

# Postpartalni sadržaj glikogena u miometriju ženki Sprague-Dawley štakora hranjenih hranom bogatom mastima i šećerom

---

Balog, Klara

Master's thesis / Diplomski 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:152:191949>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Klara Balog**

**POSTPARTALNI SADRŽAJ**

**GLIKOGENA U MIOMETRIJU ŽENKI**

**SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**HRANJENIH HRANOM BOGATOM**

**MASTIMA I ŠEĆERIMA**

**Završni rad**

**Osijek, 2023**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Klara Balog**

**POSTPARTALNI SADRŽAJ**

**GLIKOGENA U MIOMETRIJU ŽENKI**

**SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**HRANJENIH HRANOM BOGATOM**

**MASTIMA I ŠEĆERIMA**

**Završni rad**

**Osijek, 2023**

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vedrana Ivić

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

Rad ima 25 stranica i 4 slike.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Vedrani Ivić na podršci, predanosti i strpljenju prilikom ispravljanja završnog rada. Hvala što ste nam pokazali kako rad u labosu ne treba predstavljati strah, već da je to mjesto na koje dolazimo s osmijehom.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mariji Heffer na podršci, predanosti i strpljenju na putu izrade završnog rada. Hvala Vam što ste još od prve godine mog fakulteta svojim predavanjima prenijeli svu ljubav prema biologiji i neuroznanosti.*

*Hvala Lovri Mihajloviću, mag. educ. biol. et chem. i Dariji Balonek Nikolić na pomoći, brojnim savjetima i dobrom društvu prilikom rada u labosu.*

*Hvala doc. dr. sc. Senki Blažetić na savjetima i pomoći prilikom kvantifikacije slika i izrade statističkih rezultata.*

*Zahvaljujem se cijeloj katedri i predivnim ljudima koji su mi pokazali kako ne treba postojati strah za neuspjehom i zbog kojih sam toliko zavoljela rad u labosu.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima i prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog mog školovanja i bez čije podrške bi ovaj put bio puno teži. Hvala Vam što ste učinili da se na ovom putu života nikada ne osjećam samom.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Glikogen .....	1
1.1.1. Utjecaj steroidnih hormona na glikogen .....	1
1.1.2. Utjecaj inzulina na glikogen .....	2
1.2. Histologija maternice.....	3
1.3. Metabolizam glikogena u maternici .....	4
1.4. Mehanizam kontraktilnosti miometrija .....	4
1.5. Dijabetes .....	5
1.5.1. Gestacijski dijabetes.....	5
1.6. Dijabetes i kontraktilnost miometrija .....	6
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	8
4. MATERIJALI I METODE.....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Materijali .....	9
4.3. Metode .....	9
4.3.1. Priprema tkiva .....	9
4.3.2. Bojanje perjordnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) .....	10
4.3.3. Mikroskopiranje i kvantifikacija .....	11
4.4. Statistička obrada podataka .....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1. Histokemijska analiza glikogena PAS metodom.....	12
5.2. Analiza intenziteta obojenja u tkivu miometrija SD i HFHSD skupina .....	13
6. RASPRAVA.....	15
7. ZAKLJUČAK .....	19
8. SAŽETAK .....	20
9. SUMMARY .....	21
10. LITERATURA .....	22
11. ŽIVOTOPIS .....	25

## Popis kratica

PKB	protein kinaza B (engl. <i>protein kinase B</i> )
DAG	diacilglicerol
ER1	estrogen receptor 1
GDM	gestacijski dijabetes melitus (engl. <i>gestational diabetes mellitus</i> )
GLUT	prijenosnik glukoze (engl. <i>glucose transporter</i> )
GP	glikogen fosfataza (engl. <i>glycogen phosphatase</i> )
GS	glikogen sintetaza
GSK-3 $\beta$	glikogen sintaza kinaza-3 $\beta$ (engl. <i>glycogen synthase kinase-3<math>\beta</math></i> )
HCl	klorovodična kiselina
HFHSD	hrana bogata mastima i šećerima (engl. <i>high fat high sugar diet</i> )
HK	heksokinaza (engl. <i>hexokinase</i> )
IGF-1	inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i> )
IP3	inozitol-trifosfat (engl. <i>inositol triphosphate</i> )
IRS-1	supstrat inzulinskog receptora 1 (engl. <i>insulin receptor substrate 1</i> )
PAS	bojanje perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (engl. <i>Periodic acid–Schiff</i> )
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. <i>phosphoinositide 3-kinases</i> )
PIP2	fosfatidilinozitol (4,5)-bisfosfat (engl. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
PKC	protein kinaza C (engl. <i>protein kinase C</i> )
SD	standardna hrana (engl. <i>standard diet</i> )
DM2	dijabetes melitus tip 2

## 1. UVOD

### 1.1. Glikogen

Glukoza u stanicu ulazi difuzijom kroz jedan od 14 prijenosnika glukoze (obitelj gena *Slc2a*; obitelj proteina: GLUT) ili se aktivno transportira u stanice putem simportera  $\text{Na}^+$ /glukoze (obitelj gena *Sglt*). Nakon ulaska, glukoza se fosforilira heksokinazom (HK) ili glukokinazom (specifično za jetru) u glukoza-6-fosfat. Zatim se pomoću enzima fosfoglukomutaze-1 prevodi u glukoza-1-fosfat. Ukoliko se glukoza pohranjuje u obliku glikogena, glukoza se prevodi u UDP-glukozu pomoću enzima UDP-fosforilaze. Glikogen-sintetaza (GS) zatim prenosi glukozni ostatak na već postojeću molekulu glikogena preko  $\alpha$ -1,4 glikozidnih veza. Enzim za grananje glikogena prenosi glukozilne jedinice s kraja jednog lanca na drugi kraj lanca preko  $\alpha$ -1,6 glikozidne veze (1). Kao rezultat procesa dobije se razgranata struktura glikogena. Dva najveća depozita glikogena nalaze se u jetri i mišićima, iako se mogu naći i u drugim perifernim tkivima.

#### 1.1.1. Utjecaj steroidnih hormona na glikogen

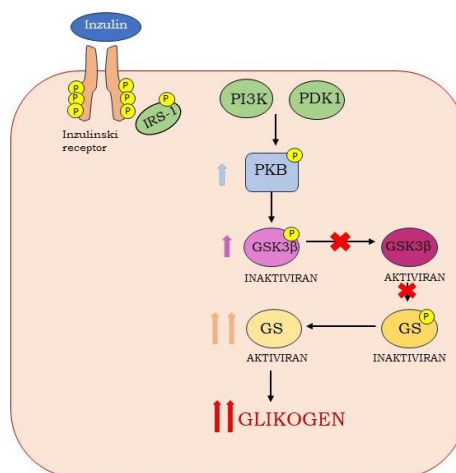
Metabolizam glikogena u maternici reguliran je steroidnim hormonima jajnika. Ovisno o vrsti različiti hormoni stimuliraju odnosno inhibiraju glikogenezu u maternici. Kod ljudi poznato je da progesteron potiče glikogenezu, te će se sukladno tome najviše količine glikogena naći neposredno poslije ovulacije u sekrecijskom (luteinizirajućem) dijelu menstruacijskog ciklusa. Navedeno potvrđuje podatak da je kod zdravih pacijentica koncentracija glikogena u endometriju pet do deset puta veća u sekrecijskoj fazi nego u proliferativnoj fazi (2). Kod drugih vrsta, kao što su štakori, glikogeneza je stimulirana estrogenom. Endometrijski glikogen doseže vrhunac tijekom proestrusa ili estrusa, kada estrogen doseže svoje najviše vrijednosti te se smanjuje za dvije trećine u diestrusu. Estradiol potiče proizvodnju inzulinu sličan faktor rasta (IGF-1) u stromi maternice, što posljedično potiče nakupljanje glikogena (3). Nadalje, djeluje na metabolizam glikogena preko estrogenskog receptora 1 (ER1) te time povećava osjetljivost stanice na inzulin. Odnosno, povećava izražaj supstrata inzulinskog receptora-1 (IRS-1), fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) i protein kinaze B (PKB) u maternici. U slučaju nedovoljne rezerve energije, dolazi do odgođenog formiranja decidue te je implatacija otežana (1).



Glikogen igra važnu ulogu tijekom rane trudnoće. Od zigote do faze morule, embriji se prvenstveno oslanja na laktat i piruvat za dobivanje energije. Poznato je da estrogen može inducirati glikogenezu u maternici nakon iscrpljivanja rezervi ugljikohidrata, odnosno tijekom gladovanja. Na taj način osigurava stalne zalihe glikogena koji služi kao izvor lako iskoristive energije.

### 1.1.2. Utjecaj inzulina na glikogen

Inzulin djeluje na način da povećava nakupljanje glikogena povećanjem fosforilirane PKB i povećanim izražajem GS. U maternici epitelne stanice endometrija nakupljaju glikogen nekoliko dana tijekom implantacijskog razdoblja. Nakon uspješne implantacije, epitel endometrija održava sintezu glikogena tjednima tijekom embrionalnog razvoja. Majčin inzulin potiče sintezu glikogena na način da se veže na inzulinski receptor na epitelnim stanicama endometrija, pokrećući signalizaciju putem IRS-1 i PKB proteina. PKB fosforilacijom inaktivira glikogen sintazu kinazu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Kada je GSK-3 $\beta$  inaktivirana, ona više ne može fosforilirati GS (4). Inzulin djeluje na način da neizravno aktivira GS inhibicijom GSK-3 $\beta$  u kanonskom putu (slika 1). Uz to povećava ukupnu razinu proteina GS povećanjem mRNA za GS. Na taj način omogućuje stalnu sintezu glikogena, neovisno o nutritivnim i hormonalnim fluktuacijama. Gubitak inzulina može aktivirati 5'-adenozin-monofosfat-aktiviranu protein kinazu, povećati ekspresiju glikogen-fosfataze (GP) i potaknuti glikogenolizu u endometriju.



Slika 1. Regulacija sinteze glikogena posredovana inzulinom. GS, glikogen sintetaza; GSK-3 $\beta$ , glikogen sintaza kinaza-3 $\beta$ ; IRS-1, supstrat inzulinskog receptora 1, PDK1, kinaza 1 ovisna o fosfoinozolidu; PI3K, fosfatidilinozitol-3-kinaza; PKB, protein kinaza B. Autor slike: Klara Balog.

## 1.2. Histologija maternice

Maternica (lat. *uterus*) je podijeljena u nekoliko slojeva različite strukture i funkcije. Najjednostavnija podjela slojeva je na sluznicu (endometrij), mišićni sloj (miometrij) te serozu (perimetrij) (slika 2). Sam endometrij podijeljen je u dvije zone: *zona basalis* i *zona functionalis*. *Zona basalis* nalazi se uz miometrij, a čini ju sloj vezivnog tkiva, točnije lamina proprija, te sadrži početni dio žlijezda maternice. *Zona functionalis* sadržava ostatak lamine proprije, tubulusne žlijezde (lat. *glandulae uterinae*) i površinski epitel. Epitel koji karakterizira potonji sloj je jednoslojni cilindrični epitel, a čine ga stanice s trepetljikama te žljezdane stanice. Miometrij predstavlja najdeblji sloj maternice kojeg karakteriziraju snopovi glatkih mišićnih stanica odijeljenih vezivnim tkivom. Razlikujemo unutarnji kružni sloj te vanjski uzdužni sloj glatkih mišića. Perimetrij predstavlja seroznu ovojnicu koja oblaže vanjsku stranu maternice.



Slika 2. Histološki prikaz presjeka maternice obojene perijodnom kiselinom i Schiffovim reagensom. Legenda: E = endometrij, M = miometrij, UM = unutarnji sloj miometrija, VM = vanjski sloj miometrija, P = perimetrij. Autor fotografije: Klara Balog

### 1.3. Metabolizam glikogena u maternici

Nakon ulaska u fibroblaste maternice, glukoza se metabolizira višestrukim putevima kako bi podržala decidualizaciju. Decidualizacija je proces sazrijevanja endometrija, njegove pripreme za implataciju. Fibroblasti endometrija prelaze u decidualne stanice. Maternica ne izražava fosfoenolpiruvat-karboksikinazu i fruktozo-1,6-bisfosfatazu, enzime koji su važan dio puta sinteze glukoze iz piruvata (5). Zbog nemogućnosti izražaja navedenih enzima maternica ne može proizvoditi glukozu *de novo*. To bi značilo da maternica svu glukozu dobiva isključivo iz cirkulacije. Iz tog razloga, maternica se služi mehanizmom pohrane glukoze u obliku glikogena. Glikogen djeluje kao spremnik glukoze te može regulirati metabolizam i izlučivanje glukoze. Decidualizacija je proces koji zahtjeva veće količine glukoze te se tu koristi pentoza-fosfatnim putem što su ustanovili Frolovo i suradnici 2011. godine (6). Nakon decidualizacije, decidua koristi Warburgov efekt sagorijevajući na taj način veliku količinu glukoze putem glikolize. Obilježje ovog promijenjenog metabolizma je povećani unos glukoze i fermentacija glukoze u laktat. Taj se fenomen opaža čak i u prisutnosti potpuno funkcionalnih mitohondrija. Navedenu činjenicu su pak ustanovili Zuo i suradnici 2015. godine (7).

### 1.4. Mehanizam kontraktilnosti miometrija

Glikogen, kao važan izvor energije u obliku glukoze, bitan je za učinkovitu kontraktilnost miometrija tijekom poroda. Sam mehanizam kontrakcije složen je proces koji se ne može odvijati bez utroška energije. Neposredno prije poroda razine glikogena rastu kako bi se kontrakcije mogle održavati tijekom cijelog poroda. Kontraktilna aktivnost miometrija ovisi o promjenama u koncentraciji intracelularnog  $Ca^{2+}$ .  $Ca^{2+}$  igra važnu ulogu kao drugi glasnik, te sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih procesa kao što su oplodnja, sekrecija, proliferacija, preuređenje citoskeleta, izražaj gena, te kontrakcija glatkih mišića. Oslobođanje  $Ca^{2+}$  iz unutarstaničnih zaliha (endoplazmatske mrežice) i ulazak iz izvanstaničnog prostora, služi za aktiviranje biokemijskih puteva koji dovode do premošćivanja aktina i miozina te posljedično tome do kontrakcije. Prevladavajući kalcijevi kanali u miocitima su kalcijevi kanali L-tipa. Miometrij sadrži i kalcijeve kanale T-tipa koji pokazuju bržu kinetiku te veći kapacitet vodljivosti. S druge strane kalcijevi kanali L-tipa su prikladniji za utjecanje  $Ca^{2+}$  tijekom duljeg razdoblja. Cijela kaskadna reakcija počinje kada prvi glasnik stupa u interakciju sa specifičnim G-protein spregnutim receptorom koji se nalazi na staničnoj membrani. Aktivacijom G-proteina

dolazi do stimulacije membranske fosfolipaze C $\beta$  koja hidrolizira fosfatidilinozitol bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) u dva druga glasnika: inozitol-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> stupa u interakciju sa specifičnim, inozitol-trifosfat receptorom koji se nalazi u membrani endoplazmatske mrežice te dovodi do oslobađanja Ca<sup>2+</sup> iz unutarstaničnog skladišta. Sukladno tome dolazi do porasta koncentracije intracelularnog Ca<sup>2+</sup>. Povećanje Ca<sup>2+</sup> neophodan je okidač za aktivaciju kalmodulina, Ca<sup>2+</sup> ovisnog proteina. Kalmodulin veže četiri Ca<sup>2+</sup> iona te čini kompleks koji aktivira kinazu lakog lanca miozina koja fosforilira miozin, što aktivira kontraktilni mehanizam. DAG aktivira izoformu protein-kinaze C (PKC) za koju je poznato da ima nekoliko izoenzima u glatkim mišićima čija je uloga specifična za tkivo. Jedan od učinaka je poticanje kontrakcije na način da fosforilira kalcijeve kanale L-tipa (9).

## 1.5. Dijabetes

Šećerna bolest ili dijabetes je kronična bolest koja nastaje kada gušterača ne proizvodi dovoljno inzulina ili kada tijelo ne može učinkovito koristiti inzulini koji proizvodi, točnije stanice postaju neosjetljive na inzulini. Hrvatski zavod za javno zdravstvo ističe kako se šećerna bolest može smatrati globalnom epidemijom. Razlog tome leži u njenoj prevalenciji u svijetu koja je znatno veća nego što se moglo očekivati prije nekoliko desetljeća. Svjetske procjene govore da 537 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina živi sa šećernom bolešću. Dok se na razini Europe smatra da od šećerne bolesti boluje 61 milijun osoba u dobi od 20 do 79 godina (10). Dijabetes mellitus tip 2 (DM2) karakterizira povećanje glukoneogeneze, inzulinske rezistencije i poremećaj metabolizma glikogena zbog disfunkcije  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače (početnu predijabetičku hiperinzulinemiju zamjenjuje dijabetička hipoinzulinemija). Klinička slika koja ga karakterizira su hipertenzija, dislipidemija i pretilost, te je praćena komplikacijama krvožilnog sustava.

### 1.5.1. Gestacijski dijabetes

Gestacijski dijabetes melitus (GDM) pojam je koji se upotrebljava kada se dijabetes po prvi puta dijagnosticira za vrijeme trudnoće. Najčešće se dijagnosticira u 2. tromjesečju trudnoće. Nastaje zbog inzulinske rezistencije koja je potencijalno izazvana hormonima posteljice (11). Zbog svog svojstva da uzrokuju dijabetes, hormoni posteljice se često nazivaju i dijabetogeni hormoni. Među dijabetogene hormone ubrajamo hormon rasta, hormon koji oslobađa

kortikotropin, placentalni laktogen (korionski somatomotropin), prolaktin i progesteron. Majčina hiperglikemija uzrokuje povećan prijenos glukoze i fetalnih  $\beta$ -staničnih sekretagoga (aminokiselina), što rezultira fetalnom hiperinzulinemijom. Time dolazi do kratkoročnih problema kao što je fetalni prekomjerni rast i/ili pretilost, a mogu nastupiti i dugoročni problemi koji se očituju kao metaboličke disfunkcije kasnije u životu. Što se tiče rizika za trudnicu, veća inzulinska rezistencija i disfunkcija  $\beta$ -stanica prije trudnoće u žena koje razvijaju GDM povećavaju rizik za oboljenje od DM2 kasnije tokom života. Inzulinska signalizacija tijekom trudnoće u žena s normalnom tolerancijom glukoze zahtijeva autofosforilaciju tirozina inzulinskog receptora u skeletnim mišićima. U slučaju GDM, uz smanjenje IRS-1, smanjena je autofosforilacija tirozina u intracelularnoj domeni  $\beta$ -podjedinice inzulinskog receptora, što rezultira 25 % nižim unosom glukoze.

### **1.6. Dijabetes i kontraktilnost miometrija**

Dijabetes donosi brojne komplikacije pri porodu kao što su makrosomija, povećani fetalni distress te smanjena kontraktilnost miometrija. Fetalni distress je rijetka komplikacija koja se obično događa kada fetus ne prima dovoljno kisika. Zbog brojnih komplikacija sve više je indicirana primjena carskog reza kod trudnica s dijabetesom. Smanjena kontraktilnost maternice za posljedicu ima produljeni porod i neuspješnu indukciju poroda, što je hitna indikacija za carski rez. Kod dijabetesa dolazi do smanjenih rezervi glikogena koji služi kao najvažniji izvor energije za kontrakcije maternice. Nadalje, dolazi do smanjene ekspresije i signalizacije kalcijevih kanala što se također odražava na smanjenje kontraktilnosti. Al-Qahtani i suradnici proveli su studiju u kojoj kao zaključak ističu smanjenu amplitudu i učestalost kontrakcije (12). Smanjenjem funkcije ili ekspresije kalcijevih kanala dolazi do smanjenja struje  $Ca^{2+}$  te sukladno tom smanjenja intracelularnog kalcija koji je neophodan za uspješnu kontraktilnost maternice (8). S druge strane, Smith i suradnici proveli su istraživanje o utjecaju kolesterola na miometrij maternice te ustanovili kako povišene razine kolesterola smanjuju snagu kontrakcije djelujući na ekspresiju kalcijevih kanala. Afinitet vezanja oksitocina za njegov receptor ovisi o količini membranskog kolesterola te zbog toga pretilje smanjeno reagiraju na stimulaciju oksitocinom (13). Kolesterol je fiziološki povišen u trudnoći i kao takav utječe na razvoj fetusa. Smatra se i da kolesterol pomaže u održavanju „mirovanja“ maternice tijekom trudnoće. Ipak, kod pretilih roditelja kolesterol je znatno povišen te sposobnost kontrakcije maternice tijekom poroda može biti ugrožena.

## 2. HIPOTEZA

Izlaganje hrani bogatoj mastima i šećerima prije i tijekom trudnoće smanjuje se sposobnost nakupljanja glikogena u mišiću maternice Spraguey-Dawley štakorica.

#### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Histokemijskom metodom bojanja perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) obojati tkiva maternice ženki Sprague–Dawley štakora hranjenih hranom bogatom mastima i šećerima i standardnom hranom te kvantificirati i usporediti sadržaj postpartalnog glikogena u miometriju tih dviju skupina.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.3. 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 na dan 15. kolovoza 2016., br. IV./3071/2016 i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek 17. srpnja 2023., klasa: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-130.

U istraživanje je uključeno deset ženki Sprague-Dawley štakora koje su podijeljene u dvije skupine s po 5 životinja. Kontrolnu skupinu činile su Sprague-Dawley ženke hranjene standardnom hranom (SD), a eksperimentalnu skupinu činile su ženke hranjene hranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) od 3. tjedna života. Nakon šest tjedana hranjenja obje skupine su parene te su 22. dana nakon utvrđene trudnoće žrtvovane. Nakon toga prikupljeno je tkivo maternice u svrhu istraživanja. Tkivo je prema protokolu fiksirano u formalinu te uklopljeno u parafin.

#### 4.3. Metode

##### 4.3.1. Priprema tkiva

Za proučavanje mikroskopske građe, uzorak je prethodno pripremljen kako slijedi: tkivo maternice najprije je fiksirano u 4 %-tnoj puferiranoj otopini formaldehida, kako bi se održala struktura same maternice. Slijedilo je uklapanje u parafinske blokove. Izrađeni parafinski blokovi zatim su se rezali pomoću rotacijskog mikrotoma (Slee, CUT 4060, Nieder-Olm, Njemačka) na rezove debljine 5 µm. Dobiveni rezovi smješteni su na predmetno staklo. Slijedio je postupak deparafinizacije nakon čega se vršilo histološko bojanje.



#### 4.3.2. Bojanje perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS)

Za dokaz glikogena koristilo se histokemijsko bojanje perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS). Navedeno bojanje se najčešće koristi za prikaz struktura za koje se želi vidjeti udio glikogena i ostalih polisaharida, te spojeva kao što su glikoproteini. Polisaharidi se dokazuju na način da reagiraju s perjodnom kiselinom, reakcijom oksidacije, te se time oslobađaju aldehidne skupine. Zatim se prikazuju bojanjem fuksin-sumpornom kiselinom, tzv. Schiffovim reagensom. Fuksin-sumporna kiselina se kemijskim djelovanjem slobodnih aldehida mijenja iz bezbojnog u obojeni oblik. PAS reakcija očituje se u obliku crveno – ružičaste do boje ciklame u obliku zrnaca u citoplazmi stanice ili u obliku difuznog crveno – ružičastog obojenja citoplazme. Prethodno je pripremljen Schiffov reagens. Odvagani 1 g pararozanilin fuksin i 1,9 g natrijev metabisulfit otopljeni su u 100 ml 0,15 M klorovodične kiseline (HCl). Kiselinu je bilo potrebno prethodno pripremiti (12 ml koncentrirane HCl dodano je u 1000 ml destilirane vode). Nakon toga dodan je svježi aktivni ugljen u količini 500 mg. Tako pripremljena otopina čuvala se u tamnoj boci zaštićenoj od svjetlosti. Nakon toga slijedio je postupak obrade rezova tkiva maternice. Rezovi tkiva na stakalcu morali su se deparafinizirati uporabom ksilola, dva puta po 5 minuta, te je zatim slijedila rehidracija tkiva prolaskom kroz alkoholne kupke sa silaznim koncentracijama alkohola. To je postupak u kojem se tkivo prvo uranjalo u 100 %-tni etanol dva puta po 5 minuta, zatim u 96 %-tni etanol, 70 %-tni etanol te destiliranu vodu po 5 minuta. Oksidacija se vršila 1 %-tnom perjodnom kiselinom 10 minuta. Nakon toga slijedio je tretman Schiffovim reagensom 10 minuta. Tijekom postupka primijenjeno je bojanje Mayerovim hematoksilinom 3 minute kako bi se jezgre obojale plavom do ljubičastom bojom. U daljnjem postupku slijedila je dehidracija etanolom s uzlaznim koncentracijama (70 – 100 %), čišćenje destiliranom vodom nakon čega je slijedilo sušenje. Za kraj, kao postupak izrade trajnih preparata, preparati su prekriveni kanada balzomom i pokrovnim stakalcem.

### 4.3.3. Mikroskopiranje i kvantifikacija

Preparati su mikroskopirani svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Njemačka). Slike tkiva uslikane su digitalnim fotoaparatom Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) spojenim na mikroskop pod ukupnim povećanjem 50×. Dobivene fotografije su se koristile za analizu. Kvantifikacija je provedena u računalnom programu ImageJ 1.53 k (14) prema sljedećemo protokolu:

- 1) *Image > Type > 8-bit*
- 2) *Image > Adjust > Brightness/contrast > Auto*
- 3) *Analyze > Set Measurements*
- 4) *Edit > Selection > Specify* (uzeta su tri kvadrata veličine 230x230 piksela za analizu unutarnjeg i vanjskog sloja miometrija)
- 5) *Analyze > Measure > Mean*

Dobivena srednja vrijednost intenziteta sive boje u odabranoj površini (engl. *mean*) podudarala se s intenzitetom obojenja glikogena te je iskorištena za statističku obradu.

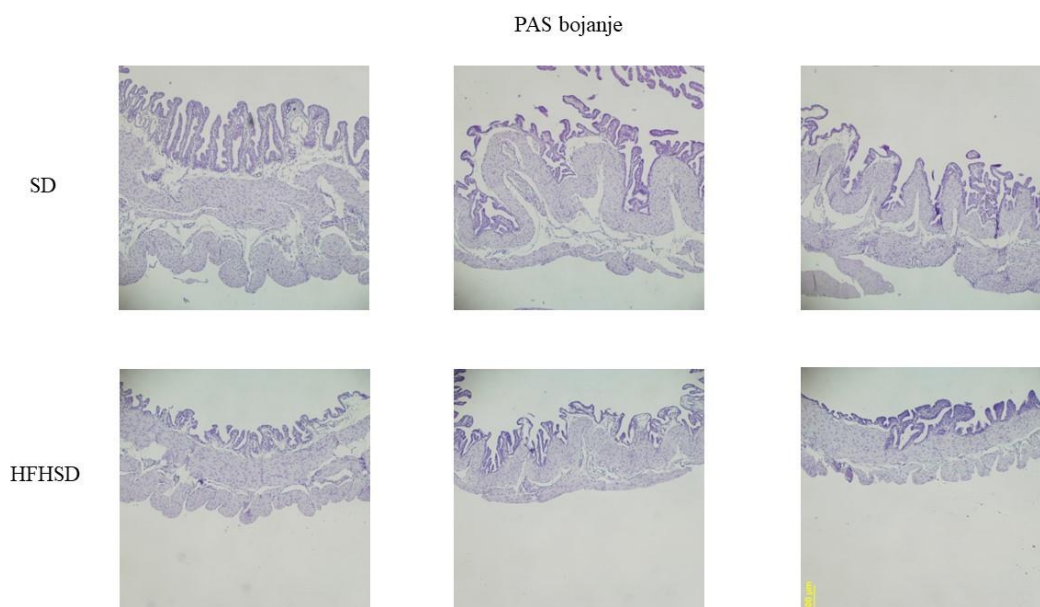
### 4.4. Statistička obrada podataka

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 postavljena je 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. Histokemijska analiza glikogena PAS metodom

Histološkim bojanjem tkiva PAS metodom utvrđena je prisutnost glikogena u endometriju i miometriju maternica Sprague-Dawley štakorica SD i HFHSD skupine. Pri pregledu preparata jasno su se mogli uočiti zasebni unutrašnji i vanjski sloj miometrija u kojima je provedena analiza količine glikogena. Kod štakorica hranjenih standardnom hranom, možemo primijetiti glikogenske granule obojene karakteristično ljubičastom bojom. Naime, na istoj fotografiji možemo uočiti primjer maternice štakorica hranjenih prehranom bogatom mastima i šećerima u kojoj primjećujemo oskudnije slojeve maternice, iako možemo primjetiti rezerve glikogena (slika 3).



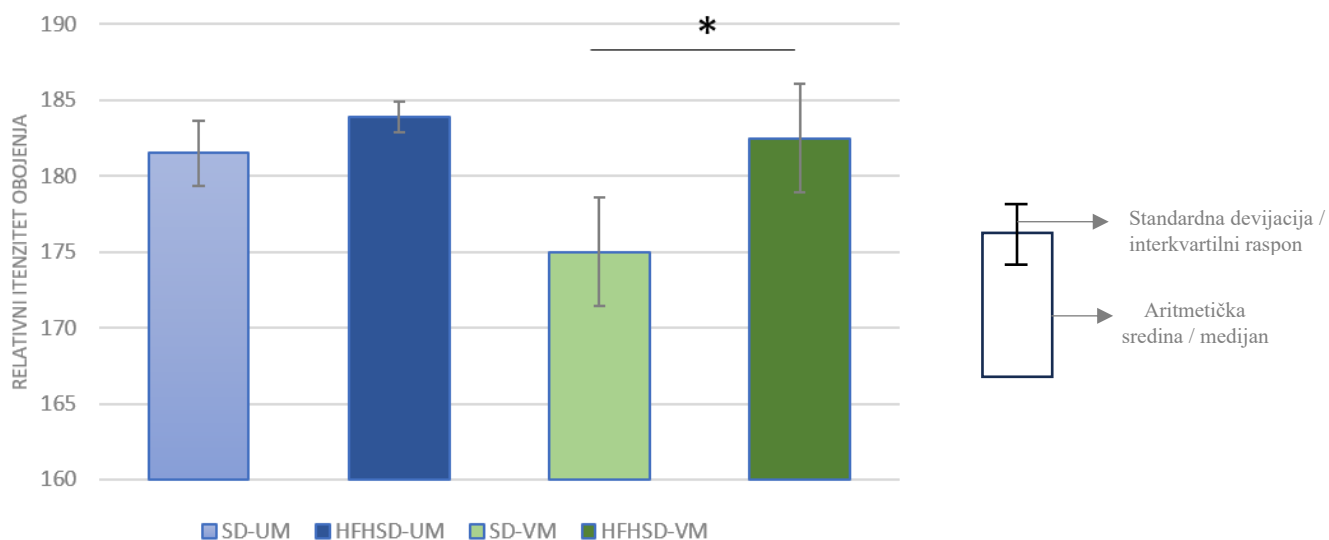
Slika 3. Tkivo maternice obojeno perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) u svrhu usporedbe količine glikogena u miometriju Sprague-Dawley štakorica na standardnoj (SD) ili prehrani bogatoj mastima i šećerima (HFHSD). Kod tkiva maternice HFHSD skupine primjećuju se nešto oskudniji slojevi za razliku od tkiva maternice SD skupine. Svaka skupina je prikazana u triplikatu kako bi se ilustrirala varijabilnost unutar skupine. Ukupno povećanje  $50\times$ . Autor fotografije: Klara Balog.

## 5.2. Analiza intenziteta obojenja u tkivu miometrija SD i HFHSD skupina

Razina glikogena ispitivana je u miometriju maternice, uključujući unutarnji i vanjski sloj miometrija. Svrha je ustanoviti povezanost između nakupljanja glikogena i različitog tipa prehrane: standardne (SD) i prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD).

Prva usporedba temelji se na podacima dobivenim analizom razine glikogena u unutarnjem sloju miometrija štakorica SD i HFHSD skupine. Podatci obje skupine slijedili su normalnu distribuciju (Shapiro-Wilkov test, SD:  $p = 0,416$ , HFHSD:  $p = 0,796$ ). Dodatno je rađen studentov t test i dobivena  $p$  vrijednost iznosila je 0,052. Navedeni statistički podatci ukazuju da nema statistički značajne razlike u razini glikogena u unutarnjem sloju miometrija između SD i HFHSD skupina. Iako, može se reći da rezultat ima graničnu vrijednost (slika 4).

Druga usporedba temelji se na podacima dobivenim analizom razine glikogena u vanjskom sloju miometrija štakorica SD i HFHSD skupine. Podatci ove dvije skupine nisu slijedili normalnu distribuciju (Shapiro-Wilkov test, SD:  $p = 0,035$ , HFHSD:  $p = 0,21$ ). Skupine su dalje uspoređene Mann Whitney testom i dobivena je vrijednost  $p = 0,016$ . Navedeni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku u razini glikogena u vanjskom sloju miometrija između pripadnica SD i HFHSD skupine (slika 4).



Slika 4: Grafički prikaz relativnog intenziteta obojenja mišića maternice PAS metodom. Relativni intenzitet obojenja izražen je u obliku srednje vrijednosti sive boje (engl. *mean gray value*), koja predstavlja zbroj vrijednosti svih piksela podijeljen s ukupnim brojem piksela u području od interesa (vrijednost u rasponu od 0 do 255). Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu, u slučaju unutarnjeg sloja miometrija, ili medijan u slučaju vanjskog sloja miometrija. Okomite crte s graničnicima predstavljaju standardnu devijaciju, u slučaju unutarnjeg sloja miometrija, te granice interkvartilnog raspona u slučaju vanjskog sloja miometrija, kao mjeru odstupanja od srednje vrijednosti. Obojenje je proporcionalno razini nakupljanja glikogena u unutarnjem i vanjskom sloju miometrija štakorica hranjenih standardnom prehranom (SD) i prehranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). U unutarnjem sloju miometrija između SD i HFHSD skupine utvrđena je granična vrijednost značajnosti ( $p = 0,052$ ). Vanjski sloj miometrija HFHSD skupine ima statistički značajno povećan intenzitet bojenja u odnosu na SD skupinu ( $p = 0,016$ ). (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ). UM, unutarnji sloj miometrija; VM, vanjski sloj miometrija.

## 6. RASPRAVA

Svrha našeg istraživanja bila je utvrditi dolazi li do smanjivanja zaliha glikogena kod štakorica hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD). Blagi porast glikogena uočava se u vanjskom sloju miometrija što ne ide u prilog našoj hipotezi da je pad glikogena kod DM2 razlog oslabljenih kontrakcija i otežanog poroda. Našu pretpostavku kako je glikogen važan oblik energije tijekom poroda potvrđuje istraživanje Chew i Rinard (1979.) koji su dokazali veliki porast glikogena u miometriju gravidnih štakorica prije poroda, te pad glikogena odmah nakon poroda. Izvijestili su o povećanim zalihama glikogena kod štakorica od 18. do 22. dana trudnoće. Neposredno prije poroda koncentracije glikogena bile su dva puta veće u odnosu na koncentracije uočene u proestrusu (15). U ispitivanih štakorica, sekrecija progesterona počinje opadati oko 15. dana trudnoće, dok je estrogen nešto niži do 18. dana te nakon toga brzo raste do 22. dana trudnoće. Neposredno prije poroda dolazi do pojačanog lučenja estrogena te sukladno tome i povećanim nakupljanjem glikogena. Navedene činjenice sugeriraju da se glikogen intenzivno troši tijekom poroda te služi kao izvor energije za održavanje kontrakcije tijekom poroda. U pozadini povišenih rezervi glikogena stoji estrogen. Naime, estrogen kod štakorica počinje rasti od 18.-22. dana trudnoće sve do poroda, a poseban rast bilježi se pred porod što je proporcionalno sadržaju glikogena. Relaksin, hormon koji se otpušta neposredno prije poroda, a luči ga žuto tijelo i posteljica, djeluje na relaksaciju mišića maternice, mišića zdjelice, te sarkoilijakalnih zglobova, te na taj način olakšava prolaz ploda kroz porođajni kanal. Uz sve navedeno, utječe na pojačano nakupljanje glikogena što su uočili Kroc i suradnici 1959. godine (16). Nakon poroda zalihe glikogena su iscrpljene te padaju na vrijednosti približno jednake koncentracijama uočenim 20. dana trudnoće. Naime, tijekom poroda kada dolazi do jakih kontrakcija maternice, sukladno tome dolazi i do smanjenog protoka krvi u maternicu. Tada rezerve glikogena predstavljaju izrazitu važnost u održavanju kontraktilnosti maternice tijekom poroda. Sve navedeno ide u prilog činjenici da zalihe glikogena služe kao važan izvor energije za maternicu tijekom poroda. Zanimljiva je dokazana činjenica koju su ustanovili Hautakangas i suradnici (2022.) kako su kontrakcije pretilih roditelja jednako jake kao i kontrakcije mršavih roditelja, iako je poznato da pretila roditelja često imaju indikaciju za carski rez. Razlozi se prepisuju svojstvu cervikalnog kanala i njegove sposobnosti širenja. Naime, cervikalni kanal biva nepopustljiv i čvrst te napetost stijenke maternice raste čime raste i intrauterini tlak. Pretila roditelja kao komplikaciju poroda mogu imati nemogućnost izvođenja

porođaja vaginalnim putem i dolaženja do stadija aktivnog poroda (17). Proučavanje nakupljanja glikogena u maternici najviše je bilo usmjereno na proučavanje djelovanja spolnih hormona. Smatralo se da estrogen kod pojedinih vrsta, kao što su štakori, utječe na pojačano nakupljanje glikogena u svim slojevima maternice, dok kod ljudi nakupljanje uzrokuje progesteron (5). Ustanovljeno je kako hormoni hipofize i kore nadbubrežne žlijezde nemaju učinak na pojačano odlaganje glikogena u maternici. Učinak prekomjerne prehrane na skladištenje glukoze u obliku glikogena proučavali su Mott i suradnici (1986.). Ispitanice su na dva tjedna izložili prekomjernoj prehrani uz 65% veći unos kalorija od normalnog unosa. Rezultati su pokazali kako kratkotrajno izlaganje prekomjernoj prehrani uzrokuje smanjenje djelovanja inzulina na skladištenje i odlaganje glukoze. U uvodu je objašnjeno kako inzulin djeluje na pojačano nakupljanje glikogena. Navedeno smanjenje skladištenja glikogena koreliralo je s visokim koncentracijama inzulina u krvi. Zabilježena je i smanjena aktivnost glikogen sintetaze koja je pridonijela učinku prekomjerne prehrane na skladištenje glukoze (18). Bo i Atkinson (1962.) provedeli su istraživanje na jedinkama štakora kastrata tretiranih hormonima jajnika. Oni su opazili granule glikogena u oba mišićna sloja maternice, iako je puno veće nakupljanje glikogena zapaženo u vanjskom (uzdužnom) mišićnom sloju (19). Istraživanje se podudara s našim rezultatima i opažanjem statistički značajnog povećanja glikogena u vanjskom sloju miometrija. Godinu kasnije proveli su istraživanje koje se temelji na analizi zaliha glikogena u maternici štakorica koje su povrgnute režimu izgladnjivanja. Poznato je kako metabolizam ugljikohidrata reguliraju gušterača, prednji režanj hipofize i kora nadbubrežne žlijezde. Istraživanjem se dokazalo kako kod hipofizektomiranih i adenektomiranih štakorica, pod utjecajem estrogena, dolazi do sinteze i nakupljanja glikogena u tkivu maternice. Djelovanje estrogena na maternicu neovisno je o endokrinim hormonima navedenih organa, ali može se reći da je analogno ulozi koju igraju hormoni potonjih organa u nakupljanju glikogena u jetri i skeletnim mišićima. Cilj je bio utvrditi može li estrogen inducirati glikogenezu i nakon iscrpljivanja rezervi glikogena. Došlo se do zaključka kako se zalihe glikogena smanjuju u jetri i skeletnim mišićima tijekom gladovanja, ali u miometriju maternice pod stimulacijom velikih količina estrogena ne dolazi do smanjenja zaliha glikogena (20). Trudnoća je stanje u kojem dolazi do velikog porasta hormona estrogena i progesterona. Zaključno tome, estrogen stimulira nakupljanje glikogena u količinama koje se mogu usporediti s zalihama glikogena u dobro uhranjenih životinja. Sadržaj glikogena u miometriju štakora varira sa stanjem kontraktilnosti. He i Kelley (2004.) zabilježili su smanjenje mišićnog glikogena za približno 20 % u DM2 ispitanika u usporedbi s mršavim nedijabetičarima. Rezultati su korelirali s hiperglikemijom natašte. Iako je došlo do smanjenja

zaliha glikogena za 20 %, ovi rezultati ne pokazuju statistički značajno smanjenje uz činjenicu da je istaknut nedostatak u aktivnosti GS (21). U svojem istraživanju napominju kako je moguće da uopće ne dođe do značajnog smanjenja zaliha glikogena u miometriju kod ispitanika s dijabetesom. S druge strane, postoje istraživanja (22, 23) koja su zabilježila povišene razine glikogena u masnom tkivu i tkivu bubrega kod osoba oboljelih od DM2. Iako, isto tako ističu kako za jetru i skeletne mišiće nisu karakteristične visoke razine glikogena kod DM2 (23). Meza i suradnici (2017.) proveli su istraživanje u kojem su skupinu ispitanika hranili „zapadnjačkom“ prehranom s visokim udjelom masti tijekom 9 tjedana, te ih nakon toga još 6 tjedana nastavili hraniti „zapadnjačkom“ prehranom ili standardnom prehranom. Zabilježeno je smanjenje razine glikogena u skeletnim mišićima kod ispitanika hranjenih prehranom s visokim udjelom masti. Napominju kako je 9 tjedana prehrane bogate mastima bilo dovoljno kako bi se kod ispitanika stvorila inzulinska rezistencija. (24). Štakorice u našem istraživanju su također hranjene 9 tjedana. Točnije, hranjeni su 6 tjedana te tijekom trudnoće koja je trajala 22 dana. No, kod naših ispitanika HFHSD skupine nije došlo do smanjenih zaliha glikogena. Iz razloga što ovo je istraživanje provedeno na skeletnim mišićima, ova činjenica nas može navesti na razmišljanje kako prehrana nije jedini aspekti koji utječe na zalihe glikogena već bi potencijalno objašnjenje moglo biti da glatki mišići u trudnoći, a možda i bez trudnoće, drugačije troši glikogen od skeletnih mišića. Još 1963. Bueding i suradnici su otkrili da se fosforilaza razlikuje u skeletnom i glatkom mišiću, te da je aktivnost fosforilaze 10 puta veća od aktivnosti fosforilaze u glatkim mišićima (25). Kontrakcija glatkih mišića prvenstveno je regulirana reverzibilnom fosforilacijom miozina koja je potaknuta povećanjem slobodnog  $Ca^{2+}$  u sarkoplazmi. Kontrakcije glatkih mišića regulirane su i drugim mehanizmima, a jedan od njih je i regulacija kalponinom, proteinom koji se za aktin veže velikim afinitetom. On omogućuje očuvanje energije kod produljene kontrakcije (26). Zaključno tome, glatki mišići iako imaju manji energetske skup adenzin trifosfata i kreatin fosfata u odnosu na skeletne mišiće, zbog smanjene aktivnosti fosforilaze ne dolazi do brzog trošenja glikogena kao što je slučaj kod skeletnih mišića. Navedeno ide u prilog očuvanju zaliha glikogena u vanjskom sloju miometrija.

Razlika u količini glikogena između ispitivanih skupina nije velika, ali je ipak statistički značajna, a tome u prilog idu prethodna istraživanja koja su ustanovila da maternica trudnih jedinki ima mehanizam čuvanja zalihe glikogena koji nije ovisan o režimu prehrane. Razlog može biti u činjenici da je estrogen učinkovit stimulans glikogeneze čak i kada su iscrpljene rezerve glikogena. Kao drugo moguće objašnjenje navodi se početna hiperinzulinemija koja



korelira s povišenim razinama glukoze unesenih hranom, a kao rezultat dobijemo povišene razine glikogena koje su nešto više izražene u vanjskom sloju miometrija. Možemo pretpostaviti da ukoliko bi prehrana s visokim udjelom masti i šećera potrajala dulje, tek tada bi došlo bi do potpune inzulinske rezistencije i smanjenja razine glikogena. U svakom slučaju, za potvrdu inzulinske rezistencije maternice nije dovoljna kvantifikacija glikogena već se istraživanje mora upotpuniti ispitivanjem aktivacije signalnog puta nakon stimulacije inzulinom ili faktorom rasta 1 sličnog inzulinu.

## 7. ZAKLJUČAK

Histokemijskom metodom bojanja perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom vizualizirane su granule glikogena u vanjskom i unutarnjem sloju miometrija ženki štakora hranjenih standardnom prehranom i onih koji su hranjeni prehranom bogatom mastima i šećerima te je utvrđena značajna razlika među skupinama u vanjskom sloju miometrija: skupina životinja hranjenih hranom bogatom mastima i šećerima ima povećane zalihe glikogena u odnosu na skupinu hranjenu standardnom prehranom.

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi:** Ciljevi ovog istraživanja bili su histokemijskom metodom bojanja perijodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) obojati tkiva maternice štakorica hranjenih hranom bogatom mastima i šećerima (HFHSD) te standardnom hranom (SD) te kvantificirati i usporediti sadržaj postpartalnog glikogena u miometriju obje skupine ženki Sprague-Dawley štakora.

**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*“. Deset ženki Sprague-Dawley štakora podjeljene su u dvije skupine. Kontrolnu skupinu činile su SD Sprague-Dawley ženke, a eksperimentalnu skupinu HFHSD ženke koje su ovu prehranu dobivale od 3. tjedna života. Prisutnost glikogenskih granula analizirana je PAS bojenjem. Tkivo maternice najprije je fiksirano u 4 %-tnoj puferiranoj otopini formaldehida, nakon čega je slijedilo uklapanje u parafinske blokove. Dobiveni rezovi debljine 5  $\mu\text{m}$ , nakon deparafinizacije, obojeni su PAS metodom. Slijedila je analiza fotografija i usporedba statističkih rezultata.

**Rezultati:** U vanjskom sloju miometrija između SD i HFHSD skupina utvrđena je statistički značajna razlika u razinama glikogena ( $p = 0,016$ ), za razliku od unutarnjeg sloja miometrija gdje je utvrđena granična vrijednost.

**Zaključak:** Povišene razine glikogena u vanjskom miometriju kod pripadnica HFHSD skupine u usporedbi s pripadnicama SD skupine pokazuju da je ovaj sloj maternice osjetljiviji na režim prehrane od unutrašnjeg sloja.

**Ključne riječi:** glikogen, maternica, miometrij, gestacijski dijabetes

## 9. SUMMARY

### **Postpartum glycogen content in the myometrium of female Sprague-Dawley rats fed a diet rich in fats and sugars**

**Objectives:** The objectives of this research were to use the histochemical method of periodic acid Schiff staining (PAS) to stain the uterine tissues of rats fed a high-fat and high-sugar diet (HFHSD) and a standard diet (SD), and to quantify and compare the content of postpartum glycogen in the myometrium of both groups of Sprague- Dawley rats.

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

**Materials and methods:** The study was made on the archive of maternal 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". Ten female Sprague-Dawley rats were divided into two groups. The control group consisted of SD Sprague-Dawley women, and the experimental group consisted of HFHSD women who received this diet from the 3rd week of life. The presence of glycogen granules was analyzed by PAS staining. The maternity tissue was first fixed in a 4% buffered formaldehyde solution, followed by embedding in paraffin blocks. The 5 µm thick sections obtained, after deparaffinization, were stained with the PAS method. This was followed by photo analysis and comparison of statistical results.

**Results:** In the outer layer of the myometrium between the SD and HFHSD groups, a statistically significant difference in glycogen levels was found ( $p = 0.016$ ), in contrast to the inner layer of the myometrium, where the limit value was determined.

**Conclusion:** Increased levels of glycogen in the outer myometrium in the HFHSD group compared to the SD group show that this layer of the uterus is more sensitive to the diet than the inner layer.

**Key words:** glycogen, uterus, myometrium, gestational diabetes

**10. LITERATURA**

1. Dean M. Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biol Reprod.* 2019 Aug 1;101(2):297-305.
2. Shivappa P, Isaacs R, Mandrelle K, & Goyal S. Glycopenic endometrium in infertility. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2022 Aug; 10(8), 1663–1667.
3. Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod.* 1992 Feb;46(2):208-19.
4. Flannery CA, Choe GH, Cooke KM, Fleming AG, Radford CC, Kodaman PH, i sur., Insulin Regulates Glycogen Synthesis in Human Endometrial Glands Through Increased GYS2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Aug 1;103(8):2843-2850.
5. Hodonu A, Escobar M, Beach L, Hunt J, Rose J. Glycogen metabolism in mink uterine epithelial cells and its regulation by estradiol, progesterone and insulin. *Theriogenology.* 2019 May;130:62-70.
6. Frolova AI, O'Neill K, Moley KH. Dehydroepiandrosterone inhibits glucose flux through the pentose phosphate pathway in human and mouse endometrial stromal cells, preventing decidualization and implantation. *Mol Endocrinol.* 2011 Aug;25(8):1444-55.
7. Zuo RJ, Gu XW, Qi QR, Wang TS, Zhao XY, Liu JL, Yang ZM. Warburg-like Glycolysis and Lactate Shuttle in Mouse Decidua during Early Pregnancy. *J Biol Chem.* 2015 Aug 28;290(35):21280-91.
8. Hector N., Aguilar, B.F. Mitchell. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility, *Human Reproduction Update*, November-December 2010, 16 (6), 725–744.
9. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003 Dec;27(1-4):201-6.
10. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Odjel za koordinaciju i provođenje programa i projekata za prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti, Dijabetes (2022.), (mrežne stranice) (citirano dana 1.srpnja 2023.) Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-koordinaciju-i-provodenje-programa-i-projekata-za-prevenciju-kronicnih-nezaraznih-bolest/dijabetes/>

11. 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* 1 July 2007; 30 (2): 112–119
12. Al-Qahtani S, Heath A, Quenby S, Dawood F, Floyd R, Burdyga T, Wray S. Diabetes is associated with impairment of uterine contractility and high Caesarean section rate. *Diabetologia*. 2012 Feb;55(2):489-98.
13. Smith RD, Babychuk EB, Noble K, Draeger A, Wray S. Increased cholesterol decreases uterine activity: functional effects of cholesterol alteration in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 May;288(5):C982-8.
14. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
15. Chew CS, Rinard GA. Glycogen levels in the rat myometrium at the end of pregnancy and immediately postpartum. *Biol Reprod*. 1979 Jun;20(5):1111-4.
16. Kroc RL, Steinetz BG, Beach VL. The effects of estrogens, progestagens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. *Ann N Y Acad Sci*. 1959 Jan 9;75:942-80.
17. 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 Sep;129(10):1790-1797.
18. Mott DM, Lillioja S, Bogardus C. Overnutrition induced decrease in insulin action for glucose storage: in vivo and in vitro in man. *Metabolism*. 1986 Feb;35(2):160-5.
19. Bo WJ, Atkinson WB. Histochemical studies on glycogen deposition in the uterus of the rat. I. In intact cyclic animals and in castrates treated with ovarian hormones. *Anat Rec*. 1952 May;113(1):91-9.
20. Bo WJ, Atkinson WB. Histochemical studies on glycogen deposition in uterus of the rat. III. Effect of starvation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953 Jun;83(2):405-7.
21. He J, Kelley DE. Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Nov;287(5):E1002-7.
22. Ceperuelo-Mallafré V, Ejarque M, Serena C, Duran X, Montori-Grau M, Rodríguez MA, i sur., Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. *Mol Metab*. 2015 Oct 16;5(1):5-18.
23. Sullivan MA, Forbes JM. Glucose and glycogen in the diabetic kidney: Heroes or villains? *EBioMedicine*. 2019 Sep;47:590-597.
24. Meza CA, Montenegro C., Pena CD, O'Keefe L, Naughton SS, Simcocks AC, i sur. High Fat Diet Induced Obesity Impairs Skeletal Muscle Glycogen and Lipid Preservation After

Adiponectin Incubation, 2017. International Journal of Exercise Science: Conference Proceedings. 2 (9), članak 28.

25. Bueding E, Kent N, Fisher J. Tissue specificity of glycogen phosphorylase B of intestinal smooth muscle. J Biol Chem. 1964 Jul;239:2099-101.
26. Winder SJ, Allen BG, Clément-Chomienne O, Walsh MP. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. Acta Physiol Scand. 1998 Dec;164(4):415-26.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Klara Balog**

**Datum i mjesto rođenja:** 26. rujna 2001., Osijek

**e-pošta:** [klara.balog3@gmail.com](mailto:klara.balog3@gmail.com)

**Adresa stanovanja:** Kneza Branimira 6, 31300, Branjin Vrh

**Obrazovanje:**

- rujna 2016. – lipanj 2020.: Medicinska škola Osijek, smjer: farmaceutski tehničar
- rujna 2020. – rujna 2023.: Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek