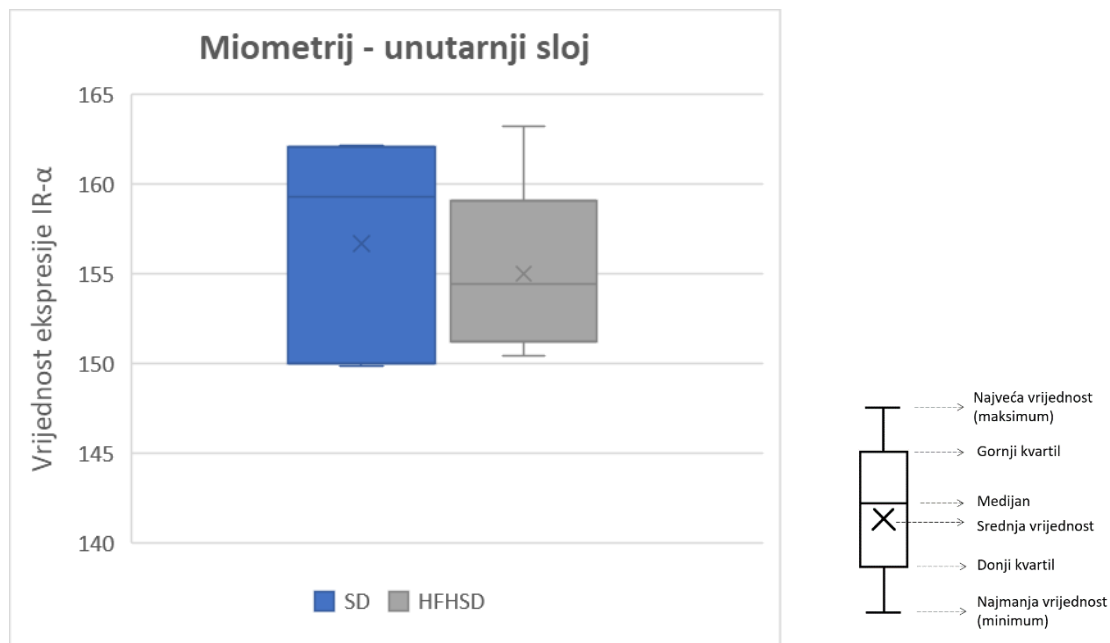
Slika 2. Imunohistokemijsko obojenje unutarnjeg sloja miometrija maternice na inzulinski receptor IR- $\alpha$ . Prikaz usporedbe dvaju skupina štakorica s obzirom na način prehrane te u odnosu na kontrolu. Fotografirano na 400 $\times$  povećanju mikroskopa. Mjerilo: 20  $\mu$ m.  $\rightarrow$  - imunopozitivna reakcija, HFHSD – prehrana bogata mastima i šećerima, IR- $\alpha$  – inzulinski receptor alfa, SD – standardna prehrana. Autor fotografije: Patricija Budić.

