

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana B. Mičić

DOPRINOS POVEĆANOG KALORIJSKOG
UNOSA U RANOM POSTNATALNOM PERIODU
RAZVOJU METABOLIČKIH POREMEĆAJA U
ANIMALNOM MODELU SINDROMA
POLICISTIČNIH JAJNIKA

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana B. Mićić

CONTRIBUTION OF EARLY POSTNATAL
OVERFEEDING TO METABOLIC DISORDERS
IN ANIMAL MODEL OF POLYCYSTIC OVARY
SYNDROME

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Danijela Vojnović Milutinović, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Tanja Jevđović, docent

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr Jelena Đorđević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Đuro Macut, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Nataša Veličković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

ZAHVALNICA

Na kraju vijugavog puta, sa puno raskršća i skretanja od kojih danas ni jedno ne smatram pogrešnim, vreme je i mesto da se osvrnem i izrazim zahvalnost svojim saputnicima:

Srećna sam što je slučaj hteo da moj mentor bude baš dr Danijela Vojnović Milutinović! Zahvalna sam joj što mi je poklonila bezuslovno poverenje čim sam se pridružila Odeljenju za biohemiju i nadam se da to poverenje nisam ni u jednom trenutku izneverila. Uz nepogrešivo navigiranje kroz dosadašnji istraživački rad i sve čemu me je naučila u profesionalnom smislu kao akademski mentor, Daca je u međuvremenu postala i moj prijatelj, svojevrсни životni mentor i uzor kako se treba vladati u komplikovanom svetu i društvu poljuljanih vrednosti.

Doc. dr Tanji Jevđović sam zahvalna na strpljenju i razumevanju sa kojima me je vodila kroz formalni deo puta do sticanja doktorata i na nesebičnom i posvećenom mentorskom pristupu kroz koji me je naučila mnogim korisnim stvarima, a moju tezu učinila kompletnijom i kvalitetnijom.

Profesorima Jeleni Đorđević i Đuru Macutu se zahvaljujem na vremenu i pažnji koju su posvetili doterivanju teksta ove disertacije i na svemu korisnom što sam naučila na osnovu njihovih sugestija tom prilikom.

Dr Nataši Veličković nisam zahvalna samo na tome što je kao član komisije među prvima pročitala ovu tezu i dala joj svoj čuveni *magic touch*, već i na svemu što sam od nje za ovih nekoliko godina naučila, na smeđu, motivaciji i što za svaki fiziološki fenomen uvek nalazi objašnjenje, a za svaku životnu situaciju prigodan vic!

Dr Ani Đorđević sam pre svega zahvalna što mi je ukazala poverenje i pozvala me da se pridružim njenoj istraživačkoj grupi koja svoj rad zasniva na dobrim praksama profesorke Goce Matić, koja mi je kao mladoj studentkinji bila jedan od profesionalnih uzora. Ančina vedrina, kreativnost, konstruktivan i podržavajući pristup značajan su izvor inspiracije i motivacije za svaki radni dan, a za to što je i mimo profesionalne dužnosti odvojila vreme da pročita ovu tezu i obogati je svojim sugestijama sam joj posebno zahvalna.

Dr Ani Teofilović i dr Marini Radovanović, koje su mi, po zaposlenju na IBISS-u, kolegijalno i domaćinski olakšale period adaptacije, zahvaljujem se što su u međuvremenu postale mnogo više od koleginica, sa kojima mi razgovori čine lepšim, lakšim i ispunjenijim ne samo posao, nego i život! Hvala za sve korisne savete, dragocene reči podrške, kafe i slatke i slane zanimacije koje smo podelile!

Dr Jeleni Brkljačić sam zahvalna što je uz Natašu moj „*Google* umesto *Google-a*“, a dr Biljani Burać na tome što je, iako više opravdano odsutna nego prisutna, u svojim protokolima već imala rešenja za neke od mojih eksperimentalnih problema koja mi je nesebično ustupila. Dr Sanji Kovačević hvala na suptilnim savetima koji su mi pomogli u trenucima važnijih dilema, dr Ljupki Gligorovskoj na britkim šalama i zaraznom smeđu, dr Mirni Jovanović na vedrini i podršci, a našem kolegi Milošu Vratariću na *skandalozno* dobroj radnoj atmosferi u laboratoriji i što me je skoro uvek puštao da biram muziku. Kolegicama dr Đurđici Ignjatović i dr Gordani Tovilović Kovačević hvala na kolegijalnosti i lepoj radnoj atmosferi.

Kolegama sa Odeljenja za citologiju, dr Nataši Nestorović, dr Nataši Ristić i dr Marku Mileru kao i kolegicama sa Odeljenja za evolucionu biologiju dr Sanji Manitašević Jovanović i Katarini

Hočevar hvala na znanju koje su podelili sa mnom i pomoći koju su mi pružili u eksperimentalnom radu.

IBISS ReFocuS timu (u najširem sastavu) hvala za sve što smo zajedno prošli za ove četiri godine avanture zvane Noć istraživača. Zadovoljstvo je sa vama pomerati lične granice, proširivati zonu komfora i ukrštati nauku i zabavu!

Kako je moj istraživački rad započeo u današnjim laboratorijama LECOTOX i ENDOS na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, zahvaljujem se i svim kolegama sa kojima sam imala priliku da radim, a posebno profesorkama Ivani Teodorović i Sonji Kaišarević na znanju i prilikama koje su uložile u moj profesionalni razvoj, kao i dr Bojani Stanić na svemu čemu me je naučila.

Dolazim do Petnice, mesta na kome sam provela svoje formativne godine u ličnom i profesionalnom razvoju i preplavljaju me emocije i lepa sećanja. Kada bih se zahvalila za svako od njih, zahvalnica bi bila duža od doktorata, a to ne bi bilo primereno. Zato, reći ću samo jedno zajedničko, ogromno: HVALA!!! U to „HVALA!“ ugrađujem svu zahvalnost, ponos i ljubav koju osećam za svoje polaznike - biologe i LNS-ovce i za saradnike i drugare – pre svih, biologe, ali i astronome, psihologe, hemičare i sve druge. Hvala za sve radne i životne, slatke i one manje slatke muke koje smo podelili, hvala što ste mi bili motivacija i inspiracija, hvala što sam u mnogima od vas imala i još uvek imam uzore, hvala što mnoge od vas danas zovem prijateljima. Pored zahvalnosti, ovde izražavam i nadu da sam svojim polaznicima i mlađim saradnicima uspela da pružim makar deo one podrške, oslonca, motivacije i znanja koje sam ja dobila od svojih „starijih“...

Ako čovek zaista vredi onoliko koliko ima prijatelja, onda bih rekla da se osećam baš dragoceno. Na ovom mestu, nekima od svojih prijatelja ipak moram posebno da se zahvalim. Hvala Jeji, za to što me sve ove godine ličnim primerom uči kako se hrabro i sa osmehom suočavati sa zamislivim i nezamislivim izazovima i što je uvek tu za mene. Hvala Branki, što neretko ima više razumevanja za mene nego ja za samu sebe i što njena pozitivnost može da rastera bilo koje oblake. Hvala Lazi za sve vrhove, figurativne i bukvalne, koje smo zajedno osvojili. Hvala Guru-Mari, na filozofskim sesijama, zagrljajima i podsetnicima da spustim ramena, dišem i smejem se. Hvala Tomici, što smo divnu saradnju pretvorili u još lepše prijateljstvo i Dini, mojoj *lab bestie*, na svim genijalnim improvizacijama koje smo smislile da rešimo ne samo eksperimentalne nego i životne probleme. Hvala Dulu (.png) za sve neprospavane noći iz kojih su se izrodili naši slatki i zanimljivi projektići, a još više za one kada smo uz tamjaniku podešavali „životnu navigaciju“. Iako sam htela da napišem nešto drugo, ovakva zahvalnica zapravo savršeno opisuje moj odnos i sa „drugim Dušanom“, pa i njega podvodim pod istu. Hvala Jeci, Milici i Ani što ne samo da smo sačuvale studentske kontakte, nego smo stvorile prijateljstva koja rastu. Hvala Žiki i Marjanu na divnim petničkim i još lepšim studentskim danima koji su nam poslužili kao baza za drugarstvo kome ne treba viza. Svima koji su se pronašli u ovim redovima, ali i između njih – hvala za sve što smo podelili! Mojoj „valjevskoj mami“, Nati, hvala za divan odnos koji smo razvile uprkos razlici u godinama.

Srećna sam što sam u paketu sa mamom i tatom dobila i ogromne familije. Divno je bilo stasavati i postajati čovek zajedno sa svima njima i uvek s ponosom odgovarati na pitanje „Čija si ti?“. Hvala što delimo i lepo i ružno!

Malo pre kraja, a ipak najvažnije – mami, tati i nani hvala na ljubavi, podršci, vaspitanju i dobrim „fabričkim podešavanjima“. Divno je imati vas kao sigurnu luku, vraćala se u nju kao pobednik, ili u zaklon!

Da sam imala priliku da biram, ne bih izabrala bolji oslonac za ceo život od svog brata Marka. Hvala što si tu, zajedno sa Nevenom, kad god, gde god i zbog čega god da te pozovem!

I na posletku, hvala Peri koji je u moj život uneo nemerljivu količinu strpljenja, razumevanja i ljubavi. Hvala za sve što smo izgradili i još više za ono što verujem da ćemo tek izgraditi!

Put do kraja početka moje karijere je bio dug, pa sam se od nekih saputnika sticajem okolnosti razišla, ali im bez obzira na to dugujem zahvalnost za deo puta koji smo prešli zajedno.

U Beogradu, 1. novembra 2023.

Bojana Mičić

Doprinos povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu razvoju metaboličkih poremećaja u animalnom modelu sindroma policističnih jajnika

SAŽETAK

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) je reproduktivni poremećaj u čijoj osnovi je hiperandrogenemija, ali ga prate i metaboličke komplikacije. PCOS se može javiti u prepubertetskom uzrastu, a povećanje telesne mase tokom ovog uzrasta predisponira za kasniji razvoj sindroma. Kalorijski suficit u perinatalnom periodu, koji se kod glodara postiže manipulacijom veličine legla, utiče na neuroendokrino programiranje, dovodeći do gojenja i ranijeg nastupanja puberteta. Cilj ove disertacije je bio da se na animalnom modelu PCOS ispita doprinos povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu razvoju metaboličkih poremećaja udruženih sa sindromom. Model PCOS je kreiran tretmanom ženki pacova 5 α -dihidrotestosteronom (DHT), a prepubertetska gojaznost postignuta kalorijskim suficitom kroz smanjenje veličine legla. Analizirani su parametri sistemske insulinske osetljivosti i lipidni status, kao i markeri insulinske signalizacije i energetskeg metabolizma na nivou visceralnog (VAT) i subkutanog (SAT) masnog tkiva i skeletnih mišića. DHT tretman u kombinaciji sa povećanim kalorijskim unosom je uslovio sistemsku hiperinsulinemiju i smanjenje insulinske osetljivosti. Uprkos hipertrofiji adipocita, insulinska osetljivost na nivou VAT je očuvana, verovatno usled aktivacije AMPK. Izostanak proliferacije SAT i istovremeno aktivirani lipolitički i lipogeni putevi ukazuju na njegovu disfunkcionalnost. Skeletni mišići u uslovima smanjene osetljivosti na insulin koriste masne kiseline kao energetske supstrat, a aktivacija AMPK doprinosi funkcionalnosti tkiva kroz povećanje stope β -oksidacije. Dobijeni rezultati sugerišu da povećanje telesne mase pre puberteta predisponira razvoj insulinske rezistencije u PCOS, dok je za njeno puno ispoljavanje ključna interakcija sa hiperandrogenemijom.

Ključne reči: sindrom policističnih jajnika, prepubertetska gojaznost, 5 α -dihidrotestosteron, hiperandrogenemija, rani postnatalni povećani kalorijski unos, visceralno masno tkivo, subkutano masno tkivo, skeletni mišići, insulinska rezistencija, hiperinsulinemija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Animalna i humana fiziologija

Contribution of early postnatal overfeeding to metabolic disorders in animal model of polycystic ovary syndrome

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a reproductive disorder based on hyperandrogenemia but also associated with metabolic complications. PCOS can occur in girls before puberty, and the increase in body weight at this age predisposes them to later development of the syndrome. Increased caloric intake in the perinatal period, easily mimicked in rodents by manipulating litter size, affects neuroendocrine programming and leads to hyperphagia and weight gain, as well as earlier onset of puberty. The aim of this doctoral dissertation was to examine the contribution of increased caloric intake in early postnatal period to the development of metabolic disorders associated with the syndrome using an animal model of PCOS. An animal model of PCOS induced by 5 α -dihydrotestosterone was additionally challenged with caloric excess by litter size reduction to induce prepubertal obesity. Parameters of systemic insulin sensitivity and lipid status were analyzed, as were markers of insulin signaling and energy metabolism at the level of visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissue and skeletal muscle. The combination of treatments resulted in systemic hyperinsulinemia and decreased insulin sensitivity. Despite adipocyte hypertrophy, insulin sensitivity is maintained at the VAT level, likely due to activation of AMPK. The absence of SAT proliferation and the concomitantly activated lipolytic and lipogenic metabolic pathways suggest its dysfunction. Skeletal muscles in conditions of reduced sensitivity to insulin use fatty acids as an energy substrate, and activation of AMPK contributes to the functionality of this tissue by increasing the rate of β -oxidation. Our results suggest that weight gain before puberty predisposes to the development of insulin resistance in PCOS, while interaction with hyperandrogenemia is critical for its full manifestation.

Key words: PCOS, prepubertal weight gain, 5 α -dihydrotestosterone, hyperandrogenemia, early postnatal overfeeding, visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, skeletal muscle, insulin resistance, hyperinsulinemia.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Animal and human physiology

SKRAĆENICE

ACC	acetil-CoA karboksilaza (eng. <i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
acetil-CoA	acetil-koenzim A
ACTH	adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AES	Društvo za višak androgena (eng. <i>Androgen Excess Society</i>)
AKT	protein kinaza B (eng. <i>protein kinase B</i>)
AMH	antimilerov hormon (eng. <i>anti-müllerian hormone</i>)
AMPK	kinaza koju aktivira adenzin-monofosfat (eng. <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
ARKO	eliminisan gen za androgeni receptor (eng. <i>androgen receptor knock-out</i>)
ASRM	Američko društvo za reproduktivnu medicinu (eng. <i>American Society for Reproductive Medicine</i>)
ATGL	adipozna lipaza triglicerida (eng. <i>adipose triglyceride lipase</i>)
ATP	adenozin-trifosfat (eng. <i>adenosine tryphosphate</i>)
c-AMP	ciklični adenzin-monofosfat (eng. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CPT1	karnitin palmitoil acil-CoA transferaza 1 (eng. <i>carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1</i>)
DGAT	diacilglicerol-aciltransferaza
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEA-S	dehidroepiandrosteron-sulfat
5 α -DHT	5 α -dihidrotestosteron
ERK	kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ESHRE	Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (eng. <i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i>)
FADH2	redukovani flavin-adenin-dinukleotid

FAS	sintaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid synthase</i>)
FAT/CD36	translokaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid translocase</i>)
FATP	protein koji transportuje masne kiseline (eng. <i>fatty acid transporter protein</i>)
FFA	slobodne masne kiseline (eng. <i>free fatty acids</i>)
FSH	folikulostimulišući hormon
GLUT	glukoзни transporter
GnRH	gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GWAS	studije asocijacije na nivou čitavog genoma (eng. <i>genome-wide association studies</i>)
HPRT	hipoksantin-guanin-fosforibozil-transferaza
HSL	lipaza osetljiva na hormone (eng. <i>hormone sensitive lipase</i>)
IGF1	faktor rasta sličan insulinu 1 (eng. <i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IL6	interleukin 6
ipGTT	intraperitoneumski test opterećenja glukozom (eng. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)
IRS1	supstrat 1 insulinskog receptora (eng. <i>insulin receptor substrate 1</i>)
LH	luteinizirajući hormon
LPL	lipaza lipoproteina (eng. <i>lipoprotein lipase</i>)
MDA	malonil-dialdehid
MGL	lipaza monoacilglicerola (eng. <i>monoacylglycerol lipase</i>)
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NFκB	nuklearni faktor κB (eng. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NIH	Nacionalni institut za zdravlje SAD (eng. <i>National Institute of Health</i>)
PCOS	Sindrom policističnih jajnika (eng. <i>polycystic ovary syndrome</i>)

PEPCK	fosfoenolpiruvat-karboksikinaza (eng. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
PGC1 α	koaktivator 1 α receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a</i>)
PKA	protein kinaza A (eng. <i>protein kinase A</i>)
PPAR	receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
SAT	subkutano masno tkivo (eng. <i>subcutaneous adipose tissue</i>)
SCD1	steroil-CoA desaturaza 1 (eng. <i>stearoyl-CoA desaturase 1</i>)
SHBG	globulin koji vezuje polne hormone (eng. <i>sex hormone-binding globulin</i>)
SIRT1	sirtuin 1
SOD2	dismutaza 2 superoksida
SRE	sekvence promotora koje odgovaraju na steroide (eng. <i>sterol regulatory element</i>)
SREBP	protein koji se vezuje za SRE sekvence (eng. <i>sterol regulatory element binding protein</i>)
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
T2DM	dijabetes tipa 2 (eng. <i>type 2 Diabetes mellitus</i>)
TNF	faktor nekroze tumora (eng. <i>tumor necrosis factor</i>)
VAT	visceralno masno tkivo (eng. <i>visceral adipose tissue</i>)
VLDL	lipoproteini veoma niske gustine (eng. <i>very low-density lipoprotein</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SINDROM POLICISTIČNIH JAJNIKA.....	1
1.1.1. EVOLUCIJA DIJAGNOSTIČKIH KRITERIJUMA I POSTAVLJANJE DIJAGNOZE PCOS	3
1.1.2. ETIOLOGIJA I PATOFIZIOLOGIJA PCOS	6
1.1.3. NEUROENDOKRINA OSNOVA REPRODUKTIVNIH PROMENA U PCOS	7
1.1.4. METABOLIČKE PROMENE U PCOS.....	9
1.1.5. GOJAZNOST U PREPUBERTETSKOM PERIODU KAO FAKTOR RIZIKA ZA PCOS.....	10
1.2. BELO MASNO TKIVO.....	11
1.2.1. STRUKTURNA ORGANIZACIJA BELOG MASNOG TKIVA.....	11
1.2.2. METABOLIČKE FUNKCIJE MASNOG TKIVA	12
1.2.2.1. Lipogeneza.....	13
1.2.2.2. Lipoliza.....	13
1.2.2.3. Energetska homeostaza u belom masnom tkivu.....	14
1.2.3. METABOLIČKI POREMEĆAJI U MASNOM TKIVU.....	16
1.3. SKELETNI MIŠIĆI.....	18
1.3.1. STRUKTURNA I FUNKCIJSKA ORGANIZACIJA SKELETNIH MIŠIĆA.....	18
1.3.2. ENERGETSKI METABOLIZAM U SKELETNIM MIŠIĆIMA	18
1.3.3. METABOLIČKA DISFUNKCIJA U SKELETNIM MIŠIĆIMA	21
1.4. ŽIVOTINJSKI MODELI U IZUČAVANJU PCOS I POVEĆANOG KALORIJSKOG UNOSA U RANOM POSTNATALNOM PERIODU	22
1.4.1. ŽIVOTINJSKI MODELI U IZUČAVANJU PCOS.....	22
1.4.2. ŽIVOTINJSKI MODEL POVEĆANOG KALORIJSKOG UNOSA U RANOM POSTNATALNOM PERIODU ..	24
2. CILJ	26
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1. EKSPERIMENTALNI DIZAJN I TRETMAN ŽIVOTINJA.....	27
3.2. SAKUPLJANJE KRVI, PRIPREMA SERUMA I IZOLOVANJE TKIVA ZA ANALIZE.....	28
3.3. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH I FIZIOLOŠKIH PARAMETARA.....	28
3.3.1. PROCENA SISTEMSKE INSULINSKE OSETLJIVOSTI.....	28
3.3.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE, TRIGLICERIDA, SLOBODNIH MASNIH KISELINA I INSULINA U SERUMU	29
3.4. HISTOLOŠKE ANALIZE.....	29
3.4.1. HISTOLOŠKA ANALIZA JAJNIKA.....	29
3.4.2. HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA VISCERALNOG I SUBKUTANOG MASNOG TKIVA.....	29
3.5. PRIPREMA UZORAKA ZA WESTERN BLOT ANALIZU.....	30
3.5.1. PRIPREMA ČELIJSKIH FRAKCIJA VISCERALNOG MASNOG TKIVA	30
3.5.2. PRIPREMA UKUPNIH PROTEINA IZ SUBKUTANOG MASNOG TKIVA.....	30
3.5.3. PRIPREMA UKUPNOG ČELIJSKOG EKSTRAKTA IZ <i>M. GASTROCNEMIUS</i>	31
3.5.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U UZORCIMA ZA WESTERN BLOT ANALIZU.....	31
3.6. ELEKTROFOREZA NA SDS-POLIAKRILAMIDNOM GELU.....	32
3.7. WESTERN BLOT I SEMI-KVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOREAKTIVNIH TRAKA NA BLOTU.....	32
3.8. IZOLOVANJE, KVANTIFIKACIJA I PROVERA KVALITETA IZOLOVANE RNK.....	33
3.9. REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije.....	34
3.10. RELATIVNA KVANTIFIKACIJA EKSPRESIJE GENA	34
3.11. PROCENA STEPENA LIPIDNE PEROKSIDACIJE.....	36
3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	36
4. REZULTATI	37
4.1. KARAKTERIZACIJA MODELA NA OSNOVU FIZIOLOŠKIH I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA.....	37

4.1.1.	DINAMIKA RASTA TOKOM PERIODA SISANJA I PARAMETRI UHRANJENOSTI ŽIVOTINJA.....	37
4.1.2.	REPRODUKTIVNE KARAKTERISTIKE KAO POTVRDA ANIMALNOG MODELA	38
4.1.3.	BIOHEMIJSKI PARAMETRI LIPIDNOG METABOLIZMA I INSULINSKE OSETLJIVOSTI.....	40
4.2.	VISCERALNO MASNO TKIVO.....	42
4.2.1.	HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA VISCERALNOG MASNOG TKIVA.....	42
4.2.2.	INSULINSKA SIGNALIZACIJA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU	44
4.2.3.	LIPIDNI METABOLIZAM U VISCERALNOM MASNOM TKIVU.....	45
4.2.4.	EKSPRESIJA I AKTIVACIJA ENERGETSKOG SENZORA AMPK U VISCERALNOM MASNOM TKIVU...	47
4.3.	SUBKUTANO MASNO TKIVO	47
4.3.1.	HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA SUBKUTANOG MASNOG TKIVA	47
4.3.2.	LIPIDNI METABOLIZAM U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU.....	48
4.3.3.	EKSPRESIJA I AKTIVACIJA ENERGETSKOG SENZORA AMPK U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU ...	50
4.4.	<i>MUSCULUS GASTROCNEMIUS</i>	51
4.4.1.	INSULINSKA SIGNALIZACIJA U <i>M. GASTROCNEMIUS</i>	51
4.4.2.	LIPIDNI METABOLIZAM U <i>M. GASTROCNEMIUS</i>	54
4.4.3.	MARKERI OKSIDATIVNOG STRESA I INFLAMACIJE U <i>M. GASTROCNEMIUS</i>	57
4.4.4.	EKSPRESIJA I AKTIVACIJA ENERGETSKOG SENZORA AMPK U <i>M. GASTROCNEMIUS</i>	59
5.	DISKUSIJA	61
5.1.	SISTEMSKI METABOLIČKI I REPRODUKTIVNI PARAMETRI ANIMALNOG MODELA PCOS MODIFIKOVANOG POVEĆANIM KALORIJSKIM UNOSOM U RANOM POSTNATALNOM PERIODU.....	61
5.2.	METABOLIČKI PROCESI U VISCERALNOM I SUBKUTANOM MASNOM TKIVU ŽENKI PACOVA IZLOŽENIH POVEĆANOM KALORIJSKOM UNOSU U RANOM POSTNATALNOM PERIODU I TRETIRANIH DHT.....	64
5.3.	METABOLIČKI PROCESI U SKELETNIM MIŠIĆIMA ŽENKI PACOVA IZLOŽENIH POVEĆANOM KALORIJSKOM UNOSU U RANOM POSTNATALNOM PERIODU I TRETIRANIH DHT	66
5.4.	DOPRINOS POVEĆANOG KALORIJSKOG UNOSA U RANOM POSTNATALNOM PERIODU METABOLIČKIM PROMENAMA U ANIMALNOM MODELU SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA.....	70
6.	ZAKLJUČCI.....	73
7.	LITERATURA	75

1. Uvod

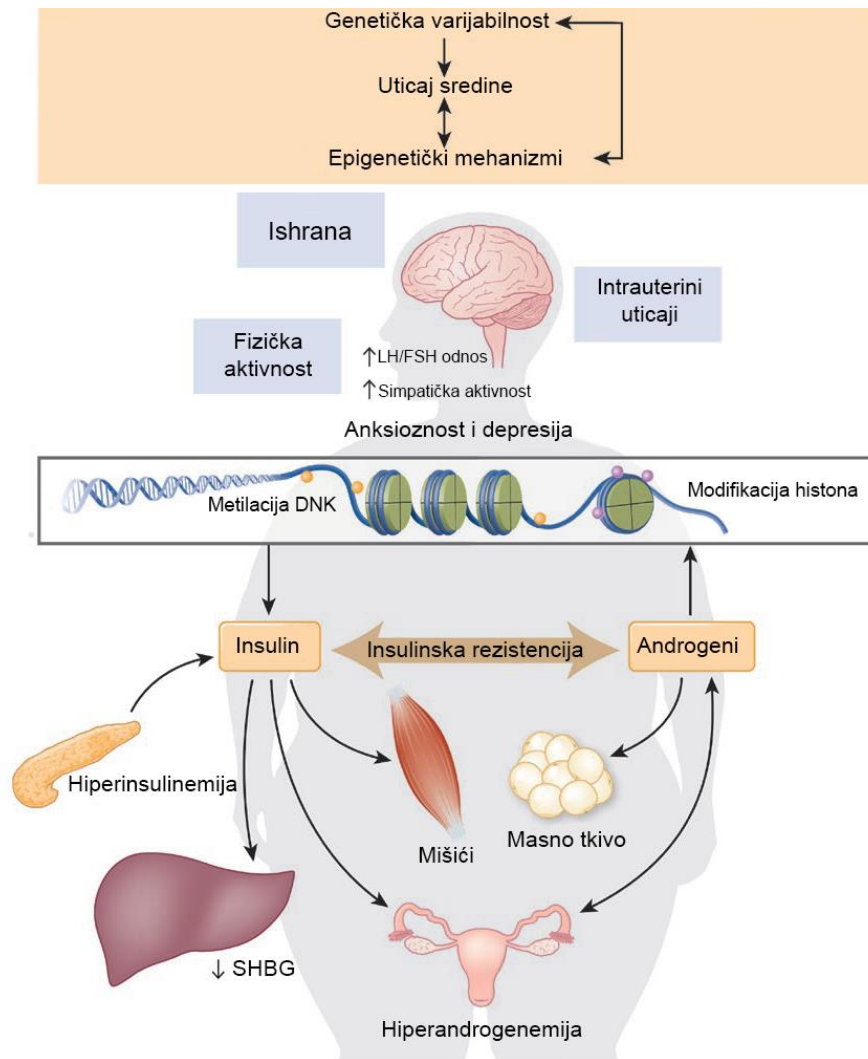
1.1. Sindrom policističnih jajnika

Najraniji dostupni opisi hiperandrogenizma kod žena, manifestovanog kroz pojavu maljavosti i maskulinizacije, praćenih izostankom menstruacije, pripisuju se Hipokratu, pre oko 2 500 godina. Inicijalno su kao uzrok hiperandrogenizacije prepoznati poremećaji u radu nadbubrežne žlezde. Sklerocistična i policistična morfoloģija jajnika je bila zapažena sredinom osamnaestog veka, dok sinteza androgena od strane jajnika dolazi u fokus početkom dvadesetog veka. Štajn i Levental u svom izveštaju iz 1935. godine prvi dovode u vezu policističnu morfoloģiju jajnika sa amenorejom, kao i sa gojaznošću i maljavošću. Štajn-Leventalov sindrom će kasnije postati prepoznat u literaturi pod imenom sindrom policističnih jajnika (eng. *Polycystic Ovary Syndrome*, PCOS) [1]. Do osamdesetih godina smatran je isključivo reproduktivnim poremećajem, ali je tada zapaženo da pacijentkinje sa PCOS pokazuju hiperinsulinemiju procenjenu oralnim testom opterećenja glukozom, koja se nije mogla objasniti gojaznošću. Kasnijim dokazom postojanja insulinske rezistencije i posledične hiperinsulinemije, kao i dovođenjem u vezu hiperandrogenizma sa insulinskom rezistencijom, uz reproduktivne manifestacije su u fokus dospеле i metaboličke komplikacije koje su karakteristične za PCOS [2].

Danas PCOS smatramo multisistemskom endokrinopatijom, koju u prvom redu karakterišu policistično izmenjeni jajnici, hiperandrogenemija, poremećaji menstrualnog ciklusa i ovulatorne funkcije jajnika. Međutim određene karakteristike, poput insulinske rezistencije, gojaznosti, dislipidemije, disglikemije i hipertenzije, PCOS deli sa metaboličkim sindromom [3]. Uz to, ovaj sindrom je često praćen i mentalnim poremećajima kao što su anksioznost i depresija, kao i problemima u regulaciji sna i apetita. Navedene karakteristike se u pojedinačnim slučajevima javljaju u različitim kombinacijama, pa je fenotipska varijabilnost u ispoljavanju ovog sindroma izuzetno velika [4].

PCOS je poremećaj heterogenog porekla i mehanizmi patogeneze su do danas slabo objašnjeni. Podaci ukazuju na interakciju genetičke osnove i faktora životne sredine i na izraženu epigenetičku komponentu u nastanku i razvoju PCOS (**Slika 1.1**) [5].

S obzirom na to da je PCOS najčešća endokrinopatija kod žena reproduktivne dobi koju prate izuzetna kompleksnost i fenotipska varijabilnost, pravilno i blagovremeno postavljanje dijagnoze, lečenje, kao i prevencija predstavljaju veliki izazov u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Sa prevalencom koja u različitim populacijama varira od 4 do 20% u zavisnosti od toga koji se dijagnostički kriterijumi koriste [6], predstavlja i veoma značajno ekonomsko opterećenje za zdravstvene sisteme.



SLIKA 1.1. HIPOTETIČKA INTERAKCIJA SREDINSKIH, EPIGENETIČKIH I GENETIČKIH FAKTORA U PATOGENEZI PCOS. PCOS je heterogen endokrini poremećaj koji zahvata različite sisteme organa i počiva na „začaranom krugu“ između hiperandrogenemije i hiperinsulinemije. SHBG - vezujući globulin polnih hormona. (Preuzeto i modifikovano iz Stener-Victorin i sar. 2020)

Imajući u vidu sve navedeno, kao zadatak budućih istraživanja nameće se bolje razumevanje različitih etiologija karakterističnih za pojedinačne fenotipove, upoznavanje molekularnih mehanizama koji leže u njihovoj osnovi i, na taj način, postavljanje dobre osnove za usmereniju terapiju i personalizovan pristup u lečenju.

1.1.1. Evolucija dijagnostičkih kriterijuma i postavljanje dijagnoze PCOS

PCOS je označen kao sindrom, a ne bolest, usled prisustva velikog broja fenotipskih karakteristika koje se u različitoj meri i u različitim kombinacijama ispoljavaju kod pacijentkinja, uz nedostatak konstantnog, zajedničkog elementa koji bi se mogao uzeti kao „zlatni standard“ za postavljanje dijagnoze. S obzirom na izuzetnu kompleksnost, dijagnostika, lečenje i prevencija PCOS predstavljaju veliki izazov u savremenoj medicinskoj praksi.

Kriterijumi za dijagnozu PCOS prvi put su zvanično definisani tokom ekspertske konferencije organizovane od strane Nacionalnog instituta za zdravlje SAD (eng. *National Institute of Health, NIH*), 1990. godine. Učesnici konferencije su tom prilikom definisali sledeće kriterijume za postavljanje dijagnoze PCOS [4,7]:

- klinički i/ili biohemijski hiperandrogenizam
- menstrualna disfunkcija, odnosno hronična anovulacija.

Klinički hiperandrogenizam se odnosi na pojavu maljavosti, akni ili opadanja kose. Biohemijski hiperandrogenizam, odnosno, hiperandrogenemija, podrazumeva povišenu koncentraciju ukupnog i slobodnog testosterona u serumu, kao androstenediona, dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA) i DHEA-sulfata (DHEA-S) [8].

Kriterijumi NIH su revidirani 2003. godine u Roterdamu [9], na združenoj konferenciji Evropskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (eng. *European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*) i Američkog društva za reproduktivnu medicinu (eng. *American Society for Reproductive Medicine, ASRM*). Tada je postojanju kliničkog ili biohemijskog hiperandrogenizma i hronične anovulacije dodat i treći kriterijum – policistična morfologija jajnika. Pored uvođenja trećeg kriterijuma, značajan napredak koji je ova konferencija donela je preporuka da se za postavljanje dijagnoze mogu koristiti bilo koja dva od navedena tri kriterijuma.

Kritikujući „fleksibilnost“ definicije postavljene u Roterdamu 2003. godine, radna grupa američkog Društva za višak androgena (eng. *Androgen Excess Society, AES*) 2006. godine insistira na tome da je u osnovi PCOS hiperandrogenizam, što ga čini obaveznim kriterijumom za postavljanje dijagnoze, dok se kao drugi kriterijum može uzeti hronična anovulacija ili policistična morfologija jajnika [10].

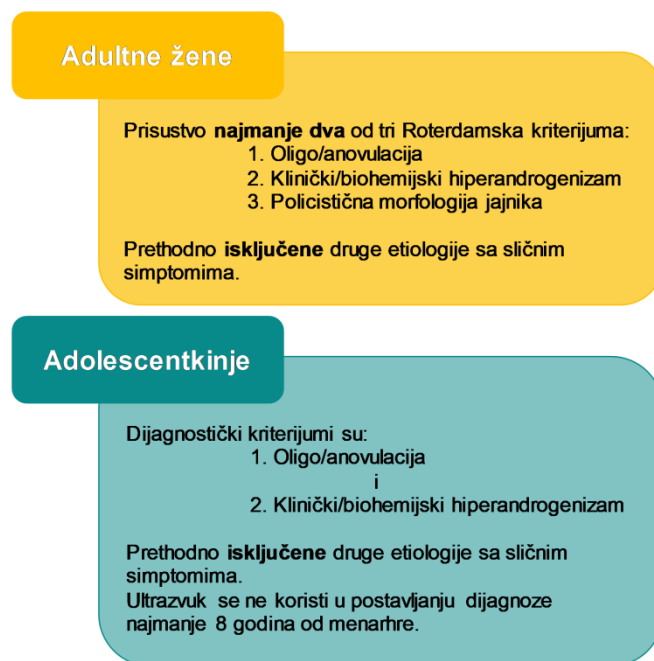
U Amsterdamu 2010. godine, na trećoj PCOS radionici sponzorisanjoj od strane ESHRE i ASRM, kombinovanjem kriterijuma ESHRE/ASRM iz 2003. godine definisana su četiri moguća PCOS fenotipa:

- **Fenotip A:** hiperandrogenizam + anovulacija + policistična morfologija jajnika (klasičan PCOS fenotip)
- **Fenotip B:** hiperandrogenizam + anovulacija (klasičan PCOS fenotip)
- **Fenotip C:** hiperandrogenizam + policistična morfologija jajnika (ovulatorni PCOS fenotip)

- **Fenotip D:** anovulacija + policistična morfologija jajnika (blagi, nehiperandrogeni PCOS fenotip)

Na toj radionici je usvojena i preporuka da se kod svake pacijentkinje prvenstveno odredi konkretan fenotip, kao i da se utvrde pridruženi metabolički poremećaji [11]. Ekspertski panel koji je pratio metodološku radionicu o PCOS organizovanu od strane NIH 2012. godine takođe je podržao Roterdamsku definiciju kao najsveobuhvatniju i najprikladniju, uz insistiranje na stratifikaciji pacijentkinja prema fenotipu, uključujući tu i definisanje metaboličkog statusa [4].

Roterdamska klasifikacija je u svojoj osnovi dovoljno precizna i informativna za postavljanje dijagnoze, jer fleksibilno korišćenje dva od tri kriterijuma omogućuje da se identifikuju umereniji fenotipovi PCOS. Međutim, iako se od PCOS najčešće leče žene u reproduktivnom dobu, prve manifestacije mogu biti prisutne već u preadolescentskom i ranom adolescentskom dobu, ali simptomi često ostaju maskirani promenama koje su karakteristične za pubertet, kao što su neredovni ciklusi i pojava akni [12]. Takođe, posledice PCOS i metabolički komorbiditeti koji ga prate često su prisutni i po nastupanju menopauze [12]. Uzimajući u obzir nova otkrića i informacije, veliki međunarodni konzorcijum sastavljen od eksperata različitih specijalnosti i pacijentkinja, sponzorisan od strane ESHRE i ASRM, 2018. godine je objavio Međunarodne smernice zasnovane na dokazima za dijagnostiku i upravljanje PCOS-om tokom života [13]. Ovaj dokument podržava primenu Roterdamskih kriterijuma kod odraslih žena, dok unutar osam godina od menarhe, za postavljanje dijagnoze PCOS zahteva i prisustvo hiperandrogenizma i hronične anovulacije (**Slika 1.2**). Ove smernice obezbeđuju lekarima detaljne i precizne preporuke za dijagnostiku i tretman, koje su zasnovane na adekvatno evaluiranim i multidisciplinarno sagledanim dostupnim podacima. Informisanje i edukacija pacijentkinja i opšte populacije je postavljeno za jedan od prioriteta, kao i prevencija nastanka prekomerne telesne mase [13].

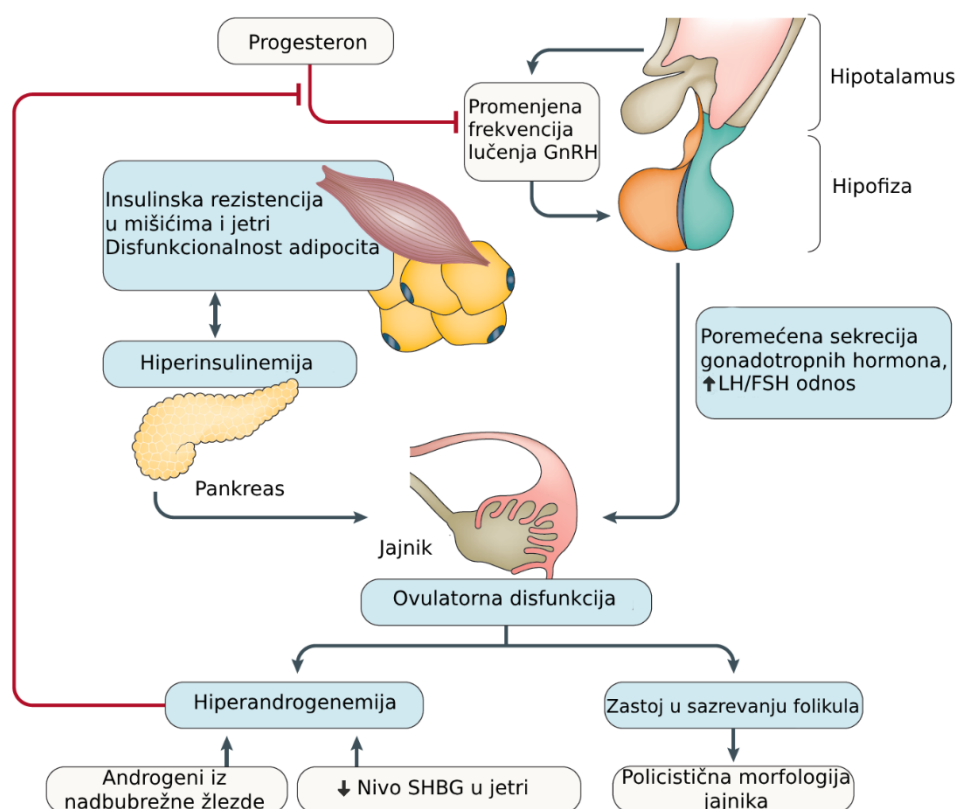


SLIKA 1.2. AKTUELNI KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE PCOS

Iako su Smernicama gojaznost i insulinska rezistencija prepoznati kao česte karakteristike PCOS, ove manifestacije se za sada ne uzimaju kao jedan od dijagnostičkih kriterijuma. Tako se u isti fenotip svrstavaju i na isti način tretiraju pacijentkinje normalne telesne mase i ekstremno gojazne, one sa blagom ili nepostojećom insulinskom rezistencijom i one sa ozbiljnim metaboličkim promenama, one sa izmenjenim metabolizmom lipida i visokim rizikom za razvoj kardiovaskularnih oboljenja i one sa uobičajenim rizikom. Zbog toga neki autori predlažu da se klasifikacija dodatno unapredi uvođenjem gojaznog podfenotipa i podfenotipa normalne telesne mase u svaki od četiri Roterdamska fenotipa. To bi doprinelo boljoj diferencijaciji pacijentkinja sa reproduktivnim i metaboličkim poremećajima i prilagođenijem terapijskom pristupu [14].

1.1.2. Etiologija i patofiziologija PCOS

Etiologija sindroma nije jedinstvena, a različiti, međusobno isprepletani mehanizmi doprinose nastanku i održavanju simptoma PCOS kod pojedinačnih pacijentkinja (Slika 1.3). Brojni uzroci mogu poremetiti funkcionisanje hipotalamo-hipofizno-gonadne (HPG) osovine, izazivajući tako hiperandrogenemiju na nivou jajnika ili nadbubrežnih žlezda. Reproductivna manifestacija PCOS je često praćena insulinskom rezistencijom i hiperinsulinemijom, ektopičnom akumulacijom lipida i disfunkcijom masnog tkiva, uz izraženu inflamaciju, dislipidemiju, oksidativni stres i lipotoksični efekat [12,15].



SLIKA 1.3. PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI PCOS. Pulsna sekrecija gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) iz hipotalamusa često je izmenjena u PCOS. To dovodi do hipersekrecije luteinizirajućeg hormona (LH) od strane hipofize, što na nivou jajnika uzrokuje poremećaje u sintezi hormona, tj. hiperandrogenizam i izostanak ovulacije. Pretpostavlja se da poremećaji u lučenju LH nastaju rano u pubertetu i imaju veze sa narušenom inhibicijom lučenja GnRH od strane progesterona. Iako su koncentracije folikuloestimulišućeg hormona (FSH) u cirkulaciji nepromenjene, verovatno kod žena sa PCOS dolazi do razvoja rezistencije na ovaj hormon na nivou folikula, usled povećane koncentracije antimileroovog hormona (AMH) na nivou jajnika. Insulinska rezistencija doprinosi celokupnoj patogenezi PCOS kroz doprinos razvoju hiperandrogenemije. (Preuzeto i modifikovano iz Azziz i sar. 2016)

U proteklih desetak godina napravljen je ogroman napredak u razumevanju genetičke i epigenetičke osnove za nastanak i progresiju PCOS [15]. PCOS se nasleđuje, ali uprkos očiglednim autozomalno-dominantnim porodičnim obrascima,

nije identifikovan ni jedan defekt u pojedinačnom genu. Umesto toga, analizom studija asocijacije na nivou čitavog genoma (eng. *Genome-wide association studies*, GWAS) izdvojeno je oko 20 gena povezanih sa neuroendokrinim, metaboličkim i reproduktivnim funkcijama [15,16]. Primenom algoritama mašinskog učenja za grupisanje bez nadzora (eng. *unsupervised machine learning clustering algorithms*), utvrđeno je da se izdvajaju reproduktivni i metabolički podtip PCOS-a, koji imaju međusobno različite genetičke osnove [16].

Pored genetičkih faktora, faktori životne sredine poput intrauterine izloženosti endokrinim ometačima, visokim koncentracijama androgena ili višku nutrijenata usled neadekvatne ishrane majke tokom trudnoće, takođe mogu da na epigenetičkom nivou doprinesu razvoju specifičnih fenotipova PCOS-a tokom odrasle dobi [12,16]. Iako se epigenetička obeležja po pravilu uklanjaju sa germinativnih ćelija pre oplodjenja, raste broj studija koje pokazuju da se neka od njih ipak zadržavaju i prenose kroz više generacija [16]. Transgeneracijske epigenetičke promene, poput obrazaca metilacije karakterističnih za PCOS mogle bi da budu osnova za razumevanje nekih šema nasleđivanja PCOS-a koje se nisu mogle objasniti promenama na genetičkom nivou [16].

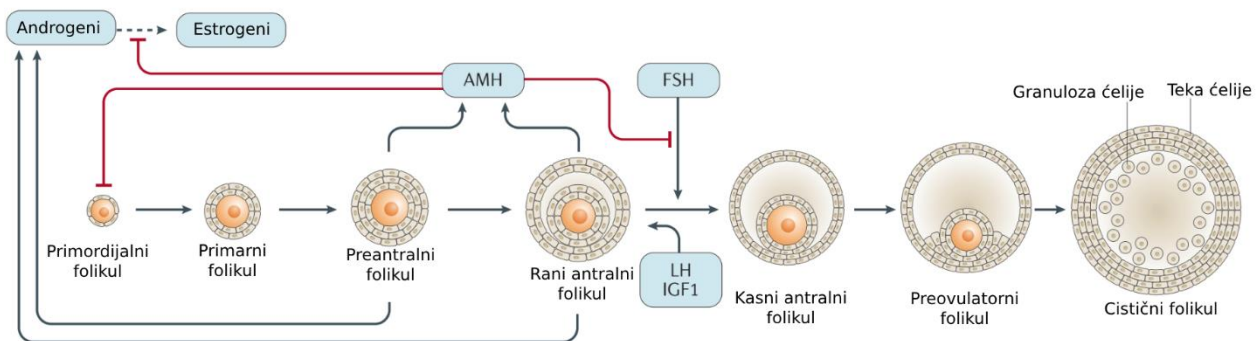
Na neuroendokrinom nivou, mogući mehanizam nastanka PCOS-a bio bi poremećaj u frekvenciji lučenja gonadotropin-oslobađajućeg hormona (eng. *Gonadotropin-releasing hormone*, GnRH), koga luče neuroni hipotalamusa. To dalje može dovesti do poremećaja u lučenju gonadotropnih hormona - folikulostimulišućeg hormona (FSH), i luteinizirajućeg hormona (LH), što može dovesti do zastoja u razvoju dominantnog folikula i izostanka oslobađanja jajne ćelije [15].

1.1.3. Neuroendokrina osnova reproduktivnih promena u PCOS

Sazrevanje oocita se dešava pod dominantnim uticajem FSH, dok se ovulacija dešava nakon stimulacije LH. Lučenje FSH i LH od strane hipofize je regulisano frekvencijom lučenja GnRH. Poremećaji u lučenju gonadotropnih hormona koji su karakteristični za PCOS pacijentkinje koje nisu gojazne jesu povećana frekvencija lučenja GnRH, koja dovodi do pojačanog lučenja LH i poremećenog odnosa LH/FSH u korist LH [17]. Daljem razvoju PCOS, prema ovom mehanizmu, doprinosi povratna sprega koja se uspostavlja između povećanog odnosa LH/FSH i visoke frekvencije lučenja GnRH. Naime, povećan odnos LH/FSH kao i folikulska rezistencija na FSH dovode do hipersekrecije androgena od strane teka ćelija folikula i izostanka lučenja progesterona (**Slika 1.4**), koji bi u fiziološkim uslovima doveo do usporavanja lučenja GnRH, te se na taj način dalje propagira razvoj PCOS [18].

Androgene i njihove prekursore luče jajnici i nadbubrežne žlezde, u odgovoru na stimulaciju odgovarajućim tropnim hormonima, LH i adrenokortikotropnim hormonom (ACTH). Oko polovine ukupne produkcije testosterona u krvi nastaje direktnim izlučivanjem iz jajnika i nadbubrežnih žlezda, dok druga polovina nastaje konverzijom cirkulišućeg androstenediona u jetri, koži i masnom tkivu [19].

Sazrevanje folikula i ovulacija su pod strogom hormonskom kontrolom i zavise od precizno usklađenih interakcija između LH, FSH, faktora rasta sličnog insulinu 1 (eng. *Insulin-like growth factor 1*, IGF1), antimilerovog hormona (AMH) i enzima koji su uključeni u konverziju polnih hormona. Oligoovulacija ili anovulacija karakteristične za PCOS mogu biti posledica nedovoljne sekrecije FSH ili lokalne folikulske rezistencije na ovaj hormon, zbog čega izostaje odabir dominantnog folikula, kako je prikazano na **Slici 1.4** [15,20]. Folikulska rezistencija na FSH se može javiti usled povećane koncentracije AMH, koji, dodatno, deluje i kao inhibitor aromataze, sprečavajući konverziju androgenskih prekursora u estrogen i doprinoseći na taj način sistemske hiperandrogenemiji. Do povećanja nivoa AMH dolazi usled postojanja većeg broja antrumskih folikula, čije granuloza ćelije proizvode ovaj hormon [21]. Ranije pomenuta hipersekrecija LH takođe nepovoljno utiče na razvoj dominantnog folikula, dovodeći do rane luteinizacije granuloza ćelija, koja uslovljava hipertrofiju folikula, akumulaciju lipida i druge promene koje se u fiziološkim uslovima dešavaju tek nakon ovulacije [15].



SLIKA 1.4. ZASTOJ U RAZVOJU FOLIKULA U PCOS. Normalna ovulacija je rezultat sinhronizovane signalizacije između centralno oslobođenih gonadotropnih hormona i lokalno produkovanih faktora od strane folikula jajnika. Anovulacija kod žena sa PCOS podrazumeva zaustavljanje rasta folikula u ranoj antralnoj fazi. Hipersekrecija luteinizirajućeg hormona (LH) i faktora rasta sličnog insulinu 1 (IGF1) uslovljava hiperandrogenemiju, što zaustavlja sazrevanje folikula na ovom stadijumu. Pored toga, visok nivo antimilerovog hormona (AMH) inhibira dejstvo folikulostimulišućeg hormona (FSH), doprinosi hiperandrogenemiji i sprečava regrutovanje sledećih primordijalnih folikula.

Opisani poremećaji na nivou HPG osovine smatraju se ključnim patofiziološkim mehanizmima u osnovi PCOS. Povećana frekvencija lučenja GnRH dovodi do zastoja u razvoju folikula i patoloških promena u sintezi polnih hormona. Tako izmenjen milje polnih hormona moduliše aktivnost GnRH-sekretujućih neurona hipotalamusa mehanizmom povratne sprege i na taj način se uspostavlja „začarani krug“ koji doprinosi daljem razvoju reproduktivnih poremećaja karakterističnih za PCOS.

Takođe je bitno napomenuti da su GnRH-sekretujućim neuronima hipotalamusa mesto gde se ukrštaju putevi regulacije reproduktivne i metaboličke funkcije u organizmu.

1.1.4. Metaboličke promene u PCOS

Sistemska insulinska rezistencija dovodi do smanjenja stope preuzimanja glukoze nakon lučenja insulina kod glodara i ljudi [22]. Javlja se kao posledica nefunkcionalnog odgovora na insulin, pre svega u perifernim tkivima i organima - masnom tkivu i skeletnim mišićima, ali i u jetri. Insulin se u fiziološkim uslovima vezuje za svoj receptor na membrani ciljnih ćelija, koji zatim regrutuje i fosforiliše nishodne proteine, pre svega supstrat insulinskog receptora (eng. *Insulin receptor substrate*, IRS), koji dalje fosforiliše i na taj način aktivira PI3K i AKT. AKT predstavlja značajno „čvorište“ u signalnoj kaskadi insulina, te prenos insulinskog signala sa AKT može da dovede do preuzimanja glukoze ispoljavanjem glukoznog transportera na površini ćelije, aktivacije sintaze glikogena, inhibicije glukoneogeneze preko transkripcionog faktora FOXO1, pokretanja sinteze proteina preko kompleksa mTOR ili procesa lipogeneze preko SREBP1 i AMPK [23]. Zajedno sa povišenim nivoom androgena, insulinska rezistencija značajno doprinosi nastanku i razvoju PCOS [24], sa prevalencom koja se procenjuje na čak do 95% među pacijentkinjama sa PCOS [25]. Periferna insulinska rezistencija najčešće nastaje kao posledica poremećaja aktivacije insulinskog receptora i/ili supstrata insulinskog receptora 1 (eng. *Insulin receptor substrate 1*, IRS1) što je zabeleženo i kod pacijentkinja sa PCOS [15]. Neke studije opisuju i smanjenu ekspresiju glukoznog transportera 4 (GLUT4) u subkutanom masnom tkivu i skeletnim mišićima ovih žena [16]. Poremećaj u insulinskom signalnom putu se javlja na nivou inhibitorne fosforilacije serinskih ostataka na insulinskom receptoru i IRS1, ali i nizvodnih molekula kao što su PI3K, AKT, uz aktiviran MEK-ERK1/2 signalni put kod PCOS pacijentkinja [15,26]. Ovo sugerise da je insulinska rezistencija u PCOS selektivna i da pogađa samo metaboličke, a ne i mitogene signalne puteve insulina, čime bi se mogla objasniti očuvana dejstva insulina u reproduktivnim organima uprkos sistemske insulinske rezistenciji [15,16]. Ulogu u nastanku i održavanju insulinske rezistencije na sistemskom nivou verovatno imaju i disfunkcionalni adipociti, koji izlučuju slobodne masne kiseline (eng. *Free fatty acids*, FFA), proinflamatorne citokine poput faktora nekroze tumora (eng. *Tumor necrosis factor*, TNF) i interleukina 6 (IL6). Tako se hepatična insulinska rezistencija beleži samo kod gojaznih pacijentkinja sa PCOS, što odražava štetan uticaj povećane mase visceralnog masnog tkiva na insulinsku osetljivost u jetri obolelih od PCOS [15,16].

U fiziološkim uslovima, hiperinsulinemija se javlja kao kompenzatorni mehanizam nastale insulinske rezistencije u perifernim tkivima [16]. Međutim, kada povećane potrebe za insulinom prevaziđu kapacitet β ćelija pankreasa da ga stvaraju, dolazi do njihove disfunkcije i oštećenja, što doprinosi razvoju dijabetesa tipa 2 (eng. *type 2 Diabetes mellitus*, T2DM). Ovakve promene su zapažene kod obolelih od PCOS nezavisno od BMI i narušenog održavanja koncentracije glukoze u optimalnom opsegu (disglikemije), mada su izraženije kod pacijentkinja koje imaju bliske srodnike obolele od T2DM [16].

Iako su insulinska rezistencija i kompenzatorna hiperinsulinemija karakteristične za prepubertetski i rani pubertetski period, kod gojaznih devojčica mogu prevazići fiziološke okvire i postati komorbiditet gojaznosti koji predstavlja faktor rizika za

razvoj kardiometaboličkih oboljenja, ali i za hiperandrogenemiju. Insulin stimuliše produkciju androgena od strane teka ćelija jajnika čak i u odsustvu LH, kao i produkciju androgena od strane nadbubrežnih žlezda [27]. Takođe, hiperinsulinemija dovodi do smanjenja produkcije globulina koji vezuje polne hormone (eng. *Sex hormone-binding globulin*, SHBG) u jetri, povećavajući na taj način biološku dostupnost testosterona, a ove promene se mogu korigovati smanjenjem telesne mase [28]. Takođe se čini da insulin direktno stimuliše ekspresiju i aktivnost 17-hidroksisteroid-dehidrogenaze, enzima koji prevodi androstenedion u testosteron u jajnicima i kori nadbubrežne žlezde [29]. Dakle, gojaznost može da utiče na direktnu sekreciju testosterona kroz hiperinsulinemiju, kao i na perifernu konverziju, kroz povećanje udela masnog tkiva. Faktori regulacije ove periferne konverzije androstenediona u testosteron nisu u potpunosti razjašnjeni, mada se kao kandidati ističu insulin, IGF1 i leptin [30].

Hiperinsulinemija, zajedno sa povećanim nivoom LH, doprinosi povećanju sekrecije androgena od strane teka ćelija. Hiperinsulinemija takođe smanjuje sintezu i izlučivanje SHBG u jetri, čime se posredno povećava količina slobodnog testosterona i time stimuliše hiperandrogenemija kod žena sa PCOS, odnosno, uspostavlja se „začarani krug“ između viška androgena i viška insulina u cirkulaciji [15].

1.1.5. Gojaznost u prepubertetskom periodu kao faktor rizika za PCOS

Prekomerna telesna masa i gojaznost se definišu od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO) kao suvišna akumulacija masti, koja može da negativno utiče na zdravlje. Brojne studije dovode u uzročno-posledičnu vezu prekomernu telesnu masu i različite aspekte pubertetskog razvoja, poput vremena nastupanja puberteta i pojave hiperandrogenemije [27,31]. Interakcija između prepubertetske i pubertetske gojaznosti sa hiperandrogenemijom mogla bi značajno da doprinese nastanku PCOS tokom adolescencije ili kasnije tokom života, a neki autori čak smatraju PCOS komorbiditetom dečije gojaznosti [32,33].

Osim hiperinsulinemije koja direktno i indirektno doprinosi hiperandrogenemiji, u krvi gojaznih devojčica izmerene su i povišene jutarnje koncentracije LH, koji povećava produkciju androgena. Takođe je pokazano da jetra gojaznih adolescentkinja stvara manje SHBG, što povećava koncentraciju slobodnog testosterona u krvi, time narušavajući uobičajeno funkcionisanje negativne povratne sprege koja reguliše oslobađanje GnRH, povećavajući frekvenciju lučenja GnRH i LH, kao i LH/FSH odnos, i sledstvenu produkciju androgena od strane teka ćelija jajnika [18]. Pored toga, neki autori su kod gojaznih devojčica zabeležili i povišenje jutarnje koncentracije ACTH, odgovornog za adrenalnu produkciju androgena [34].

Uprkos tome što hiperandrogenemija u pubertetskom uzrastu često nema kliničke manifestacije, ona bi mogla da predstavlja osnovu za nastanak PCOS u odrasloj dobi. Neki autori izdvajaju insulinsku rezistenciju i hiperandrogenemiju kao ključne faktore za nastanak PCOS [35]. Prema tome, postojanje veze između gojaznosti u

prepubertetskom i ranom pubertetskom uzrastu i hiperandrogenemije mogla bi da znači da su gojazne devojčice u visokom riziku za kasniji nastanak PCOS. Zbog toga, neki autori čak predlažu da se definiše stanje „sekundarnog PCOS nastalog usled gojaznosti“ [36]. Potvrda ove hipoteze zahteva dodatna osnovna i klinička istraživanja u cilju definisanja bioloških faktora odgovornih za pojavu hiperandrogenemije i razvoj PCOS kod gojaznih devojčica, kao i izostanka hiperandrogenemije kod nekih gojaznih devojčica.

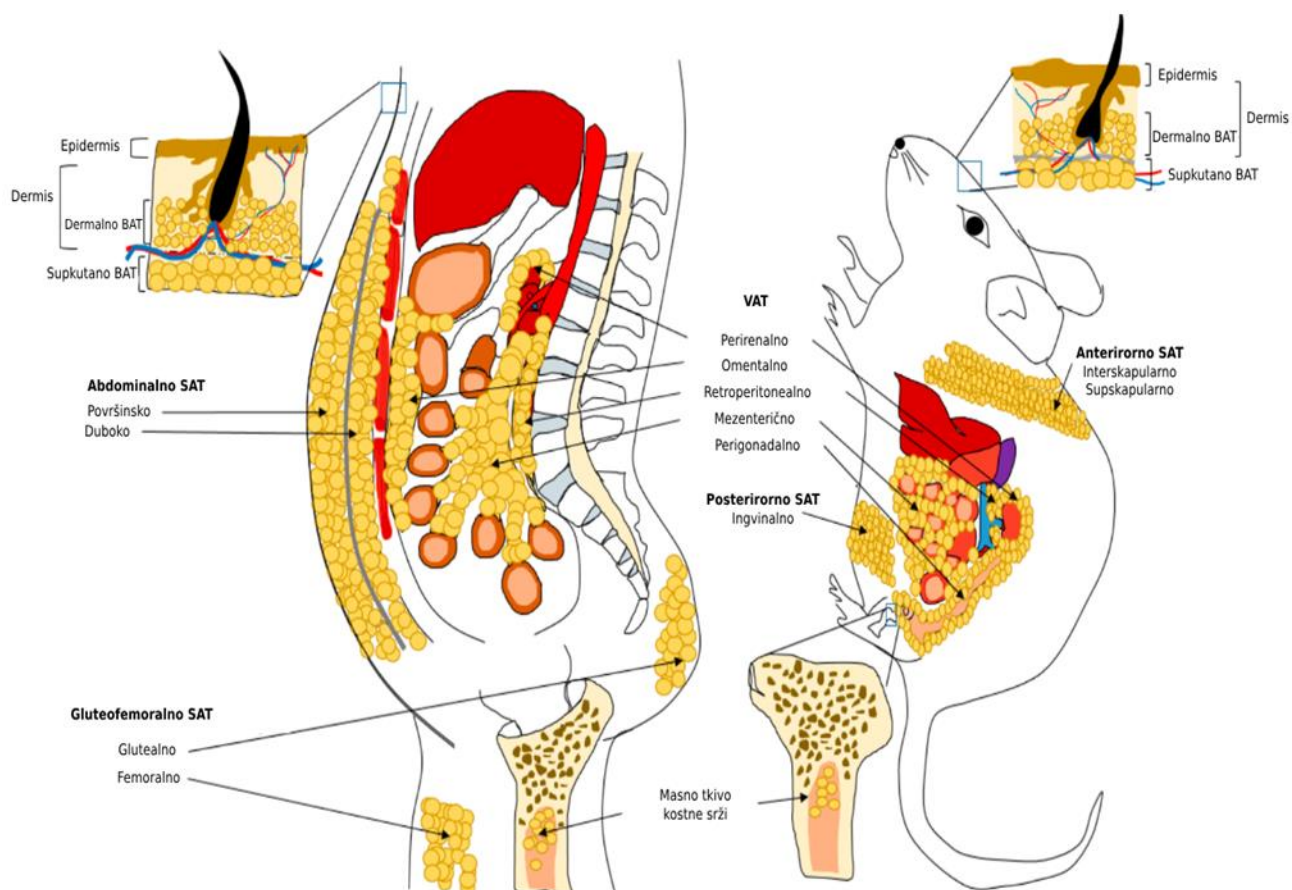
1.2. Belo masno tkivo

1.2.1. Strukturna organizacija belog masnog tkiva

Masno tkivo se danas smatra jedinstvenim, velikim organom koga odlukuju diskretna anatomija, kompleksna morfološka organizacija i izuzetna fiziološka plastičnost, kao i specifična inervacija i vaskularizacija [37]. Jedno je od ključnih mesta sistemske metaboličke regulacije. Uključeno je i u termogenezu, laktaciju i imunski odgovor, a takođe pruža unutrašnjim organima termičku izolaciju i mehaničku potporu. Glavne ćelije masnog tkiva su adipociti, a pored njih su prisutni i preadipociti, fibroblasti, endotelske ćelije, kao i ćelije imunskog sistema. Kod sisara, razlikujemo tri tipa adipocita - bele, mrke i bež, koji se razlikuju po poreklu, morfologiji, zastupljenosti mitohondrija i termogenom potencijalu [38].

Tradicionalno se razlikuju mrko masno tkivo sa dominantnom ulogom u termoregulaciji i belo masno tkivo, koje primarno služi kao depo energije, mada je danas poznato da dolazi do transdiferencijacije između belih i mrkih adipocita [37,39]. Belo masno tkivo dominantno sadrži bele adipocite koji imaju jednu veliku lipidnu kap koja ispunjava najveći deo ćelije, sa citoplazmom potisnutom uz ćelijsku membranu sa relativno malim brojem mitohondrija. Pored njih su mestimično prisutni i bež adipociti [38].

Belo masno tkivo čine dva glavna depoa: subkutano masno tkivo (eng. *Subcutaneous adipose tissue*, SAT) raspoređeno ispod kože i visceralno masno tkivo (eng. *Visceral adipose tissue*, VAT) koje se nalazi unutar trbušne duplje [37,40]. Najveći deo belog masnog tkiva je raspoređen u pomenuta dva depoa, a manji u okviru dermalnih depoa, kostne srži, srca itd. Kod ljudi, SAT čine abdominalno i gluteofemoralno masno tkivo, kojima kod glodara odgovaraju anteriorni i posteriorni depoi. VAT je na osnovu anatomske pozicije podeljeno na sledeće regione: retroperitonealno, perirenalno, mezenterično, perigonadalno i omentalno, kao što je prikazano na **Slici 1.5** [41]. Organizacija VAT je slična kod glodara i ljudi, s tim da je kod glodara omentalni depo VAT slabo razvijen [41]. Osim što se razlikuju na osnovu embrionalnog porekla adipocita, razlikuju se endokrine funkcije SAT i VAT, kao i kapacitet da odgovore na stimulaciju insulinom i drugim hormonima [43].



SLIKA 1.5. UPOREDNI PRIKAZ HUMANI I GLODARSKIH DEPOA MASNOG TKIVA. VAT- visceralno masno tkivo; SAT- subkutano masno tkivo (Modifikovano iz Luong i sar. 2019)

1.2.2. Metaboličke funkcije masnog tkiva

Osnovna uloga belog masnog tkiva je da održava energetska ravnotežu organizma, tako što skladišti višak energije nakon obroka i snabdeva ostale organe energijom, odnosno, slobodnim masnim kiselinama, između obroka. Ono takođe učestvuje i u regulaciji apetita i ponašanja vezanog za unos hrane, kroz lučenje leptina i drugih adipokina [42]. Višak energije, nastao povećanim unosom i/ili smanjenom potrošnjom, efikasno se skladišti u belom masnom tkivu u vidu neutralnih triglicerida, kroz aktivaciju lipogenih metaboličkih puteva. Nagomilavanje triglicerida u adipocitima dovodi do povećavanja masnih kapi, ekspanzije masnog tkiva i, posledično, do gojaznosti. Kada je unos hrane smanjen, potrebe za energijom povećane ili kada se prevaziđe kapacitet za skladištenje neutralnih triglicerida od strane adipocita, aktiviraju se lipolitički metabolički putevi. Masne kiseline i glicerol, koji nastaju procesom lipolize, krvotokom se transportuju do jetre ili mišića, gde mogu poslužiti kao izvor energije, čime se održava energetska ravnoteža na nivou čitavog organizma. Pored skladištenja energije, belo masno tkivo sveukupnom energetskom balansu doprinosi i kroz svoju endokrinu funkciju – produkujući

brojne citokine, označene kao adipokini, poput pomenutog leptina, ali i adiponektina, rezistina, TNF, IL6 i drugih [38].

1.2.2.1. Lipogeneza

U fiziološkim uslovima, masne kiseline koje se koriste za biosintezu triglicerida u adipocitima, uglavnom se preuzimaju iz lipoproteina krvi, kao što su hilomikroni iz digestivnog trakta i lipoproteini veoma male gustine (eng. *Very low-density lipoprotein*, VLDL) iz jetre. Oni sadrže trigliceride, čiju hidrolizu vrši enzim lipaza lipoproteina (LPL), a nastale masne kiseline adipociti preuzimaju posredstvom translokaze CD36 (poznate i kao translokaza masnih kiselina, eng. *Fatty acid translocase*, FAT) [38,43].

Adipociti mogu da vrše i *de novo* sintezu masnih kiselina, koristeći ugljene hidrate kao supstrat, ali ovaj proces je energetski izuzetno zahtevan, za razliku od preuzimanja i skladištenja masnih kiselina iz cirkulacije [43]. Početni supstrat *de novo* lipogeneze je acetil-koenzim A (acetil-CoA), metabolit glukoze koga acetil-CoA-karboksilaza (eng. *acetyl-CoA carboxylase*, ACC), ključni enzim *de novo* lipogeneze, prevodi u malonil-CoA, koga dalje sintaza masnih kiselina (eng. *Fatty acid synthase*, FAS), prevodi u palmitat [38,43]. Elongaciju palmitata vrše enzimi elongaze, dodanjem dva ugljenična atoma na karboksilni kraj. Zatim sledi desaturacija, odnosno uvođenje jedne dvostruke veze koju vrši enzim stearoil-CoA-desaturaza (eng. *stearoyl-CoA desaturase*, SCD), čime nastaju mononezasićene masne kiseline - supstrat za sintezu diglicerida i triglicerida, od strane enzima monoacilglicerol-acetiltransferaza (MGAT) i diacilglicerol-acetiltransferaza (DGAT) [44]. Tako nastali digliceridi i trigliceridi najčešće bivaju uskladišteni u masnim kapima [43].

Svi ovi procesi su stimulisani od strane insulina, koji reguliše ekspresiju najvažnijeg prolipogenog transkripcionog regulatora - proteina koji se vezuje za SRE sekvence koje odgovaraju na steroide (eng. *Sterol regulatory elements*, SRE; eng. *Sterol regulatory element binding protein*, SREBP), promotora gena koji kodiraju ključne enzime *de novo* lipogeneze - ACC, FAS i SCD1, kao i gena koji kontrolišu sintezu holesterola, triglicerida i fosfolipida [38].

1.2.2.2. Lipoliza

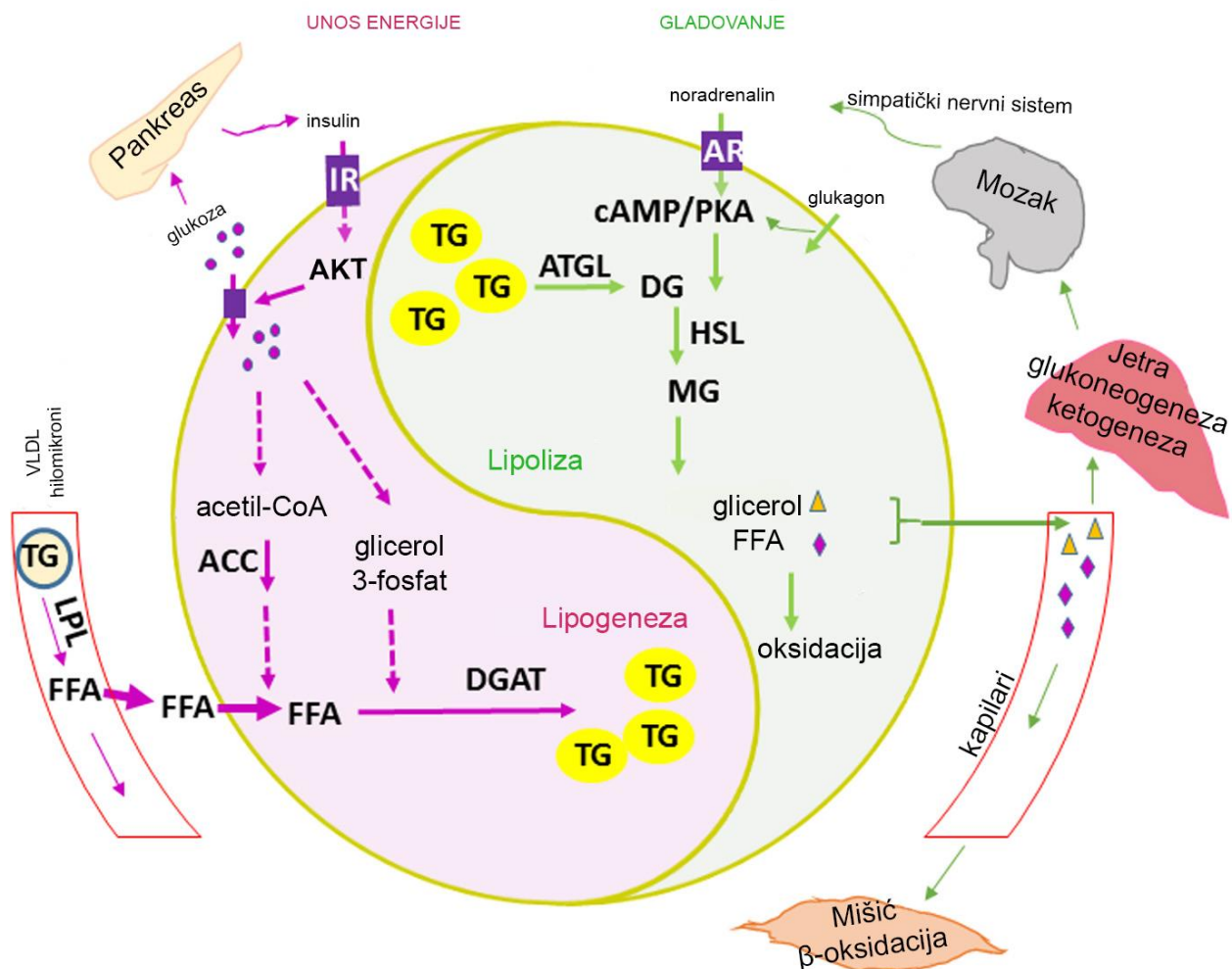
Nasuprot lipogenezi, u masnom tkivu se odvija i proces lipolize koji predstavlja katabolički proces razgradnje uskladištenih triglicerida. U slučaju nedostatka energije, slobodne masne kiseline nastale procesom lipolize mogu biti iskorišćene u procesu β -oksidacije, dok glicerol predstavlja supstrat za glukoneogenezu u jetri. U situacijama kada je dostupna velika količina slobodnih masnih kiselina, ali ne i ugljenih hidrata, one mogu procesom ketogeneze u jetri biti metabolisane do ketonskih tela, koja jedina, pored glukoze, mogu služiti kao izvor energije za mozak [38,45].

Između obroka, nivo insulina je nizak, a nivo glukagona visok, što dovodi do suprimiranja lipogeneze. Glukagon se vezuje za svoj receptor spregnut sa proteinom G i pokreće signalnu kaskadu koja dovodi do stvaranja sekundarnog glasnika cikličnog adenozin-monofosfata (c-AMP) i sledstvene aktivacije protein-kinaze A (PKA), koja fosforiliše lipazu osetljivu na hormone (eng. *Hormone sensitive lipase*, HSL) u adipocitima. Kateholamini takođe dovode do aktivacije lipolize [38].

Za proces lipolize su ključni enzimi lipaze, pre svega adipozna lipaza triglicerida (eng. *Adipose triglyceride lipase*, ATGL), koja katalizuje prevođenje triglicerida u diacilglicerole i oslobađa prvi molekul masnih kiselina. Pored ATGL, hidrolizu triglicerida u manjoj meri može da vrši i HSL. HSL je dominantno uključena u hidrolizu diacilglicerola, pri čemu dolazi do oslobađanja drugog molekula masne kiseline i monoacilglicerola, čiju konačnu hidrolizu katalizuje enzim lipaza monoacilglicerola (MGL) [43,46].

1.2.2.3. Energetska homeostaza u belom masnom tkivu

Belo masno tkivo ima ključnu ulogu u regulaciji energetske i glukozne homeostaze na nivou čitavog organizma. Lipogeni i lipolitički metabolički putevi su regulisani količinom energije koja se unosi hranom, kao i hormonima, poput insulina i glukagona, ali i kateholamina i polnih hormona [38,47]. Suptilna regulacija i ravnoteža između lipogenih i lipolitičkih puteva u masnom tkivu su izuzetno važni za održavanje energetske homeostaze na nivou čitavog organizma (**Slika 1.6**).

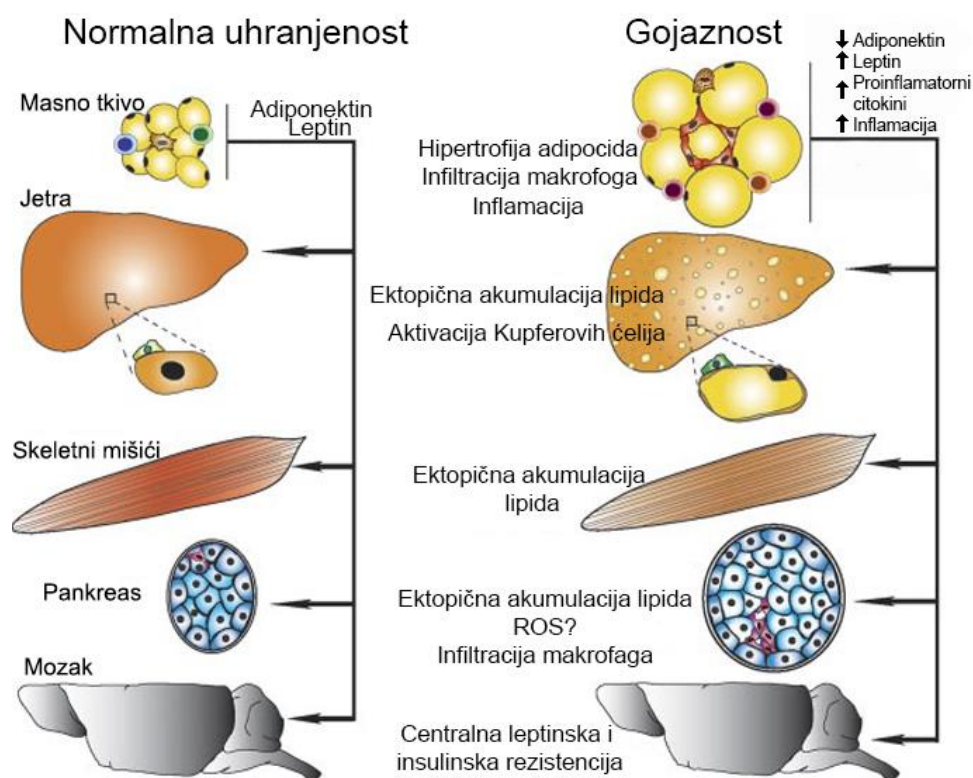


SLIKA 1.6. LIPOGENI I LIPOLITIČKI PUTEVI U BELOM MASNOM TKIVU. U procesu lipogeneze, ugljenohidratni supstrati se prevode u masne kiseline koje se usmeravaju u sintezu triglicerida, koji se zatim ugrađuju u masne kapi. Suprotno tome, u procesu lipolize se trigliceridi razlažu do glicerola i slobodnih masnih kiselina, koji mogu biti utrošeni u procesu oksidacije, ili oslobođeni u cirkulaciju, odakle ih mogu usvojiti druga tkiva. I lipogeni i lipolitički putevi su nutritivno regulisani, kao i hormonima kao što su insulin, glukagon i glukokortikoidi. IR-insulinski receptor; AR-adrenalinski receptor; TG-trigliceridi; LPL-lipaza lipoproteina; FFA-slobodne masne kiseline; ATGL-adipozna lipaza triglicerida; cAMP-ciklični adenozin-monofosfat; PKA-protein-kinaza A (Modifikovano iz Luo i sar. 2016)

Kinaza koju aktivira adenozin-monofosfat (eng. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK) ima centralnu ulogu u regulaciji energetskog metabolizma. Pored metaboličkih aktivnosti, pokazano je da AMPK ima i antiinflamatornu aktivnost, nezavisno od efekata na metabolizam ugljenih hidrata i lipida [48]. AMPK se aktivira u uslovima povećanih zahteva za energijom, poput fizičkog napora, gladovanja, ishemije ili toplotnog šoka. Rezultat aktivnosti AMPK su suprimirani anabolički procesi poput lipogeneze i sinteze triglicerida kao i stimulirana potrošnja masnih kiselina kroz proces β -oksidacije, čime se smanjuje količina cirkulišućih slobodnih masnih kiselina i pozitivno utiče na insulinsku osetljivost [49].

1.2.3. Metabolički poremećaji u masnom tkivu

Kao odgovor na povećan unos kalorija, belo masno tkivo može višestruko da uveća svoju masu. Tu ekspanziju ostvaruje uvećanjem zapremine adipocita, tj. hipertrofijom, ili povećanjem broja adipocita, odnosno hiperplazijom [50]. Pored ova dva mehanizma regulisana na ćelijskom nivou, još jedan način ekspanzije masnog tkiva jeste i remodelovanje vanćelijskog matriksa, koje je regulisano proteinima koje izlučuju miofibroblasti – kolagenima, elastinom i fibronektinom [43]. Prekomerno nakupljanje proteina vanćelijskog matriksa dovodi se u vezu sa prodiranjem proinflamatornih imunskih ćelija, poput M1 makrofaga, pojave fibroze i krunolikih struktura, koje su morfološka karakteristika disfunkcionalnog masnog tkiva i u značajnoj su korelaciji sa insulinskom rezistencijom [43]. Disfunkcionalnost masnog tkiva se kroz parakrinu i endokrinu signalizaciju odražava i na ostale metabolički aktivne vitalne organe, doprinoseći razvoju inflamacije i insulinske rezistencije, kako je prikazano na **Slici 1.7** [51].



SLIKA 1.7. UTICAJ MASNOG TKIVA NA DRUGE ORGANE U GOJAZNOSTI. Nagomilavanje lipida van masnog tkiva doprinosi metaboličkom stresu, narušavajući energetska homeostazu i dovodeći do oštećenja tkiva. U masnoj jetri dolazi do povećane ekspresije proinflatornih citokina, čiji su izvor najvećim delom Kupferove ćelije. Gojaznost takođe dovodi i do infiltracije makrofaga u pankreas, što doprinosi inflamaciji na nivou ovog organa. Gojaznost i stres na nivou endoplazminog retikuluma neurona za posledicu ima razvoj leptinske i insulinske rezistencije u moždanim tkivima, što dodatno propagira razvoj gojaznosti. (Modifikovano iz Solinas i sar. 2010)

Smatra se da je povećan rizik od nastanka kardiometaboličkih bolesti karakterističan za gojazne pacijente u korelaciji sa raspodelom depoa telesnih masti, a u manjoj meri sa ukupnom masom masnog tkiva. Osobe sa androidnim tipom gojaznosti, kod kojih

je najveći deo viška masti pozicioniran centralno, u trbušnoj duplji, u većem su riziku od osoba sa ginoidnim tipom gojaznosti koje imaju masti periferno pozicionirane u gluteofemoralnom regionu [52]. Centralna gojaznost, odnosno nagomilavanje visceralnog masnog tkiva, u vezi je sa insulinskom rezistencijom i metaboličkim bolestima, dok periferna gojaznost nastala usled nakupljanja masti u subkutanim depoima čak može da ima i protektivnu ulogu u kontekstu metaboličkih bolesti [41].

Akumulacija masti u SAT zapravo predstavlja fiziološki pufer za višak energije koji se javlja usled povećanog energetskog unosa i/ili smanjene potrošnje. Ako se prevaziđe kapacitet za skladištenje triglicerida u SAT ili je narušena njegova sposobnost za stvaranje novih adipocita, dolazi do patološkog nakupljanja suvišnih masti u visceralnim depoima. Sa porastom zapremine adipocita u VAT smanjuje se njihova funkcionalnost. Uvećani adipociti su najčešće rezistentni na insulin, hiperlipolitični i rezistentni na antilipolitične efekte insulina, dok sitniji adipociti pokazuju veći kapacitet za preuzimanje slobodnih masnih kiselina i triglicerida iz cirkulacije, čime se sprečava njihovo ektopično nakupljanje [52,53]. Sa povećanjem zapremine adipocita dolazi i do narušenog snabdevanja kiseonikom, što uslovljava ćelijsku smrt adipocita i sledstveno oslobađanje masnih kiselina, reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) i proinflamatornih citokina. Oslobođene masne kiseline i proinflamatorni citokini mogu da dovedu do dalje propagacije inflamacije u preostalim adipocitima, kroz aktivaciju proinflamatornih signalnih puteva poput JAK/STAT (eng. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) i transkripcionog faktora jedra κB (eng. *The nuclear factor- κB* , NF κB), dok sa druge strane mogu direktno da utiču na insulinsku signalizaciju, kroz inhibitornu fosforilaciju serinskih ostataka insulinskog receptora i IRS1. S obzirom da visceralno masno tkivo svoje produkte otpušta u portnu venu jetre, za razliku od subkutanog koje se drenira kroz sistemsku cirkulaciju, ono u većoj meri doprinosi izloženosti jetre slobodnim masnim kiselinama i proinflamatornim adipokinima [52]. Oslobođene masne kiseline, adipokini i ROS iz masnog tkiva se zatim „prelivaju“ u druge organe i dovode do propagacije inflamacije i poremećaja funkcionisanja insulinskog signalnog puta istim mehanizmima, što finalno dovodi do ektopičnog nagomilavanja lipida i razvoja insulinske rezistencije i u jetri, pankreasu, mišićima i mozgu [48]. Konačno, s obzirom na dominantnu ulogu masnog tkiva u regulaciji sistemske homeostaze glukoze i lipida, njegova disfunkcionalnost može dovesti do insulinske rezistencije na sistemskom nivou i razvoja T2DM [22].

Sa aspekta hormonske regulacije funkcije masnog tkiva, VAT ima više glukokortikoidnih receptora i androgenskih receptora, stoga je osetljivije na dejstvo ovih hormona u poređenju sa SAT. Za razliku od glukokortikoidnih i androgenskih receptora, estrogenski receptori su zastupljeniji u SAT, pa estrogeni ostvaruju protektivni metabolički efekat time što stimulišu nakupljanje SAT u gluteofemoralnom regionu. Smanjenje koncentracije estrogena kod žena u menopauzi ili usled bilo kakvih patoloških promena, dovodi do povećane akumulacije VAT [52].

1.3. Skeletni mišići

1.3.1. Strukturna i funkcijska organizacija skeletnih mišića

Skeletni mišići čine oko polovine ukupne telesne mase i njihova osnovna uloga jeste da, generišući i prenoseći silu na kosti i zglobove, omogućе kretanje. Čine ih mišićne ćelije ili mišićna vlakna koja nastaju fuzijom pojedinačnih mioblastu u procesu miogeneze.

Među mišićnim vlaknima razlikujemo oksidativna, sporo-kontrahujuća (Tip 1) i brzo-kontrahujuća (Tip 2), glikolitička vlakna. Oksidativna vlakna sadrže relativno mnogo mitohondrija, otporna su na zamor, bogato su vaskularizovana i zbog toga su crvene boje. Za razliku od njih, glikolitička vlakna sadrže manje mitohondrija, mogu da generišu veliku silu, ali u kratkom trajanju i zbog manje prokrvljenosti su svetlija od oksidativnih, te se označavaju i kao bela vlakna [54]. Veći deo sarkoplazme mišićnih ćelija čine miofibrili sačinjeni od naizmenično raspoređenih aktinskih i miozinskih filamenata koji formiraju sarkomere – osnovne funkcijske jedinice mišića.

Mišićne funkcije nisu ograničene samo na generisanje sile koja omogućuje održavanje stava tela, kretanje i disanje. Oni predstavljaju jedno od najvećih skladišta energije u obliku triglicerida i glikogena, pa su stoga, kao i masno tkivo, veoma bitni za održavanje energetske homeostaze. S obzirom na to da je veoma važno da komuniciraju sa drugim metabolički aktivnim organima, mišići sekretuju signalne molekule miokine, pa predstavljaju i endokrini organ [54].

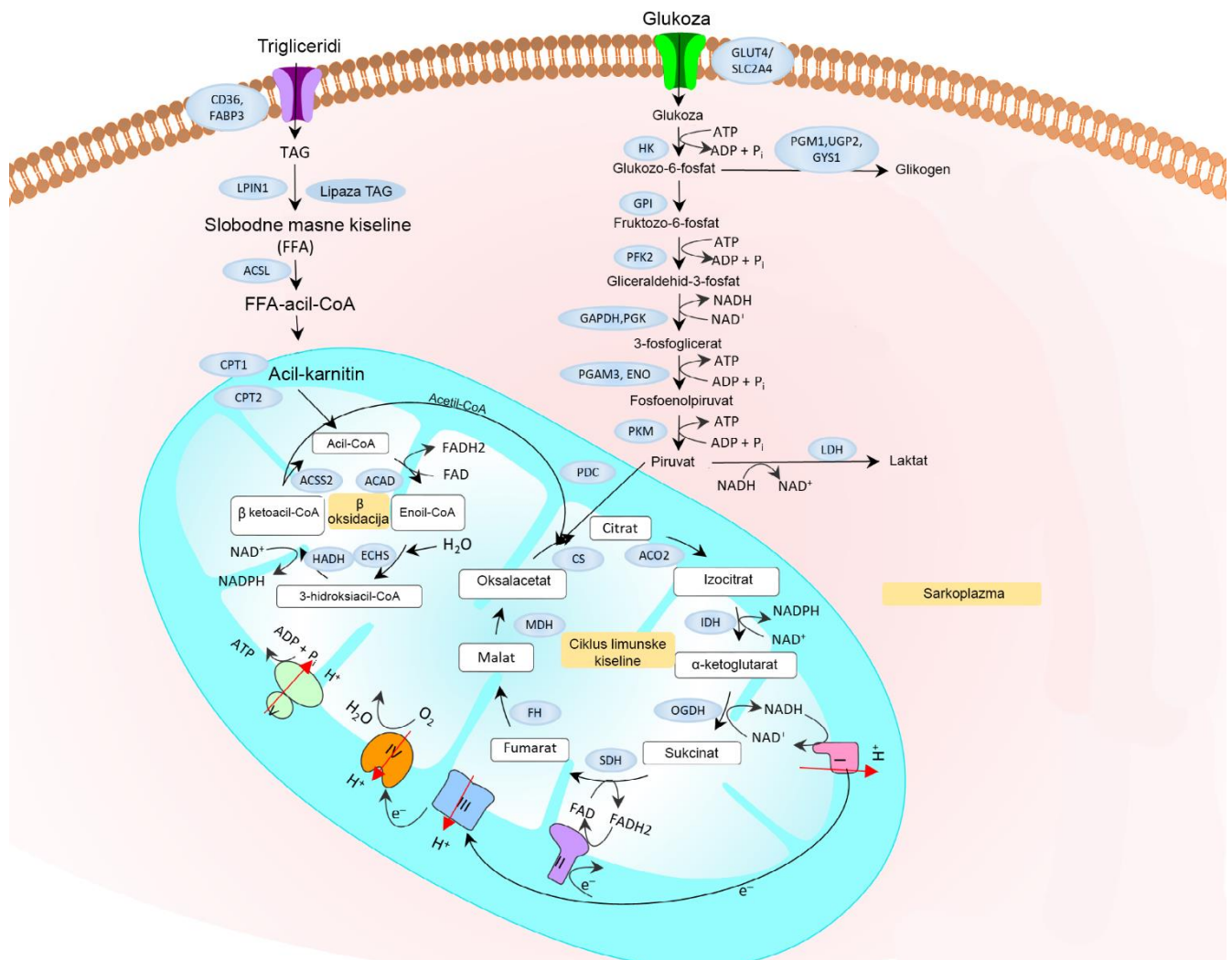
1.3.2. Energetski metabolizam u skeletnim mišićima

Uz jetru i masno tkivo, skeletni mišići predstavljaju važan metabolički centar za održavanje energetske homeostaze organizma i glavno mesto preuzimanja glukoze. Dva metabolička procesa iz kojih se obezbeđuje energija u mišićima, glikoliza i oksidativna fosforilacija, sumarno su predstavljene na **Slici 1.8**.

Glikolitički metabolički put predstavlja primarni izvor energije za mišiće. Prvi korak u ovom putu predstavlja preuzimanje glukoze iz cirkulacije posredstvom GLUT4, koji se nalazi pod kontrolom insulina i AMPK. Tokom glikolize, glukoza prolazi kroz niz transformacija do krajnjeg proizvoda - pirogroždane kiseline, odnosno piruvata, koji u aerobnim uslovima služi kao supstrat za Krebsov ciklus iz koga se generiše energija u formi ATP [55].

U aerobnim uslovima, masne kiseline i piruvat nastao kao proizvod glikolize mogu služiti kao supstrat za proizvodnju energije u mišićnim ćelijama. Razgradnja lipida u mišićima se uglavnom dešava kroz proces β -oksidacije. U mišićnim ćelijama se iz triglicerida, preuzetih iz cirkulacije, oslobađaju masne kiseline. Mišićne ćelije mogu preuzimati i slobodne masne kiseline, pomoću različitih translokaza, kao što su transporteri masnih kiselina (eng. *Fatty acid transporters*, FATP) iz familije SLC27.

Enzim acil-CoA-sintaza vrši prevođenje slobodnih masnih kiselina u citoplazmi u acil-CoA dugog lanca, koga zatim enzim karnitin-palmitoil-transferaza 1 (eng. *Carnitine palmitoyl transferase*, CPT1) prevodi u acil-karnitin dugog lanca, omogućujući njihov prolazak kroz unutrašnju membranu mitohondrija pomoću karnitin-translokaza. U mitohondrijama se obavlja proces β -oksidacije, rezultujući nastankom acetil-koenzima A, koji, kao i piruvat nastao u procesu glikolize, služi kao supstrat u Krebsovom ciklusu. Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) i redukovani flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂), koji nastaju kao proizvodi oba procesa - β -oksidacije i Krebsovog ciklusa, služe kao kofaktori za nastanak ATP molekula kroz elektron-transportni lanac u kristama mitohondrija, u procesu oksidativne fosforilacije (**Slika 1.8**) [55].



SLIKA 1.8. UPROŠČENI PRIKAZ ENERGETSKOG METABOLIZMA U MIŠIČNIM ĆELIJAMA. Piruvat nastao procesom glikolize, koji se odvija u citoplazmi, uz oslobađanje energije u vidu molekula ATP i NADH, u mitohondrijama služi kao supstrat za Krebsov ciklus (na slici Ciklus limunske kiseline). Acetil-CoA, koji nastaje u procesu β-oksidacije polazeći od slobodnih masnih kiselina, takođe može ući u Krebsov ciklus. Energijom bogati molekuli nastali kao intermedijeri Krebsovog ciklusa i β-oksidacije (NADPH i FADH₂), u procesu oksidativne fosforilacije koja se odvija na elektron-transportnom lancima kristi mitohondrija učestvuju u nastanku velikog broja molekula ATP. Oksidativna fosforilacija se odvija u aerobnim uslovima, dok u anaerobnim uslovima piruvat služi kao supstrat za nastanak laktata, uz utrošak NADH nastalog u procesu glikolize (Modifikovano iz Mukund i sar. 2019).

Oksidativni metabolizam u mišićnim ćelijama je strogo regulisan od strane receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom γ (eng. *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ) i njegovog koaktivatora 1 α (eng. *PPAR γ coactivator 1 α* , PGC1 α). PGC1 α se vezuje za sve transkripcione regulatore iz grupe PPAR, povećavajući njihovu aktivnost i ekspresiju gena koje oni regulišu, poput FATP, CD36 i CPT1 [56], kao i aktivnost gena koji kontrolišu biogenezu mitohondrija [57]. Sam PGC1 α se aktivira u direktnom odgovoru na povećanu aktivnost AMPK, ili posrednim uticajem AMPK na aktivnost sirtuina 1 (SIRT1) [57]. SIRT1 je NAD⁺ zavisna

deacetalaza. Sa povećanjem unutarćelijske koncentracije NAD⁺, dolazi do povećanja deacetilazne aktivnosti SIRT1. SIRT1 je uzvodni regulator aktivnosti AMPK, koji dovodi do njene aktivacije kroz deacetilaciju njene kinaze – jetrine kinaze B1 (eng. *liver kinase B1*, LKB1) [58]. Međutim, i sama AMPK može regulisati deacetilaznu aktivnost SIRT1, kroz povećanje unutarćelijske koncentracije NAD⁺, čime utiče na funkciju mitohondrija i održavanje energetskeg balansa. AMPK u mišićima održava energetske homeostazu kroz regulaciju kataboličkih i anaboličkih puteva. Stimulacija AMPK dovodi do suprimiranja brojnih anaboličkih procesa, kao što su sinteza masnih kiselina i holesterola i glukoneogeneza i, sa druge strane, do pokretanja kataboličkih procesa poput preuzimanja masnih kiselina i glukoze. Metaboličke promene u skeletnim mišićima uslovljene aktivacijom AMPK mogu da budu akutne, kroz fosforilaciju enzima uključenih u metabolizam, ili hronične, na nivou regulacije genske ekspresije. Aktivacija AMPK u skeletnim mišićima dovodi do povećane stope preuzimanja glukoze i oksidacije masnih kiselina i do supresije aktivnosti glikogen-sintaza i procesa u kojima se sintetisu proteini. Kroz stimulaciju mitohondrijske biogeneze, AMPK povećava oksidativni kapacitet skeletnih mišića [59].

1.3.3. Metabolička disfunkcija u skeletnim mišićima

Masne kiseline i glukoza predstavljaju primarno „gorivo“ za oksidativni metabolizam u mišićima iz koga se obezbeđuje energija za obavljanje njihovih funkcija. U fiziološkim uslovima, mišići se karakterišu velikom plastičnošću i sposobnošću da smenjuju ova dva izvora energije i prilagođavaju metaboličku aktivnost, u zavisnosti od toga koji je izvor dostupniji [60]. Glavni regulator ovog prilagođavanja dostupnom izvoru energije je insulin. Povišeni nivo insulina postprandijalno podstiče preuzimanje glukoze i njeno metabolisanje, dok nizak nivo insulina i veća dostupnost masnih kiselina u odnosu na glukozu, u stanjima kao što je gladovanje ili dugotrajna fizička aktivnost, favorizuju β -oksidaciju. Usled dislipidemije i dugotrajnih perturbacija lipidnog metabolizma na sistemskom nivou, mišići bivaju dugotrajno izloženi povišenim koncentracijama masnih kiselina, što može da dovede do insulinske rezistencije na nivou ovog tkiva (**Slika 1.9**) [61]. U skeletnim mišićima, insulinska rezistencija se definiše kao narušena sposobnost preuzimanja glukoze i pokretanja glikolitičkog metabolizma i povezana je sa ektopičnom akumulacijom neutralnih lipida u samim mišićima. Akumulacija neutralnih lipida, odnosno triglicerida, predstavlja izvor supstrata za povećanu stopu β -oksidacije, što dovodi do povećanja nivoa oksidativnog stresa, kao i nakupljanja potencijalno toksičnih nusprodukata lipidnog metabolizma, poput lipidnih peroksida, koji mogu usloviti disfunkcionalnost mišićnog tkiva [56]. Takođe, ektopično intramuskularno i perimuskularno masno tkivo predstavljaju izvor proinflamatornih citokina, koji mogu da dovedu do narušavanja funkcionisanja insulinske signalne kaskade. Pretpostavlja se da proinflamatorni citokini dovode do aktivacije različitih kinaza sa Ser/Thr aktivnošću koje vrše

fosforilaciju serinskih ostataka insulinskog receptora i IRS1, inhibirajući ih i tako dovodeći do prekida u prenosu insulinskog signala [62].

Interesantno je da je kod žena sa PCOS dobro dokumentovana smanjena metabolička fleksibilnost, odnosno sposobnost prilagođavanja mišića dostupnom izvoru energije [63] i smanjena insulinska osetljivost do 25%, i to nezavisno od stepena gojaznosti [2].

1.4. Životinjski modeli u izučavanju PCOS i povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu

1.4.1. Životinjski modeli u izučavanju PCOS

Velika prevalenca PCOS i zdravstvene komplikacije do kojih dovodi kod žena u različitim uzrasnim kategorijama, iziskuju istraživanja usmerena na razjašnjavanje etiologije ovog kompleksnog poremećaja, radi razvoja novih i efikasnijih strategija za prevenciju i lečenje. Mada je u pitanju poremećaj koji je jedinstven za ljude i postoje grupacije kliničkih lekara koje insistiraju na tome da istraživanja u ovoj oblasti treba ograničiti samo na humanu populaciju [64], preovlađuje stav da su životinjski modeli od ključnog značaja, kako za dosadašnji, tako i za budući napredak u oblasti [5,65].

Životinjski model relevantan za izučavanje PCOS mora da ima karakteristike uporedive sa onima kod žena sa PCOS, odnosno da zadovoljava najmanje dva kriterijuma ekvivalentna Roterdamskim dijagnostičkim kriterijumima. Do danas su razvijeni brojni animalni modeli na glodarima, primatima i ovcama, koji se uglavnom zasnivaju na prenatalnim ili postnatalnim tretmanima androgenima (testosteron, DHT, DHEA-S) AMH, estradiol-valeratom, ali i inhibitorom aromataze - letrozolom [5]. Pored hormonskih tretmana, razvijeni su i modeli dobijeni genetičkim modifikacijama na glodarima [66], a u novije vreme i kombinacija oba pristupa [67].

Jednokratni tretmani ženske mladunčadi glodara i primata u neonatalnom periodu testosteronom ili DHT ne dovode do nastanka dovoljno izraženih karakteristika koje podsećaju na PCOS [5,68]. Za razliku od toga, subkutana implantacija hormonskih peleta koji kontinuirano oslobađaju niske doze DHT tokom tri meseca ženkama pacova ili miševa starosti 3-4 nedelje, što odgovara periodu pre početka puberteta kod ljudi, dovodi do pojave brojnih endokrinih, metaboličkih i reproduktivnih karakteristika PCOS [69,70]. Sa druge strane, hronično izlaganje niskim dozama DHT započeto kod odraslih ženki pacova rezultira u reproduktivnim i samo nekim metaboličkim karakteristikama PCOS [5].

Životinjski model PCOS se može uspostaviti i peripubertetskim i adultnim tretmanom ženki pacova letrozolom, koji inhibira aromatazu i na taj način dovodi do endogene hiperandrogenemije. Za razliku od tretmana letrozolom u

peripubertetskom periodu, adultni tretman ne dovodi do razvoja gojaznosti i insulinske rezistencije, tako da predstavlja dobar model za reproduktivni fenotip PCOS bez prisustva gojaznosti [5].

Genetička manipulacija pruža mogućnost za temeljne osnovne studije koje mogu u najvećoj meri doprineti razumevanju porekla i nastanka PCOS. Među najduže korišćenim modelima su miševi sa potpuno ili tkivno specifično eliminisanim genom za androgenski receptor (eng. *androgen receptor knock-out*, ARKO). Kombinovanjem ARKO modela sa onima u kojima su karakteristike nalik na PCOS izazvane tretmanom DHT, u skorašnjim studijama je napravljen značajan pomak u razumevanju značaja prisustva hiperandrogenemije za nastanak, kao i uloge određenih tkiva u različitim fazama razvoja PCOS. Tako, danas prepoznajemo mozak kao jedno od ciljnih tkiva za delovanje androgena u razvoju PCOS, dok nam za detaljnije upoznavanje patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi PCOS služe drugi transgeni modeli, poput nokauta za insulinski ili leptinski receptor u anoreksigenim proopiomelanokortinskim neuronima lučnog jedra hipotalamusa. Na sličan način, transgeni modeli pružaju platformu za istraživanje doprinosa gena u kojima su genetičke studije na ženama detektovale postojanje više varijanti poput *ErbB4*, *Cyp17*, *Dennd1a*, radi boljeg razumevanja njihove uloge u nastanku i razvoju PCOS [5,66].

Glodarski modeli PCOS imaju brojne prednosti koje se ogledaju pre svega u njihovoj relativno lakoj dostupnosti i niskim eksperimentalnim troškovima, kao mogućnosti invazivnijeg eksperimentalnog pristupa, u odnosu na humane studije. Međutim, treba imati u vidu i njihova ograničenja, i pri ekstrapolaciji rezultata dobijenih na glodarima ne gubiti iz vida da su oni multiovulatorne životinje sa kratkim estrusnim ciklusom u poređenju sa humanim menstrualnim ciklusom, kao i da ih karakteristišu trudnoće sa više fetusa.

Modeli PCOS, dobijeni genetičkom manipulacijom ili izlaganjima androgenima, letrozolu ili AMH u različitim razvojnim fazama, nedvosmisleno pokazuju da je višak androgena okidač za reproduktivne, metaboličke i bihevioralne manifestacije sindroma. Međutim, velika fenotipska varijabilnost primećena među njima ukazuje na značajan doprinos drugih faktora, naročito u ključnim razvojnim fazama, kakve su prenatalna, rana postnatalna i pubertetska [66].

Kao i u dosadašnjim istraživanjima PCOS, životinjski modeli ostaju od velikog značaja za buduće razumevanje kompleksnih etiopatofiziologija ovog sindroma, kao i za izučavanje novih potencijalnih terapijskih meta.

1.4.2. Životinjski model povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu

Gojaznost predstavlja jedan od najvećih savremenih problema javnog zdravlja, a kao glavni faktori koji leže u njenoj osnovi uzimaju se genetička predisponiranost, loše navike u ishrani i slaba fizička aktivnost.

Pretpostavka da uslovi sredine tokom ranih razvojnih faza kod ljudi mogu da dovedu do gojaznosti i asociраних hroničnih bolesti dospela je u istraživački fokus devedesetih godina prošlog veka [71]. Danas je široko prihvaćeno da nutritivni i hormonski status tokom embrionskog i fetusnog razvoja ima važnu modulatornu ulogu u ekspresiji genoma. Međutim, kod većine sisara, plastičnost genoma se zadržava i u ranoj postnatalnoj fazi, pa i tada nutritivni status i drugi sredinski faktori mogu da utiču na remodeliranje metabolizma i održavanje energetske homeostaze i u odrasloj dobi [72,73].

Kod glodara se unos kalorija u ranom postnatalnom periodu može manipulirati kroz prilagođavanje broja mladunaca u leglu. Smanjenje veličine legla neposredno po rođenju dovodi do povećanog unosa hrane od strane mladunaca, s obzirom na veću količinu dostupnog mleka tokom tog kritičnog perioda [74]. Pored dostupnosti veće količine mleka, pokazano je da je mleko majki koje doje mala legla energetski bogatije, usled povećanog sadržaja lipida, naročito triglicerida [75]. Zbog toga mladunci gajeni u malim leglima po prestanku sisanja i nakon odvajanja od majki pokazuju povećanu telesnu masu, a stepen te prekomerne uhranjenosti varira u zavisnosti od vrste i soja, kao i broja mladunaca u leglu [71]. Osim što imaju veću telesnu masu od vršnjaka gajenih u leglima sa prosečnim brojem mladunaca (oko 12) nakon odvajanja od majki nastavljaju da konzumiraju veću količinu čvrste hrane [71]. Ova hiperfagija se objašnjava promenama na nivou oreksigenih neurona hipotalamusa koji eksprimiraju neuropeptid Y, i regulišu apetit, kao i na nivou hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalne (HPA) osovine i regulatornih puteva u masnom tkivu [71]. Bitna razlika između modela dobijenih visokokalorijskom ili visokomasnom ishranom u adultnom periodu i onih koji se dobijaju povećanim unosom kalorija u ranom postnatalnom periodu kroz smanjenje veličine legla, ogleda se u tome što oni gajeni u malim leglima imaju značajno veću masu od kontrolnih čak i kada se hrane standardnom laboratorijskom hranom, dok se efekat visokokalorijske hrane može delimično ili u potpunosti poništiti prebacivanjem na standardnu hranu [71]. Ovim se potvrđuje da je efekat gajenja u malom leglu dugotrajan u pogledu kalorijskog unosa kod ovih životinja. Pored toga, dok gojaznost izazvana visokokalorijskom ishranom kod glodara odgovara ekstremnim oblicima gojaznosti u humanoј populaciji, povećan kalorijski unos u ranom uzrastu odražava umereno povećanje telesne mase [71]. Uz metaboličke i poremećaje na nivou centralnog nervnog sistema, dosadašnje studije su pokazale i doprinos hormona fenotipu karakterističnom za mala legla. Leptin, insulin i glukokortikoidi povezani su sa regulacijom apetita i homeostazom glukoze, dok hipotiroidizam favorizuje nastanak i razvoj gojaznosti. Takođe su prijavljene promene metabolizma u jetri, promene u ponašanju i reproduktivne disfunkcije [76].

Glodari gajeni u malim leglima, koji u adultnom periodu imaju veću masu od odgovarajućih kontrola pogodan su model za izučavanje posledica umerenog povećanja telesne mase kod adolescenata i odraslih, kao i adaptivnih mehanizama u njenoj osnovi.

2. Cilj

PCOS je primarno reproduktivni poremećaj sa hiperandrogenemijom u osnovi, praćen metaboličkim komplikacijama poput gojaznosti, dislipidemije, smanjene osjetljivosti na insulin i povećanog rizika od razvijanja T2DM ili gestacijskog dijabetesa [3]. Iako je hiperandrogenemija osnova za nastanak sindroma, smatra se da i insulinska rezistencija ima značajnu ulogu u patogenezi, budući da se beleži kod 62-95% pacijentkinja sa PCOS, zavisno od njihovog indeksa telesne mase (eng. *Body mass index*, BMI), i da gojaznost dodatno pogoršava poremećene metaboličke procese [25]. Prve manifestacije PCOS se uočavaju kod devojčica prepubertetskog uzrasta, a brojna istraživanja ukazuju da ih povećanje BMI tokom ovog osjetljivog perioda predisponira za kasniji razvoj sindroma i metaboličke komplikacije povezane sa njim tokom puberteta i odrasle dobi [32,36].

Polazeći od prethodno navedenog, cilj ove doktorske disertacije je da se na animalnom modelu PCOS, indukovanom tretmanom 5 α -dihidrotestosteronom (DHT), ispita doprinos povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu razvoju metaboličkih poremećaja udruženih sa sindromom. U skladu sa time, definisani su sledeći specifični ciljevi:

- Da se analiziraju morfološki (masa tela, masa masnog tkiva), fiziološki i biohemijski parametri (koncentracija triglicerida, slobodnih masnih kiselina, glukoze i insulina, insulinska osjetljivost), kao i reproduktivne karakteristike (masa jajnika i materice, histološka karakterizacija jajnika) životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT;
- Da se histološki i morfometrijski okarakterišu visceralno i subkutano masno tkivo;
- Da se analizira ekspresija ključnih molekula - „čvorišta“ signalnog puta sa receptora za insulin u visceralnom masnom tkivu (IRS1, AKT, ERK1/2) i skeletnim mišićima (IRS1, AKT);
- Da se ispita aktivacija ključnog energetskog senzora AMPK u visceralnom i subkutanom masnom tkivu, kao i mišićima;
- Da se ispita ekspresija enzima uključenih u metabolizam lipida u visceralnom (FAS, ACC, SCD1, PEPCK, LPL, HSL) i subkutanom masnom tkivu (ACC, PEPCK, LPL, HSL), kao i skeletnim mišićima (SIRT1, PGC1 α , CPT1-b, FATP1, ATGL, perilipin-2 i SCD1);
- Da se ispita ekspresija markera inflamacije (IL1 β , IL6) i oksidativnog stresa (SOD2, malonil-dialdehid) u skeletnim mišićima.

Uvođenje faktora povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu u ustanovljeni animalni model PCOS trebalo bi da doprinese boljem razumevanju sudejstva između gojaznosti u prepubertetskom periodu sa hiperandrogenemijom i njihov doprinos razvoju ovog sindroma.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalni dizajn i tretman životinja

U studiji su korišćene ženke pacova soja Wistar. Usled sukcesivnog uvođenja ispitivanih tretmana, studija je podeljena na dva dela:

- formiranje malih legala, čime je uveden faktor povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu (2. dan)
- kontinuirani tretman DHT, čime je uveden faktor hiperandrogenemije (22. dan).

Drugog dana nakon okota formirana su mala legla, koja su se sastojala od po tri mladunčeta sa majkom u laktaciji, dok su legla prosečne veličine, sa po deset mladunaca oba pola korišćena kao kontrolna. Veličinom legla je manipulirano sa ciljem da se postigne povećan kalorijski unos kod životinja u malim leglima, odnosno, normalan kalorijski unos kod životinja iz legala uobičajene veličine [71]. Prilikom odvajanja od majki, 22. dana starosti, životinjama su, prema uputstvu proizvođača, u predelu vrata subkutano postavljani peleti koji su sadržali 7,5 mg 5 α -dihidrotosterona koji se tokom 90 dana tretmana kontinuirano oslobađao u dnevnoj dozi od 83 μ g ili placebo peleti koji nisu sadržali aktivnu supstancu (Innovative Research of America, SAD). Doza je odabirana tako da odgovara količini cirkulišućeg DHT-a kod žena kod kojih je dijagnostikovano PCOS [70,77]. Formirane su četiri eksperimentalne grupe koje su brojale po šest jedinki: životinje iz normalnih legala, kojima su implantirani placebo peleti (NL-Placebo), životinje iz normalnih legala, kojima su implantirani DHT peleti (NL-DHT) i odgovarajuće grupe životinja iz malih legala (ML-Placebo i ML-DHT).

Sve životinje su imale *ad libitum* pristup standardnoj laboratorijskoj peletiranoj hrani za pacove (Veterinarski zavod, Subotica, Srbija) i česmenskoj vodi. Kako bi se izbegao stres socijalne izolacije, boravile su po tri, u standardnim transparentnim kavezima, u prostoriji sa kontrolisanom temperaturom (22 ± 2 °C), konstantnom vlažnošću vazduha i strogo definisanim dnevno-noćnim ritmom sa smenom na 12h, pri čemu je svetlo uključivano u 7h. Kontinuirano su praćeni unos hrane i telesna masa životinja, a energetski unos je računat prema formuli:

$$\text{Energetski unos} = (\text{masa pojedene hrane (g)} \times 11 \text{ kJ}) / 3$$

Faza estrusnog ciklusa je određivana na osnovu preovlađujućeg tipa ćelija u vaginalnim brisevima životinja uzimanih dnevno, počevši od desete nedelje tretmana [78].

Sve procedure nad životinjama su izvedene u skladu sa smernicama Evropske komisije za zaštitu životinja (Direktiva 2010/63/EU) i odobrene od strane Etičke komisije Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (dozvola broj 01-02/19).

3.1. Sakupljanje krvi, priprema seruma i izolovanje tkiva za analize

Po završetku hormonskog tretmana u trajanju od 90 dana, životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom na giljotini (Harvard Apparatus, SAD), u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa. Iz kaveza je uklanjana hrana 6 h pred žrtvovanje.

Krv iz trupa je sakupljena u epruvete. Nakon inkubacije u trajanju od 40 min na sobnoj temperaturi, krv je centrifugirana na $1600\times g$, 10 min na $14\text{ }^{\circ}\text{C}$, a serum, koji se nakon centrifugiranja izdvojio kao supernatant, alikvotiran je i do analiza čuvan na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Retroperitonealni depo VAT, anteriorni depo SAT i *musculus gastrocnemius*, kao tipični skeletni mišić izgrađen dominantno od glikolitičkih vlakana, precizno su izolovani, ispirani u fiziološkom rastvoru, mereni, trenutno zamrzavani u tečnom azotu i do upotrebe u molekularno-biološkim analizama čuvani na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Delovi tkiva za histološke analize su odmah izdvajani i fiksirani u 4% paraformaldehidu ili Bouenovom fiksativu, nakon čega su dalje procesuirani prema odgovarajućim protokolima.

3.2. Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara

3.2.1. Procena sistemske insulinske osetljivosti

Sistemska insulinska osetljivost je procenjivana na osnovu rezultata intraperitoneumskih testova opterećenja glukozom (ipGTT) i HOMA indeksa (eng. *Homeostasis model assessment*).

Tri dana pred odvajanje od majki i implantaciju peleta, kao i tri dana pred žrtvovanje, sprovedeni su ipGT testovi. Nakon šestočasovnog gladovanja, životinjama je intraperitonealno injektiran rastvor glukoze (2 g/kg telesne mase). Krv za merenje koncentracije glukoze je uzimana zasecanjem vene na vrhu repa. Koncentracija glukoze je merena pomoću automatskog analizatora Accu-Chek i odgovarajućih test traka za glukozu (Roche, Nemačka), neposredno pre injektiranja glukoze, kao i 15, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injektiranja. Izmerene koncentracije glukoze su korišćene za konstruisanje glukoznih krivi u funkciji vremena, a površina ispod krive (eng. *Area under curve*, AUC) računata prema trapezoidnom pravilu (GraphPad Prism 8, SAD) uzimana je za parametar procene stanja insulinske osetljivosti. HOMA indeks je računat na osnovu koncentracija glukoze i insulina izmerenih na žrtvovanju, prema formuli [79]:

$$[\text{insulin (mIU/L)} \times \text{glukoza (mmol/L)}] / 22,5.$$

3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze, triglicerida, slobodnih masnih kiselina i insulina u serumu

Koncentracija glukoze je merena neposredno pre žrtvovanja, iz pune krvi, pomoću automatskog analizatora Accu-Chek i odgovarajućih test traka za glukozu (Roche, Nemačka).

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u serumu je merena pomoću Randox NEFA kompleta (Randox Laboratories Ltd., UK), praćenjem uputstva proizvođača. Za određivanje koncentracije triglicerida je korišćen komplet OSR60118 (Beckman Coulter, Austrija). Obe analize su vršene uslužno, u komercijalnoj laboratoriji VetLab u Beogradu, na hemijskom analizatoru Olympus AU400 (Olympus, Japan).

Koncentracija insulina u serumu je merena uslužno, u laboratoriji Instituta za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu. Za merenje je korišćen radioimunoesej razvijen od strane INEP laboratorije, sa pragom osetljivosti od 0,06 mU/L, dok je intra- i interesejska varijabilnost iznosila 2,5% i 7,7%, respektivno.

3.3. Histološke analize

3.3.1. Histološka analiza jajnika

Jajnik je po izolovanju ispiran u fiziološkom rastvoru, fiksiran u Buenovom fiksativu tokom 48h, dehidratisan u rastućem koncentracionom gradijentu etanola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%), prosvetljivani u ksilolu i kalupljen u parafinske blokove. Serije preseka debljine 5 μ m su montirane na predmetna stakla i bojena hematoksilinom i eozinom. Mikrografije za analizu su pravljene na radnoj stanici koja se sastoji od Olympus BX 51 mikroskopa (Olympus, Japan), motorizovanog manipulatora (Prior Scientific Instruments, UK) za postepeno pomeranje preparata po x i y osi i CCD kamere (PixeLink, SAD) povezane na računar. Sistem je kontrolisan pomoću softverskog paketa VIS-Visiopharm Integrator System 3.2.7.0 (Visiopharm, Danska). Korišćen je objektiv sa uvećanjem 10 \times .

3.3.2. Histološka i morfometrijska analiza visceralnog i subkutanog masnog tkiva

Nakon fiksiranja u 4% paraformaldehidu, uzorci VAT i SAT za histološku analizu su dehidratirani u rastućem koncentracionom gradijentu etanola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%), prosvetljivani u ksilolu i kalupljeni u parafinske blokove. Pravljeni su preseki VAT i SAT debljine 7 μ m, odnosno 10 μ m i bojani hematoksilinom i eozinom. Mikrografije za morfometrijsku analizu su pravljene na svetlosnom mikroskopu Leitz DMRB opremljenom CCD kamerom Leica MC190 HD, kontrolisanom pomoću

softvera Leica Application Suite (LAS) 4.11.0 (Leica Microsystems, Nemačka), korišćenjem objektiva 20×. Površina i prečnik adipocita su mereni korišćenjem Adiposoft 1.16 dodatka za ImageJ softver, u manuelnom režimu rada, sa kalibracijom izvršenom merenjem razmernika sa neobrađenih mikrografija. Svaki rezultat je pregledan i oštećene ćelije ili strukture koje su podsećale na ćelije su ručno isključivane iz analize. Analizirano je po 100 ćelija na nasumično napravljene 3 mikrografije po preseku, 3 preseka po životinji (6 životinja po eksperimentalnoj grupi).

3.4. Priprema uzoraka za *Western blot* analizu

3.4.1. Priprema ćelijskih frakcija visceralnog masnog tkiva

Zamrznuto retroperitonealno VAT je homogenizovano u hladnom homogenizacionom puferu (20 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM EGTA-Na₂, 10% glicerol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 20 mM Na₂MoO₄, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5 mM Na₄O₂P₇, 20 mM β-glicerofosfat i 25 mM NaF), u odnosu 1:1, pomoću homogenizera (Janke-Kunkel Ultra Turrax, IKA, Nemačka), pri brzini od 8000 obrtaja/min.

Homogenati su ceđeni kroz gazu i centrifugirani na 2000×g, 15 min na 4 °C, nakon čega je uklanjan površinski sloj masnoće.

Dobijeni supernatanti S1 su korišćeni za izolaciju citosolne i mitohondrijske frakcije proteina, dok su iz taloga T1 izolovani jedarni proteini.

Ponovnim centrifugiranjem S1 na 10000×g, 25 min na 4 °C, razdvajani su supernatant S2 koji sadrži citosolnu i mikrozomsku frakciju proteina i talog sa mitohondrijskim proteinima. S2 je centrifugiran na 150000×g, 90 min na 4 °C, nakon čega je izdvajan supernatant koji je korišćen kao čista citosolna frakcija proteina.

3.4.2. Priprema ukupnih proteina iz subkutanog masnog tkiva

Ukupni proteini su izolovani iz subkutanog masnog tkiva TRIzol reagensom (Invitrogen, SAD), prateći uputstva proizvođača. Po izdvajanju vodene faze koja sadrži RNK, organskoj fazi je dodavan etanol, pa su uzorci centrifugirani na 2000×g, 15 min na 4 °C. U tako dobijeni fenolno-etanolni supernatant je dodavan izopropanol, pa su uzorci centrifugirani na 12000×g, 15 min na 4 °C, kako bi se istaložili proteini. Proteinski talog je zatim dva puta ispiran u 0,3 M guanidin-hidrohloridu u 95% etanolu, centrifugiranjem na 7500×g, 5 min na 4 °C, a onda i u 100% etanolu na isti način. Finalni proteinski talog je kratko sušen na vazduhu, zatim rastvaran u 1% SDS energičnim mešanjem i inkubiran 1 h na 60 °C, a potom čuvan na -70 °C do daljih analiza.

3.4.3. Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta iz *m. gastrocnemius*

Zamrzuto tkivo *m. gastrocnemius* je homogenizovano u hladnom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA- Na_2 , 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% natrijum deoksiholat, 2 mM DTT, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 2,5 mM $\text{Na}_4\text{O}_2\text{P}_7$ i 10 mM NaF) u odnosu 1:4, pomoću Janke-Kunkel Ultra Turrax homogenizera (IKA, Nemačka), pri brzini od 9500 obrtaja/min. Dobijeni homogenati su sonifikovani 3×5 s sa pauzama od po 30 s (1A, 50/60 Hz, 30% amplituda, Hielscher Ultrasound Processor, Nemačka), a zatim inkubirani 30 min na ledu uz često intenzivno mešanje i vorteksovanje. Supernatanti dobijeni centrifugiranjem na $1400 \times g$, 35 min na 4°C su korišćeni kao ukupan ćelijski ekstrakti mišićnog tkiva, a do dalje upotrebe su skladišteni na -70°C .

3.4.4. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima za *Western blot* analizu

Koncentracija proteina izolovanih iz VAT, SAT i *m. gastrocnemius* je merena kolorimetrijski, metodom po Loriju [80], korišćenjem albumina iz goveđeg seruma (eng. *Bovine serum albumin*, BSA, Sigma Aldrich, UK) kao standarda za konstruisanje kalibracione krive. U uzorke adekvatno razblažene destilovanom vodom i standardne rastvore BSA je dodavan reagens C (2% rastvor Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH + 0,1% vodeni rastvor $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 2% vodeni rastvor Na-tartarata). Nakon petnaestominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, dodavan je i petostruko razblažen Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, UK), a zatim je usledila inkubacija od još 30 min na sobnoj temperaturi, u mraku, uz povremeno vorteksovanje uzoraka. Apsorbanca razvijene boje je merena na talasnoj dužini od 670 nm na Multiskan Spektrum spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD), a koncentracije su računane spram krive konstruisane na osnovu apsorbanci standardnih rastvora. Sva merenja su vršena u triplikatu.

3.5. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu

Proteinski uzorci su pripremani za elektroforezu petominutnom inkubacijom na 100 °C u jednakoj zapremini redukujućeg pufera za pripremu uzorka (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol i 10% 2-merkaptoetanol) sa 1% brom-fenol plave boje. 10-50 µg proteina iz uzoraka je razdvajano prema molekulskoj masi denaturišućom elektroforezom na 7,5-12% poliakrilamidnim gelovima, spram referentnih proteina poznate molekulske mase u opsegu 10-170 kDa (Thermo Scientific, SAD). Elektroforeze su vršene u aparaturi Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, SAD), u puferu za rezervoare (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1% SDS i 192 mM glicin), pri konstantnom naponu od 120 V, na sobnoj temperaturi.

3.6. Western blot i semi-kvantitativna analiza imunoreaktivnih traka na blotu

Po završenoj elektroforezi, razdvojeni proteini su prebacivani na polivinilidendifluoridne (PVDF) membrane (Immobilon-FL, Millipore, SAD), polusuvim transferom, korišćenjem aparature Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, SAD), pri konstantnom naponu od 25 V i jačini struje do 1 A, u trajanju od 40 min. Uspešnost transfera je proveravana bojenjem membrana 1% rastvorom Ponceau S boje u 5% sirćetnoj kiselini. Nespecifično vezivanje antitela za membranu je sprečavano jednoipčasovnim blokiranjem membrana u 5% rastvoru BSA ili odmašćenog mleka u PBS puferu (engl. *Phosphate buffer saline*; 1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl, pH 7,2) na sobnoj temperaturi.

Membrane su preko noći inkubirane sa odgovarajućim rastvorima primarnih antitela (Tabela 3.1) na 4 °C uz blago mešanje, pa po četiri puta po 5 min ispirane 0,1% rastvorom deterdženta Tween 20 u PBS puferu (PBS-T rastvor) energičnim mućkanjem. Zatim su inkubirane 90 min na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-zečjim IgG antitelom (1:20000, ab6721, Abcam, UK) ili anti-mišjim IgG antitelom (1:20000, ab97046, Abcam, UK), konjugovanim sa peroksidazom rena, pa ponovo ispirane PBS-T rastvorom. Imunopozitivne trake su vizualizovane hemiluminiscentnom metodom, korišćenjem 1% rastvora vodonik peroksida u luminolu za pobuđivanje aktivnosti peroksidaze rena i snimljene na aparatu iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Po vizualizaciji i snimanju imunoreaktivnih traka za svaki ciljni protein, membrane su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi u 0,2 M NaOH, uz energično mućkanje, kako bi se uklonilo vezano antitelo, a potom blokirane i inkubirane sa narednim primarnim antitelom.

Relativna optička gustina (intenzitet) imunoreaktivnih traka je određivana pomoću iBright softvera za analizu (Thermo Fisher Scientific, SAD). Intenzitet imunoreaktivnih traka za ciljne proteine je normalizovana na intenzitet traka za proteine koji su korišćeni kao kontrola nanošenja uzoraka na gel (β-aktin ili β-tubulin), kako bi se neutralisale greške pri određivanju koncentracije proteina i

nanošenju uzoraka na gel. Zatim su normalizovani intenziteti traka deljeni sa srednjom vrednošću intenziteta traka za kontrolne uzorke sa date membrane, da se kompenzuju varijacije u efikasnosti transfera proteina sa gela na membranu i u efikasnosti vezivanja antitela.

TABELA 3.1. KARAKTERISTIKE PRIMARNIH ANTITELA KORIŠĆENIH ZA KVANTIFIKACIJU PROTEINSKE EKSPRESIJE WESTERN BLOT METODOM

Ciljni protein	Molekulska masa (kDa)	Korišćeno razblaženje	Poreklo	Proizvođač i kataloški broj
pIRS1 (Ser307)	130	1:500	kunić	Abcam, ab5599
IRS1	180	1:1000	kunić	Cell Signaling, 2382s
pAKT1/2/3 (Ser473)	56/60/62	1:500	miš	Santa Cruz Biotechnology, sc-514032
pAKT1/2/3 (Thr308)	56/60/62	1:500	miš	Santa Cruz Biotechnology, sc-271966
AKT1/2/3	56/60/62	1:500	miš	Santa Cruz Biotechnology, sc-81434
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	42/44	1:1000	kunić	Cell Signaling, 9101s
ERK1/2	42/44	1:1000	kunić	Cell Signaling, 9102s
GLUT4	50	1:500	kunić	Cell Signaling, 2213s
pAMPK α (Thr172)	62	1:1000	kunić	Cell Signaling, 2535s
AMPK α 1/2	62	1:1000	kunić	Santa Cruz Biotechnology, sc-25792
PGC1 α	92	1:1000	kunić	Abcam, ab54481
Sirtuin1	120	1:1000	kunić	Santa Cruz Biotechnology, sc-15404
Perilipin 2	51	1:1000	kunić	Novus Biologicals, NB110-40877
SOD2	26	1:2000	kunić	Abcam, ab13533
β -aktin	43	1:10000	kunić	Abcam, ab8227
β -tubulin	52	1:1000	miš	Razvijeno u lab. dr U. Euteneuer

3.7. Izolovanje, kvantifikacija i provera kvaliteta izolovane RNK

Ukupna RNK iz VAT, SAT i *m. gastrocnemius* je izolovana TRIzol reagensom (Invitrogen, SAD), prema uputstvu proizvođača, uz modifikacije. Tkivo je homogenizovano u reagensu u odnosu 1:10, potom sonifikovano 2-3 \times 10 s sa pauzama od po 30 s (1 A, 50/60 Hz, 30% amplituda, Hielscher Ultrasound Processor, Nemačka) na ledu. Nakon petominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, dodavana je odgovarajuća zapremina hloroforma, pa su uzorci centrifugirani na 12000 \times g, 15 min na 4 °C. Izdvajana gornja vodena faza je prenošena u čiste tube i dodavana je odgovarajuća zapremina izopropanola, a zatim su uzorci inkubirani na -20 °C preko noći, kako bi se istaložila RNK. Narednog dana su uzorci centrifugirani na 14000 \times g, 15 min na 4 °C, a talozi RNK su ispirani u 75% etanolu, ponovo centrifugirani na 14000 \times g, 15 min na 4 °C i kratko sušeni na vazduhu. Finalni talozi su rastvarani u dietil-pirokarbonatom (DEPC) tretiranoj vodi, energičnim mešanjem i desetominutnom inkubacijom na 60 °C, pa čuvani do daljih analiza na -70 °C.

Koncentracija izolovane RNK je određivana spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 260 nm na nanofotometru N60 (Implen GmbH, Nemačka). Odnos apsorbanaci A_{260}/A_{230} korišćen je kao pokazatelj čistoće izolovane RNK u pogledu ostataka organskih rastvarača korišćenih za izolaciju i smatran je zadovoljavajućim ako je bio $>1,8$.

Radi provere integriteta, izolovana RNK je razdvajana elektroforezom na 1% agaroznom gelu u TBE puferu (1,1 M Tris-HCl pH 8,3, 900 mM borna kiselina i 25 mM EDTA) uz dodatak fluorescentne interkalirajuće boje etidijum bromida, pri konstantnom naponu od 100 V. Trake su vizualizovane pod UV svetlom i snimane na XR sistemu GelDoc (Bio-Rad Laboratories, SAD).

3.8. Reakcija reverzne transkripcije

Izolovana RNK je prevođena u komplementarnu DNK (cDNK) korišćenjem *High Capacity Reverse Transcription* kompleta (Applied Biosystems, SAD), prema uputstvu proizvođača. Po 2 μg RNK je dodavano u reakcionu smešu koja se sastojala od odgovarajućeg pufera, četiri tipa dezoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), nasumičnih oligonukleotidnih prajmera i enzima reverzne transkriptaze. Reverzna transkripcija se odigravala u sledećem temperaturnom režimu: 10 min inkubacije na 25 °C, inkubacija u trajanju od 120 min na 37 °C, a zatim zaustavljanje reakcije petominutnim zagrevanjem do 85 °C. Tako dobijena cDNK je razblaživana do radne koncentracije od 5 ng/ μL i do daljih analiza čuvana na -20 °C.

3.9. Relativna kvantifikacija ekspresije gena

Relativna kvantifikacija genske ekspresije je vršena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qPCR). Jedan deo ciljnih gena je ispitivan korišćenjem *SybrGreen* tehnologije (Tabela 3.2), dok su za ostale korišćene komercijalno dostupne *TaqMan* probe proizvođača Applied Biosystems (Assay-on-Demand Gene Expression Products), prikazane u Tabeli 3.3.

TABELA 3.2. OZNAKE GENA I SEKVENCE PRAJMERA KORIŠĆENIH ZA KVANTIFIKACIJU GENSKE EKSPRESIJE QPCR METODOM (SYBRGREEN TEHNOLOGIJA)

Naziv gena	Oznaka gena	Uzvodni prajmer	Nizvodni prajmer
Steroil-CoA desaturaza 1	<i>Scd1</i>	5'-TGG TGC TCT TTC CCT GTT TGC-3'	5'-TGG GCT TTG GAA GGT GGA CA-3'
Sintaza masnih kiselina (FAS)	<i>Fasn</i>	5'-TTC CTC TGG GAT GTA CCC TCT A-3'	5'-CCG AGT GAA TGA GCA CAG TTT-3'
Karnitin palmitoil transferaza 1	<i>Cpt1b</i>	5'-CCA GGC AAA GAG ACA GAC TTG-3'	5'-GCC AAA CCT TGA AGA AGC GA-3'
Transporter masnih kiselina 1	<i>Fatp1</i>	5'-CCC AAG TGG ATA CAA CAG GCA-3'	5'-GGT CTA GAA AGA AGA GCC GGT C-3'
Interleukin 1 β	<i>Il1b</i>	5'-AGC AGC TTT CGA CAG TGA GG-3'	5'-CTC CAC GGG CAA GAC ATA GG-3'
Interleukin 6	<i>Il6</i>	5'-GTT TCT CTC CGC AAG AGA CTT-3'	5'-ATA CTG GTC TGT TGT GGG TGG-3'
Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza	<i>Hprt</i>	5'-CAG TCC CAG CGT GAT TA-3'	5'-AGC AAG TCT TTC AGT CCT GTC-3'

TABELA 3.3. OZNAKE GENA I IDENTIFIKACIONI BROJEVI TAQMAN PROBA KORIŠĆENIH ZA KVANTIFIKACIJU GENSKE EKSPRESIJE QPCR METODOM (TAQMAN TEHNOLOGIJA)

Naziv gena	Oznaka gena	ID broj TaqMan probe
Lipaza lipoproteina	<i>Lpl</i>	Rn00561482_m1
Hormon senzitivna lipaza (HSL)	<i>Lipe</i>	Rn00563444_m1
Lipaza triglicerida adipocita (ATGL)	<i>Pnpla2</i>	Rn01479969_m1
Fosfoenolpiruvatna karboksikinaza (PEPCK)	<i>Pck1</i>	Rn00563444_m1
Acetil-CoA karboksilaza (ACC)	<i>Acaca</i>	Rn00573474_m1
TATA-vezujući protein	<i>Tbp</i>	Rn01455646_m1
β 2 mikroglobulin	<i>B2m</i>	Rn00560865_m1

Sve reakcije su izvođene u duplikatu, na uređaju Quant Studio 3 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, SAD).

Reakciona smeša za *SybrGreen* reakcije ukupne zapremine 10 μ L se sastojala od *Power SybrGreen master mix-a* (Applied Biosystems, SAD), 20 ng cDNK matrice i odgovarajućeg para prajmera. Temperaturni profil reakcija je bio sledeći: 2 min inkubacije na 50 °C, 10 min inkubacije na 95 °C, nakon čega je usledilo 60 ciklusa u trajanju od po 15 s na 95 °C i inkubacija u trajanju od 60 s na 60 °C. Na kraju svake *SybrGreen* reakcije analizirane su krive topljenja, kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo artefakata poput dimerizovanih prajmera i kontaminacije genomskom DNK.

Reakciona smeša za *TaqMan* reakcije sadržala je *TaqMan universal PCR master mix*, 20 ng cDNK matrice i odgovarajuće *TaqMan* probe u ukupnoj zapremini od 10 μ L. Uslovi odvijanja *TaqMan* qPCR reakcije su bili sledeći: 2 min na 50 °C za aktivaciju enzima uracil-N-glikozilaze, potom 10 min na 95 °C za aktivaciju *AmpliTaq Gold*

DNK polimeraze, 40 ciklusa od po 15 s na 95 °C za denaturaciju dimera i 60 s na 60 °C u toku kojih dolazi do hibridizacije i umnožavanja.

Kao endogene kontrole korišćeni su geni čija ekspresija je stabilna i ne menja se u zavisnosti od primenjenog tretmana (eng. *housekeeping genes*). Relativna kvantifikacija genske ekspresije je vršena komparativnom $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metodom [81]. Vrednosti C_t (engl. *Cycle threshold*), koje označavaju broj ciklusa u qPCR reakciji u kom se detektuje fluorescentni signal, za gene od interesa su normalizovane prema C_t vrednostima endogenih kontrola za isti uzorak, a zatim i prema kalibracionom uzorku.

3.10. Procena stepena lipidne peroksidacije

Stepen lipidne peroksidacije u mišićnom tkivu je meren pomoću Lipid Peroxidation (MDA) Assay kompleta (Merck, Nemačka), prateći uputstva proizvođača. Ukratko, 10 mg zamrznutog tkiva je homogenizovano u puferu za lizu, koji je sadržao butilovani hidroksi-toluen (BHT), pa su uzorci potom centrifugirani. Izdvojeni supernatant, kao i standardni rastvori su mešani sa rastvorom tiobarbiturne kiseline (TBA) i inkubirani 1 h na 95 °C. Apsorbanca razvijene crvene boje merena je na talasnoj dužini od 532 nm, a koncentracije malonil-dialdehida, kao markera lipidne peroksidacije su računane spram krive konstruisane na osnovu apsorbanci izmerenih za standardne rastvore.

3.11. Statistička obrada podataka

Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) ili standardna greška (SEM).

Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjima praćena Šidakovim *post hoc* testom je korišćena da se uporedi prirast mase životinja u normalnim i malim leglima za vreme perioda sisanja, dok su koncentracije glukoze merene tokom ipGT testa pred odvajanje od majki i implantaciju peleta upoređivane Studentovim *t*-testom.

Efekti smanjenja veličine legla i tretmana DHT-om, kao i interakcija ovih faktora je ispitivana dvofaktorskom ANOVA. U slučaju da je utvrđena značajna interakcija između ispitivanih faktora, primenjivan je Tukijev *post hoc* test da se ispituju razlike između eksperimentalnih grupa, a za značajne su smatrane razlike sa $p < 0,05$.

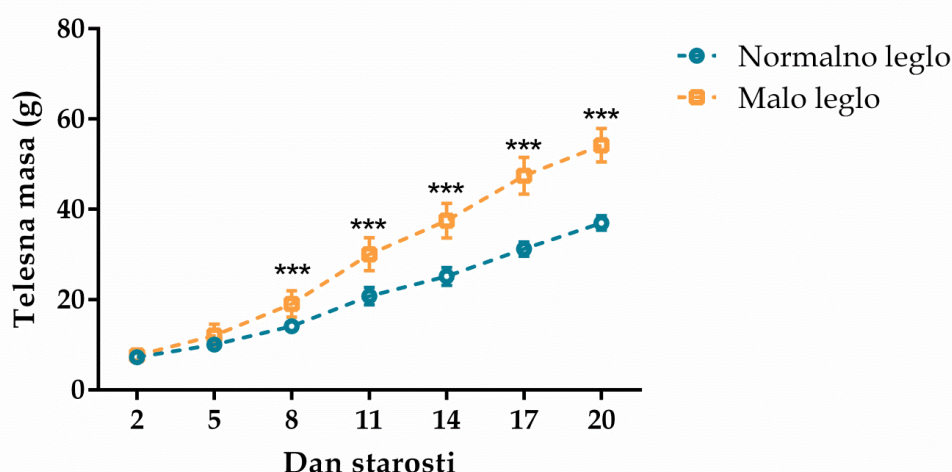
Deo analiza je obavljen upotrebom softvera STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., SAD), dok je za drugi deo analiza i za izradu grafičkih prikaza korišćen softver GraphPad Prism 8 (GraphPad, SAD).

4. Rezultati

4.1. Karakterizacija modela na osnovu fizioloških i biohemijskih parametara

4.1.1. Dinamika rasta tokom perioda sisanja i parametri uhranjenosti životinja

Na **Slici 4.1** prikazani su rezultati merenja prirasta telesne mase ženki pacova gajenih i normalnim (NL) i malim leglima (ML). Životinje koje su gajene u malim leglima su imale značajno veću telesnu masu (** $p < 0,001$) u odnosu na životinje gajene u normalnim leglima od osmog dana po rođenju, a postignuta razlika u masi se održala sve do 22. dana starosti, kada su odvojene od majki.



SLIKA 4.1. PRIRAST MASE ŽENKI GAJENIH U MALIM, NASPRAM ŽENKI GAJENIH U NORMALNIM LEGLIMA TOKOM PERIODA SISANJA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=12$ životinja po grupi). Podaci su analizirani dvofaktorskom ANOVA analizom sa ponovljenim merenjima, praćenom Šidakovim *post hoc* testom. Zvezdice označavaju značajne razlike između masa životinja u malim leglima i životinja u leglima normalne veličine (** $p < 0,001$).

Prilikom odvajanja od majki 22. dana starosti, životinjama su implantirani placebo ili DHT-oslobađajući peleti. Nakon tretmana u trajanju od 90 dana, analizirani su efekti smanjene veličine legla, DHT tretmana, kao i kombinacije ova dva faktora na kalorijski unos eksperimentalnih životinja. Životinje gajene u malim leglima su i nakon prelaska na čvrstu hranu zadržale povećan unos energije, što se odrazilo na njihovu masu i udeo visceralnog masnog tkiva nakon tretmana (**Tabela 4.1**). Dvofaktorskom ANOVA analizom je utvrđen značajan efekat smanjene veličine legla na unos energije nakon odvajanja od majki ($F(1,56)=14,31$; $p < 0,001$). Telesna

masa je bila povećana pod uticajem smanjenja veličine legla ($F(1,20)=13,48$; $p<0,001$), kao i DHT tretmana ($F(1,20)=5,50$; $p<0,05$), dok je na povećanje apsolutne i relativne mase visceralnog masnog tkiva značajno uticalo samo smanjenje veličine legla ($F(1,20)=21,61$; $p<0,001$; $F(1,20)=19,48$; $p<0,001$, respektivno). Ni jedan od ispitivanih faktora nije značajno uticao na apsolutnu i relativnu masu subkutanog masnog tkiva. Energetski unos i fiziološki parametri uhranjenosti su prikazani u **Tabeli 4.1**.

TABELA 4.1. ENERGETSKI UNOS I FIZIOLOŠKI PARAMETRI UHRANJENOSTI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

	NL-Placebo	NL-DHT	ML-Placebo	ML-DHT	Dvofaktorska ANOVA		
					SVL	DHT	SVL x DHT
Energetski unos (kJ/dan/kavez)	475,50 ± 10,00	467,60 ± 15,50	512,40 ± 13,60	531,10 ± 13,40	p<0,001	ns	ns
Masa tela (g)	230,00 ± 4,60	241,00 ± 11,00	252,33 ± 4,24	283,33 ± 13,00	p<0,001	p<0,05	ns
Masa VAT (g)	7,00 ± 0,60	8,40 ± 1,40	14,00 ± 1,40	12,00 ± 1,10	p<0,001	ns	ns
Masa VAT/masa tela (x100)	3,00 ± 0,20	3,30 ± 0,40	5,30 ± 0,50	4,50 ± 0,40	p<0,01	ns	ns
Masa SAT (g)	2,10 ± 0,30	1,80 ± 0,40	2,00 ± 0,17	2,2 ± 0,3	ns	ns	ns
Masa SAT/masa tela (x100)	0,90 ± 0,10	0,70 ± 0,10	0,80 ± 0,10	0,80 ± 0,10	ns	ns	ns

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla; ns - statistički neznačajna razlika.

4.1.2. Reproduktivne karakteristike kao potvrda animalnog modela

Na osnovu preovlađujućeg tipa ćelija u razmazima vaginalnih briseva, koji su uzimani dnevno počevši od desete nedelje tretmana, utvrđeno je da su sve životinje DHT tretirane bile aciklične, u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa, uz dominaciju leukocita u vaginalnim brisevima. Životinje sa placebo peletima zadržale su normalnu cikličnost, sa estrusnim ciklusom koji je trajao 4-5 dana.

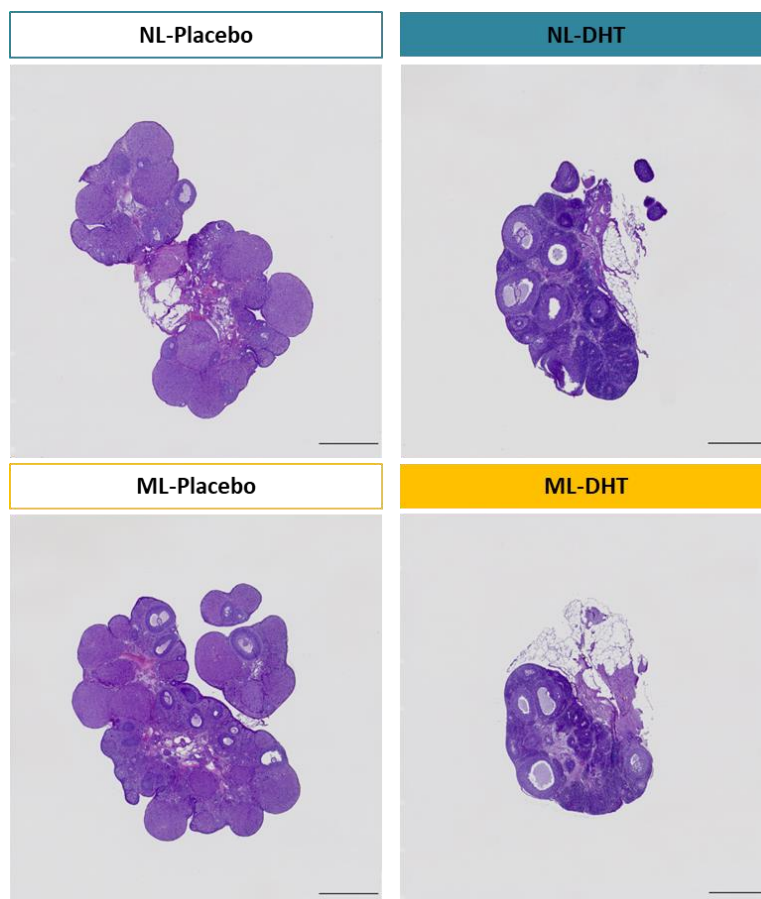
Dvofaktorskom ANOVA analizom je pokazan značajan efekat DHT tretmana na smanjenje apsolutne i relativne (u odnosu na masu tela) mase jajnika ($F(1,20)=23,99$; $p<0,001$ i $F(1,20)=29,24$; $p<0,001$, respektivno), kao na i smanjenje apsolutne i relativne mase materice ($F(1,20)=24,14$; $p<0,001$ i $F(1,20)=28,11$; $p<0,001$, respektivno), kao što je prikazano u **Tabeli 4.2**. Uočen je i trend smanjenja relativne mase materice usled interakcije smanjene veličine legla sa DHT tretmanom, ali ova vrednost nije dostigla statističku značajnost ($F(1,20)=3,56$; $p=0,07$).

TABELA 4.2. MASE REPRODUKTIVNIH ORGANA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

	NL-Placebo	NL-DHT	ML-Placebo	ML-DHT	Dvofaktorska ANOVA		
					SVL	DHT	SVL x DHT
Masa jajnika (g)	0,048 ± 0,003	0,027 ± 0,006	0,043 ± 0,002	0,025 ± 0,004	ns	p<0,001	ns
Masa jajnika/masa tela (x1000)	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,085 ± 0,01	ns	p<0,001	ns
Masa materice (g)	0,49 ± 0,06	0,20 ± 0,03	0,39 ± 0,05	0,24 ± 0,04	ns	p<0,001	ns
Masa materice/masa tela (x1000)	2,10 ± 0,22	0,85 ± 0,14	1,60 ± 0,22	0,86 ± 0,16	ns	p<0,001	ns

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla; ns - statistički neznačajna razlika.

Kod obe grupe životinja sa placebo peletima usled nenarušenog odvijanja estrusnih ciklusa se na histološkim presecima jajnika uočava nekoliko generacija žutih tela, kao i zdravi folikuli u svim stadijumima folikulogeneze i retki atretični folikuli. Ovarijumi svih DHT tretiranih životinja su manji, bez prisustva žutih tela. U njima se uočava veći broj atretičnih folikula, od kojih neki poprimaju morfologiju intersticijalnih, steroid-produkujućih žlezda (Slika 4.2).



SLIKA 4.2. HISTOLOŠKI PRESECI JAJNIKA NAKON BOJENJA HEMATOKSILINOM I EOZINOM. Na histološkim presecima jajnika životinja sa placebo peletima se uočavaju brojna žuta tela, koja svedoče o odvijanju ovulacija. Na presecima jajnika DHT tretiranih životinja žuta tela odsustvuju i uočava se više atretičnih folikula nego kod životinja sa placebo peletima, od kojih neki poprimaju morfologiju intersticijalnih, steroid-produkujućih žlezda. Dužina razmernika na mikrografijama je 1 mm. NL - normalno leglo; ML - malo leglo.

4.1.3. Biohemijski parametri lipidnog metabolizma i insulinske osetljivosti

Ni jedan od ispitivanih tretmana nije značajno uticao na koncentraciju triglicerida i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji životinja (**Tabela 4.3**). Međutim, sistemska insulinska osetljivost je bila narušena kod životinja gajenih u malom leglu i tretiranih DHT (**Tabela 4.3**). Mada ispitivani faktori nisu imali uticaja na glikemiju, koncentracija insulina u serumu je bila promenjena pod uticajem smanjene veličine legla ($F(1,20)=22,13$; $p<0,001$), DHT tretmana ($F(1,20)=8,86$; $p<0,01$), kao i usled kombinacije ova dva faktora ($F(1,20)=4,58$; $p<0,05$). Tukijev *post hoc* test je detektovao značajno povećanje koncentracije insulina u ML-DHT grupi u poređenju sa svim ostalim grupama ($p<0,001$ vs. NL-Placebo, NL-DHT i ML-Placebo). U skladu sa time, i vrednosti HOMA indeksa su bile promenjene pod uticajem smanjene veličine legla, DHT tretmana i njihove interakcije (SVL: $F(1,20)=21,55$; $p<0,001$; DHT: $F(1,20)=7,82$; $p<0,05$; interakcija: $F(1,20)=5,07$; $p<0,05$), a Tukijev *post hoc* test je detektovao

značajno povećanje vrednosti HOMA indeksa u ML-DHT grupi u poređenju sa svim ostalim grupama ($p < 0,001$ vs. NL-Placebo i NL-DHT; $p < 0,01$ vs. ML-Placebo).

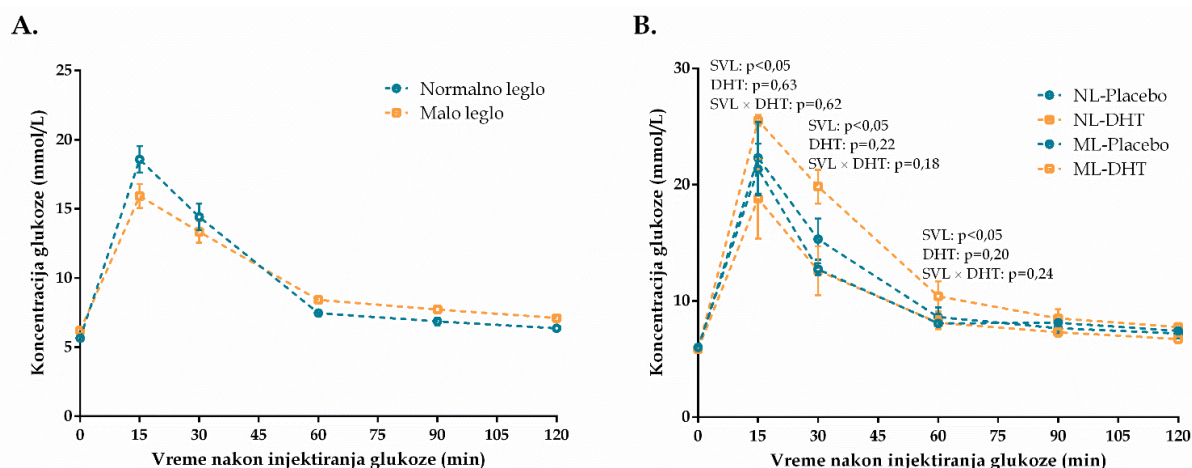
TABELA 4.3. PARAMETRI LIPIDNOG METABOLIZMA I SISTEMSKE INSULINSKE OSETLJIVOSTI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

	NL-Placebo	NL-DHT	ML-Placebo	ML-DHT	Dvofaktorska ANOVA		
					SVL	DHT	SVL x DHT
Trigliceridi (mmol/L)	0,87 ± 0,09	0,88 ± 0,11	0,73 ± 0,03	0,93 ± 0,07	ns	ns	ns
Slobodne masne kiseline (mmol/L)	1,53 ± 0,29	1,22 ± 0,18	1,15 ± 0,21	1,20 ± 0,25	ns	ns	ns
Glukoza (mmol/L)	6,00 ± 0,18	5,82 ± 0,14	5,85 ± 0,14	5,83 ± 0,16	ns	ns	ns
Insulin (μU/mL)	18,00 ± 1,26	16,60 ± 1,53	23,32 ± 1,23	39,87 ± 5,40 ^{***, ###, \$\$\$}	<0,001	<0,01	<0,001
HOMA indeks	4,46 ± 0,16	4,85 ± 0,59	6,07 ± 0,34	10,50 ± 1,80 ^{***, ###, \$\$\$}	<0,001	<0,05	<0,05
ipGTT AUC	1248,83 ± 49,14	1173,42 ± 118,38	1441,60 ± 45,36	1556,67 ± 87,98	<0,01	ns	ns

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. Oznaka ^{***} $p < 0,001$ vs. NL-Placebo ; ^{###} $p < 0,001$ vs. NL-DHT; ^{\$\$\$} $p < 0,01$, ^{\$\$\$} $p < 0,001$ vs. ML-Placebo; NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla; ns - statistički neznačajna razlika.

Intraperitoneumski testovi tolerancije glukoze izvedeni su kada su životinje bile stare 19 dana, neposredno pred implantaciju peleta i odvajanje od majki, i na kraju studije, nakon tromesečnog DHT tretmana. Ovaj test podrazumeva davanje glukoze, koje uslovljava nagli skok glikemije, nakon čega dolazi do izlučivanja insulina, koji dovodi do postepenog spuštanja koncentracije glukoze i njene stabilizacije na početnim vrednostima. Izmenjena dinamika preuzimanja glukoze iz cirkulacije je pokazatelj narušenog stanja insulinske osetljivosti.

Površina ispod krive (AUC) izračunata na osnovu parametara izmerenih tokom ipGTT izvedenog na životinjama starim 19 dana, neposredno pre implantacije placebo i hormonskih peleta, nije se razlikovala između životinja gajenih u malom leglu i životinja gajenih u leglu normalne veličine (Slika 4.3A). Međutim, rezultati ipGTT izvedenog na životinjama koje su bile izložene konstantnom delovanju DHT tokom tri meseca su pokazali da je AUC vrednost (Tabela 4.3) pod značajnim uticajem smanjenja veličine legla, mada nisu detektovane značajne međugrupne razlike (Slika 4.3B).



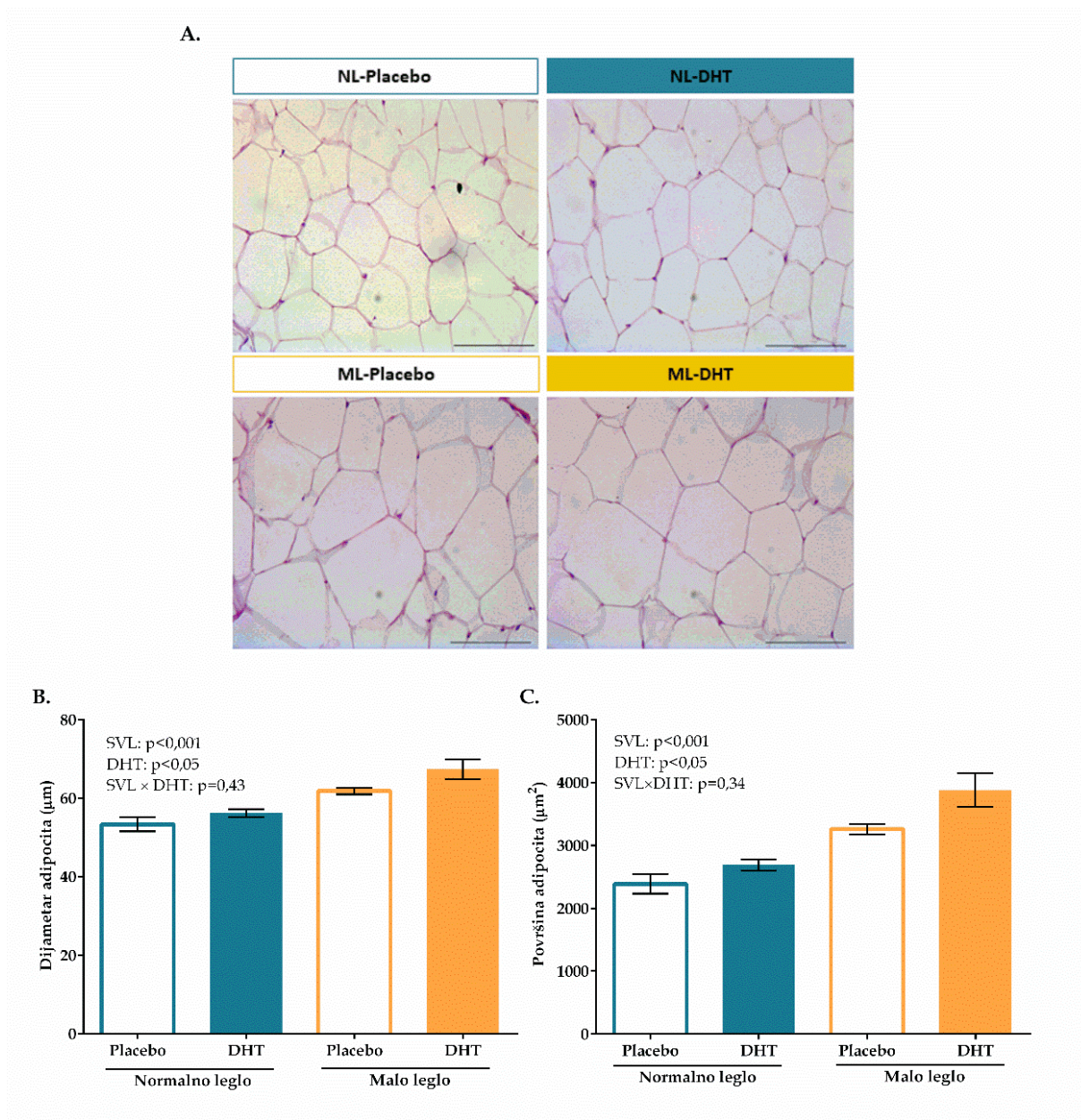
SLIKA 4.3. ZAVISNOST KONCENTRACIJA GLUKOZE U SERUMU (MMOL/L) OD VREMENA (MIN) TOKOM IZVOĐENJA IPGT TESTOVA. A. ipGTT pre implantacije peleta (n=12 životinja po grupi); vrednosti su upoređene Studentovim *t*-testom. **B.** ipGTT na kraju eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi); Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla.

Efekat smanjenja veličine legla na sistemsku insulinsku osetljivost ženske mladunčadi se ogleda i u značajno većem porastu vrednosti glukoze 15 minuta nakon injektiranja ($F(1,17)=4,57$; $p<0,05$), kao i u sporijem vraćanju na početne vrednosti (30 min: $F(1,17)=8,02$; $p<0,05$; 60 min: $F(1,17)=4,07$; $p<0,05$), prilikom ipGTT izvedenog pred kraj eksperimenta, što ukazuje na narušenu efikasnost preuzimanja glukoze od strane perifernih tkiva (**Slika 4.3B**).

4.2. Visceralno masno tkivo

4.2.1. Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva

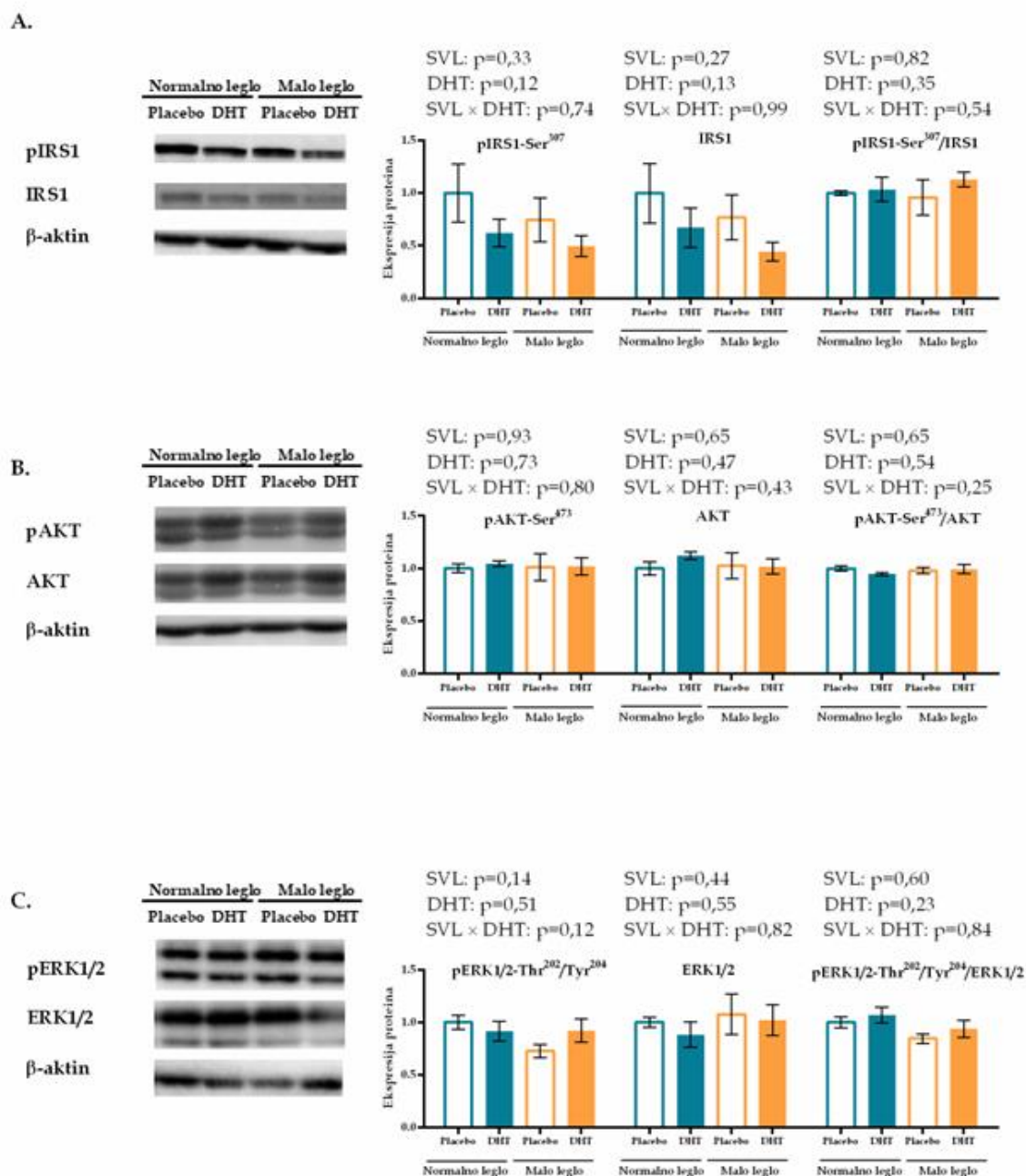
Na **Slici 4.4A** prikazani su preseki visceralnog masnog tkiva, na kojima se uočava da su i smanjena veličina legla i DHT tretman doveli do povećanja veličine adipocita. Morfometrijskom analizom i statističkom obradom podataka potvrđen je značajan efekat oba faktora na povećanje dijametra adipocita ($F(1,20)=34,50$; $p<0,001$; $F(1,20)=6,19$; $p<0,05$, respektivno), kao i njihove površine ($F(1,20)=38,16$; $p<0,001$; $F(1,20)=7,64$; $p<0,05$, respektivno), što je prikazano na **Slici 4.4B** i **4.4C**.



SLIKA 4.4. HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA ADIPOCITA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU. A. Preseci visceralnog masnog tkiva obojeni hematoksilinom i eozinom **B.** Dijametar adipocita **C.** Površina adipocita. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. Dužina razmernika na mikrografijama je $100 \mu\text{m}$. NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla.

4.2.2. Insulinska signalizacija u visceralnom masnom tkivu

Očuvanost insulinskog signalnog puta u visceralnom masnom tkivu je procenjavana na osnovu ekspresije ukupnog IRS1, pIRS1-Ser³⁰⁷, kao i na osnovu ekspresije ukupnihi fosforilisanih formi AKT i ERK. Kao što je prikazano na **Slici 4.5**, ni jedan od tretmana nije doveo do značajne razlike u ekspresiji ukupnih formi, kao ni inhibitory ili aktivatorno fosforilisanih formi ovih tirozinskih kinaza.

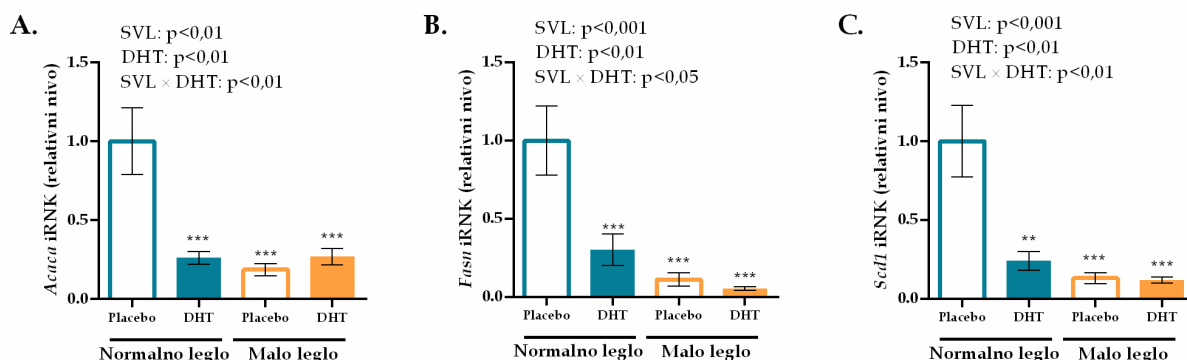


SLIKA 4.5. INSULINSKA SIGNALIZACIJA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU **A.** Ekspresija pIRS1-Ser³⁰⁷, IRS1 i njihov relativni odnos sa reprezentativnim *Western blot*-om; **B.** Nivo ekspresije pAKT-Ser⁴⁷³, AKT i njihov relativni odnos sa reprezentativnim *Western blot*-om; **C.** Nivo ekspresije pERK1/2-Tre²⁰²/Tyr²⁰⁴, ERK1/2 i njihov relativni odnos sa reprezentativnim *Western blot*-om. Ekspresija proteina je analizirana *Western blot* metodom u citosolnoj frakciji visceralnog masnog tkiva i

normalizovana spram β -aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

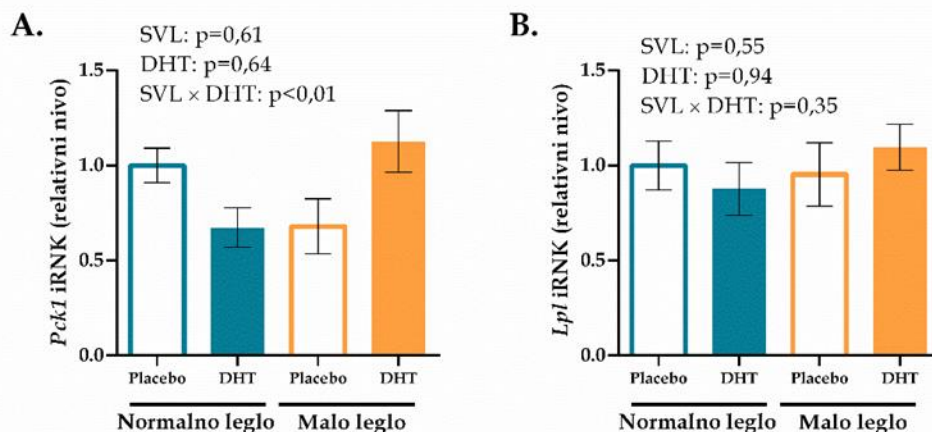
4.2.3. Lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu

Na **Slici 4.6** prikazani su rezultati merenja relativne ekspresije gena koji kodiraju enzime *de novo* lipogeneze acetil-CoA-karboksilaze (ACC), sintaze masnih kiselina (FAS) i stearoil-CoA-desaturaza (SCD). Ispitivani faktori - smanjena veličina legla i DHT tretman doveli su do drastičnog smanjenja ekspresije gena koji kodiraju ispitivane enzime. Dvofaktorskom ANOVA analizom je detektovan značajan efekat smanjene veličine legla, DHT tretmana i njihove interakcije na ekspresiju gena koji kodiraju ACC (SVL: $F(1,20)=12,93$; $p<0,01$; DHT: $F(1,20)=8,70$; $p<0,01$; SVL \times DHT: $F(1,20)=13,35$; $p<0,01$), FAS (SVL: $F(1,20)=21,69$; $p<0,001$; DHT: $F(1,20)=9,45$; $p<0,01$; SVL \times DHT: $F(1,20)=6,57$; $p<0,05$), i SCD1 (SVL: $F(1,20)=17,10$; $p<0,001$; DHT: $F(1,20)=10,37$; $p<0,01$; SVL \times DHT: $F(1,20)=9,82$; $p<0,01$). *Post hoc* testom je pokazano značajno smanjenje ekspresije gena koji kodiraju enzime *de novo* lipogeneze u VAT pacova svih eksperimentalnih grupa u poređenju sa grupom NL-Placebo ($p<0,001$).



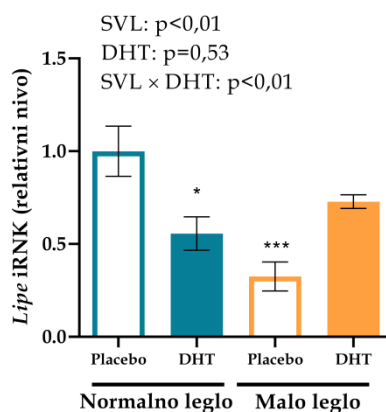
SLIKA 4.6. MARKERI DE NOVO LIPOGENEZE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU. Relativni nivo iRNK za (A) ACC (B) FAS i (C) SCD1. *Hprt* ili *Tbp* su korišćeni kao endogene kontrole za normalizaciju nivoa iRNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. NL-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

Kada su u pitanju geni koji kodiraju enzime uključene u sintezu triglicerida iz cirkulišućih masnih kiselina, ispitivani tretmani nisu uticali na ekspresiju gena koji kodira lipazu lipoproteina (LPL), dok je na ekspresiju gena za fosfoenolpiruvatnu karboksikinazu (PEPCK) značajan efekat imala samo interakcija ispitivanih faktora ($F(1,20)=5,89$; $p<0,01$), mada međugrupne razlike nisu detektovane *post hoc* testom u visceralnom masnom tkivu ovih životinja (**Slika 4.7**).



SLIKA 4.7. MARKERI SINTEZE TRIGLICERIDA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU. Relativni nivo iRNAK za (A) PEPCK i (B) LPL. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. SVL - smanjena veličina legla.

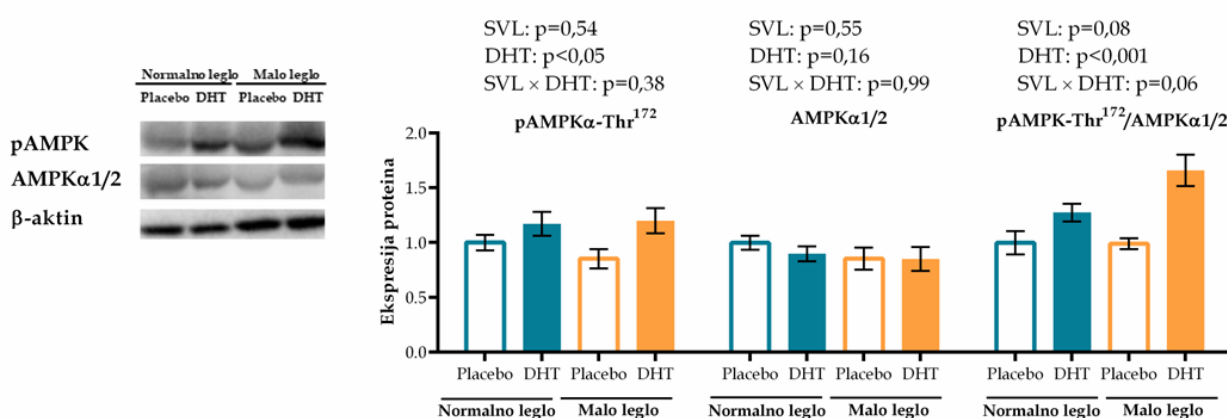
Međutim, ekspresija gena koji kodira lipazu osetljivu na hormone (HSL), enzim uključen u lipolizu, je bio pod značajnim uticajem faktora smanjenja veličine legla ($F(1,20)=8,36$; $p<0,01$), kao i interakcije ovog faktora i DHT tretmana ($F(1,20)=13,50$; $p<0,01$) u visceralnom masnom tkivu. *Post hoc* testom je utvrđeno značajno smanjenje ekspresije ovog lipolitičkog markera u VAT ženki pacova NL-DHT i ML-Placebo grupe, u poređenju sa NL-Placebo grupom ($p<0,05$ i $p<0,001$, respektivno; Slika 4.8).



SLIKA 4.8 RELATIVNA EKSPRESIJA GENA ZA HSL KAO MARKER LIPOLIZE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije dva faktora. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. NL-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

4.2.4. Ekspresija i aktivacija energetskog senzora AMPK u visceralnom masnom tkivu

AMPK je ključni regulator ćelijske energetske homeostaze i aktivira se kada postoji potreba za energijom. Ekspresija AMPK na nivou proteina u visceralnom masnom tkivu se nije menjala pod uticajem smanjene veličine legla, DHT tretmana, niti pod uticajem interakcije ova dva faktora. Međutim, povećao se nivo aktivirane AMPK sa fosforilacijom na treoninu na poziciji 172 pod efektom DHT tretmana ($F(1,20)=7,06$; $p<0,05$), kao i relativni odnos aktivirane i ukupne forme ovog enzima ($F(1,20)=21,84$; $p<0,001$). *Post hoc* test je pokazao da je efekat interakcije faktora na relativan odnos fosforilisane i ukupne forme AMPK na pragu statističke značajnosti ($F(1,20)=3,87$; $p=0,06$) kao što se može videti na **Slici 4.9**.

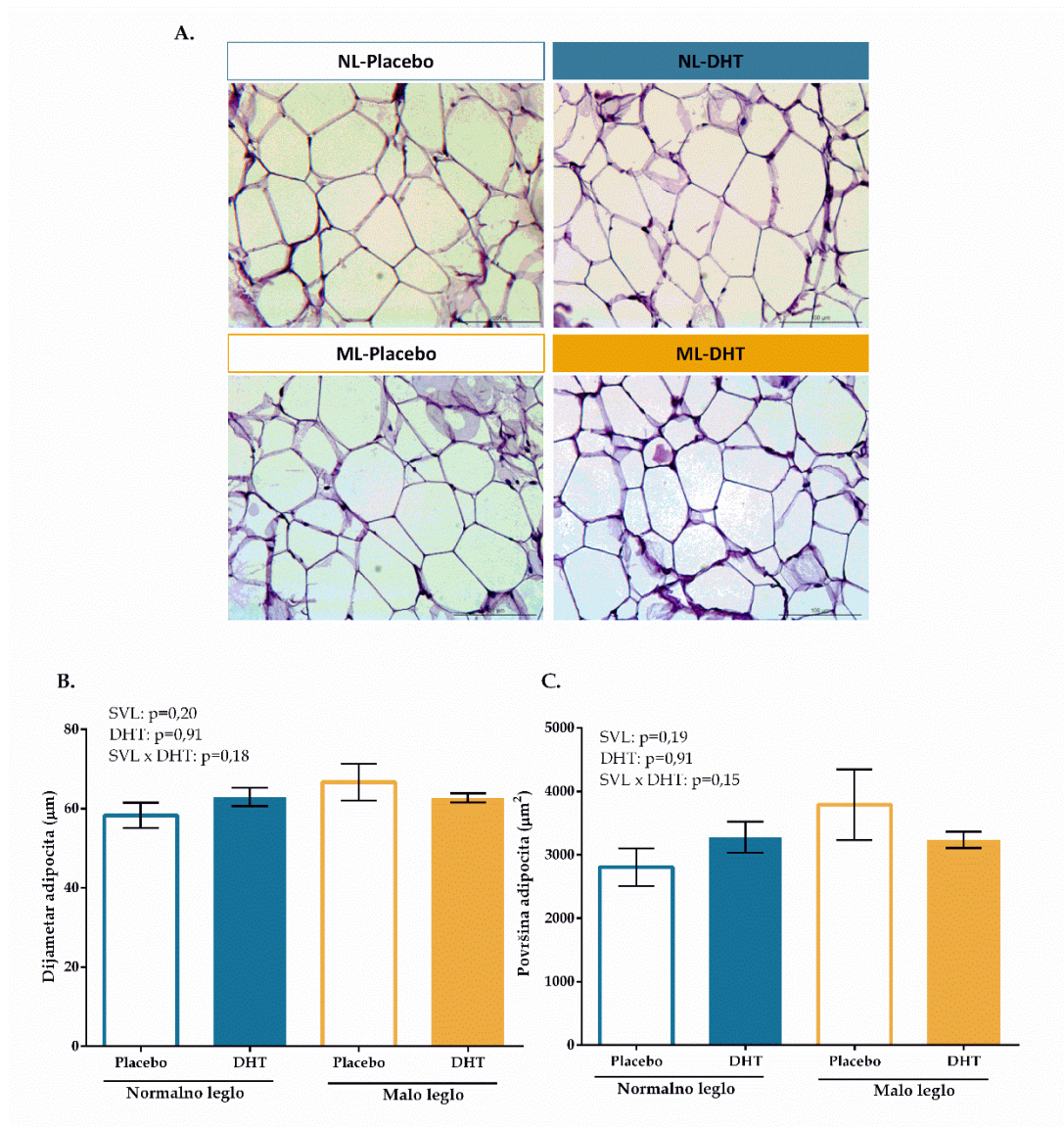


SLIKA 4.9. EKSPRESIJA PAMPKα-THR¹⁷², AMPKα1/2 I NJIHOV RELATIVNI ODNOS U VISCERALNOM MASNOM TKIVU SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OVIMA. Ekspresija proteina je izmerena u citosolnoj frakciji visceralnog masnog tkiva *Western blot* metodom i normalizovana spram β-aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

4.3. Subkutano masno tkivo

4.3.1. Histološka i morfometrijska analiza subkutanog masnog tkiva

Prilikom histološke analize subkutanog masnog tkiva nisu uočene razlike u izgledu i veličini adipocita nakon primene ispitivanih tretmana (**Slika 4.10A**). Morfometrijska analiza i statistička obrada potvrdile su da nema značajnih razlika u dijametru i površini adipocita u subkutanom masnom tkivu ženki pacova svih ispitivanih grupa (**Slika 4.10B i 4.10C**).

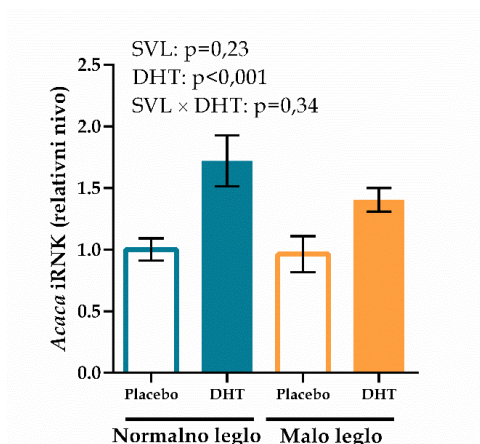


SLIKA 4.10. HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA ADIPOCITA U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU. A. Preseci subkutanog masnog tkiva obojeni hematoksilinom i eozinom **B.** Dijametar adipocita **C.** Površina adipocita. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. Dužina razmernika na mikrografijama je 100 μm . NL - normalno leglo; ML - malo leglo; SVL - smanjena veličina legla.

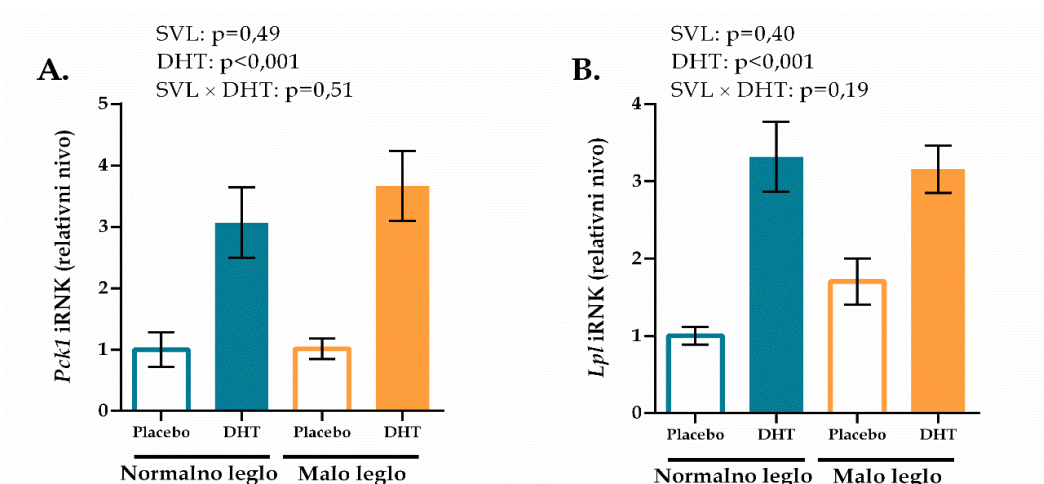
4.3.2. Lipidni metabolizam u subkutanom masnom tkivu

S obzirom na to da ekspanzija visceralnog masnog tkiva i metabolički procesi koji se u njemu odvijaju zavise od funkcionalnosti subkutanog masnog tkiva, ispitivani su markeri lipidnog metabolizma u ovom depou masnog tkiva. DHT tretman, sudeći po rezultatima dvofaktorske ANOVA analize, je imao efekat na ekspresiju gena koji kodira ACC, ključni enzim u procesu *de novo* lipogeneze ($F(1,20)=16,54$; $p<0,001$ **Slika 4.11**) u subkutanom masnom tkivu. Sinteza triglicerida iz cirkulišućih masnih kiselina je takođe bila stimulisana u subkutanom masnom tkivu, kao što se može

zaključiti na osnovu DHT-stimulisane ekspresije gena koji kodiraju LPL i PEPCK (F(1,20)=35,33; p<0,001 i F(1,20)=29,14; p<0,001, respektivno, **Slika 4.12**).

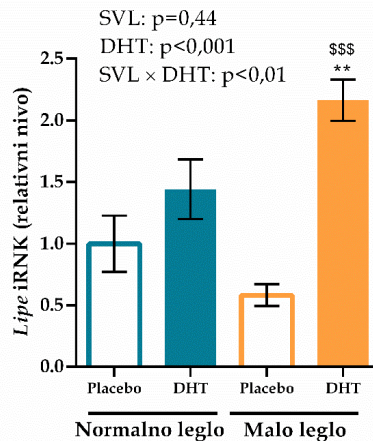


SLIKA 4.11. RELATIVNA EKSPRESIJA ACACAGENA, KAO MARKERA DE NOVO LIPOGENEZE U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.



SLIKA 4.12. RELATIVNA EKSPRESIJA MARKERA SINTEZE TRIGLICERIDA U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU. Relativna koncentracija iRNAK za (A) PEPCK i (B) LPL. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

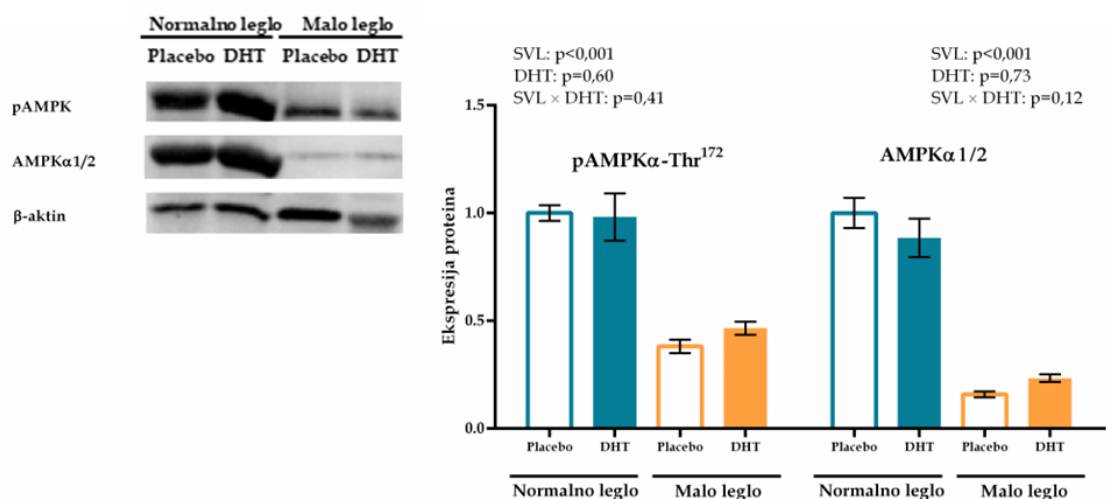
U isto vreme, DHT tretman ($F(1,20)=27,93$; $p<0,001$), kao i njegovo interaktivno delovanje sa faktorom smanjenja veličine legla ($F(1,20)=8,89$; $p<0,01$) značajno su uticali na ekspresiju lipolitičkog markera - gena koji kodira HSL. *Post hoc* testom je utvrđeno da je ekspresija gena koji kodira HSL značajno povećana u SAT pacova ML-DHT grupe, u poređenju sa životinjama iz normalnih legala ($p<0,01$), kao i kod životinja iz malih legala sa placebo peletima ($p<0,001$), što je prikazano na **Slici 4.13**.



SLIKA 4.13. RELATIVNA EKSPRESIJA GENA ZA HSL (LIPE iRNK) KAO MARKERA LIPOLIZE U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom. ** $p<0,01$ vs. NL-Placebo; \$\$\$ $p<0,001$ vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

4.3.3. Ekspresija i aktivacija energetskog senzora AMPK u subkutanom masnom tkivu

Za razliku od visceralnog, u subkutanom masnom tkivu ekspresija AMPK, kao i aktivacija ove kinaze kroz fosforilaciju na treoninu 172 je bila izrazito smanjena pod uticajem smanjene veličine legla životinja ($F(1,20)=166,2$; $p<0,001$ i $F(1,20)=84,87$; $p<0,001$, respektivno), kao što se može videti na **Slici 4.14**.

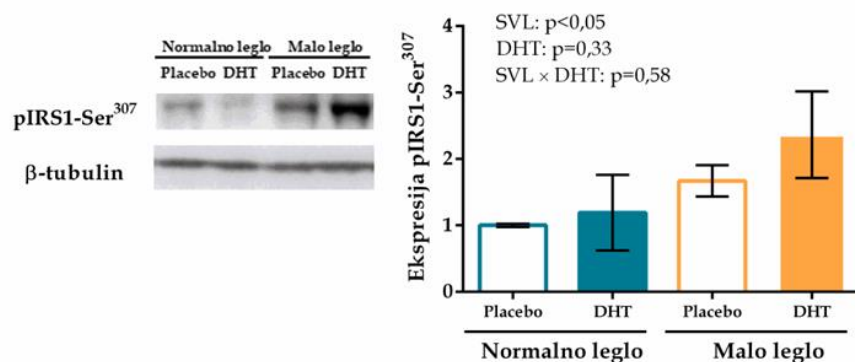


SLIKA 4.14. EKSPRESIJA PAMPK α -THR¹⁷² I AMPK α 1/2 U SUBKUTANOM MASNOM TKIVU SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OVIMA. Ekspresija proteina je izmerena u ukupnom proteinskom ekstraktu subkutanog masnog tkiva *Western blot* metodom i normalizovana spram β -aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina leđa.

4.4. *Musculus gastrocnemius*

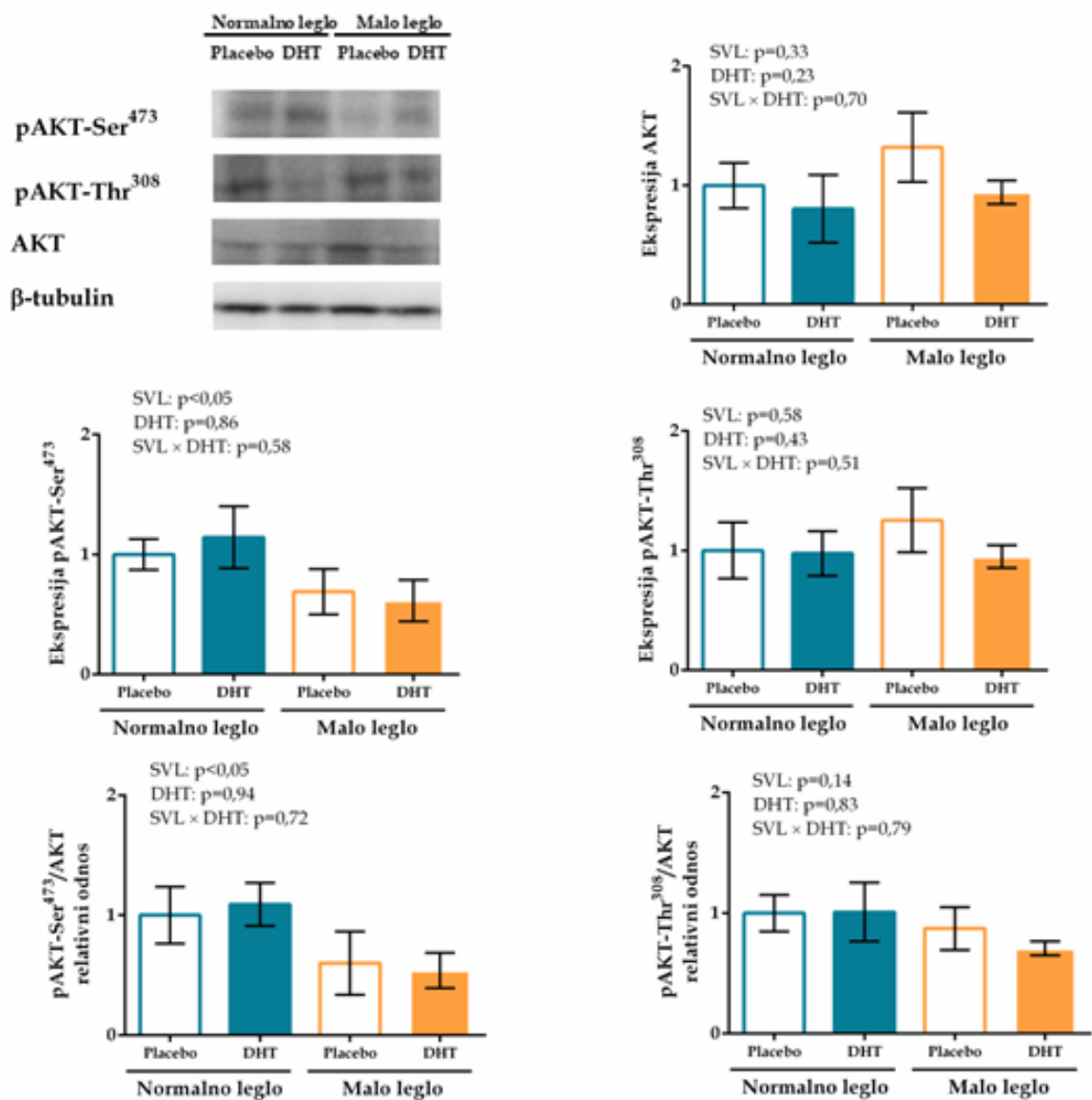
4.4.1. Insulinska signalizacija u *m. gastrocnemius*

S obzirom na to da čine oko polovine telesne mase i uz belo masno tkivo su dominantni centar regulacije energetske homeostaze na nivou čitavog organizma, ispitivana je funkcionalnost insulinskog signalnog puta u skeletnim mišićima. U *m. gastrocnemius* zabeležene su suptilne promene u ekspresiji ključnih proteina insulinskog signalnog puta. Naime, dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat smanjenja veličine leđa na ekspresiju IRS1 sa inhibitornom fosforilacijom na serinu 307 ($F(1,20) = 4,18; p < 0,05$, **Slika 4.15**).

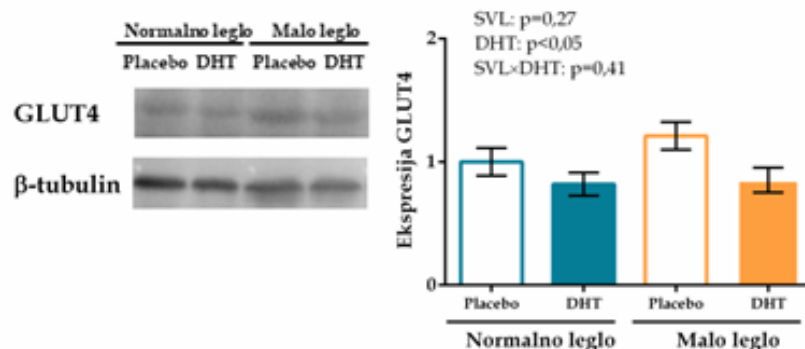


SLIKA 4.15. PROKSIMALNA INSULINSKA SIGNALIZACIJA U *M. GASTROCNEMIUS* - EKSPRESIJA PIRS-SER³⁰⁷. Koncentracija ciljnog proteina je analizirana *Western blot* metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β -aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

Smanjene veličine legla dovelo je do smanjenja ekspresije AKT sa fosforilacijom na serinu 473 ($F(1,20)=4,77$; $p < 0,05$), kao i relativnog odnosa ove forme i ukupnog AKT proteina ($F(1,20)=5,04$; $p < 0,05$), dok su ekspresija AKT sa drugom aktivirajućom fosforilacijom na treoninu 308 i ukupne AKT bili nepromenjeni (Slika 4.16).



SLIKA 4.16. DISTALNA INSULINSKA SIGNALIZACIJA U *M. GASTROCNEMIUS* - EKSPRESIJA PAKT-SER⁴⁷³, PAKT-THR³⁰⁸, UKUPNE AKT I NJIHOVI RELATIVNI ODNOSI SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OVIMA. Koncentracija ciljnih proteina je analizirana *Western blot* metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β-aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

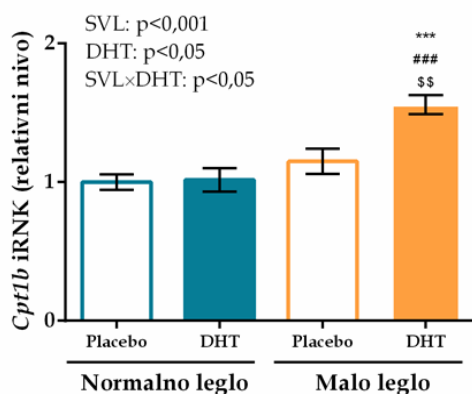


SLIKA 4.17. EKSPRESIJA GLUT4 U *M. GASTROCNEMIUS* SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OM. Relativna koncentracija ciljnog proteina je analizirana *Western blot* metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β -aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

4.4.2. Lipidni metabolizam u *m. gastrocnemius*

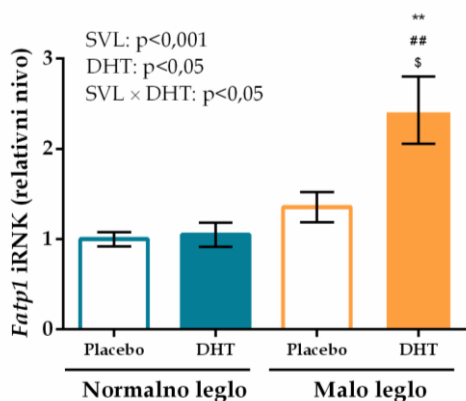
Kako je zabeležena disfunkcionalnost insulinskog signalnog puta i preuzimanja glukoze, pretpostavka je da skeletni mišići kao izvor energije koriste masne kiseline, stoga je ispitivan lipidni metabolizam.

Smanjena veličina legla ($F(1,20)=20,67$; $p<0,001$), DHT tretman ($F(1,20)=7,77$; $p<0,05$), kao i njihova interakcija ($F(1,20)=6,66$; $p<0,05$) su imali značajan efekat na ekspresiju gena koji kodira karnitin-palmitoil-transferazu 1 (CPT1). *Post hoc* testom je pokazano značajno povećanje ekspresije ovog gena u mišiću ženki pacova SL-DHT grupe u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama ($p<0,001$ vs. NL-Placebo i NL-DHT i $p<0,01$ vs. ML-Placebo), kao što se može videti na **Slici 4.18**.



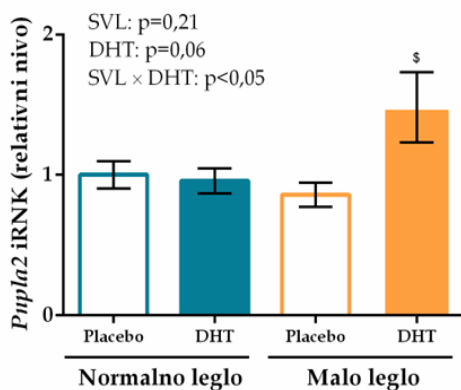
SLIKA 4.18. RELATIVNA EKSPRESIJA *CPT1B* GENA KAO MARKERA β -OKSIDACIJE U *M. GASTROCNEMIUS*. *Hprt* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. ***p<0,001 vs. NL-Placebo; ###p<0,001 vs. NL-DHT; \$\$p<0,01 vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

Na **Slici 4.19** prikazani su rezultati ispitivanja ekspresije gena koji kodira transporter masnih kiselina *FATP1*, na koju su značajno uticali smanjene veličine legla, DHT tretman i njihova interakcija. *Post hoc* testom je pokazano značajno povećanje ekspresije ovog gena u mišiću ženki pacova SL-DHT grupe u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama (p<0,01 vs. NL-Placebo i NL-DHT i p<0,05 vs. ML-Placebo).



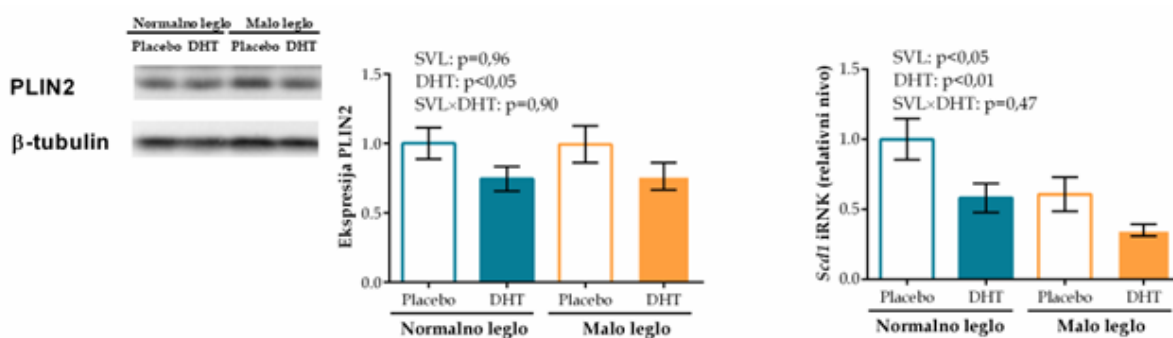
SLIKA 4.19. RELATIVNA EKSPRESIJA *FATP1* GENA KAO MARKERA PREUZIMANJA MASNIH KISELINA U *M. GASTROCNEMIUS*. *Hprt* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNAK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Poređenja (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, praćenom Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. **p<0,01 vs. NL-Placebo; ##p<0,01 vs. NL-DHT; \$p<0,05 vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

Ekspresija gena koji kodira lipazu triglicerida adipocita je bila pod značajnim efektom interakcije ispitivanih faktora ($F(1,20)=5,12$; $p<0,05$), sa značajnim povećanjem ekspresije ovog gena u mišiću ženki pacova ML-DHT grupe u poređenju sa ML-Placebo grupom ($p<0,05$), kao što se može videti na **Slici 4.20**.



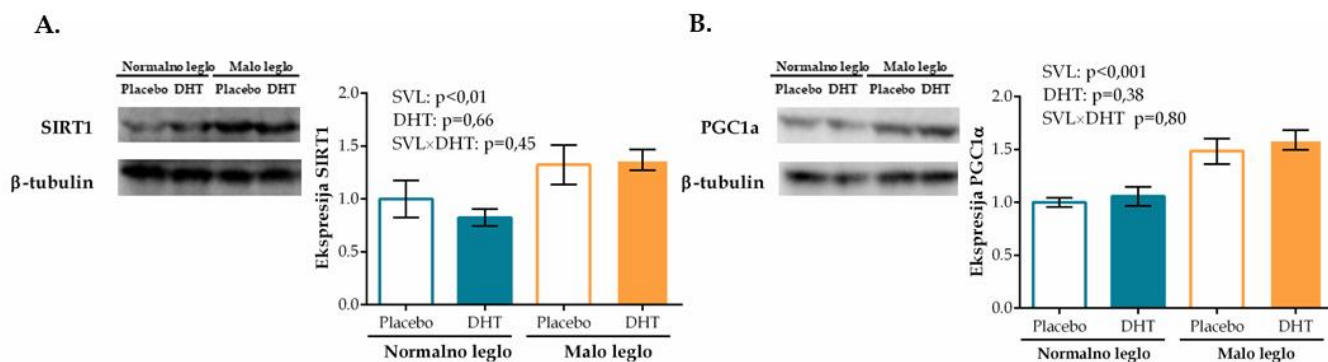
SLIKA 4.20. RELATIVNA EKSPRESIJA PNPLA2 GENA KAOMARKERA LIPOLIZE U M. GASTROCNEMIUS. *Tbp* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, koja je praćena Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. ^{\$} $p<0,05$ vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

Kako bi se ustanovilo da li dolazi do intramuskularne akumulacije lipida, ispitivana je ekspresija perilipina 2, kao i relativna ekspresija *Scd1* gena. Statistička analiza je pokazala značajan efekat DHT tretmana na ekspresiju ovog proteina ($F(1,20)=4,87$; $p<0,05$), dok je ekspresija gena koji kodira stearoil-CoA-desaturazu bila pod značajnim efektom smanjenja veličine legla ($F(1,20)=7,92$; $p<0,05$) i DHT tretmana ($F(1,20)=9,32$; $p<0,01$), kao što se može videti na **Slici 4.21**.



SLIKA 4.21. MARKERI EKTOPIČNOG NAKUPLJANJA LIPIDA U M. GASTROCNEMIUS. A. Ekspresija perilipina 2. B. Relativna koncentracija *Scd1* iRNK. Ekspresija proteina je kvantifikovana u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β -tubulina. *Hprt* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

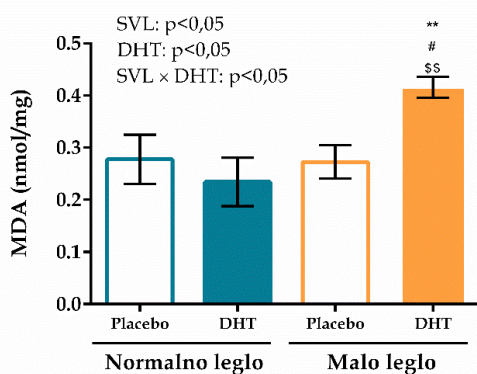
Na **Slici 4.22** prikazani su rezultati ispitivanja ekspresije sirtuina 1 (SIRT1) i koaktivatora PPAR 1 α (PGC1 α), uključenih u biogenezu mitohondrija i kontrolu β -oksidacije. Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat smanjenja veličine legla na ekspresiju SIRT1 ($F(1,20)=9,18$; $p<0,01$) i PGC1 α ($F(1,20)=30,9$; $p<0,001$) u mišiću tretiranih ženki pacova.



SLIKA 4.22. MARKERI BIOGENEZE MITOHONDRIJA U *M. GASTROCNEMIUS*. Ekspresija (A) SIRT1 i (B) PGC1 α sa reprezentativnim *Western blot*-ovima. Ekspresija ciljnih proteina je analizirana *Western blot* metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β -aktina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih tretmana i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

4.4.3. Markeri oksidativnog stresa i inflamacije u *m. gastrocnemius*

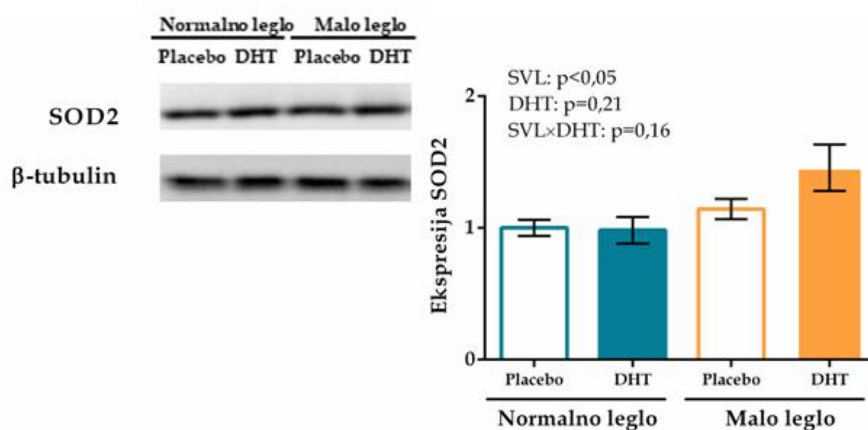
Količina malonil-dialdehida (MDA), direktnog pokazatelja peroksidacije lipida je bila pod značajnim efektom smanjenja veličine legla ($F(1,20)=5,69$; $p<0,05$), DHT tretmana ($F(1,20)=5,74$, $p<0,05$), kao i njihove interakcije ($F(1,20)=5,74$, $p<0,05$) u *m. gastrocnemius*. Kao što se može videti na **Slici 4.23**, količina MDA bila je povećana u mišiću životinja iz ML-DHT grupe, u poređenju sa životinjama iz normalnih i malih legala sa placebo peletima ($p<0,01$), kao i životinjama iz normalnih legala tretiranim DHT ($p<0,05$).



SLIKA 4.23. KOLIČINA MALONIL-DIALDEHIDA U *M. GASTROCNEMIUS* KAO POKAZATELJ LIPIDNE PEROKSIDACIJE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom

ANOVA analizom, koja je praćena Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. **p < 0,01 vs. NL-Placebo; # p < 0,05 vs. NL-DHT; \$\$p < 0,01 vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

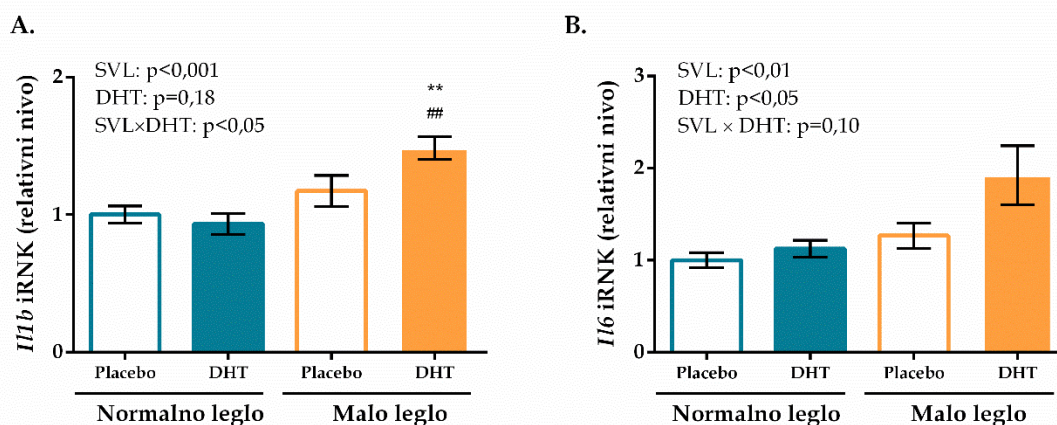
Ekspresija superoksid dismutaze (SOD2), još jednog pokazatelja oksidativnog stresa u mitohondrijama mišićnih ćelija, je takođe bila pod značajnim stimulatornim efektom smanjenja veličine legla ($F(1, 20) = 7,48$; $p < 0,05$), kao što je prikazano na **Slici 4.24**.



SLIKA 4.24. EKSPRESIJA SOD2, KAO POKAZATELJA OKSIDATIVNOG STRESA SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OM. Ekspresija proteina je kvantifikovana u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β -tubulina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ($n = 6$ životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom. SVL - smanjena veličina legla.

Osim detekcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u mišićima, ispitivana je i ekspresija proinflamatornih citokina kao markera inflamacije, i rezultati su prikazni na slici **4.25**. Ekspresija gena koji kodira IL1 β je bila pod značajnim uticajem smanjenja veličine legla ($F(1, 18) = 16,67$, $p < 0,001$, kao i njene interakcije sa DHT tretmanom (**Slika 4.25A**; $F(1, 18) = 4,60$; $p < 0,05$). *Post hoc* testom je pokazano značajno povećanje ekspresije gena za ovaj citokin u mišiću ženki pacova ML-DHT grupe u poređenju sa životinjama gajenim u normalnim leglima bez obzira na DHT tretman ($p < 0,05$).

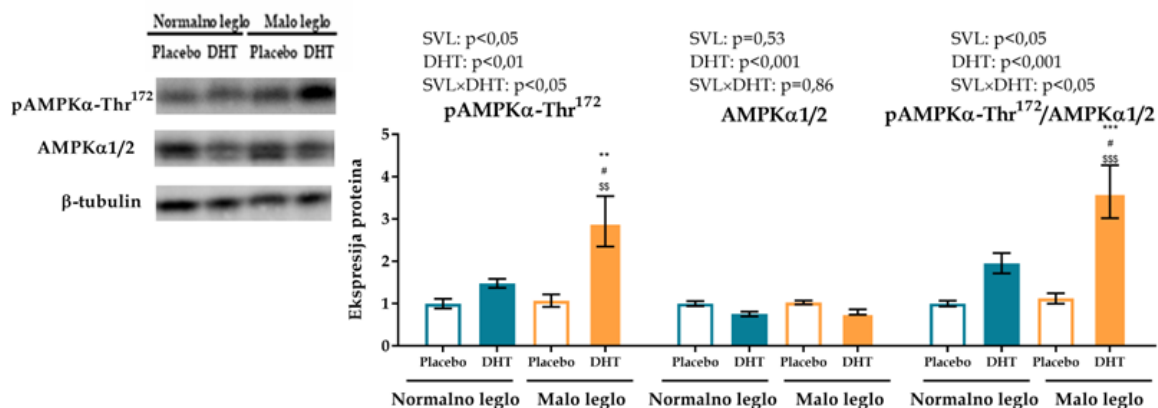
Ekspresija gena za još jedan proinflamatorni citokin, IL6, bila je pod značajnim efektom smanjenja veličine legla ($F(1, 18) = 12,01$; $p < 0,01$) i DHT tretmana ($F(1, 18) = 6,46$; $p < 0,05$), dok je kombinacija ova dva faktora pokazala tendenciju povećanja ali bez dostizanja statističke značajnosti ($F(1,18) = 3,01$; $p = 0,10$), kao što se može videti na **Slici 4.25B**.



SLIKA 4.25. MARKERI INFLAMACIJE U *M. GASTROCNEMIUS*. Relativna ekspresija gena za proinflamatorne citokine **(A)** IL1 β i **(B)** IL6. *Hprt* je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, koja je praćena Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. **p<0,01 vs. NL-Placebo; ##p<0,01 vs. NL-DHT. SVL - smanjena veličina legla.

4.4.4. Ekspresija i aktivacija energetskog senzora AMPK u *m. gastrocnemius*

Smanjenje veličine legla ($F(1,20)=5,87$; $p<0,05$), DHT tretman ($F(1,20)=13,72$; $p<0,01$) i njihova interakcija ($F(1,20)=4,83$; $p<0,05$) značajno su uticali na aktivaciju AMPK u *m. gastrocnemius*, odnosno povećali ekspresiju njegove fosforilisane forme na treoninu na poziciji 172. Isti trend je uočen i kada je reč o uticaju SVL ($F(1,20)=7,02$; $p<0,05$); DHT tretmana ($F(1,20)=25,93$; $p<0,001$), i njihove kombinacije ($F(1,20)=5,28$; $p<0,05$) na odnos aktivirane i ukupne AMPK. Kako se može videti na **Slici 4.26**, nivo fosforilisane forme pAMPK-Thr¹⁷² je bio povećan u mišiću pacova ML-DHT grupe u poređenju sa svim ostalim grupama ($p<0,01$ vs. NL-Placebo i ML-Placebo; $p<0,05$ vs. NL-DHT), a isti obrazac povećanja je pratio i relativni odnos fosforilisane i ukupne AMPK ($p<0,001$ vs. NL-Placebo i ML-Placebo; $p<0,01$ vs. NL-DHT). Ekspresiju ukupne AMPK povećao je samo DHT tretman ($F(1,20)=17,04$; $p<0,001$).



SLIKA 4.26. EKSPRESIJA PAMPKα-THR¹⁷², AMPKα1/2 I NJIHOV RELATIVNI ODNOS SA REPREZENTATIVNIM WESTERN BLOT-OM. Ekspresija proteina je kvantifikovana u ukupnom ćelijskom ekstraktu *m. gastrocnemius* i normalizovana spram β-tubulina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6 životinja po grupi). Statistička analiza efekata primenjenih faktora i njihove interakcije je urađena dvofaktorskom ANOVA analizom, koja je praćena Tukijevim *post hoc* testom u slučaju interakcije ispitivanih faktora. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. NL-Placebo; #p < 0,05 vs. NL-DHT; \$\$p < 0,01, \$\$\$p < 0,001 vs. ML-Placebo. SVL - smanjena veličina legla.

5. Diskusija

5.1. Sistemski metabolički i reproduktivni parametri animalnog modela PCOS modifikovanog povećanim kalorijskim unosom u ranom postnatalnom periodu

Aktuelna epidemija gojaznosti predstavlja jedan od vodećih globalnih problema javnog zdravlja [82]. Prekomerna telesna masa kod dece i odraslih može da uslovi i da značajno doprinese razvoju brojnih metaboličkih poremećaja, poput T2DM, kao i kardiovaskularnih bolesti. Takođe, prekomerna telesna masa se kod oba pola dovodi u vezu sa poremećajima reproduktivne funkcije, što može da uslovi infertilitet i komplikacije u trudnoći [83]. Iako se PCOS primarno smatra reproduktivnim poremećajem i tretira se kao takav, sve veća pažnja se posvećuje metaboličkim aspektima ovog sindroma, s obzirom na to da su pacijentkinje sa PCOS najčešće gojazne i/ili pate od insulinske rezistencije. Dosadašnje studije ukazuju na blisku interakciju između insulinske rezistencije i hiperandrogenemije, ali precizni mehanizmi, kao ni smer kauzalnosti nisu do sada razjašnjeni [3,61].

Prepubertetska gojaznost se smatra značajnim faktorom rizika za razvoj PCOS u pubertetu, usled razvoja insulinske rezistencije i kompenzatorne hiperinsulinemije. Povećanje koncentracije insulina u cirkulaciji za posledicu ima povećanu produkciju androgena od strane nadbubrežne žlezde i jajnika, kao i smanjenu hepatičnu produkciju globulina koji vezuje polne hormone (SHBG), što dodatno povećava biodostupnost androgena [84,85]. Pubertet je, stoga, kritičan period tokom kog hiperinsulinemija i njome uslovljena hiperandrogenemija mogu u sadejstvu da dovedu do rane pojave simptoma PCOS [32]. Ovaj koncept se u literaturi prepoznaje kao „PCOS sekundarno nastao usled gojaznosti“ i dodatno je podržan činjenicom da je u porastu učestalost gojaznosti u dečijoj populaciji, kao i učestalost adolescentkinja sa PCOS. Štaviše, gojaznost se kod devojčica u periodu pre puberteta i kod adolescentkinja uzima kao osnova za razvoj PCOS. Konkretno, pokazano je da višak androgena, koji se ogleda u povećanim koncentracijama ukupnog i slobodnog testosterona u cirkulaciji, po pravilu prethodi pojavi poremećaja menstrualnog ciklusa kod adolescentkinja, kao i da je porast BMI u korelaciji sa porastom koncentracije ukupnog i slobodnog testosterona [36].

Imajući u vidu prethodno navedeno, očigledna je važnost interakcije između prepubertetske gojaznosti i hiperandrogenemije u nastanku i razvoju metaboličkih poremećaja u PCOS. Kako bi bila ispitana ova dva faktora, modifikovan je standardizovani animalni model PCOS izazvan kontinuiranim tretmanom DHT, uvođenjem faktora prekomernog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu, kroz smanjenje veličine legla [71].

Hormonski i nutritivni milje u perinatalnom periodu ima bitnu ulogu u modulaciji ekspresije genoma i programiranju HPA i HPG osovina sisara [86–88]. Regulacija

apetita i dinamika rasta mogu biti dugoročno pogođene neodgovarajućim nutritivnim statusom, kako tokom fetalnog života, tako i u neposrednom postnatalnom periodu [71]. Glodari koji su u ranom postnatalnom periodu izloženi prekomernom kalorijskom unosu predstavljaju dragocen model za izučavanje dugoročnih posledica prekomerne telesne mase, komplementaran klasičnim genetičkim ili modelima gojaznosti izazvanim visokomasnom ishranom. Prekomeran kalorijski unos kod glodara neposredno nakon rođenja se postiže jednostavnom manipulacijom veličine legla, što za posledicu ima ne samo postizanje veće telesne mase tokom perioda sisanja, nego i izmenjenu regulaciju apetita koja se održava i tokom daljeg razvoja, tako da se zadržava povećan unos energije i nakon prelaska na čvrstu hranu [71]. Glodari u malim leglima nisu u kompeticiji za hranu i unose veću količinu mleka, bogatijeg lipidima, od vršnjaka gajenih u normalnim leglima [75]. U skladu sa time, u ovoj studiji životinje gajene u malim leglima postigle su značajno veću telesnu masu od vršnjakinja iz legala prosečne veličine već osmog dana starosti, a postignuta razlika u masi se održala do kraja perioda sisanja (**Slika 4.1**). Time je postignut cilj da se izazove umerena gojaznost u ranom postnatalnom periodu, što se može uporediti sa prepubertetskom gojaznošću kod devojčica u ovom periodu života. Dodatno, smanjenje veličine legla je dovelo i do povećanog kalorijskog unosa i nakon prelaska na čvrstu hranu, što je rezultovalo značajno većim prirastom telesne mase, kao i uvećanjem apsolutne i relativne mase masnog tkiva (**Tabela 4.1**) kod adultnih jedinki, a može se objasniti neadekvatnim programiranjem HPA ose i regulacijom apetita. Uočene promene u telesnoj masi i masi visceralnog masnog tkiva kod životinja uporedive su sa umerenom gojaznošću kod ljudi, koja nije praćena dislipidemijom, s obzirom na to da nisu zabeležene promene u koncentraciji triglicerida i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji (**Tabela 4.3**).

Kontinuiranim tretmanom gojaznih ženki DHT, uvedena je i hiperandrogenemija uz povećan kalorijski unos u ranom postnatalnom periodu, radi ispitivanja interakcije ova dva faktora. Visceralna gojaznost i hiperandrogenemija su faktori koji se nezavisno dovode u vezu sa poremećajima u insulinskoj signalizaciji i narušavanjem insulinske osetljivosti na sistemskom nivou [89]. Iako mehanizam nastanka insulinske rezistencije u PCOS nije u potpunosti objašnjen, nesporno je da gojaznost dodatno pogoršava metaboličke manifestacije sindroma [89,90]. U ovoj studiji, sistemska insulinska osetljivost je bila narušena samo kod životinja gajenih u malim leglima koje su tretirane DHT, sudeći po povećanim koncentracijama insulina u krvi i vrednostima HOMA indeksa (**Tabela 4.3**). Zabeležena hiperinsulinemija verovatno predstavlja kompenzatorni mehanizam kojim su se održavale fiziološke vrednosti koncentracije glukoze u krvi. Za pojavu hiperinsulinemije ključna je kombinacija ispitivanih faktora. Međutim, dominantan efekat smanjene veličine legla na maksimalnu vrednost koncentracije glukoze i njeno sporije vraćanje na fiziološke vrednosti, tokom ipGTT izvedenog na kraju eksperimenta (**Slika 4.3B**), upravo ukazuje na predisponirajuću ulogu prepubertetske gojaznosti za razvoj insulinske rezistencije u PCOS [61,91]. Akumulacija lipida, odnosno gojaznost, uzrokuje brojne metaboličke poremećaje, uključujući i poremećaje u regulaciji i preuzimanju glukoze. Pre svega, gojaznost podrazumeva promene u funkcionisanju masnog tkiva, koje uključuju hipoksiju, pojavu inflamacije, smanjenu produkciju adiponektina i drugih

adipokina koji povećavaju osetljivost na insulin, povećanu stopu lipolize i oslobodjenja masnih kiselina u cirkulaciju, odnosno izostanak postprandijalne supresije lipolize usled insulinske rezistencije na nivou ovog tkiva. Slobodne masne kiseline i proinflamatorni citokini oslobođeni iz masnog tkiva dalje doprinose razvoju insulinske rezistencije na nivou drugih tkiva, koja su uključena u održavanje homeostaze glukoze. Tako, smanjena insulinska osetljivost jetre, dovodi do pokretanja procesa sinteze glukoze – glikogenolize i glukoneogeneze – na koje insulin deluje inhibitorno. Nakon jetre, insulinska rezistencija se razvija i u skeletnim mišićima. U fizioloskim uslovima, između obroka mišići uglavnom koriste masne kiseline oslobođene u procesu lipolize iz masnog tkiva, dok postprandijalno dolazi do smanjenja koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, a oslobođeni insulin stimuliše mišiće da preuzimaju i koriste glukozu. Po preuzimanju od strane miocita, glukoza biva fosforilisana i može podleći oksidaciji ili biti uskladištena u formi glikogena. Međutim, kod gojaznih subjekata i onih sa insulinskom rezistencijom detektovani su brojni poremećaji u ekspresiji insulinskog receptora i aktivnosti nizvodnih molekulskih efektoru u signalnoj kaskadi insulina, usled čega su i glikoliza i glikogeneza suprimirane, kao i preuzimanje glukoze iz cirkulacije posredstvom GLUT4 [92].

Hiperandrogenemija indukovana tretmanom DHT značajno je uticala na pojavu reproduktivnih karakteristika PCOS, odnosno na smanjenje masa jajnika i materice u ovoj studiji (**Tabela 4.2**), čime je potvrđena uspešnost modela. Bitno je napomenuti da i smanjenje veličine legla uslovljava trend smanjenja masa reproduktivnih struktura, mada efekat nije statistički značajan. Prekomerna telesna masa i gojaznost se dovode u vezu sa reproduktivnim poremećajima kod oba pola [31]. Dok neki autori prijavljuju kašnjenje vaginalnog otvaranja kod glodara [83], što bi odgovaralo početku puberteta kod ljudi, drugi prijavljuju da pubertet ranije nastupa, kako kod glodara [93], tako i kod ljudi sa prekomernom telesnom masom [31]. Uz to, opisano je i povećanje mase perigonadnog masnog tkiva glodara gajenih u malim leglima, kao i smanjenje mase reproduktivnih organa kako mužjaka [83] tako i ženki [93], što je u skladu sa nalazima ove studije.

Histološka analiza jajnika potvrđuje da tretman DHT indukuje promene karakteristične za sindrom. Naime, u jajnicima ženki pacova NL-Placebo grupe je uočen veliki broj žutih tela, koja svedoče o regularnom odvijanju ovulacija, kao i zdravi folikuli u svim fazama razvoja i retki atretnični folikuli, što je bio slučaj i sa histološkim nalazima jajnika pacova ML-Placebo grupe. Sa druge strane, na histološkim presecima jajnika životinja DHT tretiranih žuta tela odsustvuju, što je pokazatelj izostanka ovulacija [94] (**Slika 4.2**). Uz to, žuta tela su odgovorna za sintezu progesterona [95], pa se može pretpostaviti da je njena koncentracija smanjena kod DHT tretiranih životinja. Kod životinja tretiranih DHT uočeni su i folikuli u različitim fazama atrezije, uključujući i one koji poprimaju morfologiju intersticijalnih žlezda. Intersticijalne žlezde su steroid-sekretujuće strukture u kojima nije detektovano prisustvo aromataze, što znači da one ne sekretuju estrogen i verovatno svojom aktivnošću doprinose povećanim koncentracijama androgena u cirkulaciji [96].

5.2. Metabolički procesi u visceralnom i subkutanom masnom tkivu ženki pacova izloženih povećanom kalorijskom unosu u ranom postnatalnom periodu i tretiranih DHT

Jedna od osnovnih uloga masnog tkiva je održavanje energetske ravnoteže. Različiti depoi masnog tkiva mogu da odgovore na izazov povećanog priliva energije povećanjem broja adipocita - hiperplazijom, ili povećanjem zapremine adipocita, odnosno hipertrofijom [50]. Subkutano masno tkivo ima veći kapacitet da formira nove ćelije, dok je za visceralno karakterističan hipertrofični mehanizam ekspanzije. Kritičan faktor u zaštiti organizma od razvoja sistemske insulinske rezistencije je sposobnost subkutanog masnog tkiva da se širi i preuzima masne kiseline, kako bi sprečilo njihovu akumulaciju u visceralnom masnom tkivu i drugim metabolički aktivnim organima - jetri i skeletnim mišićima [22]. Akumulacija lipida u visceralnom masnom tkivu doprinosi smanjenju sistemske insulinske osetljivosti, s obzirom na to da korelira sa akumulacijom lipida u jetri. U uslovima povećanog kalorijskog unosa, subkutano masno tkivo ima kompenzatornu ulogu da kroz proces adipogeneze i preuzimanja slobodnih masnih kiselina spreči njihovu akumulaciju u visceralnom masnom tkivu, smanjujući na taj način rizik od poremećaja metabolizma glukoze i insulinske signalizacije, kao i lipotoksične efekte na jetru i skeletne mišiće [22]. Kada su skladišni kapaciteti subkutanog masnog tkiva prevaziđeni, ili kada je, usled nekih patoloških promena, smanjena funkcionalnost ovog depoa, visceralno masno tkivo služi kao alternativni depo za skladištenje viška energije u formi lipida [97]. Morfometrijskom analizom u ovoj studiji nije pokazana razlika u dijametru i površini adipocita u subkutanom masnom tkivu (**Slika 4.10**), dok su i smanjenje veličine legla i DHT tretman doveli do značajnog povećanja dijametra i površine ćelija u visceralnom masnom tkivu (**Slika 4.4**) ženki pacova. S obzirom na povećan energetski unos i hipertrofiju adipocita u visceralnom masnom tkivu, nije zabeleženo povećanje koncentracija slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji. U studijama izvedenim na ženkama primata, koje imaju sličnu eksperimentalnu postavku kao ova studija, pokazano je da pod kombinovanim uticajem umerene hiperandrogenemije i energetski bogate ishrane, dolazi do hipertrofije adipocita u visceralnom, ali ne i u subkutanom masnom tkivu, što je povezano sa većim unosom slobodnih masnih kiselina kroz ishranu i njihovim smanjenim iskorišćavanjem [98,99]. Izostanak proliferacije i diferencijacije adipocita zabeležen u subkutanom masnom tkivu ženki u ovoj studiji ukazuje na njegovu disfunkcionalnost, dok se hipertrofična akumulacija lipidnih kapi u visceralnom masnom tkivu, može se smatrati adaptivnim odgovorom organizma u uslovima povećanog energetskog unosa i poremećene funkcije subkutanog masnog tkiva [100].

Više mogućih mehanizama povezuju akumulaciju lipida u visceralnom masnom tkivu sa insulinskom rezistencijom i rizikom od razvoja T2DM, za razliku od akumulacije u subkutanom masnom tkivu. Akumulacija lipida u visceralnom

masnom tkivu može doprineti sistemske insulinske rezistenciji kroz „prelivanje“ adipokina i lipida kroz portnu cirkulaciju direktno u jetru ili posredstvom proinflammatoryh citokina prisutnih u hipertrofiranom tkivu, koji lokalno ometaju insulinsku signalizaciju [22]. Insulinska osetljivost u hipertrofiranom visceralnom masnom tkivu analizirana je određivanjem nivoa ukupnog IRS1 i pIRS1-Ser³⁰⁷, kao i ukupnih i fosforilisanih formi AKT i ERK1/2 u ovom depou belog masnog tkiva. Nisu zabeležene promene na nivou ovih proteina bez obzira na tretman (**Slika 4.5**). Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da je funkcionalnost insulinskog signalnog puta u visceralnom masnom tkivu gojaznih ženki sa hiperandrogenemijom očuvana.

Hipertrofija belog masnog tkiva je generalno praćena lipogenezom i akumulacijom lipidnih kapi. U ovoj studiji ekspresija gena za glavne lipogene enzime: ACC, FAS i SCD1 je bila smanjena u visceralnom masnom tkivu pod dejstvom oba ispitivana faktora, kao i njihove interakcije (**Slika 4.6**). Ovakav nalaz se objašnjava pretpostavkom da se, u uslovima hipertrofije adipocita njihova lipogena aktivnost smanjuje adaptivnim mehanizmom povratne sprege koji bi trebalo da spreči dalju ekspanziju visceralnog depoa masnog tkiva. Ova pretpostavka je podržana ranijim nalazom Ortege i saradnika [101] koji su pokazali dramatično smanjenje genske ekspresije ACC i FAS u visceralnom masnom tkivu gojaznih ljudi, kao i nalazom Fernandez i saradnika [102], koji su pokazali da je smanjenje ekspresije SCD1 u ekstrahepatičnim tkivima, uključujući i belo masno tkivo, kod miševa na visokomasnoj ishrani, protektivno u uslovima gojaznosti i insulinske rezistencije. Supresija *de novo* lipogeneze u adipocitima visceralnog masnog tkiva životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT verovatno je doprinela očuvanju insulinske osetljivosti na nivou ovog tkiva. Uz dramatično smanjenje ekspresije lipogenih enzima zabeležen je i supresivni efekat smanjene veličine legla na ekspresiju gena za HSL (**Slika 4.8**). Ovakve promene u lipogenezi su verovatno rezultat aktivacije AMPK, ključnog regulatora energetske homeostaze u visceralnom masnom tkivu pod dejstvom DHT, kao i interakcije sa povećanim kalorijskim unosom (**Slika 4.9**). Aktivirana AMPK u masnom tkivu suprimira lipogenezu i sintezu triglicerida, lipolizu i sekreciju proinflammatoryh citokina, čime se smanjuje količina slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji i time održava sistemska insulinska osetljivost u fiziološkim okvirima [49]. Iako neki autori prijavljuju da androgeni smanjuju ekspresiju i aktivnost AMPK u masnom tkivu [47], Micuhaši je sa saradnicima [103] pokazao da testosteron povećava preuzimanje glukoze u diferencirane 3T3-L1 adipocite preko GLUT4, posredstvom aktivacije LKB1-AMPK signalnog puta. Imajući sve ovo u vidu, pretpostavka je da aktivacija AMPK u visceralnom masnom tkivu, kao posledica tretmana DHT, sprečava remećenje insulinske signalizacije kroz supresiju *de novo* lipogeneze na nivou ovog depoa masnog tkiva, u uslovima hipertrofije adipocita i smanjene sistemske insulinske osetljivosti.

Usklađena regulacija lipogeneze i lipolize u subkutanom masnom tkivu je ključna za njegovo funkcionisanje i preuzimanje slobodnih masnih kiselina u uslovima povećanog energetske priliva. Efikasno odlaganje masnih kiselina u ovom depou zahteva koordinisanu aktivnost transportnih proteina, ključnih enzima i drugih molekula koji kontrolišu lipogene i lipolitičke puteve [104]. U ovoj studiji, povišena

ekspresija gena za lipogeni enzim ACC, kao i enzime uključene u sintezu triglicerida LPL i PEPCCK, pod dejstvom DHT ukazuje na povećanje stope *de novo* lipogeneze i sinteze triglicerida (**Slike 4.11 i 4.12**). Istovremeno povećana ekspresija gena za HSL u subkutanom masnom tkivu ženki iz ML-DHT grupe (**Slika 4.13**) ukazuje na povišenu stopu lipolize, koja bi u fiziološkim uslovima trebalo da bude suprimirana delovanjem insulina. Konstantno pojačano cikliranje između triglicerida i slobodnih masnih kiselina u subkutanom masnom tkivu makar jednim delom doprinosi sistemskoj insulinskoj rezistenciji, jer konstantno oslobađanje komponenti za sintezu triglicerida u cirkulaciju ostvaruje lipotoksičan efekat na druga tkiva, poput skeletnih mišića. Na taj način se uslovljava ektopična akumulacija lipida [22]. Istovremeno stimulisani procesi sinteze triglicerida i lipolize usko su povezani sa insulinskom rezistencijom i hipertrofijom visceralnog masnog tkiva kod gojaznih žena [104], te bi se ovakvim promenama u subkutanom masnom tkivu mogle objasniti i povećana masa visceralnog masnog tkiva i sistemska insulinska rezistencija zabeležene u ovoj studiji.

Za razliku od visceralnog masnog tkiva, u subkutanom je zabeleženo drastično smanjenje ekspresije ukupne i fosforilisanе forme AMPK kod životinja gajenih u malim leglima, nezavisno od tretmana DHT (**Slika 4.14**). Smanjena aktivnost AMPK u subkutanom masnom tkivu veoma gojaznih ljudi je povezana sa oksidativnim stresom, izmenjenom ekspresijom ključnih gena za metabolizam lipida i sekrecijom hormona i parakrinih faktora koji doprinose propagaciji inflamacije i sistemske insulinske rezistencije [105].

Uloga AMPK je ključna u regulaciji lipidnog metabolizma i lokalne insulinske osetljivosti u različitim depoima masnog tkiva, kao i održavanju sistemske insulinske osetljivosti. U ovoj studiji zabeležena je višestruko smanjena ekspresija i aktivacija AMPK u subkutanom masnom tkivu pod uticajem smanjene veličine legla, kao i poremećen metabolizam lipida u pravcu povećane lipogeneze i lipolize usled DHT tretmana. To ukazuje na disfunkcionalnost ovog depoa masnog tkiva, što verovatno doprinosi hipertrofiji visceralnog masnog tkiva i smanjenoj sistemskoj insulinskoj osetljivosti. Sa druge strane, povećana aktivnost AMPK u visceralnom masnom tkivu je verovatno doprinela očuvanju lokalne insulinske osetljivosti u uslovima hiperandrogenemije i povećanog energetskeg priliva.

5.3. Metabolički procesi u skeletnim mišićima ženki pacova izloženih povećanom kalorijskom unosu u ranom postnatalnom periodu i tretiranih DHT

Osim u masnom tkivu, insulin reguliše preuzimanje glukoze i u ćelije skeletnih mišića. S obzirom na to, narušavanje insulinske signalizacije na nivou ovog tkiva uzima se za jedan od glavnih mogućih uzročnika insulinske rezistencije specifične za PCOS [3,15]. Poznato je da insulinska rezistencija u PCOS može da bude tkivno-specifična, pri čemu se smanjuje osetljivost na ovaj hormon u metabolički aktivnim

tkivima, dok u jajnicima ostaje neizmenjena. Na taj način, hiperinsulinemija koja se javlja kao posledica rezistencije na insulin u metabolički aktivnim tkivima ima kognodotropni efekat na jajnike i uslovljava pojačanu biosintezu androgena, što doprinosi postojećoj hiperandrogenemiji i zatvara začarani krug sa hiperinsulinemijom [106].

Neka istraživanja su pokazala korelaciju mišićne mase i snage sa koncentracijom androgena u cirkulaciji [107,108], dok druga u vezu dovode značajno povećanje mase mišića sa hiperinsulinemijom, a ne sa hiperandrogenemijom kod PCOS pacijentkinja [109,110]. Međutim, sve ove studije su korelacione prirode i u njima nisu ispitivani dominantni tip mišićnih vlakana, niti precizni mehanizmi funkcionisanja mišića. Razumno je pretpostaviti da transformacija jednog tipa mišićnih vlakana u drugi sa sobom nosi i promenu preferiranog energetskog supstrata, čime se, posledično, menja i ukupna potrošnja energije u organizmu i tolerancija na glukozu i insulin [111]. Stepto i saradnici ističu značaj razumevanja molekularnih mehanizama metaboličke disfunkcije, a posebno insulinske rezistencije u mišićima u uslovima hiperandrogenemije, za prevazilaženje ograničenja terapijskih pristupa koji se danas koriste u tretmanu PCOS [3].

Budući da su IRS i AKT prepoznati kao ključna čvorišta insulinskog signalnog puta [112] ispitana je ekspresija, kao i fosforilacioni status ovih kinaza u *m. gastrocnemius*. Zabeležen je efekat smanjenja veličine legla na povećanje ekspresije IRS1 sa inhibitornom fosforilacijom na Ser³⁰⁷ koja ga označava za proteozomsku degradaciju (**Slika 4.15**), kao i smanjenje ekspresije pAKT-Ser⁴⁷³ (**Slika 4.16**). Ekspresija pAKT-Thr³⁰⁸, ukupnog AKT i njihov relativni odnos nisu bili pod uticajem povećanog kalorijskog unosa. Za uspešnu transmisiju signala sa insulinskog receptora na nishodne proteine u kaskadi i punu aktivaciju AKT i potrebno je da bude fosforilisan na Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸ [112]. Ovakvi rezultati ukazuju da povećanje kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu predisponira razvoj insulinske rezistencije u mišiću, što je podržano nalazom Šeli i saradnika [113] koji su pokazali da ženke pacova čije su majke bile gojazne imaju smanjenu količinu ukupnog IRS1 i pAKT-Ser⁴⁷³ u skeletnim mišićima. Međutim, do smanjenog preuzimanja glukoze, kako je procenjeno na osnovu smanjenja ekspresije transportera GLUT4, dolazi samo kada je primenjen DHT tretman, što implicira neophodnost postojanja oba ispitivana faktora da bi se ispoljila insulinska rezistencija u skeletnim mišićima (**Slika 4.17**). Hiperandrogenemijom indukovano smanjenje preuzimanja glukoze, posredovano insulinom, prijavljeno je kako kod gojaznih, tako i kod normalno uhranjenih žena sa PCOS [25]. Na osnovu dobijenih rezultata, može se pretpostaviti da je poremećaj u insulinskom signalnom putu u skeletno-mišićnim ćelijama ključna promena koja uslovljava kasnije sistemsko smanjenje osetljivosti na insulin, uočeno kod životinja gajenih u malim leglima, a zatim tretiranih DHT.

U uslovima smanjene insulinske osetljivosti i usled smanjenog transporta glukoze, mišići su prinuđeni da koriste lipide kao dominantan izvor energije [114]. S obzirom da povećana stopa lipolize u subkutanom masnom tkivu nije rezultovala povećanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, može se pretpostaviti da su masne kiseline oslobođene iz subkutanog masnog tkiva bile transportovane direktno u skeletne mišiće, da posluže kao alternativni izvor

energije. Ovu pretpostavku podržava izmereno povećanje ekspresije gena za transporter masnih kiselina - FATP1 kod životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT, što je rezultat oba primenjena tretmana i njihove interakcije (**Slika 4.19**). Isti trend uočen je i kada je u pitanju ekspresija gena za karnitin-palmitoil-transferazu 1 - CPT1b (**Slika 4.18**), koja zajedno sa FATP1 posreduje u procesu unošenja preuzetih masnih kiselina iz cirkulacije u mitohondrije, čime se povećava stopa β -oksidacije [115]. Ovakav rezultat implicira da je β -oksidacija bila favorizovana u odnosu na ektopičnu akumulaciju lipida u skeletnim mišićima. Pretpostavku da je akumulacija lipida u skeletnim mišićima bila onemogućena procesom β -oksidacije dodatno podupiru i rezultati ispitivanja efekta DHT na relativnu količinu perilipina 2, čija je ekspresija u skeletnim mišićima bila smanjena (**Slika 4.21A**). Perilipin 2 spada u familiju proteina asociranih sa masnim kapima. Smanjenje ekspresije perilipina dovodi do promena u skladištenju lipida unutar ćelija, odnosno do nagomilavanja lipotoksičnih intermedijera kao što su ceramidi i diacilglicerol, umesto neutralnih lipida - triglicerida. Prema tome, ekspresija ovog proteina ključnog za skladištenje lipida u mišićima u negativnoj je korelaciji sa razvojem insulinske rezistencije izazvane lipotoksičnim intermedijerima lipidnog metabolizma [116]. Perilipin 2^{-/-} mišićne ćelije su pokazale preusmeravanje energetskog metabolizma ka oksidaciji masnih kiselina i smanjenu akumulaciju lipida [117]. Osim toga, povećan kalorijski unos i DHT tretman su doveli do smanjenja ekspresije gena za sterol-CoA desaturazu - SCD1, (**Slika 4.21B**) jednog od markera *de novo* lipogeneze, što takođe govori u prilog favorizovanju β -oksidacije nad akumulacijom neutralnih lipida. Kod miševa kojima je „nokautiran“ *Scd1* opisana je povećana ekspresija CPT1 i, u skladu sa time, povećana stopa β -oksidacije [118]. Međutim, smanjena ekspresija gena za SCD1 u mišićima pod uticajem smanjene veličine legla i DHT tretmana, ukazuje na to da je verovatno prisutna veća količina zasićenih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline narušavaju metaboličke procese u ćeliji i doprinose inflamaciji posredstvom različitih mehanizama, a takođe predstavljaju i supstrat za ceramid-sintaze, čime doprinose lipotoksičnom efektu ceramida [119]. Identifikovane su različite ceramid-sintaze, koje proizvode ceramide sa različitom dužinom masnokiselinskog lanca, koji su ključni za metabolizam sfingolipida. Pokazano je da nagomilavanje ceramida u različitim tkivima, uključujući i skeletne mišiće, ima negativan uticaj na toleranciju glukoze i lipidni metabolizam. Uloga različitih vrsta ceramida u patogenezi insulinske rezistencije verovatno je tkivno-specifična [120]. Dodatno, uočena je i povećana ekspresija gena za adipoznu lipazu triglicerida - ATGL kod životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT (**Slika 4.20**), što je još jedna potvrda toga da se u njihovim skeletnim mišićima ne dešava akumulacija neutralnih lipida, već se masne kiseline oslobađaju i usmeravaju u proces β -oksidacije [121]. Sve ovo zajedno ukazuje na to da je u ovom animalnom modelu PCOS ne dolazi do akumulacije intramiocelularnih neutralnih lipida i da se masne kiseline usmeravaju u proces β -oksidacije. Međutim, moguće je da ipak dolazi do nakupljanja lipotoksičnih intermedijera poput ceramida, koji bi mogli doprineti lokalnom smanjenju insulinske osetljivosti kod ovih životinja. Delujući kao sekundarni glasnik, ceramid može da ometa funkciju tirozinskih kinaza, fosfataza i transkripcionih faktora uključenih u insulinsku signalizaciju [122].

Povećana β -oksidacija u mitohondrijama je praćena oksidativnim stresom i formiranjem ROS [123,124]. Step en oksidativnog stresa zavisi od balansa između količine ROS i efikasnosti mehanizama antioksidativne zaštite u njihovom uklanjanju. Pojačan oksidativni stres je pokazatelj disfunkcionalnosti mitohondrija, kako je pokazano u skeletnim mišićima mišijeg modela PCOS, i smatra se da, takođe, doprinosi insulinskoj rezistenciji na nivou ovog organa [125]. U ovom PCOS modelu, kod životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT (**Slika 4.23**), zabeleženo je značajno povećanje količine malonil-dialdehida, markera oksidativnog stresa, koji nastaje lipidnom peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina. Međutim, oksidativni stres može biti i okidač za aktivaciju AMPK u okviru adaptivnog odgovora na patološka stanja u ćeliji [126]. Aktivacija AMPK u skeletnim mišićima ima ulogu u metaboličkom reprogramiranju, kroz kontrolu gena uključenih u biogenezu mitohondrija, antioksidativnu zaštitu i glikolizu [126]. Aktivnost AMPK se zato smatra ključnom za neometano funkcionisanje mitohondrija u skeletnim mišićima u uslovima oksidativnog stresa. U ovoj studiji, oba tretmana i njihova kombinacija doveli su do pojave oksidativnog stresa i, istovremeno, do aktivacije AMPK fosforilacijom na Thr¹⁷² (**Slika 4.26**), što može da ima višestruke efekte na funkcionisanje mišića. Aktivacija mitohondrijske biogeneze u mišićima regulisana od strane AMPK se dešava preko transkripcionog koaktivatora PGC1 α koji je ključan za ekspresiju gena mitohondrija u odgovoru na različite stimulse. Poznato je nekoliko mehanizama kojima AMPK može da aktivira PGC1 α , uključujući direktnu fosforilaciju [127] i deacetilaciju posredovanu SIRT1 [57]. Takođe, između aktivacije AMPK i SIRT1 postoji pozitivna povratna sprega, jer i SIRT1 može doprineti aktivaciji AMPK, kroz deacetilaciju njene kinaze LKB1 [58]. U ovoj studiji i hormonski tretman i povećan kalorijski unos bili su neophodni za aktivaciju AMPK, dok je na povećanje ekspresije PGC1 α i SIRT1 uticao samo povećan kalorijski unos (**Slika 4.22**).

Povećana aktivnost AMPK i PGC1 α , pored toga što ima ulogu u aktivaciji biogeneze mitohondrija, takođe aktivira i transkripciju gena za SOD2 i katalazu, enzime uključene u antioksidativnu zaštitu [128]. Povećanjem ekspresije enzima antioksidativne zaštite postiže se supresija oksidativnih oštećenja i na taj način se štite ćelije i tkiva. Smanjenje veličine legla je pozitivno uticalo na ekspresiju SOD2, naročito u grupi životinja gajenih u malom leglu i tretiranih DHT (**Slika 4.24**), u kojoj je uočeno i značajno povećanje količine malonil-dialdehida. Pretpostavka je da ispitivani faktor smanjene veličine legla, kroz aktivaciju AMPK i PGC1 α dovodi do uočenog povećanja ekspresije SOD2, čime se ublažavaju negativni efekti oksidativnog stresa, na koji jasno ukazuje povećana koncentracija malonil-dialdehida u mišićnom tkivu životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT.

Pored oksidativnog stresa, u skeletnim mišićima životinja gajenih u malim leglima, kao i tretiranih DHT prisutna je i inflamacija, sudeći po povećanju relativne ekspresije gena za proinflamatorne citokine, IL1 β i IL6 (**Slika 4.25**). Hiperandrogenemija može da izazove inflamaciju u skeletnim mišićima aktivacijom NF κ B i time promenu funkcionalnosti enzima uključenih u signalnu kaskadu insulina i na kraju dovede do razvoja insulinske rezistencije u mišićima [129]. Uz hiperandrogenemiju, uzrok inflamacije na nivou skeletnih mišića može biti i

gojaznost. Proinflamatorni citokini aktiviraju signalne puteve JNK i NF κ B u ciljnim ćelijama insulina, dodatno doprinoseći inflamaciji, ali i narušavajući signalnu kaskadu insulina. IL1 β je poznat kao inflamatorni medijator gojaznosti, koji doprinosi razvoju insulinske rezistencije i T2DM [130], dok IL6 pored uloge u inflamaciji ima i ulogu u preraspodeli energije u miocitima. Lučenje IL6 iz skeletnih mišića u situacijama smanjene dostupnosti energije stimuliše lipolizu u svim telesnim depozitima lipida uključujući masna tkiva i same mišiće i povećava aktivnost transportera za masne kiseline u membranama mišićnih ćelija [131]. Oba citokina takođe doprinose aktivaciji AMPK u skeletnim mišićima, kao deo adaptivnog mehanizma u odgovoru na inflamaciju, verovatno kroz povećanje koncentracije cAMP i odnosa AMP/ATP [132,133].

Sumarno, ovi rezultati ukazuju na to da su u mišićima životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT prisutni oksidativni stres i inflamacija, koji mogu biti uzrok razvoja insulinske rezistencije u ovom tkivu. Šta više, s obzirom na to da do narušavanja prenosa insulinskog signala u mišićima može doći znatno pre nego što se uoči disglukemija u cirkulaciji [134], razvoj insulinske rezistencije u skeletnim mišićima bi mogao da bude u osnovi razvoja insulinske rezistencije na sistemskom nivou [3,61]. Narušavanju prenosa insulinskog signala u skeletnim mišićima dominantno doprinosi faktor smanjenja veličine legla, dok su za manifestaciju insulinske rezistencije na sistemskom nivou potrebni i smanjenje veličine legla i DHT tretman. Prooksidativno-proinflamatorni milje u skeletnim mišićima je verovatno rezultat povećane stope β -oksidacije, što sa druge strane dovodi do adaptivne aktivacije AMPK, koja kroz regulaciju biogeneze mitohondrija i prilagođavanje nivoa antioksidativne zaštite održava funkciju mišića, uprkos izraženoj insulinskoj rezistenciji.

5.4. Doprinos povećanog kalorijskog unosa u ranom postnatalnom periodu metaboličkim promenama u animalnom modelu sindroma policističnih jajnika

Smanjivanje veličine legla je dovelo do povećane dostupnosti mleka, sledstvenog povećanja kalorijskog unosa i telesne mase životinja još za vreme perioda sisanja, u poređenju sa vršnjacima gajenim u normalnim leglima. Štaviše, povećan kalorijski unos u neposrednom postnatalnom periodu uslovio je dugoročnu hiperfagiju, verovatno zbog promene centralnih mehanizama regulacije apetita kod ovih životinja. To je dovelo do kontinuiranog unosa većih količina hrane tokom života, što se odrazilo na povećanje telesne mase i relativnog udela mase masnog tkiva u ukupnoj telesnoj masi, čineći ove životinje podložnim razvoju sistemske insulinske rezistencije.

S obzirom na povećani energetske unos tokom čitavog života, pretpostavka je da se kod životinja gajenih u malim leglima javlja hiperinsulinemija, kao adaptivni mehanizam održanja optimalne koncentracije glukoze u cirkulaciji. Ipak,

hiperinsulinemija nije uslovlila razvoj sistemske insulinske rezistencije, koja se, sudeći po vrednostima HOMA indeksa, javila samo kod životinja gajenim u malim leglima tretiranim DHT. Hiperinsulinemija, verovatno odmah po uvođenju DHT tretmana, uspostavlja pozitivan međuzavisni odnos sa hiperandrogenemijom po principu pozitivne povratne sprege, čime ova dva poremećaja uspostavljaju „začarani krug“ koji bi mogao da bude odgovoran za progresiju kako metaboličkih, tako i reproduktivnih poremećaja karakterističnih za PCOS. Kako je ranije u tekstu istaknuto, insulin na nivou jajnika deluje gonadotropno, doprinoseći povećanoj sintezi androgena. Dok u uslovima hiperinsulinemije slabi osetljivost na insulin u metabolički aktivnim tkivima i organima, čime se narušava i njihova funkcionalnost, u jajnicima ona ostaje neizmenjena [135].

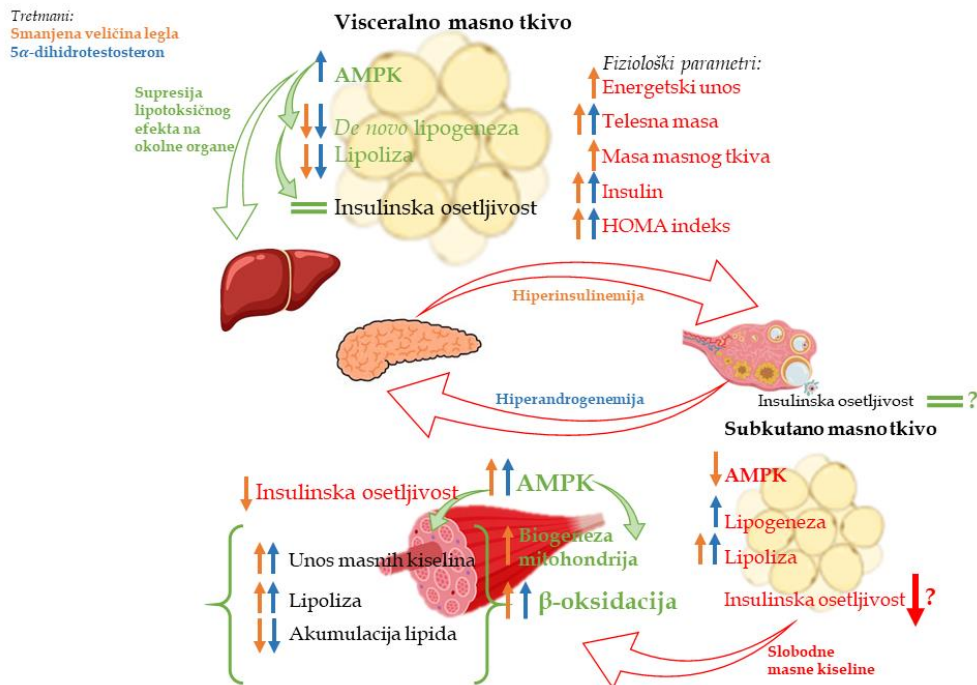
Povećani kalorijski unos i hiperandrogenemija uzrokuju hipertrofiju i povećanje mase visceralnog masnog tkiva, ali očekivan razvoj rezistencije na insulin u ovom depou nije pokazan. Aktivirana AMPK predstavlja verovatni protektivni mehanizam čuvanja insulinske osetljivosti na nivou ovog depoa masnog tkiva, sprečavanja njegove dalje ekspanzije i umanjenja lipotoksičnog efekta na jetru, s obzirom na neposrednu komunikaciju ova dva tkiva kroz portnu cirkulaciju.

Visceralno masno tkivo je alternativni depo za akumulaciju viška energije, koji se razvija kada se prevaziđu kapaciteti subkutanog masnog tkiva da skladišti lipide, ili kada je ono disfunkcionalno. Izostanak proliferacije uočen histološkom analizom subkutanog masnog tkiva, ukazuje na njegovu disfunkcionalnost, što potvrđuje istovremena aktivacija lipolitičkih i lipogenih procesa u ovom tkivu. Interesantno je istaći da je, za razliku od visceralnog, u subkutanom masnom tkivu ženki poreklom iz malih legala zabeleženo upečatljivo smanjenje kako fosforilisane, tako i ukupne forme AMPK. Neki autori su pokazali da određeni androgeni stimulatorno utiču na aktivaciju AMPK [103], dok drugi tvrde suprotno [47]. Međutim, imajući u vidu da su u subkutanom masnom tkivu daleko zastupljeniji receptori za estrogene nego za androgene [52], nedostatak estrogena u našem eksperimentalnom modelu bi mogao da doprinosi smanjenoj količini AMPK u subkutanom masnom tkivu [136].

Masne kiseline oslobođene procesom lipolize iz subkutanog masnog tkiva životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT-om verovatno bivaju usvojene od strane skeletnih mišića, s obzirom na povećanu ekspresiju gena *Fatp1* u ovom tkivu. U uslovima narušene insulinske signalizacije usled smanjenja veličine legla ili DHT tretmana u skeletnim mišićima ovih životinja, pretpostavka je da mišići dominantno troše masne kiseline kao izvor energije umesto glukoze. Povećana stopa β -oksidacije neminovno dovodi do oksidativnog stresa o kome u ovoj studiji svedoči povećana koncentracija malonil-dialdehida. Aktivirana AMPK bi mogla da bude odgovorna i za aktivaciju enzima antioksidativne zaštite, o čemu svedoči povećana ekspresija SOD2 usled smanjenja veličine legla, i za aktivaciju biogeneze mitohondrija, čime se skeletni mišići održavaju u metabolički funkcionalnom stanju, uprkos prisutnoj insulinskoj rezistenciji i inflamaciji.

Uzevši sve rezultate u obzir, u ovom modelu PCOS udruženom sa povećanjem telesne mase, uspostavlja se pozitivna povratna sprega između hiperandrogenemije i hiperinsulinemije, koja, zajedno sa povećanim energetske unosom, uslovljava

razvoj insulinske rezistencije na nivou skeletnih mišića. Aktivacija energetskog senzora AMPK predstavlja protektivni mehanizam, koji održava funkcionalnost visceralnog masnog tkiva i skeletnih mišića kao i metabolički integritet na sistemskom nivou. (Slika 5.1).



SLIKA 5.1. EFEKTI POVEĆANOG KALORIJSKOG UNOSA U RANOM POSTNATALNOM RAZVOJU NA METABOLIČKE PROMENE U ANIMALNOM MODELU PCOS-A KORIŠĆENOM U OVOJ STUDIJU

Rezultati ove studije ukazuju da AMPK predstavlja vrednu terapijsku metu za ublažavanje metaboličke disfunkcionalnosti u klasičnim PCOS fenotipima u kojima je prisutna hiperandrogenemija. U tom svetlu, zadatak budućih istraživanja je da otkriju koji faktori doprinose njegovoj aktivaciji kroz fosforilaciju, a i koji smanjuju stabilnost ovog molekula i dovode do njegove degradacije u pojedinim tkivima, u uslovima smanjene osetljivosti na insulin.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Ženke pacova gajene u malim leglima postižu značajno veći prirast telesne mase i udeo visceralne masne mase u ukupnoj telesnoj masi od vršnjakinja gajenih u leglima prosečne veličine, usled povećanog kalorijskog unosa koji se održava tokom života.
- Tretman ženki DHT dovodi do reproduktivnih promena karakterističnih za animalni model PCOS, koje se ogledaju u smanjenju mase jajnika i materice, kao i do histoloških obeležja karakterističnih za disfunkcionalne jajnike.
- Visceralno masno tkivo životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT karakteriše prisustvo hipertrofiranih adipocita, za razliku od subkutanog masnog tkiva u kome nisu uočene hiperplastične, niti hipertrofične promene.
- Životinje gajene u malim leglima i tretirane DHT imaju narušenu insulinsku osetljivost na sistemskom nivou, koja se karakteriše kompenzatornom hiperinsulinemijom u cilju održanja glikemije.
- U visceralnom masnom tkivu životinja tretiranih DHT aktivirana je AMPK, što se može interpretirati kao protektivni mehanizam koji sprečava narušavanje insulinske signalizacije u ovom tkivu. Aktivacija AMPK takođe doprinosi očuvanju funkcionalnosti skeletnih mišića, dok je u subkutanom masnom tkivu zabeleženo smanjenje ekspresije ovog proteina uslovljeno smanjenom veličinom legla.
- *De novo* lipogeneza u visceralnom masnom tkivu ženki svih eksperimentalnih grupa je suprimirana, što može predstavljati adaptivni mehanizam da se spreči dalja ekspanzija masnog tkiva i insulinska rezistencija na nivou ovog tkiva.
- Lipidni metabolizam subkutanog masnog tkiva kod DHT tretiranih životinja se karakteriše istovremenim povećanjem ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u lipogenezu i u lipolizu, koja je stimulirana interakijom ispitivanih faktora. Pored odsustva adipogeneze, ovaj rezultat ide u prilog disfunkcionalnosti ovog depoa masnog tkiva. Smanjena funkcija subkutanog masnog tkiva se može dovesti u vezu sa povećanom masom visceralnog masnog tkiva i sistemskom insulinskom rezistencijom.
- U skeletnom mišiću ženki gajenih u malim leglima su uočene promene u funkcionalnosti insulinskog signalnog puta, dok je DHT tretman doveo do smanjenog unosa glukoze u mišićne ćelije.

- Uprkos povećanom unosu masnih kiselina u mišiće životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT, one se u ovom organu ne deponuju, već se troše u procesu β -oksidacije.
- Povećana stopa β -oksidacije je praćena oksidativnim stresom u skeletnim mišićima, što, zajedno sa povećanim nivoom proinflammatoryh citokina, dovodi do aktivacije AMPK kod životinja gajenih u malim leglima i tretiranih DHT. Aktivacija AMPK verovatno dovodi do aktivacije puteva mitohondrijske biogeneze i antioksidativne zaštite, što predstavlja adaptivni mehanizam za očuvanje funkcionalnosti mišića i održanje homeostaze na sistemskom nivou.

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, povećan kalorijski unos u ranom postnatalnom periodu očigledno doprinosi smanjenju insulinske osetljivosti u perifernim metaboličkim tkivima, dok je za puno izražavanje insulinske rezistencije potrebna interakcija između hiperandrogenemije, i povećane mase visceralnog masnog tkiva.

AMPK se ističe kao metabolički regulator sa velikim protektivnim potencijalom i u visceralnom masnom tkivu i skeletnim mišićima, koji doprinosi očuvanju energetske homeostaze, uprkos patološki izmenjenim metaboličkim putevima na nivou oba tkiva, što je stavlja u istraživački fokus u kontekstu optimizacije terapijskih pristupa kod gojaznih pacijentkinja sa PCOS.

Animalni model razvijen za potrebe ove studije, koji podrazumeva kontinuirani DHT tretman mladih ženki pacova, unapređen ranim postnatalnim prekomernim kalorijskim unosom postignutim kroz smanjenje veličine legla predstavlja vredan i lako dostupan alat za istraživanje interakcija između umerene gojaznosti u prepubertetskom periodu i hiperandrogenemije na nivou molekularnih mehanizama u metaboličkim tkivima. Među najvećim izazovima, kako za razumevanje etiologije, tako i za efikasniji pristup u lečenju PCOS nastavlja da bude „začarani krug“ između hiperandrogenemije i hiperinsulinemije. Buduća istraživanja na upravo ovakvom modelu mogla bi da doprinesu rešenju tog izazova.

7. Literatura

- (1) Azziz, R. Brief History of Androgen Excess. In *Contemporary Endocrinology: Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders*; Azziz, R., Nestler, J. E., Dewailly, D., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, **2006**; pp 3–16.
- (2) Diamanti-Kandarakis, E.; Dunaif, A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited: An Update on Mechanisms and Implications. *Endocr. Rev.* **2012**, *33* (6), 981–1030. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1034>.
- (3) Stepto, N. K.; Moreno-Asso, A.; Mcilvenna, L. C.; Walters, K. A.; Rodgers, R. J. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome: Unraveling the Conundrum in Skeletal Muscle? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104* (11), 5372–5381. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00167>.
- (4) Conway, G.; Dewailly, D.; Diamanti-Kandarakis, E.; Escobar-Morreale, H. F.; Franks, S.; Gambineri, A.; Kelestimur, F.; Macut, D.; Micic, D.; Pasquali, R.; Pfeifer, M.; Pignatelli, D.; Pugeat, M.; Yildiz, B. O. The Polycystic Ovary Syndrome: A Position Statement from the European Society of Endocrinology. *Eur. J. Endocrinol.* **2014**, *171* (4), P1–P29. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0253>.
- (5) Stener-Victorin, E.; Padmanabhan, V.; Walters, K. A.; Campbell, R. E.; Benrick, A.; Giacobini, P.; Dumesic, D. A.; Abbott, D. H. Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr. Rev.* **2020**, *41* (4), 1–39. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa010>.
- (6) Deswal, R.; Narwal, V.; Dang, A.; Pundir, C. S. The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. *J. Hum. Reprod. Sci.* **2020**, 261–272. <https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS>.
- (7) Dewailly, D. Diagnostic Criteria for PCOS: Is There a Need for a Rethink? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2016**, *37*, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.03.009>.
- (8) Guo, Z.; Jin, F.; Chen, S.; Hu, P.; Hao, Y.; Yu, Q. Correlation between Biochemical and Clinical Hyperandrogenism Parameter in Polycystic Ovary Syndrome in Relation to Age. *BMC Endocr. Disord.* **2023**, *23* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12902-023-01346-x>.
- (9) The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 Consensus on Diagnostic Criteria and Long- Term Health Risks Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Hum. Reprod.* **2004**, *19* (1), 41–47. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh098>.

- (10) Azziz, R.; Carmina, E.; Dewailly, D.; Diamanti-Kandarakis, E.; Escobar-Morreale, H. F.; Futterweit, W.; Janssen, O. E.; Legro, R. S.; Norman, R. J.; Taylor, A. E.; Witchel, S. F. POSITION STATEMENT: Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91* (11), 4237–4245. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0178>.
- (11) Fauser, B. C. J. M.; Tarlatzis, B. C.; Rebar, R. W.; Legro, R. S.; Balen, A. H.; Lobo, R.; Carmina, E.; Chang, J.; Yildi, B. O.; Laven, Joop, S. E.; Boivin, J.; Petraglia, F.; Wijeyerante, C. N.; Norman, R. J.; Dunaif, A.; Franks, S.; Wild, R. A.; Dumesic, D.; Barnhart, K. Consensus on Women’s Health Aspects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil. Steril.* **2012**, *97* (1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024>.
- (12) Witchel, S. F.; Teede, H. J.; Peña, A. S. Curtailing PCOS. *Pediatr. Res.* **2020**, *87* (2), 353–361. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0615-1>.
- (13) Teede, H. J.; Misso, M. L.; Costello, M. F.; Dokras, A.; Laven, J.; Moran, L.; Piltonen, T.; Norman, R. J. Recommendations from the International Evidence-Based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. *Hum. Reprod.* **2018**, *33* (9), 1602–1618. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey256>.
- (14) Carmina, E. Need to Introduce the Finding of Obesity or Normal Body Weight in the Current Diagnostic Criteria and in the Classification of PCOS. *Diagnostics* **2022**, *12* (10). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102555>.
- (15) Azziz, R.; Carmina, E.; Chen, Z.; Dunaif, A.; Laven, J. S. E.; Legro, R. S.; Lizneva, D.; Natterson-Horowitz, B.; Teede, H. J.; Yildiz, B. O. Polycystic Ovary Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>.
- (16) Dapas, M.; Dunaif, A. Deconstructing a Syndrome: Genomic Insights into PCOS Causal Mechanisms and Classification. *Endocr. Rev.* **2022**, *43* (6), 927–965. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac001>.
- (17) Banaszewska, B.; Spaczyński, R. Z.; Pelesz, M.; Pawelczyk, L. Incidence of Elevated LH/FSH Ratio in Polycystic Ovary Syndrome Women with Normo- and Hyperinsulinemia. *Rocz. Akad. Med. w Białymstoku* **2003**, *48*, 131–134.
- (18) Burt Solorzano, C. M.; McCartney, C. R.; Blank, S. K.; Knudsen, K. L.; Marshall, J. C. Hyperandrogenaemia in Adolescent Girls: Origins of Abnormal Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2010**, *117* (2), 143–149. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2009.02383.x>.
- (19) Rosenfield, R. L.; Ehrmann, D. A. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian. *Endocr. Rev.* **2016**, *37* (October), 467–520. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1104>.

- (20) Fauser, B. C. J. M.; Van Heusden, A. M. Manipulation of Human Ovarian Function: Physiological Concepts and Clinical Consequences. *Endocr. Rev.* **1997**, *18* (1), 71–106. <https://doi.org/10.1210/er.18.1.71>.
- (21) Broekmans, F. J.; Visser, J. A.; Laven, J. S. E.; Broer, S. L.; Themmen, A. P. N.; Fauser, B. C. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Dysfunction. *Trends Endocrinol. Metab.* **2008**, *19* (9), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.08.002>.
- (22) Hardy, O. T.; Czech, M. P.; Corvera, S. What Causes the Insulin Resistance Underlying Obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2012**, *19* (2), 81–87. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283514e13>.
- (23) Li, M.; Chi, X.; Wang, Y.; Setrerrahmane, S.; Xie, W.; Xu, H. Trends in Insulin Resistance: Insights into Mechanisms and Therapeutic Strategy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>.
- (24) Macut, D.; Bjekić-Macut, J.; Rahelić, D.; Doknić, M. Insulin and the Polycystic Ovary Syndrome. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2017**, *130*, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.06.011>.
- (25) Stepto, N. K.; Cassar, S.; Joham, A. E.; Hutchison, S. K.; Harrison, C. L.; Goldstein, R. F.; Teede, H. J. Women with Polycystic Ovary Syndrome Have Intrinsic Insulin Resistance on Euglycaemic – Hyperinsulaemic Clamp. *Hum. Reprod.* **2013**, *28* (3), 777–784. <https://doi.org/10.1093/humrep/des463>.
- (26) Rajkhowa, M.; Brett, S.; Cuthbertson, D. J.; Lipina, C.; Ruiz-alcaraz, A. J.; Thomas, G. E.; Logie, L.; Petrie, J. R.; Sutherland, C. Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome Is Associated with Defective Regulation of ERK1/2 by Insulin in Skeletal Muscle in Vivo. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 665–671. <https://doi.org/10.1042/BJ20082176>.
- (27) Burt Solorzano, C. M.; Knudsen, K. L.; Anderson, A. D.; Hutchens, E. G.; Collins, J. S.; Patrie, J. T.; Marshall, J. C.; McCartney, C. R. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and LH: Relative Roles in Peripubertal Obesity-Associated Hyperandrogenemia. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* **2018**, *103* (7), 2571–2582. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00131>.
- (28) Reinehr, T.; de Sousa, G.; Roth, C. L.; Andler, W. Androgens before and after Weight Loss in Obese Children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (10), 5588–5595. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0438>.
- (29) Du, X.; Rosenfield, R. L.; Qin, K. KLF15 Is a Transcriptional Regulator of the Human Potential Link between Regulation of Testosterone Production and Fat Stores in Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94* (7), 2594–2601. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0139>.

- (30) L'Allemand, D.; Schmidt, S.; Rousson, V.; Brabant, G.; Gasser, T.; Gru, A. Associations between Body Mass, Leptin, IGF-I and Circulating Adrenal Androgens in Children with Obesity and Premature Adrenarche. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, *146*, 537–543.
- (31) Burt Solorzano, C. M.; McCartney, C. R. Obesity and the Pubertal Transition in Girls and Boys. *Reproduction* **2010**, *140*, 390–410. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0119>.
- (32) Anderson, A. D.; Solorzano, C. M. B.; McCartney, C. R. Childhood Obesity and Its Impact on the Development of Adolescent PCOS. *Semin. Reprod. Med.* **2014**, *32* (3), 202–213. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371092>.
- (33) Ibáñez, L.; de Zegher, F. Adolescent PCOS: A Postpubertal Central Obesity Syndrome. *Trends Mol. Med.* **2023**, *29* (5), 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.02.006>.
- (34) Durá-Travé, T.; Gallinas-Victoriano, F. Hyper-Androgenemia and Obesity in Early-Pubertal Girls. *J. Endocrinol. Invest.* **2022**, *45* (8), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01797-4>.
- (35) Ding, H.; Zhang, J.; Zhang, F.; Zhang, S.; Chen, X.; Wenging, L.; Xie, Q. Resistance to the Insulin and Elevated Level of Androgen: A Major Cause of Polycystic Ovary Syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 741764. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.741764>.
- (36) Pasquali, R.; Oriolo, C. Obesity and Androgens in Women. *Front. Horm. Res.* **2019**, *53*, 120–134. <https://doi.org/10.1159/000494908>.
- (37) Cinti, S. The Adipose Organ at a Glance. *DMM Dis. Model. Mech.* **2012**, *5* (5), 588–594. <https://doi.org/10.1242/dmm.009662>.
- (38) Luo, L.; Liu, M. Adipose Tissue in Control of Metabolism. *J. Endocrinol.* **2016**, *231*, R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>.
- (39) Cinti, S. Between Brown and White: Novel Aspects of Adipocyte Differentiation. *Ann. Med.* **2011**, *43*, 104–115. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.535557>.
- (40) Cinti, S. The Adipose Organ: Morphological Perspectives of Adipose Tissues. *Proc. Nutr. Soc.* **2001**, *60*, 319–328. <https://doi.org/10.1079/pns200192>.
- (41) Luong, Q.; Huang, J.; Lee, K. Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel)*. **2019**, *8* (23). <https://doi.org/10.3390/biology8020023>.
- (42) Cinti, S. The Adipose Organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2005**, *73*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.010>.
- (43) Chouchani, E. T.; Kajimura, S. Metabolic Adaptation and Maladaptation in Adipose Tissue. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 189–200. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0021-8>.

- (44) Shi, Y.; Cheng, D. Beyond Triglyceride Synthesis: The Dynamic Functional Roles of MGAT and DGAT Enzymes in Energy Metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2009**, *297* (1), 10-18. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90949.2008>.
- (45) Jensen, N. J.; Wodschow, H. Z.; Nilsson, M.; Rungby, J. Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (22), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms21228767>.
- (46) Ahmadian, M.; Wang, Y.; Sook, H. S. Medicine in Focus: Lipolysis in Adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42* (5), 555-559. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.009.Medicine>.
- (47) McInnes, K. J.; Corbould, A.; Simpson, E. R.; Jones, M. E. Regulation of Adenosine 5',Monophosphate-Activated Protein Kinase and Lipogenesis by Androgens Contributes to Visceral Obesity in an Estrogen-Deficient State. *Endocrinology* **2006**, *147* (12), 5907-5913. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0879>.
- (48) Bijland, S.; Mancini, S. J.; Salt, I. P. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Adipose Tissue Metabolism and Inflammation. *Clin. Sci.* **2013**, *124* (8), 491-507. <https://doi.org/10.1042/CS20120536>.
- (49) Daval, M.; Fougelle, F.; Ferré, P. Functions of AMP-Activated Protein Kinase in Adipose Tissue. *J. Physiol.* **2006**, *574* (1), 55-62. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111484>.
- (50) Jo, J.; Gavrilova, O.; Pack, S.; Jou, W.; Mullen, S.; Sumner, A. E.; Cushman, S. W.; Perival, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.* | **2009**, *5* (3), e1000324. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000324>.
- (51) Solinas, G.; Karin, M. JNK1 and IKK β : Molecular Links between Obesity and Metabolic Dysfunction. *FASEB J.* **2010**, *24* (8), 2596-2611. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151340>.
- (52) Ibrahim, M. M. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obes. Rev.* **2010**, *11* (1), 11-18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>.
- (53) Frayn, K. N. Visceral Fat and Insulin Resistance - Causative or Correlative? *Br. J. Nutr.* **2000**, *83* (S1), S71-S77. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000982>.
- (54) Schnyder, S.; Handschin, C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: PGC-1 α , Myokines and Exercise. *Bone* **2015**, *80*, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.008>.
- (55) Mukund, K.; Subramaniam, S. Skeletal Muscle: A Review of Molecular Structure and Function, in Health and Disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2020**, *12* (1), 1-46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.

- (56) Muoio, D. M.; Koves, T. R. Skeletal Muscle Adaptation to Fatty Acid Depends on Coordinated Actions of the PPARs and PGC1 α : Implications for Metabolic Disease. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2007**, *32* (5), 874–883. <https://doi.org/10.1139/H07-083>.
- (57) Canto, C.; Gerhart-Hines, Z.; Feige, J. N.; Lagouge, M.; Noriega, L.; Milne, J. C.; Elliott, P. J.; Puigserver, P.; Auwerx, J. AMPK Regulates Energy Expenditure by Modulating NAD⁺ Metabolism and SIRT1 Activity. *Nature* **2009**, 458. <https://doi.org/10.1038/nature07813>.
- (58) Lan, F.; Cacicedo, J. M.; Ruderman, N.; Ido, Y. SIRT1 Modulation of the Acetylation Status, Cytosolic Localization, and Activity of LKB1. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (41), 27628–27635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805711200>.
- (59) Kjøbsted, R.; Hingst, J. R.; Fentz, J.; Foretz, M.; Sanz, M.-N.; Pehmøller, C.; Shum, M.; Marette, A.; Mounier, R.; Treebak, J. T.; Wojtaszewski, Jørgen F. P. Viollet, B.; Lantier, L. AMPK in Skeletal Muscle Function and Metabolism. *FASEB J.* **2018**, *32*, 1741–1777. <https://doi.org/10.1096/fj.201700442R>.
- (60) Zidane, A. S.; Kovačević, S.; Brkljačić, J.; Teofilović, A.; Elaković, I.; Djordjevic, A.; Matic, G. Decreased Glucocorticoid Signaling Potentiates Lipid-Induced Inflammation and Contributes to Insulin Resistance in the Skeletal Muscle of Fructose-Fed Male Rats Exposed to Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7206. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22137206>.
- (61) McDonnell, T.; Cussen, L.; McIlroy, M.; O'Reilly, M. W. Characterizing Skeletal Muscle Dysfunction in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **2022**, *13*, 1–15. <https://doi.org/10.1177/20420188221113140>.
- (62) Fazakerley, D. J.; Krycer, J. R.; Kearney, A. L.; Hocking, S. L.; James, D. E. Muscle and Adipose Tissue Insulin Resistance: Malady without Mechanism? *J. Lipid Res.* **2019**, *60* (10), 1720–1732. <https://doi.org/10.1194/jlr.R087510>.
- (63) Hansen, S. L.; Svendsen, P. F.; Jeppesen, J. F.; Hoeg, L. D.; Andersen, N. R.; Kristensen, J. M.; Nilas, L.; Lundsgaard, A.; Wojtaszewski, J. F. P.; Madsbad, S.; Kiens, B. Molecular Mechanisms in Skeletal Muscle Underlying Insulin Resistance in Women Who Are Lean With Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* **2019**, *160*, 1841–1854. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01771>.
- (64) Azziz, R. PCOS: Animal Models for PCOS-Not the Real Thing. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13* (7), 382–384. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.57>.
- (65) Walters, K. A. Androgens in Polycystic Ovary Syndrome: Lessons from Experimental Models. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2016**, *23* (3), 257–263. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000245>.
- (66) Stener-Victorin, E. Update on Animal Models of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol. (United States)* **2022**, *163* (12), 1–11. <https://doi.org/10.1210/endo/bqac164>.

- (67) Aflatounian, A.; Edwards, M. C.; Paris, V. R.; Bertoldo, M. J.; Desai, R.; Gilchrist, R. B.; Ledger, W. L.; Handelsman, D. J.; Walters, K. A. Androgen Signaling Pathways Driving Reproductive and Metabolic Phenotypes in a PCOS Mouse Model. *J. Endocrinol.* **2020**, *245* (3), 381–395. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0530>.
- (68) Abbott, D. H.; Nicol, L. E.; Levine, J. E.; Xu, N.; Goodarzi, M. O.; Dumesic, D. A. Nonhuman Primate Models of Polycystic Ovary Syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *373* (1–2), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.013>.
- (69) Nikolić, M.; Macut, D.; Djordjevic, A.; Veličković, N.; Nestorović, N.; Bursać, B.; Antić, I. B.; Macut, J. B.; Matic, G.; Vojnović Milutinović, D. Possible Involvement of Glucocorticoids in 5 α -Dihydrotestosterone-Induced PCOS-like Metabolic Disturbances in the Rat Visceral Adipose Tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *399*, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.08.013>.
- (70) Mannerås, L.; Cajander, S.; Holmäng, A.; Seleskovic, Z.; Lystig, T.; Lönn, M.; Stener-Victorin, E. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology* **2007**, *148* (8), 3781–3791. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0168>.
- (71) Habbout, A.; Li, N.; Rochette, L.; Vergely, C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *J. Nutr.* **2013**, *143* (5), 553–562. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>.
- (72) Grove, K. L.; Smith, M. S. Ontogeny of the Hypothalamic Neuropeptide Y System. *Physiol. Behav.* **2003**, *79* (1), 47–63. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00104-5).
- (73) Kaung, H. C. Growth Dynamics of Pancreatic Islet Cell Populations during Fetal and Neonatal Development of the Rat. *Dev. Dyn.* **1994**, *200* (2), 163–175. <https://doi.org/10.1002/aja.1002000208>.
- (74) Plagemann, A.; Harder, T.; Rake, A.; Melchior, K.; Rohde, W. Increased Number of Galanin-Neurons in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus of Neonatally Overfed Weanling Rats. *Brain Research* **1999**, *818*, 160–163.
- (75) Šefčíková, Z.; Bujňáková, D.; Raček, L.; Kmet, V.; Možeš, Š. Developmental Changes in Gut Microbiota and Enzyme Activity Predict Obesity Risk in Rats Arising From Reduced Nests. *Physiol. Res.* **2011**, *8408*, 337–346. <https://doi.org/https://doi.org/10.33549/physiolres.931939>.
- (76) Souza, L. L.; Moura, E. G.; Lisboa, P. C. Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring. *Nutrients* **2022**, *14* (10). <https://doi.org/10.3390/nu14102045>.

- (77) Silfen, M. E.; Denburg, M. R.; Manibo, A. M.; Lobo, R. A.; Jaffe, R.; Ferin, M.; Levine, L. S.; Oberfield, S. E. Early Endocrine, Metabolic, and Sonographic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Comparison between Nonobese and Obese Adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88* (10), 4682–4688. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030617>.
- (78) Cora, M. C.; Kooistra, L.; Travlos, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol. Pathol.* **2015**, *43* (6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.
- (79) Rodríguez-López, J. M.; Lachica, M.; González-Valero, L.; Fernández-Figares, I. Determining Insulin Sensitivity from Glucose Tolerance Tests in Iberian and Landrace Pigs. *PeerJ* **2021**, *9*, e11014. <https://doi.org/10.7717/peerj.11014>.
- (80) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L. A.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
- (81) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- (82) NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide Trends in Body-Mass Index, Underweight, Overweight, and Obesity from 1975 to 2016: A Pooled Analysis of 2416 Population-Based Measurement Studies in 128.9 Million Children, Adolescents, and Adults. *Lancet* **2017**, *390* (10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3).
- (83) Costa, V. M. G.; Andreazzi, A. E.; Bolotari, M.; Lade, C. G.; Guerra, M. O.; Peters, V. M. Effect of Postnatal Overfeeding on the Male and Female Wistar Rat Reproductive Parameters. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2019**, *10* (6), 667–675. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000163>.
- (84) McCartney, C. R.; Prendergast, K. A.; Chhabra, S.; Eagleson, C. A.; Yoo, R.; Chang, R. J.; Foster, C. M.; Marshall, J. C. The Association of Obesity and Hyperandrogenemia during the Pubertal Transition in Girls: Obesity as a Potential Factor in the Genesis of Postpubertal Hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91* (5), 1714–1722. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1852>.
- (85) Pinola, P.; Lashen, H.; Bloigu, A.; Puukka, K.; Ulmanen, M.; Ruokonen, A.; Martikainen, H.; Pouta, A.; Franks, S.; Hartikainen, A. L.; Järvelin, M. R.; Morin-Papunen, L. Menstrual Disorders in Adolescence: A Marker for Hyperandrogenaemia and Increased Metabolic Risks in Later Life? Finnish General Population-Based Birth Cohort Study. *Hum. Reprod.* **2012**, *27* (11), 3279–3286. <https://doi.org/10.1093/humrep/des309>.

- (86) Boullu-Ciocca, S.; Dutour, A.; Guillaume, V.; Achard, V.; Oliver, C.; Grino, M. Postnatal Diet-Induced Obesity in Rats Upregulates Systemic and Adipose Tissue Glucocorticoid Metabolism During Development and in Adulthood. *Diabetes* **2005**, *54*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.014>.
- (87) Castellano, J. M.; Bentsen, A. H.; Sánchez-Garrido, M. A.; Ruiz-Pino, F.; Romero, M.; Garcia-Galiano, D.; Aguilar, E.; Pinilla, L.; Diéguez, C.; Mikkelsen, J. D.; Tena-Sempere, M. Early Metabolic Programming of Puberty Onset: Impact of Changes in Postnatal Feeding and Rearing Conditions on the Timing of Puberty and Development of the Hypothalamic Kisspeptin System. *Endocrinology* **2011**, *152* (9), 3396–3408. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1415>.
- (88) Novelle, M. G.; Vázquez, M. J.; Peinado, J. R.; Martinello, K. D.; López, M.; Luckman, S. M.; Tena-Sempere, M.; Malagón, M. M.; Nogueiras, R.; Diéguez, C. Sequential Exposure to Obesogenic Factors in Females Rats: From Physiological Changes to Lipid Metabolism in Liver and Mesenteric Adipose Tissue. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46194>.
- (89) Gambineri, A.; Pelusi, C. Sex Hormones, Obesity and Type 2 Diabetes: Is There a Link? *Endocr. Connect.* **2019**, *8* (1), R1–R9. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0450>.
- (90) Behboudi-Gandevani, S.; Ramezani Tehrani, F.; Rostami Dovom, M.; Farahmand, M.; Bahri Khomami, M.; Noroozadeh, M.; Kabir, A.; Azizi, F. Insulin Resistance in Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Gynecol. Endocrinol.* **2016**, *32* (5), 343–353. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1117069>.
- (91) Chun, S. Predictive Capability of Fasting-State Glucose and Insulin Measurements for Abnormal Glucose Tolerance in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **2021**, *48* (2), 156–162. <https://doi.org/10.5653/cerm.2020.04308>.
- (92) Klein, S.; Gastaldelli, A.; Yki-Järvinen, H.; Scherer, P. E. Why Does Obesity Cause Diabetes? *Cell Metab.* **2022**, *34* (1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>.
- (93) Caron, E.; Ciofi, P.; Prevot, V.; Bouret, S. G. Alteration in Neonatal Nutrition Causes Perturbations in Hypothalamic Neural Circuits Controlling Reproductive Function. *J. Neurosci.* **2012**, *32* (33), 11486–11494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6074-11.2012>.
- (94) Ristić, N.; Nestorović, N.; Manojlović-Stojanoski, M.; Trifunović, L.; Ajdžanović, V.; Filipović, B.; Pendovski, L.; Milošević, V. Prenatal Dexamethasone Exposure and Developmental Programming of the Ovary of the Offspring: A Structural Study in the Rat. *Reprod. Fertility Dev.* **2021**, *33* (3), 245–255. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/RD20164>.

- (95) Stocco, C.; Telleria, C.; Gibori, G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocr. Rev.* **2007**, *28* (1), 117–149. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0022>.
- (96) Makita, T.; Hirose, H. Several Types of Granule Indicating Steroidgenesis in the Interstitial Gland Cells of Murine Ovary. *Pathophysiology* **1994**, *1* (2), 79–89. [https://doi.org/10.1016/0928-4680\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0928-4680(94)90020-5).
- (97) Després, J. P.; Lemieux, I. Abdominal Obesity and Metabolic Syndrome. *Nature* **2006**, *444* (7121), 881–887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>.
- (98) True, C. A.; Takahashi, D. L.; Burns, S. E.; Mishler, E. C.; Bond, K. R.; Wilcox, M. C.; Calhoun, A. R.; Bader, L. A.; Dean, T. A.; Ryan, N. D.; Slayden, O. D.; Cameron, J. L.; Stouffer, R. L. Chronic Combined Hyperandrogenemia and Western-Style Diet in Young Female Rhesus Macaques Causes Greater Metabolic Impairments Compared to Either Treatment Alone. *Hum. Reprod.* **2017**, *32* (9), 1880–1891. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex246>.
- (99) Varlamov, O.; Bishop, C. V.; Handu, M.; Takahashi, D.; Srinivasan, S.; White, A.; Roberts, C. T. Combined Androgen Excess and Western-Style Diet Accelerates Adipose Tissue Dysfunction in Young Adult, Female Nonhuman Primates. *Hum. Reprod.* **2017**, *32* (9), 1892–1902. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex244>.
- (100) Heilbronn, L.; Smith, S. R.; Ravussin, E. Failure of Fat Cell Proliferation, Mitochondrial Function and Fat Oxidation Results in Ectopic Fat Storage, Insulin Resistance and Type II Diabetes Mellitus. *Int. J. Obes.* **2004**, *28* (SUPPL. 4), 12–21. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802853>.
- (101) Ortega, F. J.; Mayas, D.; Moreno-Navarrete, J. M.; Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Esteve, E.; Rodriguez-Hermosa, J. I.; Ruiz, B.; Ricart, W.; Peral, B.; Fruhbeck, G.; Tinahones, F. J.; Fernández-Real, J. M. The Gene Expression of the Main Lipogenic Enzymes Is Downregulated in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects. *Obesity* **2010**, *18* (1), 13–20. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.202>.
- (102) Fernandez, C.; Schuhmann, K.; Herzog, R.; Fielding, B.; Frayn, K.; Shevchenko, A.; James, P.; Holm, C.; Ström, K. Altered Desaturation and Elongation of Fatty Acids in Hormone-Sensitive Lipase Null Mice. *PLoS One* **2011**, *6* (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021603>.
- (103) Mitsushashi, K.; Senmaru, T.; Fukuda, T.; Yamazaki, M.; Shinomiya, K.; Ueno, M.; Kinoshita, S.; Kitawaki, J.; Katsuyama, M.; Tsujikawa, M.; Obayashi, H.; Nakamura, N.; Fukui, M. Testosterone Stimulates Glucose Uptake and GLUT4 Translocation through LKB1/AMPK Signaling in 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrine* **2016**, *51* (1), 174–184. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0666-y>.

- (104) Gauthier, M. S.; Pérusse, J. R.; Lavoie, M. È.; Sladek, R.; Madiraju, S. R. M.; Ruderman, N. B.; Coulombe, B.; Prentki, M.; Rabasa-Lhoret, R. Increased Subcutaneous Adipose Tissue Expression of Genes Involved in Glycerolipid-Fatty Acid Cycling in Obese Insulin-Resistant versus -Sensitive Individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99* (12), E2518–E2528. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1662>.
- (105) Ruderman, N. B.; Carling, D.; Prentki, M.; Cacicedo, J. M. AMPK, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123* (7), 2764–2772. <https://doi.org/10.1172/JCI67227.2764>.
- (106) Sanchez-Garrido, M. A.; Tena-Sempere, M. Metabolic Dysfunction in Polycystic Ovary Syndrome: Pathogenic Role of Androgen Excess and Potential Therapeutic Strategies. *Mol. Metab.* **2020**, *35*, 100937. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.001>.
- (107) Douchi, T.; Oki, T.; Yamasaki, H.; Kuwahata, R.; Nakae, M.; Nagata, Y. Relationship of Androgens to Muscle Size and Bone Mineral Density in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet. Gynecol.* **2001**, *98* (3), 445–449. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(01\)01450-8](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(01)01450-8).
- (108) Kogure, G. S.; Silva, R. C.; Picchi Ramos, F. K.; Miranda-Furtado, C. L.; Lara, L. A. D. S.; Ferriani, R. A.; Dos Reis, R. M. Women with Polycystic Ovary Syndrome Have Greater Muscle Strength Irrespective of Body Composition. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31* (3), 237–242. <https://doi.org/10.3109/09513590.2014.982083>.
- (109) Carmina, E.; Guastella, E.; Longo, R. A.; Rini, G. B.; Lobo, R. A. Correlates of Increased Lean Muscle Mass in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* **2009**, *161* (4), 583–589. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0398>.
- (110) Mario, F. M.; Do Amarante, F.; Toscani, M. K.; Spritzer, P. M. Lean Muscle Mass in Classic or Ovulatory PCOS: Association with Central Obesity and Insulin Resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2012**, *120* (9), 511–516. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1309006>.
- (111) Stuart, C. A.; Mccurry, M. P.; Marino, A.; South, M. A.; Howell, M. E. A.; Layne, A. S.; Ramsey, M. W.; Stone, M. H. Slow-Twitch Fiber Proportion in Skeletal Muscle Correlates With Insulin Responsiveness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98* (5), 2027–2036. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3876>.
- (112) Taniguchi, C. M.; Emanuelli, B.; Kahn, C. R. Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action. *Nat. Rev.* **2006**, *7*, 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>.

- (113) Shelley, P.; Martin-Gronert, M. S.; Rowleson, A.; Poston, L.; Heales, S. J. R.; Hargreaves, I. P.; McConnell, J. M.; Ozanne, S. E.; Fernandez-Twinn, D. S. Altered Skeletal Muscle Insulin Signaling and Mitochondrial Complex II-III Linked Activity in Adult Offspring of Obese Mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2009**, *297* (3). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2009>.
- (114) Abdul-Ghani, M. A.; Defronzo, R. A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/476279>.
- (115) Sebastián, D.; Guitart, M.; García-Martínez, C.; Mauvezin, C.; Orellana-Gavaldà, J. M.; Serra, D.; Gómez-Foix, A. M.; Hegardt, F. G.; Asins, G. Novel Role of FATP1 in Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle Cells. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (9), 1789–1799. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800535-JLR200>.
- (116) Bosma, M.; Hesselink, M. K. C.; Sparks, L. M.; Timmers, S.; Ferraz, M. J.; Mattijssen, F.; Beurden, D. Van; Schaart, G.; Baets, M. H. De; Verheyen, F. K.; Kersten, S.; Schrauwen, P. Perilipin 2 Improves Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle Despite Elevated Intramuscular Lipid Levels. *Diabetes* **2012**, *61*, 2679–2690. <https://doi.org/10.2337/db11-1402>.
- (117) Feng, Y. Z.; Lund, J.; Li, Y.; Knabenes, I. K.; Bakke, S. S.; Kase, E. T.; Lee, Y. K.; Kimmel, A. R.; Thoresen, G. H.; Rustan, A. C.; Dalen, K. T. Loss of Perilipin 2 in Cultured Myotubes Enhances Lipolysis and Redirects the Metabolic Energy Balance from Glucose Oxidation towards Fatty Acid Oxidation. *J. Lipid Res.* **2017**, *58* (11), 2147–2161. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079764>.
- (118) Dobrzyn, P.; Dobrzyn, A.; Miyazaki, M.; Cohen, P.; Asilmaz, E.; Hardie, D. G.; Friedman, J. M.; Ntambi, J. M. Stearoyl-CoA Desaturase 1 Deficiency Increases Fatty Acid Oxidation by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (17), 6409–6414. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401627101>.
- (119) Stamatikos, A. D.; Paton, C. M. Role of Stearoyl-CoA Desaturase-1 in Skeletal Muscle Function and Metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2013**, *305*, 767–775. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00268.2013>.
- (120) Turpin-Nolan, S. M.; Hammerschmidt, P.; Chen, W.; Jais, A.; Timper, K.; Awazawa, M.; Brodesser, S.; Brüning, J. C. CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* **2019**, *26* (1), 1-10.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.031>.
- (121) Meex, R. C. R.; Hoy, A. J.; Mason, R. M.; Martin, S. D.; Mcgee, S. L.; Bruce, C. R.; Watt, M. J. ATGL-Mediated Triglyceride Turnover and the Regulation of Mitochondrial Capacity in Skeletal Muscle. *Am. J. Endocrinol. Metab.* **2015**, *308*, 960–970. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00598.2014>.

- (122) Hegarty, B. D.; Furler, S. M.; Ye, J.; Cooney, G. J.; Kragen, E. W. The Role of Intramuscular Lipid in Insulin Resistance. *Acta Physiol. Scand.* **2003**, *178*, 373–383. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-116-5_3.
- (123) Zhao, R. Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z. Bin. Mitochondrial Electron Transport Chain, ROS Generation and Uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *44* (1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- (124) Newsholme, P.; Haber, E. P.; Hirabara, S. M.; Rebelato, E. L. O.; Procopio, J.; Morgan, D.; Oliveira-Emilio, H. C.; Carpinelli, A. R.; Curi, R. Diabetes Associated Cell Stress and Dysfunction: Role of Mitochondrial and Non-Mitochondrial ROS Production and Activity. *J. Physiol.* **2007**, *583* (1), 9–24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.135871>.
- (125) Yao, Q.; Zou, X.; Liu, S.; Wu, H.; Shen, Q.; Kang, J. Oxidative Stress as a Contributor to Insulin Resistance in the Skeletal Muscles of Mice with Polycystic Ovary Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911384>.
- (126) Wu, S. B.; Wu, Y. T.; Wu, T. P.; Wei, Y. H. Role of AMPK-Mediated Adaptive Responses in Human Cells with Mitochondrial Dysfunction to Oxidative Stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (4), 1331–1344. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.034>.
- (127) Jager, S.; Handschin, C.; St-Pierre, J.; Spiegelman, B. M. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Action in Skeletal Muscle via Direct Phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2007**, *104* (29), 12017–12022. <https://doi.org/www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705070104>.
- (128) Rabinovitch, R. C.; Samborska, B.; Faubert, B.; Ma, E. H.; Gravel, S. P.; Andrzejewski, S.; Raissi, T. C.; Pause, A.; St.-Pierre, J.; Jones, R. G. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell Rep.* **2017**, *21* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.026>.
- (129) Zhao, H.; Zhang, J.; Cheng, X.; Nie, X.; He, B. Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome across Various Tissues: An Updated Review of Pathogenesis, Evaluation, and Treatment. *J. Ovarian Res.* **2023**, *1*–17. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01091-0>.
- (130) Lee, M. K. S.; Yvan-Charvet, L.; Masters, S. L.; Murphy, A. J. The Modern Interleukin-1 Superfamily: Divergent Roles in Obesity. *Semin. Immunol.* **2016**, *28* (5), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.001>.
- (131) Kistner, T. M.; Pedersen, B. K.; Lieberman, D. E. Interleukin 6 as an Energy Allocator in Muscle Tissue. *Nat. Metab.* **2022**, *4* (2), 170–179. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00538-4>.

- (132) Kelly, M.; Gauthier, M. S.; Saha, A. K.; Ruderman, N. B. Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Interleukin-6 in Rat Skeletal Muscle: Association with Changes in CAMP, Energy State, and Endogenous Fuel Mobilization. *Diabetes* **2009**, *58* (9), 1953–1960. <https://doi.org/10.2337/db08-1293>.
- (133) Takaguri, A.; Inoue, S.; Takashi, K.; Satoh, K. AMPK Activation by Prolonged Stimulation with Interleukin-1 β Contributes to the Promotion of GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle Cells†. *Cell Biol. Int.* **2016**, *40*, 1204–1211. <https://doi.org/10.1002/cbin.10673>.
- (134) DeFronzo, R. A.; Tripathy, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32* (Supplement 2). <https://doi.org/10.2337/dc09-S302>.
- (135) Baillargeon, J. P.; Nestler, J. E. Commentary: Polycystic Ovary Syndrome: A Syndrome of Ovarian Hypersensitivity to Insulin? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91* (1), 22–24. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1804>.
- (136) Bjune, J. I.; Strömmland, P. P.; Jersin, R. Å.; Mellgren, G.; Dankel, S. N. Metabolic and Epigenetic Regulation by Estrogen in Adipocytes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2022**, *13*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.828780>.

Biografija autora

Bojana B. Mičić je rođena u Beogradu 3. januara 1991. godine. Po završetku gimnazijskog školovanja, 2010. godine upisuje se na Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Osnovne studije biologije završila je 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,39, a master studje na modulu Eksperimentalna fiziologija 2015. godine, sa prosečnom ocenom 9,83. Na doktorske akademske studije na istom fakultetu, na modulu Animalna i humana fiziologija upisana je 2016. godine.

Od 2015. do 2020. godine, Bojana je bila zaposlena kao asistent rukovodioca, a zatim kao rukovodilac (od 2017. godine) Odeljenja za biologiju u Istraživačkoj stanici Petnica, gde je stekla dragoceno pedagoško i organizaciono iskustvo.

U zvanje istraživača pripravnika izabrana je 2017. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, gde je započela naučno-istraživački rad kroz angažman na međunarodnom projektu Solutions (FP7 603437, 2013-2018), pri Laboratoriji za ekotoksikologiju (LECOTOX). Od 2019. godine zaposlena je u Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS), gde 2020. godine stiče zvanje istraživača saradnika.

Uz istraživački rad veliki deo vremena posvećuje radu na popularizaciji nauke i neformalnom naučnom obrazovanju, od 2020. godine kao deo IBISS tima za organizaciju Noći istraživača i učesnik projekata ReFocuS 3.0 (HORIZON-MSCA-NIGHT-2020 955020, 2020-2021.) i ReFocuS Art (HORIZON-MSCA-2022-CITIZENS-01 101061356, 2022-2024.).

Autor/koautor je 6 radova objavljenih u međunarodnim časopisima, kao i brojnih sopštenja sa domaćih i međunarodnih skupova.

Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju, Evropskog društva za endokrinologiju i predsednica Upravnog odbora Istraživačke stanice Petnica.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бојана Мићић

Број индекса Б3021/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболличких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичних јајника

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, **1.11.2023.**

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Бојана Мићић

Број индекса: Б3021/2016

Студијски програм: Биологија, модул: Анимална и хумана физиологија

Наслов рада: Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичних јајника

Ментори: др Данијела Војновић Милутиновић, доц. др Тања Јевђовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, **1.11.2023.**

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболличких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичних јајника

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, **1.11.2023.**

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.