## 5.2. Usporedba izražaja IR u tkivu miometrija SD i HFHSD skupini

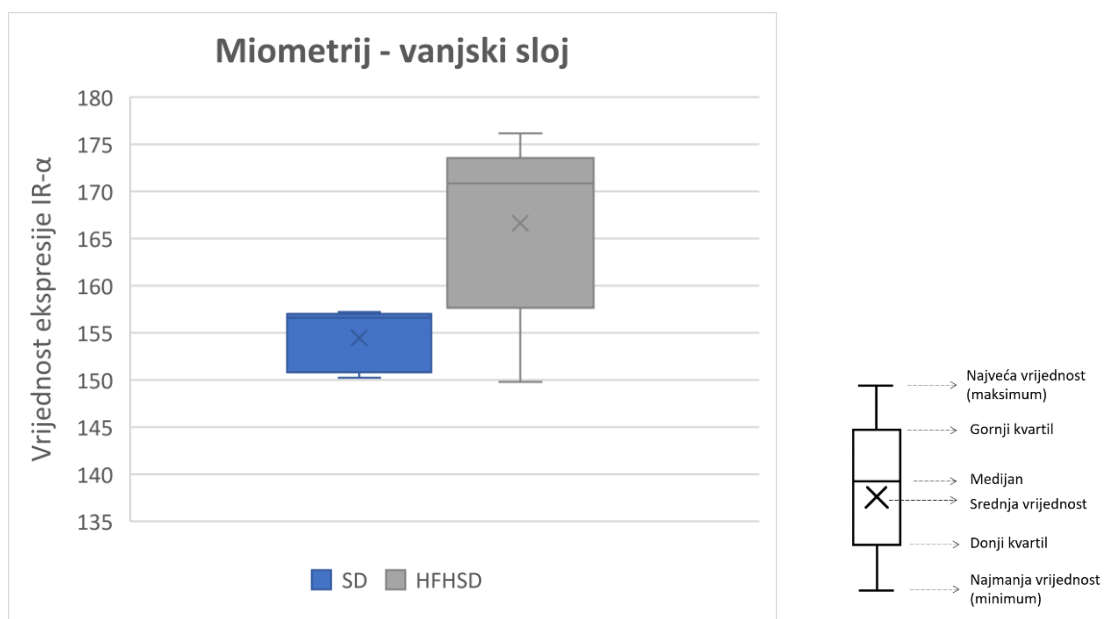
Uspoređeni su podatci dobiveni analizom izražaja IR- $\alpha$  u unutarnjem miometriju štakorica SD skupine i unutarnjem miometriju štakorica HFHSD skupine. Podatci obje skupine slijedili su normalnu distribuciju (Shapiro-Wilkov test, SD:  $p = 0,064$ , HFHSD:  $p = 0,266$ ). Studentovim t testom zabilježen je  $p = 0,652$ . Navedeno znači da nema statistički značajne razlike u izražaju IR- $\alpha$  u unutarnjem miometriju između navedenih skupina (Slika 3).

Osim toga, uspoređeni su podatci dobiveni analizom izražaja IR- $\alpha$  u vanjskom miometriju štakorica SD skupine i vanjskom miometriju štakorica HFHSD skupine. Podatci obje skupine također su slijedili normalnu distribuciju (Shapiro-Wilkov test, SD:  $p = 0,062$ , HFHSD:  $p = 0,232$ ) te su navedene skupine uspoređene Studentovim t testom. Dobivena je  $p$  vrijednost u iznosu 0,034. Navedeno znači da se razina izražaja u vanjskom sloju miometrija

SD skupine statistički značajno razlikuje od razine izražaja IR- $\alpha$  u vanjskom sloju miometrija HFHSD skupine (Slika 4).



Slika 3. Grafički prikaz izražaja IR- $\alpha$  u unutarnjem sloju miometrija maternice štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i hranjenih prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Vrijednost izražaja IR- $\alpha$  izražena je u obliku aritmetičke sredine (engl. *mean value*), koja predstavlja zbroj vrijednosti svih piksela podijeljen s ukupnim brojem piksela u području od interesa (vrijednost u rasponu 0 do 255). Nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama ( $p = 0,652$ ).



Slika 4. Grafički prikaz izražaja IR- $\alpha$  u vanjskom sloju miometrija maternice štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i hranjenih prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Vrijednost izražaja IR- $\alpha$  izražena je u obliku aritmetičke sredine (engl. *mean value*), koja predstavlja zbroj vrijednosti svih piksela podijeljen s ukupnim brojem piksela u području od interesa (vrijednost u rasponu 0 do 255). Utvrđena je statistički značajna razlika među skupinama ( $p = 0,034$ ).

## 6. RASPRAVA

Ovaj rad istražio je izražaj inzulinskog receptora alfa u postpartalnom miometriju Sprague-Dawley štakora nakon unosa hrane bogate mastima i šećerima. Navedeni način prehrane je jedan od glavnih čimbenika razvoja GDM-a i inzulinske rezistencije. Prehrana s visokim udjelom zasićenih masti, rafiniranih šećera te crvenog i prerađenog mesa povezana je s povećanim rizikom za razvoj GDM-a, dok je prehrana s visokim udjelom vlakana, mikronutrijenata i polinezasićenih masti povezana sa smanjenjem rizika za razvoj GDM-a (1). Nadalje, istraživanjima je dokazano da je visoki unos životinjskih masti i proteina povezan s povećanim rizikom za razvoj GDM-a, dok je veći unos biljnih bjelančevina bio povezan s manjim rizikom (35). Pića zaslađena šećerom povećavaju rizik za razvoj dijabetesa. Iako se sve češće koriste umjetni zaslađivači kao zamjena za šećer, istraživanja provedena na ljudima sugeriraju da kontinuirana izloženost umjetnim zaslađivačima može smanjiti akutni odgovor na inzulin te smanjiti inzulinsku osjetljivost (36). U istraživanju provedenom na vrsti *Drosophila melanogaster* zapaženo je da su larve koje su hranjene prehranom bogatom šećerima bile hiperglikemične, hiperinzulinemične te su pokazivale neispravan odgovor na inzulin. Slični rezultati su zapaženi i kod muških i kod ženskih odraslih muha. Također, navedeno istraživanje ukazuje na to da prehrana visokim udjelom šećera skraćuje životni vijek i izaziva srčanu disfunkciju i aritmije (37). Osim što dovode do razvoja inzulinske rezistencije pića zaslađena šećerima mogu dovesti i do prijevremenog poroda. Šećer dovodi do povećanja koncentracije glukoze u plazmi i do smanjenja osjetljivosti na inzulin. Smanjena inzulinska osjetljivost jedan je od faktora prijevremenog poroda, a visoke koncentracije glukoze u plazmi povezane su s povišenim koncentracijama interleukina koji su dio upalne reakcije te su povezani s prijevremenim porodom (11). Inzulinska rezistencija je vrlo često uzrokovana povećanom upalom u organizmu. Upala može biti uzrokovana visokim koncentracijama glukoze u krvi, pretilošću ili prehranom, odnosno masnim kiselinama. Konkretno, omega-6 zasićene masne kiseline (arahidonska i palmitinska kiselina) smatraju se proupalnim molekulama. Također, mogu se vezati na specifične vezne proteine koji mogu uzrokovati inzulinsku rezistenciju (38). Provedeno je istraživanje u kojemu je ispitivan utjecaj hiperinzulinemije na IR. Hiperinzulinemija, koja nastaje kao posljedica hiperglikemija, tijekom kroničnog djelovanja može dovesti do smanjenja fosforilacije IR-a. Međutim u navedenom istraživanju nije zapažena promjena u količini ili položaju IR-a (39).

Različitim istraživanjima dokazano je da hiperglikemija utječe na proliferaciju glatkih mišićnih stanica te da može imati stimulirajući ili inhibitorni učinak. Također, uočeno je da potrošnja glukoze glatkih mišićnih stanica ostaje vrlo visoka kod dijabetesa, odnosno da se ponašaju gotovo kao tumorske stanice po pitanju potrošnje glukoze. Međutim, glatke mišićne stanice koriste glikolitički put za stvaranje ATP-a (adenozin-trifosfata) čak i u anaerobnim uvjetima. Procesom aerobne glikolize glatke mišićne stanice štite se od oksidativnog stresa. Neke studije predlažu teoriju u kojoj kronična hiperglikemija dovodi do indukcije proliferacije i nakupljanja glatkih mišićnih stanica (40). Iz navedenih činjenica vidljivo je da se tijekom hiperglikemije povećava potrošnja glukoze u glatkim mišićnim stanicama te da kronična hiperglikemija može potaknuti proliferaciju i povećanje broja glatkih mišićnih stanica. Ukoliko dođe do povećanja broja mišićnih stanica, dolazi i do povećanog izražaja IR- $\alpha$ . S obzirom da su štakorice hranjene prehranom bogatom mastima i šećerima, cijelo vrijeme bile su izložene hiperglikemiji koja je mogla dovesti do proliferacije i povećanja broja mišićnih stanica, a samim time i do povećanja broja IR- $\alpha$ .

Hipotezom ovog istraživanja pretpostavljeno je da će doći do smanjenja broja IR- $\alpha$  međutim to je karakteristična pojava za skeletne mišiće, a ne za glatke mišićne stanice. Tijekom hiperinzulinemije većina glukoze se skladišti u skeletnim mišićima no kod kronične hiperinzulinemije dolazi do pojave inzulinske rezistencije. S napredovanjem inzulinske rezistencije i smanjenjem unosa glukoze u mišiće, porast koncentracije glukoze u plazmi postaje pretjeran, ali je porast hiperinzulinemije dovoljan da se održi koncentracija glukoze unutar normalnog raspona. Usprkos tome, dolazi do prekomjernog porasta koncentracije glukoze u plazmi te je potrebno više vremena za uspostavljanje normoglikemije nakon svakog obroka. Na kraju, međutim, inzulinska rezistencija postaje toliko jaka da kompenzacijska hiperinzulinemija nije dovoljna za održavanje normalnih razina glukoze. Dolazi do razvoja hiperglikemije koja i dalje stimulira lučenje inzulina iz  $\beta$ -stanica. Kronična hiperinzulinemija uzrokuje smanjenje broja IR- $\alpha$  i intracelularnih događaja uključenih u djelovanje inzulina, čime se pogoršava inzulinska rezistencija (41). Dakle, da je analiza izražaja IR- $\alpha$  provedena na skeletnim mišićima pretpostavljamo da bi došlo do smanjenja izražaja nakon izloženosti prehrani bogatom mastima i šećerima.

Provedeno je istraživanje kako bi se ispitalo utjecaj gestacijskog dijabetesa na kontraktilost miometrija. Uočeno je da postoje značajne razlike u kontrakcijama kod pacijenata s dijabetesom u odnosu na pacijente bez dijabetesa. Kontrakcije kod pacijenata s dijabetesom bile su slabije i trajale su kraće. Tijekom istraživanja zapaženo je da se smanjuje



signalizacija kalcijevih kanala koji su vjerojatno uzrok smanjene kontraktilosti. Smanjena signalizacija posljedica je smanjenog izražaja  $Ca^{2+}$  kanala u miometriju pacijenata s dijabetesom(42).

Istraživanjima je dokazano da je normalni miometrij sastavljen od različitih fenotipova glatkih mišićnih stanica. Vanjski miometrij sastavljen je od terminalno diferenciranih glatkih mišićnih stanica dok je, s druge strane, unutarnji miometrij sastavljen od nediferenciranih glatkih mišićnih stanica (43). S obzirom da se vanjski i unutarnji miometrij razlikuju svojom građom za očekivati je da izražaj IR- $\alpha$  nije isti u navedenim slojevima. U ovom istraživanju došlo je do povećanja izražaja IR- $\alpha$  u vanjskom miometriju dok je u unutarnjem ostala gotovo nepromijenjena. Razlika u izražaju vidljiva je zbog razlike u tkivima, odnosno zbog različite diferencijacije glatkih mišićnih stanica.

## 7. ZAKLJUČAK

Imunohistokemijskim metodama, uz pomoć protutijela na inzulinski receptor alfa (IR- $\alpha$ ), obojana su tkiva maternica štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) ili prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) te je utvrđen izražaj IR- $\alpha$  u unutarnjem i vanjskom miometriju u obje skupine. U unutarnjem miometriju nije utvrđena značajna razlika u izražaju IR- $\alpha$  između štakorica hranjenih standardnom prehranom i prehranom bogatom mastima i šećerima. S druge strane, u vanjskom je miometriju uočena značajna razlika u izražaju IR- $\alpha$  između dvije skupine te je utvrđena veća razina IR- $\alpha$  kod skupine hranjene prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) u odnosu na štakorice hranjene standardnom prehranom (SD).

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Imunohistokemijskim metodama, uz pomoć protutijela na inzulinski receptor alfa (IR- $\alpha$ ) obojiti tkiva maternice štakorica hranjenih standardnom prehranom ili prehranom bogatom mastima i šećerima od 3. tjedna starosti te usporediti izražaj inzulinskih receptora u tkivu miometrija štakorica hranjenih standardnom prehranom i prehranom bogatom mastima i šećerima.

**Ustroj studije:** Eksperimentalna studija na animalnom modelu – studija parova.

**Materijali i metode:** Studija je napravljena na arhivi tkiva maternica prikupljenih u sklopu studije 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*“. U istraživanju su korištene ženke Sprague-Dawley štakora koje su od 3. tjedna starosti hranjene standardnom prehranom (SD) ili prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Prisutnost IR- $\alpha$  u tkivu maternice analizirana je imunohistokemijskom metodom. Nakon fiksacije u 4 %-tnoj puferiranoj otopini formaldehida tijekom 24 sata, tkiva su uklopljena u parafinske blokove standardnim postupkom. Na deparafiniziranim rezovima debljine 5  $\mu$ m provedeno je imunohistokemijsko bojanje tkiva uz pomoć protutijela na IR- $\alpha$ . Na kraju je provedena analiza mikrofotografija te statistička analiza dobivenih podataka.

**Rezultati:** U vanjskom miometriju štakorica hranjenih prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) dolazi do povećanja izražaja inzulinskih receptora alfa u odnosu na štakorice hranjene standardnom prehranom (SD).

**Zaključak:** Imunohistokemijskom metodom uz pomoć protutijela na IR- $\alpha$  obojana su tkiva maternica te je zapaženo povećanje izražaja IR- $\alpha$  u vanjskom miometriju HFHSD skupine.

**Ključne riječi:** gestacijski dijabetes, inzulinski receptor, inzulinska rezistencija.

## 9. SUMMARY

Insulin receptor expression in the postpartum myometrium of female Sprague-Dawley rats after exposure to a diet rich in fats and sugars

**Objective:** Immunohistochemical methods, with the help of antibodies to the insulin receptor alpha (IR- $\alpha$ ), to stain the uterine tissues of rats fed a standard diet or a diet rich in fats and sugars from the 3rd week of age and to compare the expression of insulin receptors in the myometrial tissue of rats fed standard diet and diet rich in fats and sugars.

**Study desing:** Experimental research on an animal model – the case-control study.

**Material and methods:** The research was made on the archive of uterine tissues collected as part of the study 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*“. The research used female Sprague-Dawley rats that were fed a standard diet (SD) or a diet rich in fats and sugars (HFHSD) from the 3rd week of age. The presence of IR- $\alpha$  in uterine tissue was analyzed by immunohistochemical method. After fixation in 4 % buffered formaldehyde solution for 24 hours, the tissue were embedded in paraffin blocks using a standard procedure. Immunohistochemical tissue staining was performed on deparaffinized sections with a thickness of 5  $\mu$ m using an antibody to IR- $\alpha$ . At the end, an analysis of microphotographs and statistical analysis of the obtained data was carried out.

**Results:** In the outer myometrium of rats fed a diet rich in fats and sugars (HFHSD), there is a increase in the expression of insulin receptors alpha compared to rats fed a standard diet (SD).

**Conclusion:** Uterine tissues were stained with an immunohistochemical method using IR- $\alpha$  antibodies, and an increase expression was observed in the outer myometrium of the HFHSD group.

**Key words:** gestational diabetes, insulin receptor, insulin resistance.

## 10. LITERATURA

1. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 26;19(11):3342
2. Lende M, Rijhsinghani A. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Dec 21;17(24):9573.
3. International Diabetes Federation. Gestational diabetes (mrežne stranice) (citirano 26. srpnja 2023.) Dostupno na: <https://idf.org/about-diabetes/gestational-diabetes/>
4. Hrvatski zavod za Javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2021. godinu, 2023 Jan; 256.
5. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel; Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, i sur. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 2010 Mar;33(3):676-82.
6. Poliklinika Bayer. OGTT (Oralni glukoza tolerans test) (mrežne stranice) (citirano 26. srpnja 2023.) Dostupno na: <https://breyer.hr/pretrage/sve-pretrage/ogtt-oralni-glukoza-tolerans-test>
7. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Rev.* 2022 Sep 26;43(5):763-793.
8. Zhang C, Ning Y. Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr.* 2011 Dec;94(6 Suppl):1975S-1979S.
9. Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. *Diabetes Metab J.* 2022 Jan;46(1):3-14.
10. Alejandro EU, Mamerto TP, Chung G, Villavieja A, Gaus NL, Morgan E, i sur. Gestational Diabetes Mellitus: A Harbinger of the Vicious Cycle of Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 15;21(14):5003.
11. Englund-Ögge L, Brantsæter AL, Haugen M, Sengpiel V, Khatibi A, Myhre R, i sur. Association between intake of artificially sweetened and sugar-sweetened beverages and preterm delivery: a large prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2012 Sep;96(3):552-9.
12. Devarshi PP, Grant RW, Ikonte CJ, Hazels Mitmesser S. Maternal Omega-3 Nutrition, Placental Transfer and Fetal Brain Development in Gestational Diabetes and Preeclampsia. *Nutrients.* 2019 May 18;11(5):1107.

13. Kamana KC, Sumisti Shakya, Hua Zhang; Gestational Diabetes Mellitus and Macrosomia: A Literature Review. *Ann Nutr Metab* 1 June 2015; 66 (Suppl. 2): 14–20.
14. Mohammadbeigi A, Farhadifar F, Soufi Zadeh N, Mohammadsalehi N, Rezaiee M, Aghaei M. Fetal macrosomia: risk factors, maternal, and perinatal outcome. *Ann Med Health Sci Res*. 2013 Oct;3(4):546-50.
15. Hermann GM, Dallas LM, Haskell SE, Roghair RD. Neonatal macrosomia is an independent risk factor for adult metabolic syndrome. *Neonatology*. 2010;98(3):238-44.
16. Schaefer-Graf U, Napoli A, Nolan CJ; Diabetic Pregnancy Study Group. Diabetes in pregnancy: a new decade of challenges ahead. *Diabetologia*. 2018 May;61(5):1012-1021.
17. Wu Y, Liu B, Sun Y, Du Y, Santillan MK, Santillan DA, et al. Association of Maternal Prepregnancy Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus With Congenital Anomalies of the Newborn. *Diabetes Care*. 2020 Dec;43(12):2983-2990.
18. Nogueira Avelar E Silva R, Yu Y, Liew Z, Vested A, Sørensen HT, Li J. Associations of Maternal Diabetes During Pregnancy With Psychiatric Disorders in Offspring During the First 4 Decades of Life in a Population-Based Danish Birth Cohort. *JAMA Netw Open*. 2021 Oct 1;4(10):e2128005.
19. Anastassios G. Pittas and others, Adipocytokines and Insulin Resistance, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 89, Issue 2, 1 February 2004, Pages 447–452
20. van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 2023 Jun 28;51(3):1057-1069.
21. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Jan;19(1):31-44.
22. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005 May;26(2):19-39.
23. Kampmann U, Knorr S, Fuglsang J, Ovesen P. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *J Diabetes Res*. 2019 Nov 19;2019:5320156.
24. Catalano PM. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet Med*. 2014 Mar;31(3):273-81.
25. Hwang YJ, Jung GS, Jeon W, Lee KM. Lin28a ameliorates glucotoxicity-induced  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis. *BMB Rep*. 2021 Apr;54(4):215-220.
26. Choudhury AA, Devi Rajeswari V. Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Nov; Volume 143, 112183

27. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S112-9.
28. Sharma AK, Singh S, Singh H, Mahajan D, Kolli P, Mandadapu G, i sur. Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Cells*. 2022 Aug 28;11(17):2672.
29. Ruszała M, Niebrzydowska M, Pilszyk A, Kimber-Trojnar Ź, Trojnar M, Leszczyńska-Gorzela B. Novel Biomolecules in the Pathogenesis of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 27;22(21):11578.
30. Ameer MA, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, et al. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. [Updated 2022 Dec 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.
31. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije, prijevod 10. američkog izdanja. Školska knjiga: Zagreb, 2005.
32. E. T. Korgun Et Al. , "Expression of insulin, insulin-like growth factor I and glucocorticoid receptor in rat uterus and embryo during decidualization, implantation and organogenesis," *REPRODUCTION* , vol.125, no.1, pp.75-84, 2003.
33. Sekulovski N, Whorton AE, Shi M, Hayashi K, MacLean JA 2nd. Insulin signaling is an essential regulator of endometrial proliferation and implantation in mice. *FASEB J*. 2021 Apr;35(4):e21440.
34. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):676–82.
35. Bao W, Bowers K, Tobias DK, Olsen SF, Chavarro J, Vaag A, i sur. Prepregnancy low-carbohydrate dietary pattern and risk of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr*. 2014 Jun;99(6):1378-84.
36. Toi PL, Anothaisintawee T, Chaikledkaew U, Briones JR, Reutrakul S, Thakkinstian A. Preventive Role of Diet Interventions and Dietary Factors in Type 2 Diabetes Mellitus: An Umbrella Review. *Nutrients*. 2020 Sep 6;12(9):2722.
37. Musselman LP, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Hathiramani SS, Cagan RL, i sur. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech*. 2011 Nov;4(6):842-9.
38. Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis*. 2015 Sep 29;14:121.

39. Catalano KJ, Maddux BA, Szary J, Youngren JF, Goldfine ID, et al. (2014) Insulin Resistance Induced by Hyperinsulinemia Coincides with a Persistent Alteration at the Insulin Receptor Tyrosine Kinase Domain. PLOS ONE 9(9): e108693.
40. Saikia, U.N., Mitra, S. (2017). Smooth Muscle Cells in Diabetes Mellitus. In: Kartha, C., Ramachandran, S., Pillai, R. (eds) Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus. Advances in Biochemistry in Health and Disease, vol 17. Springer, Cham.
41. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2009 Nov;32 Suppl 2(Suppl 2):S157-63.
42. Al-Qahtani S, Heath A, Quenby S, Dawood F, Floyd R, Burdyga T, i sur. Diabetes is associated with impairment of uterine contractility and high Caesarean section rate. Diabetologia. 2012 Feb;55(2):489-98.
43. Kishi Y, Shimada K, Fujii T, Uchiyama T, Yoshimoto C, Konishi N, i sur. Phenotypic characterization of adenomyosis occurring at the inner and outer myometrium. PLoS One. 2017 Dec 18;12(12):e0189522.



## 11. ŽIVOTOPIS

### Patricija Budić

Datum i mjesto rođenja: 29. prosinca 2001., Rijeka

e-pošta: [patricija.budic@gmail.com](mailto:patricija.budic@gmail.com)

### Obrazovanje:

- rujan 2016. – lipanj 2020.: Katolička gimnazija s pravom javnosti u Požegi
- rujan 2020. – danas: sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku