

AEROBNA IN GLIKOLITIČNA KAPACITETA
RAZLIČNIH TIPOV MIŠIČNIH VLAKEN MIŠIC VITKIH
IN DEBELIH MIŠI

PODROČJE: Medicina

VRSTA NALOGE: Raziskovalna naloga

AVTORICI: Saša STANIČ MENCIN, Nika SRDAREV

4.A

MENTOR: doc. dr. Nejc UMEK, dr. med.

SOMENTOR: doc. dr. Miha SLAPNIČAR, prof. kem. in biol.

BIOTEHNIŠKI IZOBRAŽEVALNI CENTER LJUBLJANA,
GIMNAZIJA IN VETERINARSKA ŠOLA

Ljubljana, marec 2025

KAZALO

POVZETEK	2
ZAHVALA	2
1 UVOD	3
2 TEORETIČNI DEL	4
2.1 Opredelitev in razširjenost debelosti	4
2.2 Večfaktorska narava debelosti	5
2.3 Povezava med debelostjo in hormoni.....	5
2.4 Skeletne mišice	5
2.4.1 Struktura skeletne mišice	5
2.4.2 Tipi mišičnih vlaken	6
2.4.3 Mišica plantaris	6
2.5 Vpliv debelosti na skeletne mišice.....	7
2.5.1 Strukturne spremembe skeletnih mišic pri debelosti	7
2.5.1.1 Vpliv debelosti na delež posameznih tipov mišičnih vlaken.....	7
2.5.1.2 Vpliv debelosti na premer mišičnih vlaken	7
2.5.1.3 Vpliv debelosti na glikolitično in oksidativno kapaciteto mišičnih vlaken.....	7
2.6 Druge presnovne spremembe v skeletnih mišicah zaradi debelosti.....	8
2.6.1 Vpliv debelosti na znotrajcelične zaloge glikogena v mišičnih vlaknih.....	8
2.6.2 Vpliv debelosti na vsebnost kolagena in vezivnega tkiva.....	8
2.6.3 Vpliv debelosti na kapilarizacijo skeletnih mišic	8
2.6.4 Zmanjšana občutljivost na inzulin zaradi debelosti.....	9
2.7 Živalski modeli za preučevanje debelosti.....	9
3 HIPOTEZE.....	10
4 EMPIRIČNI DEL	10
4.1 Zasnova raziskave	10
4.2 Osnovni podatki o miših.....	10
4.2.1 Uporaba mišjega modela za analizo vpliva debelosti na lastnosti skeletnih mišičnih vlaken.....	10
4.2.2 Reja miši	11

4.3 Odvzem vzorcev	11
4.4 Histokemijsko in imunohistokemijsko označevanje	11
4.5 Zajemanje in računalniška obdelava slik	14
4.5.1 Zajemanje slik	14
4.5.2 Računalniška obdelava slik	15
4.5.3 Analiza slik	16
5 REZULTATI	16
6 RAZPRAVA	19
7 ZAKLJUČEK	20
8 LITERATURA	26

KAZALO SLIK:

<u>Slika 1: Narisani prikaz mišic zadnjega levega uda miši. Natančen položaj mišice plantaris.</u>	10
<u>Slika 2: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris z označenimi tipi vlaken 2b s protitelesi BF-F3.</u>	15
<u>Slika 3: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris z označenimi mišičnimi vlakni tipa 1 s protitelesi BD-A5</u>	15
<u>Slika 4: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris z označenimi mišičnimi vlakni tipa 2a s protitelesi SC-71.</u>	16
<u>Slika 5: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris obarvanje z inkubacijsko raztopino za označevanje aktivnosti encima SDH</u>	17
<u>Slika 6: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris obarvane z inkubacijsko raztopino za označevanje aktivnosti encima FFK</u>	18
<u>Slika 7: Mikroskopska slika deleža mišice plantaris obarvan SDH v programu Ellipse z označenimi vlakni.</u>	20
<u>Slika 8: Mikroskopska slika odseka mišice plantaris obarvane FFK v programu Ellipse z označenimi posameznimi vlakni.</u>	20
<u>Slika 9: Stolpični prikaz povprečja deležev, označenih s procenti, tipov vlaken 1, 2a, 2x in 2b. s sivo je prikazan delež posameznih tipov vlaken za 16 miši debele linije, s črno pa 16 miši vitke linije.</u>	22
<u>Slika 10: Stolpični prikaz relativne intenzitete obarvanih vlaken tipa 1, 2a, 2x in 2b. S črno so prikazane 16 miši vitke linije s sivo pa 16 miši debele linije. Relativna intenziteta obarvanega vlakna prikazuje aktivnost encima.</u>	23

Slika 11: Stolpični prikaz relativne intenzitete obarvanih vlaken tipa 1, 2a, 2x in 2b. S črno je prikazanih 16 miši vitke linije, s sivo pa debele linije. Stolpični prikaz prikazuje aktivnost encima FFK......24

SEZNAM PRILOG:

Priloga 1.....	28
Priloga 2.....	32

POVZETEK

Ključne besede: debelost, miši, mišice, encimi

Debelost je kompleksno patološko stanje, ki nastane zaradi prepleta genetskih in okoljskih dejavnikov. V raziskavah debelosti pogosto uporabljamo živalske modele, pri čemer so miši in podgane ključne zaradi genetske podobnosti s človekom. Kljub uporabnosti teh modelov je treba upoštevati, da je debelost pri ljudeh poligensko in večfaktorsko stanje, kjer imajo pomembno vlogo tudi okoljski dejavniki, predvsem prehrana.

V okviru raziskave smo analizirali vpliv genetske nagnjenosti k debelosti na mišico plantaris, ki ima pomembno vlogo pri gibanju in proprioceptiji spodnje okončine. Ugotovili smo, da se biokemijske in strukturne lastnosti mišičnih vlaken v mišici plantaris razlikujejo med genetsko debelimi in genetsko vitkimi mišmi.

Spremembe v oksidativni in glikolitični kapaciteti pri debelih miših nakazujejo na prilagoditve v energijski presnovi, ki bi lahko vplivale na telesno zmogljivost in metabolizem. Raziskava ponuja pomembne vpoglede v vpliv debelosti na skeletne mišice, kar lahko prispeva k razvoju novih strategij za preprečevanje in zdravljenje te bolezni.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema doc. dr. Nejc Umeku, dr. Med., visokošolskemu učitelju docentu za področje anatomije, UL MF.

Zahvaljujema se tudi doc. dr. Mihi Slapničarju, prof. kem. in biol., visokošolskemu učitelju docentu za področje kemije v izobraževanju, UL PEF.

Radi bi se zahvalili tudi Majdi Črnak-Maasarani, Marku Slaku, Nataši Pollak Kristl in asist. Žigi Šinku (UL Medicinska fakulteta Ljubljana, Inštitut za anatomijo).

1 UVOD

V zadnjih nekaj letih smo pričča naraščanju števila primerov debelosti, ki ima pomemben vpliv na delovanje telesa, vključno s skeletnimi mišicami. Debelost se lahko razvije zaradi genetske nagnjenosti, prehranskih navad ali kombinacije obojega. Debelost vpliva na različne kapacitete, saj lahko poveča delež hitrih vlaken, ki so odvisna od glikolitičnih procesov, hkrati pa zmanjša sposobnost za aerobno presnovo, kar pomeni manjšo vzdržljivost. Zanimal nas je točen vpliv debelosti na glikolitično in aerobno kapaciteto mišičnih vlaken mišice plantaris. Cilj te raziskave je preučiti vpliv genetske predispozicije za debelost in uživanja prehrane z visoko vsebnostjo maščob na glikolitično in anaerobno kapaciteto mišičnih vlaken skeletne mišice plantaris. S tem želimo pridobiti boljše razumevanje, kako debelost vpliva na mišično funkcijo ter kako lahko različni dejavniki vplivajo na energetske presnovo mišic.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Opredelitev in razširjenost debelosti

Debelost je kronična bolezen z več vzroki, ki se hitro širi tako v razvitih kot tudi v manj razvitih državah. V zadnjih 50 letih je postala ena največjih globalnih zdravstvenih težav, pri čemer se po vplivu na smrtnost uvršča takoj za kajenjem, visokim krvnim tlakom in nezdravimi prehranskimi navadami (*Obesity causes cancer*, 2022). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) se je med letoma 1975 in 2020 delež odraslih s prekomerno telesno težo skoraj potrojil in tako leta 2020 dosegel približno 39 % (*Obesity and overweight fact sheet*, 2021). Leta 2000 je SZO debelost prepoznala kot globalno pandemijo, ki vsako leto povzroči najmanj 2,8 milijona smrti (*Obesity*, 2021). Debelost je kompleksna bolezen, ki vpliva na številne fiziološke procese v telesu, vključno z delovanjem skeletnih mišic. Naša raziskava je s pomočjo divergentno selekcioniranih mišjih modelov omogočila vpogled v vpliv debelosti na sestavo in presnovne lastnosti mišičnih vlaken. Rezultati potrjujejo, da genetska predispozicija in povečano kopičenje maščob vplivata na deleže posameznih tipov mišičnih vlaken ter njihovo presnovno aktivnost. Debelost se opredeljuje kot prekomerno kopičenje telesne maščobe, ki negativno vpliva na zdravje. Pri njeni določitvi se pogosto uporablja indeks telesne mase (ITM), ki ga izračunamo po formuli:

$ITM = \text{telesna masa (kg)} / \text{telesna višina}^2 \text{ (m}^2\text{)}$

O prekomerni telesni teži govorimo pri ITM med 25 in 30, debelost pa nastopi, ko vrednost preseže 30 (*Obesity and overweight fact sheet*, 2021).

Maščobne zaloge v telesu niso zgolj vir energije, temveč lahko v obliki visceralne maščobe povečajo tveganje za razvoj številnih presnovnih motenj, kot so sladkorna bolezen, visok krvni tlak in motnje v ravni krvnih maščob. Te bolezni skupaj z debelostjo sestavljajo presnovni sindrom, ki pomembno prispeva k razvoju srčno-žilnih obolenj (Volčanšek in Pfeifer, 2014). Poleg tega je debelost povezana s povečano verjetnostjo za prezgodnjo smrt in pojavom nekaterih vrst raka, vključno z rakom dojke, debelega črevesa in maternične sluznice (Pati idr., 2023).

2.2 Večfaktorska narava debelosti

Natančen vpliv genetskih dejavnikov na razvoj debelosti še ni povsem raziskan, a je znano, da njena vloga ni zanemarljiva ter da gre v večini primerov za poligenski način dedovanja, torej da zanjo ni odgovoren le en gen. Identificiranih je bilo že več kot 50 genov, ki prispevajo k večji verjetnosti za nastanek bolezni, vendar je njihov učinek pogosto razmeroma majhen. Obstajajo tudi redki primeri družinske oblike debelosti, kjer je vzrok mutacija v enem samem genu – najpogosteje v genu MC4R, ki nosi zapis za melanokortinski receptor 4 in sodeluje pri uravnavanju apetita v osrednjem živčevju (*Genes and Obesity*, 2013). Debelost je torej kompleksno stanje, ki ga povzroča preplet različnih dejavnikov. Raziskovanje njenega nastanka je ključno za razvoj učinkovitih strategij zdravljenja, preprečevanja in zaustavljanja njenega napredovanja, saj postaja vedno bolj razširjena in negativno vpliva na zdravje celotnega organizma (*Obesity causes cancer*, 2022).

2.3 Povezava med debelostjo in hormoni

Med debelostjo in hormonskim ravnovesjem obstaja močna povezava, saj hormoni pomembno vplivajo na regulacijo apetita, presnovo in shranjevanje maščobe. Maščobno tkivo pri debelosti ne deluje zgolj kot skladišče energije, temveč tudi kot endokrini organ, ki proizvaja določene hormone in hkrati zavira nastajanje drugih. Zaradi tega hormonsko neravnovesje lahko prispeva k razvoju debelosti, medtem ko sama debelost dodatno vpliva na hormonsko ravnovesje, kar ustvarja začaran krog.

Prekinitev tega cikla pogosto zahteva spremembo življenjskega sloga in ustrezne terapijske pristope. Razumevanje interakcij med hormoni in debelostjo je zato bistvenega pomena za

prepoznavanje njenih sistemskih učinkov. Med ključne hormone, povezane s to boleznijo, sodijo leptin, grelin, inzulin, kortizol ter spolni in ščitnični hormoni (Álvarez-Castro, 2011).

2.4 Skeletne mišice

Skeletne mišice predstavljajo od 40 % do 60 % celotne telesne mase in imajo osrednjo vlogo pri gibanju, presnovnih procesih ter vzdrževanju energijskega ravnovesja (Maltin, 2008). Poleg tega lahko tudi delujejo kot endokrini organ, saj izločajo nekatere hormone in zavirajo nastanek drugih (Graf in Ferrari, 2019).

2.4.1 Struktura skeletne mišice

Celoten mišični sistem obdaja ovojnica fascija, ki je iz gostega, nepravilnega vezivnega tkiva. Na zunanji strani posamične mišice je vezivno tkivo imenovano epimizij, ki omogoča krčenje mišice, hkrati pa ohranja njeno strukturno celovitost. Prav tako tudi ločuje in preprečuje drgnjenje mišice ob druga tkiva in kosti v tem območju, kar omogoča mišici samostojno gibanje. Znotraj vsake skeletne mišice so mišična vlakna organizirana v posamezne snope. Vezivno tkivo ki obdaja in ločuje posamezne snope imenujemo perimizij. Taka organizacija je pogosta v mišicah okončin; omogoča živčnemu sistemu, da sproži določeno gibanje mišice z aktiviranjem podskupine mišičnih vlaken znotraj snopa mišice. Podenota vsakega snopa je mišično vlakno, ki je obdano s tanko plastjo vezivnega tkiva iz kolagena in retikularnih vlaken, imenovanih endomizij. Ta vsebuje zunajcelično tekočino in hranila za podporo mišičnih vlaken (Chrušćik, 2019).

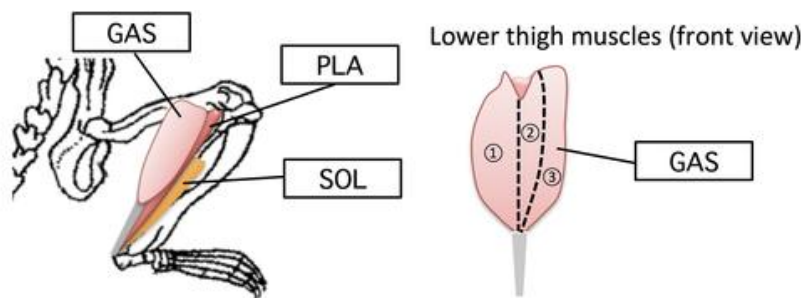
2.4.2 Tipi mišičnih vlaken

Mišična vlakna se delijo glede na kontraktilnost, presnovne lastnosti in izražanje različnih izooblik težkih verig miozina v dve glavni skupini: vlakna tipa 1, ki so počasi krčljiva, oksidativna vlakna in vlakna tipa 2, ki so hitro krčljiva, glikolitična vlakna, katera nadalje delimo na podtipa 2a, 2x/d in 2b (Schiaffino in Reggiani, 2011). Vlakna tipa 1 tanka vlakna, vsebujejo veliko mioglobina, ki jim daje značilno rdečo barvo. Imajo nizek prag za aktivacijo motoneurona, počasno krčenje in prisotnost velikega števila velikih mitohondrijev, ki vsebujejo oksidativne fosforilacijske encime. Takšna vlakna so zaradi počasnega zmanjševanja dobro prilagojena dolgotrajni obremenitvi. Vlakna tipa 2a imajo visoko ATP-azno aktivnost miozina ter dobro razvito oksidativno in glikolitično sposobnost, zaradi česar so manj podvržena utrujenosti in predstavljajo nekakšen vmesni tip med vlakni tipa 1 in 2. Vlakna tipa 2b imajo visoko ATP-azno aktivnost miozina in se hitro utrudijo, saj imajo nizko oksidativno kapaciteto in visoko glikolitično aktivnost (Chrušćik, 2019).

Za razliko od mišic miši in podgan, ki se pogosto uporabljajo v raziskavah o vplivu debelosti in sladkorne bolezni na skeletne mišice (miši smo uporabili tudi v naši raziskavi), pri ljudeh vlakna tipa 2b niso prisotna (Maxwell idr., 1982).

2.4.3 Mišica plantaris

V tej raziskavi smo analizirali mišico plantaris (lat. *musculus plantaris*). To je tanka in dolga mišica, ki izvira iz zunanega dela spodnjega konca stegenice in se razteza po zadnji strani goleni. Njena dolga in tanka tetiva poteka ob mečni mišici (m. gastrocnemius) in pod njo ležeči mišici soleus ter se na koncu pripenja na petnico. Lahko se pritrudi samostojno ali pa se zlije z Ahilovo tetivo. Deluje kot pomožna mišica pri plantarni fleksiji stopala in fleksiji v kolenskem sklepu. Mišica plantaris je sestavljena iz različnih vrst mišičnih vlaken, zaradi česar velja za heterogeno mišico. Sestavljajo jo vlakna tipov 1, 2a, 2b in 2x. Ker ima predvsem pomožno vlogo pri gibanju stopala in ni primarna nosilka obremenitve, je pogosto večji delež hitrih vlaken (tip 2), kar ji omogoča hitro, a kratkotrajno delovanje (Pirie, 2023).



Slika 1: Narisani prikaz mišic zadnjega levega uda miši. Natančen položaj mišice plantaris.

2.5 Vpliv debelosti na skeletne mišice

Debelost, kot sistemska bolezen, negativno vpliva na različne organske sisteme, med katerimi so srčno-žilni sistem, jetra, trebušna slinavka, endokrini sistem in možgani (Uranga in Keller, 2019). Spremembe pa se odražajo tudi v skeletnih mišicah, ki imajo pomembno vlogo v energijski presnovi (Straight idr., 2021). Debelost lahko povzroči mišično-skeletne težave, kot so zmanjšana telesna dejavnost in posledična oslabitev mišične funkcije in moči, kar povečuje tveganje za padce, slabša kakovost življenja ter vodi v večjo umrljivost (Sousa idr., 2021).

2.5.1 Strukturne spremembe skeletnih mišic pri debelosti

Ena izmed posledic debelosti je povečano znotrajcelično kopičenje maščob v mišičnih vlaknih, kar zmanjšuje občutljivost na inzulin (Umek, 2021). Prav tako pride do sprememb v premeru mišičnih vlaken, razmerju posameznih tipov vlaken ter sestavi zunajceličnega matriksa v

skeletnih mišicah (Straight idr., 2021). Te spremembe lahko negativno vplivajo na mišično funkcijo, zmanjšajo moč mišic in omejijo telesno zmogljivost (Maltin, 2008).

2.5.1.1 Vpliv debelosti na delež posameznih tipov mišičnih vlaken

Debelost povzroča premik v razmerju mišičnih vlaken proti hitrim tipom, kar pomeni povečanje deleža glikolitičnih vlaken tipa 2b in 2x/d, medtem ko se zmanjšuje delež oksidativnih vlaken tipov 1 in 2a (Tanner idr., 2002)).

2.5.1.2 Vpliv debelosti na premer mišičnih vlaken

Debelost lahko vpliva na premer mišičnih vlaken, kar je bilo opaženo pri genetsko spremenjenih db/db miših, kjer so vlakna tanjša v primerjavi z zdravimi mišmi (Almond idr., 1988).

Pri tem modelu je prisotna okvara leptinskega signaliziranja, ki vpliva na presnovne procese in povzroča zmanjšanje premera mišičnih vlaken. Po drugi strani pa pri blagi do zmerni poligenski debelosti, kjer so presnovne motnje manj izrazite, do atrofije običajno ne pride; nasprotno, mišice, ki nosijo telesno težo, se lahko zaradi večje obremenitve celo hipertrofirajo (Tomlinson idr., 2016).

2.5.1.3 Vpliv debelosti na glikolitično in oksidativno kapaciteto mišičnih vlaken

Na razmerje med različnimi tipi mišičnih vlaken v skeletnih mišicah vplivajo genetski in okoljski dejavniki. Med vlakni je genetsko najbolj določeno število vlaken tipa 1, medtem ko okoljski dejavniki, kot so telesna aktivnost, presnovne motnje in staranje, vplivajo na njihovo prilagodljivost (Maltin, 2008).

Skeletne mišice pri debelosti prehajajo v bolj glikolitične tipe vlaken (2b in 2x/d), kar zmanjšuje oksidativno kapaciteto mišic in posledično prispeva k razvoju debelosti ter zmanjšani občutljivosti na inzulin (Maltin, 2008; Oberbach idr., 2006). Raziskave so pokazale, da imajo oksidativna vlakna zaščitno vlogo pred negativnimi vplivi debelosti (Wang idr., 2004, Ryder idr., 2003).

Poleg tega debelost povzroča mitohondrijsko disfunkcijo, kar zmanjšuje sintezo energije, povečuje oksidativni stres in vpliva na presnovo maščob ter signalno pot inzulina (Heo idr., 2017; Oguntibeju, 2019; Wahwah idr., 2020). Prav tako zmanjšuje sposobnost oksidacije maščob, kar vodi v njihovo kopičenje, pridobivanje telesne mase in slabšo občutljivost na inzulin (Berggren idr., 2008; Boden, 2011).

Telesna aktivnost in nekateri dodatki, kot so kreatin, koencim Q10, antioksidanti ter krioterapija, lahko povečajo delež oksidativnih mišičnih vlaken ter izboljšajo oksidacijo maščob, s čimer zmanjšujejo škodljive učinke debelosti (Berggren idr., 2008; Shepherd idr.,

2014; Dan Wang idr., 2023). Kljub temu še vedno ni jasno, ali so te spremembe v mišicah posledica debelosti ali pa tudi prispevajo k njenemu razvoju (Maltin, 2008).

2.6 Druge presnovne spremembe v skeletnih mišicah zaradi debelosti

2.6.1 Vpliv debelosti na znotrajcelične zaloge glikogena v mišičnih vlaknih

Skeletne mišice skupaj z jetri predstavljajo glavni rezervoar glikogena. Njegovo skladiščenje je tesno povezano z občutljivostjo na inzulin, ki pri debelosti upada. Posledično povišane koncentracije inzulina spodbujajo shranjevanje glukoze v obliki glikogena, kar lahko privede do hiperglikemije in zmanjšane sinteze glikogena v mišičnih vlaknih (Boden, 2003).

2.6.2 Vpliv debelosti na vsebnost kolagena in vezivnega tkiva

Pri debelosti je prisotno neravnovesje med antioksidanti in prostimi radikali ter vnetnimi in protivnetnimi citokini (Pérez-Torres idr., 2021; Esser idr., 2014). Kronično vnetje in oksidativni stres spodbujata povečano kopičenje kolagena in vezivnega tkiva v skeletnih mišicah, kar lahko zmanjša njihovo elastičnost in kontraktilnost ter posledično oslabi mišično funkcijo (Martinez-Huenchullan idr., 2017).

2.6.3 Vpliv debelosti na kapilarizacijo skeletnih mišic

V zgodnjih fazah debelosti lahko pride do povečane kapilarizacije v mišicah, ki nosijo telesno težo, zaradi prilagoditve na večje obremenitve (Umek, 2019). Dolgotrajna debelost pa lahko zaradi povečanega oksidativnega stresa povzroči zmanjšano kapilarizacijo, kar vpliva na zmanjšan dotok kisika v mišice, slabšo vzdržljivost in zmanjšan transport inzulina do mišičnih vlaken, kar dodatno zmanjšuje občutljivost na inzulin (Umek 2019; Espino-Gonzalez idr., 2021).

2.6.4 Zmanjšana občutljivost na inzulin zaradi debelosti

Debelost negativno vpliva na presnovo glukoze v skeletnih mišicah, saj zmanjša njihovo sposobnost privzema in uporabe glukoze. To vodi v povišane ravni krvnega sladkorja in povečano tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 (Esser idr., 2014). K temu prispeva tudi kronično vnetje, ki vpliva na sproščanje adipokinov in miokinov (Graf in Ferrari, 2019; Bulló, 2007).

Skeletne mišice igrajo ključno vlogo pri uravnavanju postprandialne presnove, saj posredujejo večino inzulinsko stimuliranega privzema in oksidacije glukoze (Björnholm in Zierath, 2005). V primeru zmanjšane občutljivosti na inzulin, kot posledice debelosti, se zmanjša delež

oksidativnih mišičnih vlaken, medtem ko se poveča delež bolj glikolitičnih vlaken (Stuart idr., 2013; Gaster idr., 2001).

Različni tipi mišičnih vlaken imajo različno stopnjo občutljivosti na inzulin – počasna oksidativna vlakna tipa 1 so nanj dobro odzivna (Adachi idr., 2007), medtem ko so hitra glikolitična vlakna tipa 2b odporna na inzulin (Schiaffino in Reggiani, 2011). Povečanje deleža vlaken tipa 2b zaradi debelosti je zato povezano z razvojem zmanjšane občutljivosti na inzulin (Stuart idr., 2013). Raziskave na podganah Zucker so pokazale, da imajo živali z debelostjo in sladkorno boleznijo manjši delež vlaken tipa 2a ter nižjo ekspresijo genov, povezanih z oksidativno presnovo (Lillioja idr., 1987; Bruce idr., 2003).

2.7 Živalski modeli za preučevanje debelosti

Za raziskovanje debelosti ter vpliva genetskih in okoljskih dejavnikov nanjo se pogosto uporabljajo miši in podgane.

Ti modeli so posebej uporabni v primerih, ko raziskave na ljudeh niso izvedljive zaradi etičnih, praktičnih ali finančnih omejitev. Monogeni živalski modeli omogočajo ciljno spreminjanje genoma z uporabo genskega inženiringa, bodisi prek specifičnih genetskih modifikacij bodisi z izklopom določenih genov. Ker imata miši in ljudje podobno fiziološko zasnovo, razvoj ter organizacijo genoma, lahko izsledki raziskav na teh živalih deloma pomagajo pri razumevanju določenih procesov v človeškem telesu (Lutz in Woods, 2012).

Najpogosteje preučevani monogeni modeli debelosti vključujejo miši ob/ob (s spremembo v genu za hormon leptin), db/db (s spremenjenim receptorjem za leptin) in s/s (z mutacijo v signalni poti leptina). Poleg tega so pogosto uporabljene tudi podgane Zucker ali Wistar fa/fa, ki imajo mutacijo v receptorju za leptin (Lutz in Woods, 2012). Ti modeli praviloma že v zgodnjih fazah razvijejo izrazito debelost, pri večini – z izjemo miši s/s – pa se pojavi tudi hiperglikemija in sladkorna bolezen (Almond idr., 1988; Suriano idr., 2021).

Kljub uporabnosti monogenih modelov je treba upoštevati njihovo omejenost, saj predstavljajo poenostavljeno različico debelosti, ki jo pri ljudeh običajno povzročajo številni geni v kombinaciji z okoljskimi dejavniki, kot je prehrana. Ti modeli omogočajo preučevanje posameznih genov, ki vplivajo na debelost, vendar niso najprimernejše orodje za raziskovanje poligenih in večfaktorskih patoloških stanj, kamor spada tudi debelost (Lutz in Woods, 2012).

3 HIPOTEZE

1. Glikolitična in oksidativna kapaciteta tipov mišičnih vlaken se razlikujeta med tipi mišičnih vlaken genetsko debelih miši in genetsko vitkih miši.
2. Mišična vlakna genetsko debelih miši imajo nižjo oksidativno kapaciteto kot mišična vlakna genetsko vitkih miši.
3. Mišična vlakna genetsko debelih miši imajo višjo glikolitično kapaciteto kot mišična vlakna genetsko vitkih miši.

4 EMPIRIČNI DEL

4.1 Zasnova raziskave

Našo raziskavo smo izvedli na Inštitutu za anatomijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Analizirali smo histološke prečne rezine mišice plantaris (lat. *musculus plantaris*), ki smo jih pridobili v sodelovanju s Katedro za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Raziskavo je odobrila Etična komisija za poskuse na živalih Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varnost rastlin (številki dovoljenj: U34401-23/2020/6 in U34401-23/2020/13).

V raziskavi smo uporabili 32 mišjih samcev dveh genetsko različnih linij: v vitki liniji (angl. *high lean group*, FHI) je bilo 16 genetsko vitkih, v debeli liniji (angl. *low lean group*, FLI) pa prav tako 16 miši, ki so bile Genetsko debele. Miši smo evtanazirali z metodo dekapitacije. Izvlečene mišične vzorce smo razrezali v zaporedne 10 µm debele histološke kriosekcije in jih označili s histokemičnimi in imunohistokemičnimi tehnikami. Slike so bile zajete z mikroskopom in digitalno obdelane. Na koncu smo analizirali zbrane podatke o tipih mišičnih vlaken, aktivnosti encimov SDH in FFK ter količini glikogena in maščob v mišičnih vlaknih.

4.2 Osnovni podatki o miših

4.2.1 Uporaba mišjega modela za analizo vpliva debelosti na lastnosti skeletnih mišičnih vlaken

V raziskavi smo uporabili edinstven živalski model – divergentno selekcionirane miši z različnim odstotkom telesnega maščevja. Gre za dve liniji miši, ki ju je prof. dr. Simon Horvat z Biotehniške fakultete, v sodelovanju s strokovnjaki iz Velike Britanije, selekcioniral preko več kot 60 generacij. V debeli liniji se je odstotek telesne maščobe postopno povečal s približno 10 % na 22 %, medtem ko se je v vitki liniji zmanjšal na 4 %. Razlika med linijama je rezultat postopnega kopičenja alelov, povezanih z debelostjo v debeli liniji, ter alelov, povezanih z vitkostjo, v vitki liniji.

4.2.2 Reja miši

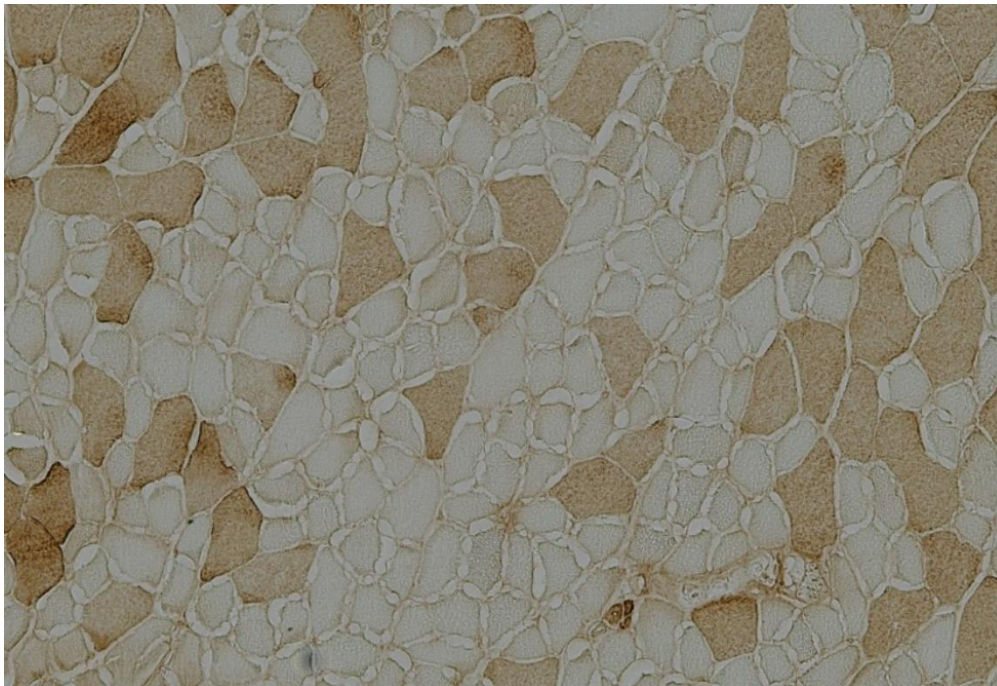
Miši smo redili v Centru za laboratorijske živali Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, pri standardnih pogojih (svetlobno/temni cikel 12 : 12) v posamično ventiliranih kletkah (IVC), po 2 do 3 živali na kletko. Voda in krma so bile na voljo ad libitum (imele so neomejen dostop do hrane). V poskus smo jih vključili ob odstavitvi pri povprečni starosti 25 dni, zaključili pa pri starosti 11 tednov, ko smo jih žrtvovali z dekapitacijo.

4.3 Odvzem vzorcev

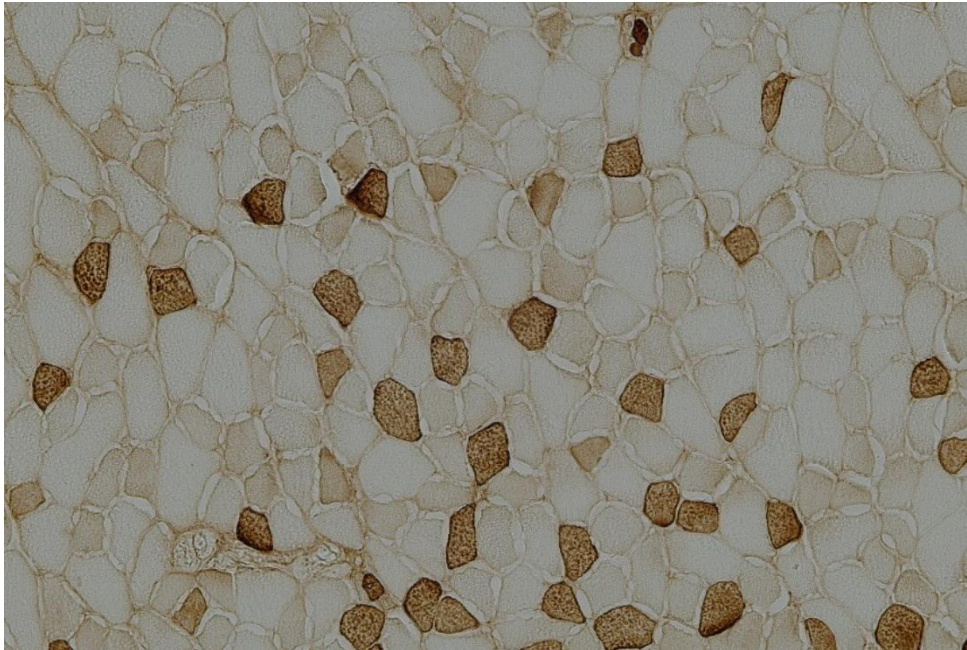
Vzorci mišice plantaris smo odvzeli z levega zadnjega uda, jih takoj zamrznili v tekočem dušiku in hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. S kriostatom (Leica CM 1950) smo iz vsakega vzorca pripravili zaporedne prečne rezine debeline $10\text{ }\mu\text{m}$, ki smo jih prenesli na objektna stekelca. Zaporedno rezanje omogoča analizo istih mišičnih vlaken na vseh preparatih.

4.4 Histokemijsko in imunohistokemijsko označevanje

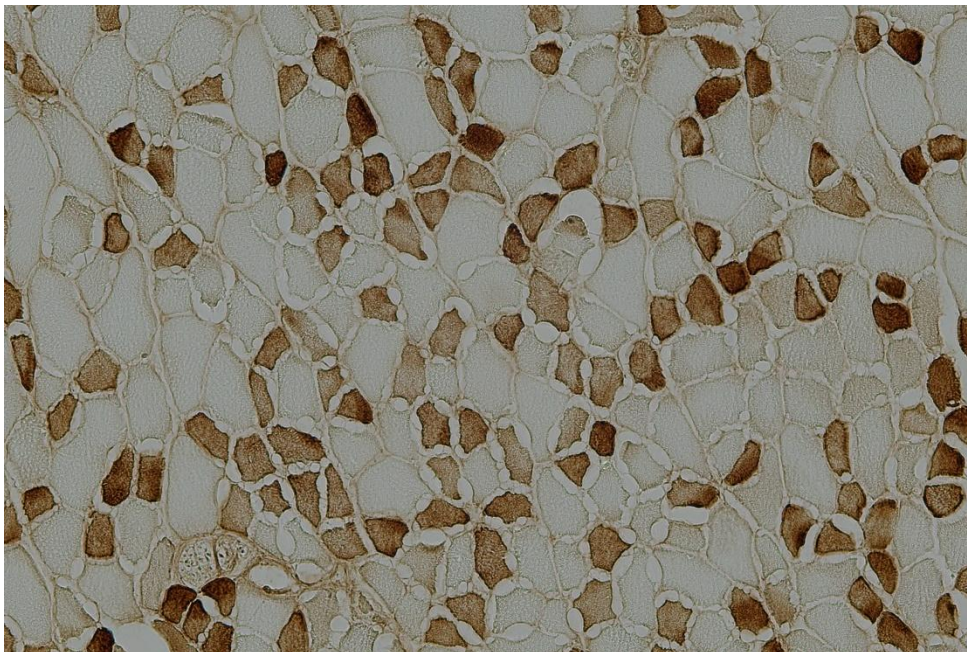
Najprej smo štiri zaporedne prečne rezine inkubirali 20 minut z govejim serumskim albuminom (BSA) in kunčjim serumom, da bi preprečili nespecifične vezave. Ta predinkubacija preprečuje nezaželeno vezavo protiteles. Nato smo izvedli inkubacijo 30 prečnih rezin z mišjimi monoklonskimi primarnimi protitelesi tipa IgG, ki so specifična za različne izooblike težkih verig miozina. Mišična vlakna tipa 1 smo označili z protitelesom BA-D5, vlakna tipa 2a z protitelesom SC-71, oboje razredčeno v razmerju 1:100. Mišična vlakna tipa 2b smo označili z protitelesom BF-F3, razredčenim v razmerju 1:30. Inkubacija je trajala 16 ur pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 2: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris z označenimi tipi vlaken 2b s protitelesi BF-F3



Slika 3: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris z označenimi mišičnimi vlakni tipa 1 s protitelesi BD-A5

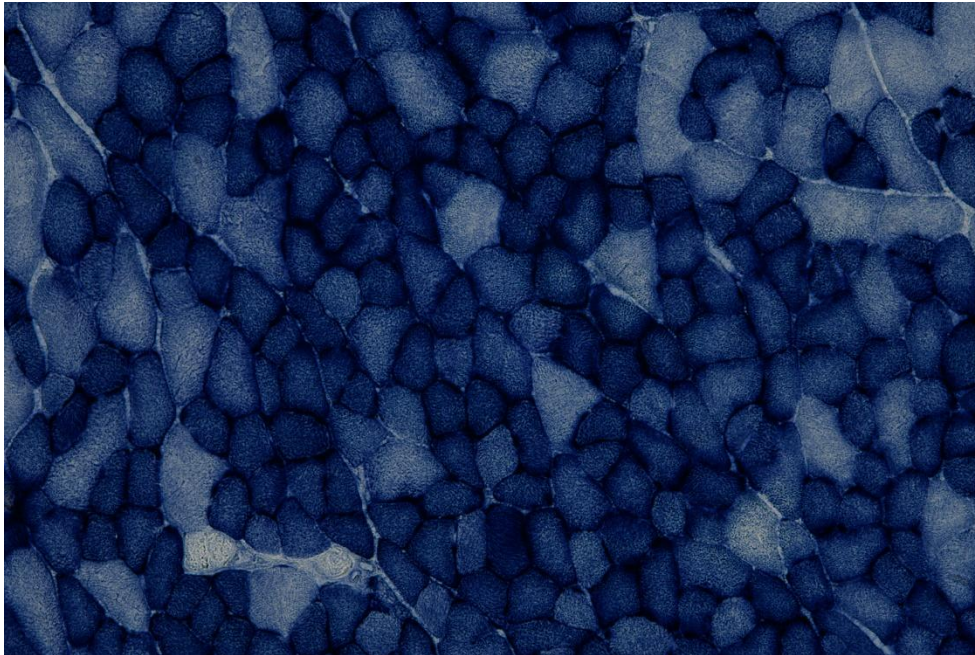


Slika 4: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris z označenimi mišičnimi vlakni tipa 2a s protitelesi SC-71

Po inkubaciji s primarnimi protitelesi smo prečne rezine oprali s PBS in jih eno uro inkubirali s sekundarnim kunčjim protitelesom P260, razredčenim v razmerju 1:100. Ta protitelesa prepoznajo mišja IgG protitelesa, označena s hrenovo peroksidazo. Mišična vlakna tipa 2x smo označili s primarnim protitelesom 6H1 proti težkim verigam miozina 2x, razredčenim v razmerju 1:100, pri čemer smo inkubirali še eno uro in nato vzorce oprali s PBST (raztopina fosfatnega puferja (PBS) z dodatkom Tween 20). Za detekcijo vezave teh protiteles smo

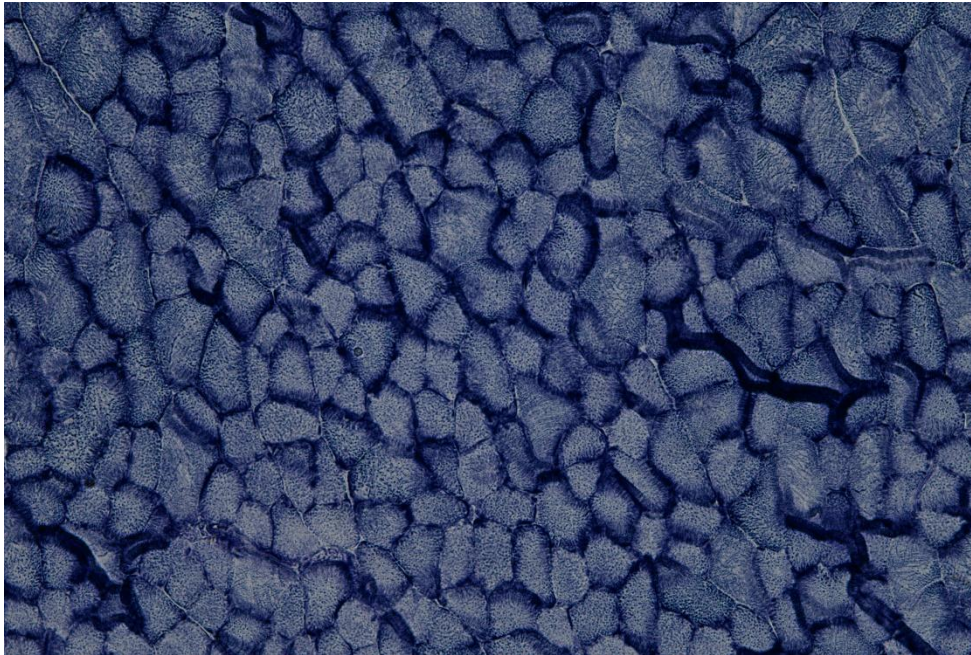
uporabili NovoLink Polymer Detection sistem, ki vključuje polimerni konjugat s hrenovo peroksidazo, medtem ko smo za označevanje mišičnih vlaken tipa 2b uporabili sistem za detekcijo polimerov (Novolink). Vse štiri reakcije smo razvili z diaminbenzidinom, ki pri reakciji s hrenovo peroksidazo obarva vezavna mesta v rjavo. Po tem smo pripravke dehidrirali v alkoholu: prečne rezine smo najprej namakali 5 minut v 70%, nato v 96%, in na koncu v 100% etanolu, sledilo pa je dvakratno 5-minutno namakanje v ksilolu za bistrenje. Preparate smo nato pokrili z medijem za pokrivanje (Glas™ Mounting Medium, Tissue-Tek®) in nanje položili krovna stekelca.

S pomočjo histokemijskega barvanja pa smo prikazali aktivnost encimov sukcinatna dehidrogenaza (SDH) in fosfofruktokinaza (FFK). Aktivnost encima SDH je bil marker oksidativne kapacitete, aktivnost encima FFK pa glikolitične kapacitete. Za prikaz aktivnosti encima SDH smo pripravili inkubirano raztopino, ki so jo sestavljale predhodno pripravljenih raztopine: 5 mM EDTA (Merck Titriplex III; Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), 10 mM NaCN (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Nemčija), 2 mM fenazin metasulfat (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Nemčija), 500 mM natrijev sukcinat (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Nemčija) in 15 mM Nitrotetrazolium Blue chloride (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Nemčija), ki smo jih združili in dobro premešali. Raztopin se je hranila pri -18°C in smo jo prede uporabo odtalili. Stekelca z rezinami smo pred nanosom inkubacijske raztopine pustili sušiti pri sobni temperaturi za 3 minute. Nato smo stekelca vodoravno zložili v komoro za inkubacijo, na njih nakapali inkubacijsko rastopino; pazili smo da smo jih popolnoma prekrili, in inkubirali v termostatu pri 37°C 12 minut. Po inkubaciji smo jih sprali pod tekočo vodo, dehidrirali, zbistrili v ksilolu in pokrili s pokrivnim medijem. Glede na encimsko aktivnost so bila vlakna obarvana v različnih modro-sivih odtenkih: vlakna z visoko oksidativno aktivnostjo v najintenzivnejši modro-sivi barvi, vlakna z nizko oksidativno aktivnostjo v svetlem odtenku modro-sive barve.



Slika 5: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris obarvanje z inkubacijsko raztopino za označevanje aktivnosti encima SDH

Za prikaz aktivnosti encima FFK smo pripravili inkubacijsko raztopino iz predhodno pripravljenih raztopin: 20 mM Na-arsenat, 10 mM fruktoza-6-fosfat, 10 mM NAD, 10 mM β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, 1 mg/ml Nitrotetrazolium Blue chloride (vse kemikalije Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Nemčija) in 40 mM Mg- sulfat (Kemika d.d., Zagreb, Croatia), ki smo jih združili in dobro premešali. Zaporedne prečne rezine smo v sveže pripravljene inkubacijske raztopine inkubirali v termostatu pri 37 °C 60 minut, sprali pod tekočo vodo in pokrili s pokrovnim medijem. Glede na encimsko aktivnost so bila vlakna obarvana v različnih modrih odtenkih: vlakna z visoko stopnjo aktivnosti glikolize v intenzivni modri barvi, vlakna z nizko stopnjo glikolize v svetlem odtenku modre barve.



Slika 6: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris obarvane z inkubacijsko raztopino za označevanje aktivnosti encima FFK

4.5 Zajemanje in računalniška obdelava slik

4.5.1 Zajemanje slik

Slike prečnih rezin mišice plantaris smo posneli z mikroskopom Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokio, Japonska), ki je imel 20-kratni objektiv (zaslonka 0,5). Mikroskop je bil povezan z digitalno kamero Nikon DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokio, Japonska), slike pa smo zajemali s programom Lucia GF (verzija 4.82, Laboratory Imaging, Praga, Češka) v ločljivosti 2560 x 1920 slikovnih točk. Da bi bili vsi vzorci primerljivi, smo vse slike posneli v enakih pogojih – v zatemnjenem prostoru, z enakim virom svetlobe, ter z enakimi nastavitvami svetlosti, zaslonke in kamere.

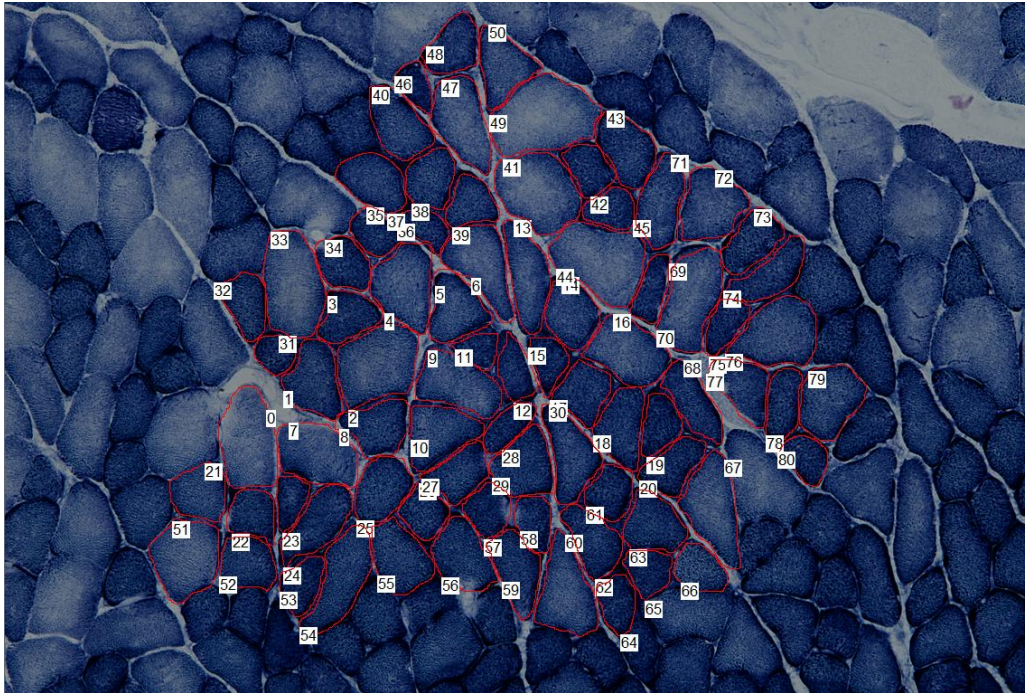
Najprej smo pri vsakem vzorcu slikali prvo prečno rezino, ki je bila obarvana za prikaz aktivnosti encima SDH. Ta slika nam je služila kot osnovni zemljevid, da smo se lažje orientirali na ostalih zaporednih rezinah. Na tej prvi rezini smo izbrali dve mesti – globoko, temnejše območje, kjer so vlakna z višjo oksidativno kapaciteto, ter povrhnje, svetlejše območje, kjer so vlakna z nižjo oksidativno kapaciteto.

Na vseh naslednjih prečnih rezinah iste mišice, ki so bile obarvane z drugimi metodami, smo poiskali ista mesta in slikali ista mišična vlakna. Tako smo za vsako vlakno pridobili podatke o izražanju različnih izooblik težkih verig miozina, vsebnosti maščob, vsebnosti glikogena ter aktivnosti encimov SDH in FFK.

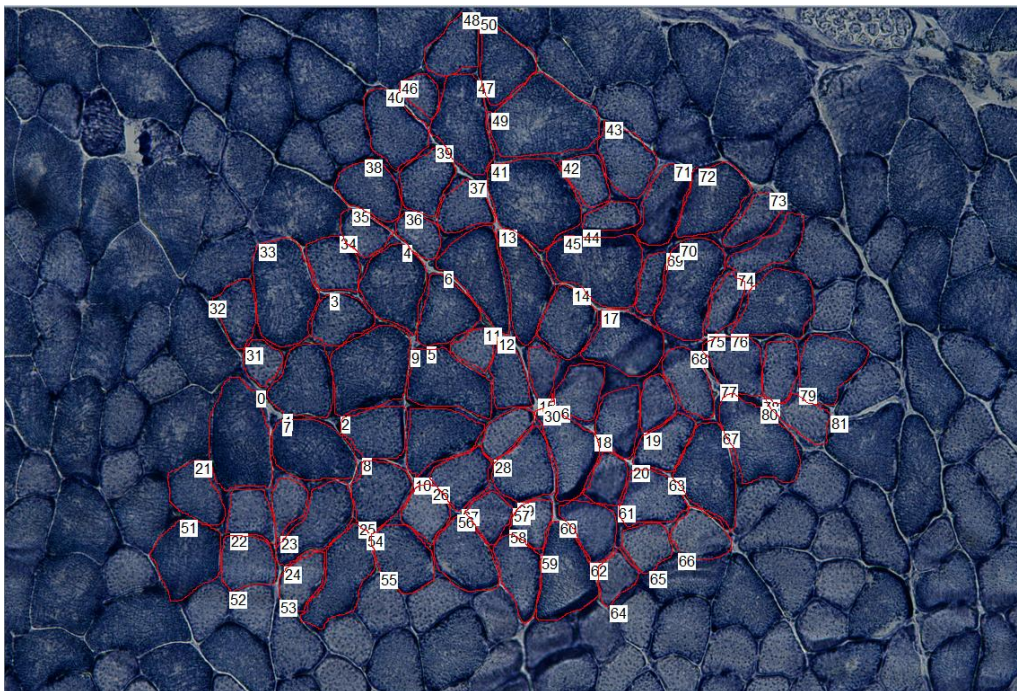
4.5.2 Računalniška obdelava slik

Izražanje izooblik težkih verig miozina smo prikazali z imunohistokemijskimi metodami označevanja s protitelesi 6H1, BF-F3, BAD5 in SC71. Najprej smo s programom Ellipse verzije 2.081 (ViDiTo, Košice, Slovaška) ročno obrisali ista mišična vlakna na slikah prečnih rezin mišice plantaris, histokemijsko obarvanih s Sudanom in PAS ter prikazano aktivnostjo encimov SDH in FFK. Nato smo v programu MuscRegM (Karen in sodelavci, 2009) na slikah zaporednih rezin iste mišice na enakih mestih razpršeno določili oporne točke, ki so služile kot vodilo za poravnavo slik rezin, imunohistokemijsko označenih z različnimi protitelesi proti posameznim izooblikam težkih verig miozina. Slike smo poravnali s slikami prečnih rezin, obarvanih z metodo PAS. Tip posameznega vlakna na sliki smo nato določili v programu FibClasM (Karen in sodelavci, 2009).

Glede na relativno jakost obarvanosti posameznega vlakna smo semikvantitativno določili jakost označenosti s posameznim protitelesom (0 – ni označeno (svetla vlakna), 1 – šibko označeno, 2 – močno označeno (temna vlakna)). Podatke o označenosti s posameznim protitelesom smo skupaj s podatki o ploščini in premeru mišičnega vlakna, ki smo ju izračunali iz obrisov vlaken s programom Ellipse, vnesli v poseben makro v programu Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, ZDA), izdelan za izračun številčnega in površinskega deleža, ki ga posamezen tip vlakna predstavlja na sliki, ter povprečnega najmanjšega Feretovega premera mišičnih vlaken posameznega tipa.



Slika 7: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris obarvan SDH v programu Ellipse z označenimi vlakni.



Slika 8: Mikroskopska slika prečne rezine mišice plantaris obarvane FFK v programu Ellipse z označenimi posameznimi vlakni.

4.5.3 Analiza slik

Za analizo aktivnosti encimov SDH in FFK ter jakosti obarvanja z metodo PAS smo uporabili program ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, ZDA).

S pomočjo posebnega dodatka za ločevanje barv smo s slik prečnih rezin mišice plantaris, obarvanih za SDH in FFK, izluščili modri barvni kanal. To sliko smo nato prenesli v program Ellipse in jo pretvorili v sivinsko (8-bitno) sliko.

Na to sivinsko sliko smo naložili že prej narisane obrise mišičnih vlaken. Za vsako vlakno smo nato izmerili povprečno sivino, ki kaže na encimsko aktivnost. Te podatke smo vnesli v Excelov makro, kjer smo jih povezali s podatki o izražanju izooblik težkih verig miozina. Za vsako vrsto mišičnega vlakna smo izračunali povprečno sivino, ki pove, kako aktivna sta encima SDH in FFK. Aktivnost smo izrazili kot razmerje povprečne sivine proti 255 (ker je 255 črna barva, 0 pa bela).

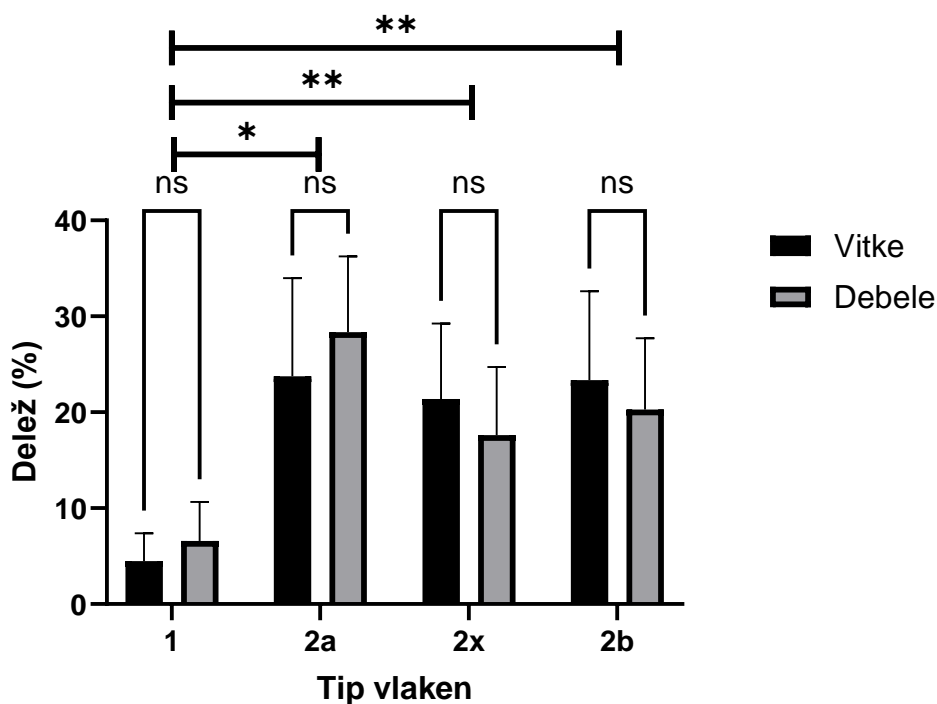
Pri slikah prečnih rezin mišice plantaris, ki so bile obarvane s PAS za prikaz glikogena, smo uporabili podoben postopek. Edina razlika je bila, da smo iz slike izluščili rdeči barvni kanal, saj PAS barva glikogen v rdeče.

5 REZULTATI

Z imunohistokemijskim označevanjem smo določili posamične deleže tipov vlaken v mišici plantaris. Opazili smo, da je povprečno najpogostejši tip vlaken 2a pri miših debele linije prav tako pa tudi pri miših vitke linije (20 – 30%). Pri miših debele linije so vlakna tipa 2a bolj prevladovala kot pri vitki liniji. Prav tako pa je bilo pri obeh linija najmanj mišičnih vlaken tipa 1 (0 – 10%), tudi tukaj smo opazili, da je ta tip vlaken bolj prevladoval pri miših debele linije. Pri povprečju deležev tipov vlaken ni bilo drastičnih razlik med vitkimi in debelimi mišjimi.

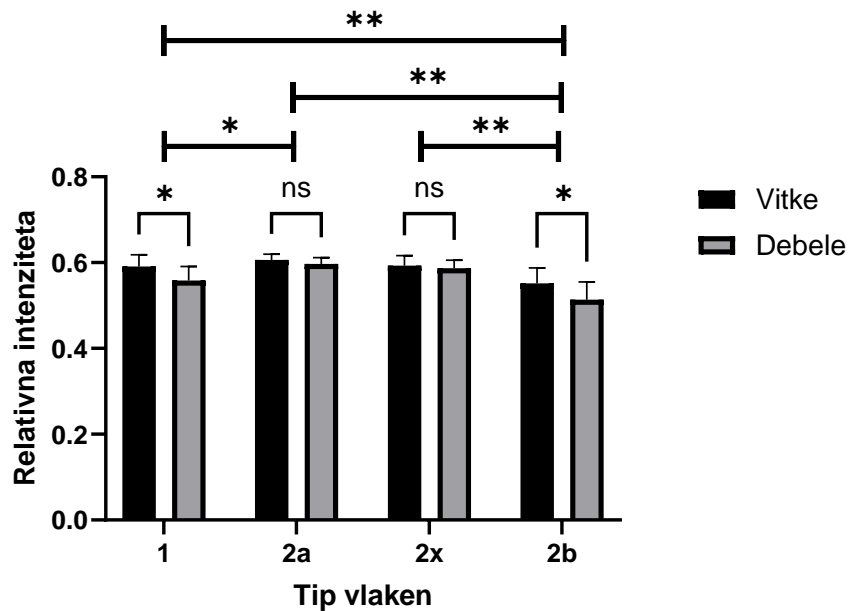
graf povprečja deležev, označenih s procenti, tipov vlaken 1, 2a, 2x in 2b. S sivo je prikazan delež posameznih tipov vlaken za 16 miši debele linije, s črno pa 16 miši vitke linije.

Numerični delež posameznih tipov vlaken



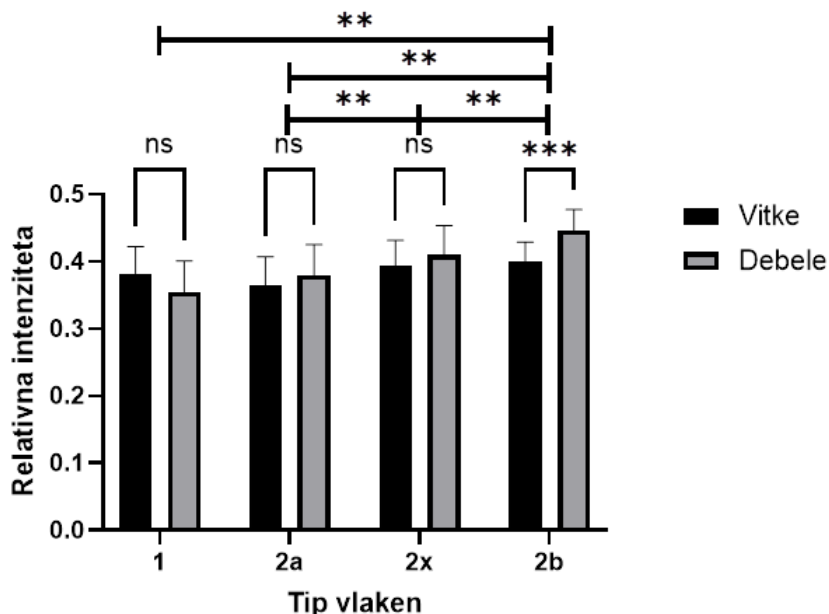
Slika 9: Stolpični prikaz povprečja deležev, označenih s procenti, tipov vlaken 1, 2a, 2x in 2b. S sivo je prikazan delež posameznih tipov vlaken za 16 miši debele linije, s črno pa 16 miši vitke linije.

Z uporabo histokemijske metode za označevanje vlaken smo uspeli ugotoviti različno aktivnost encimov SDH in FFK. Tako smo lahko razbrali kakšno imajo glikolitično in oksidativno kapaciteto. Večja kot je aktivnost določenega encima v vlaknu večjo kapaciteto ima. Pri analizi oksidativne kapacitete, merjene z aktivnostjo encima SDH, je bilo ugotovljeno, da imajo vlakna tipa 2b najnižjo oksidativno kapaciteto. Vlakna tipa 1 pa kažejo nekoliko nižjo oksidativno kapaciteto v primerjavi z vlakni tipa 2a. Poleg tega je bilo opaženo, da je pri genetsko debelih miših oksidativna kapaciteta v vlaknih tipa 1 in 2b nižja kot pri genetsko vitkih miših. Iz grafa lahko razberemo, da imajo vsa vlakna miši debele linije nižjo oksidativno kapaciteto.

Aktivnost encima SDH v mišičnih vlaknih posameznega tipa

Slika 10: Stolpični prikaz relativne intenzitete obarvanih vlaken tipa 1, 2a, 2x in 2b. S črno so prikazane 16 miši vitke linije sivo pa 16 miši debele linije. Relativna intenziteta obarvanega vlakna prikazuje aktivnost encima.

Iz grafa lahko razberemo, da imajo vlakna tipa 2b najvišjo glikolitično kapaciteto, sledijo jim vlakna tipa 2x, medtem ko imajo vlakna tipa 2a in 1 najnižjo. Poleg tega je bilo opaženo, da se pri genetsko debelih miših glikolitična kapaciteta vlaken na splošno nekoliko poveča, pri čemer je to povečanje še posebej izrazito v vlaknih tipa 2b. Razen pri vlaknih tipa 1, kjer vidimo, da miši debele linije nekoliko nižjo kapaciteto.

Aktivnost encima FFK v mišičnih vlaknih posameznega tipa

Slika 11: Stolpični prikaz relativne intenzitete obarvanih vlaken tipa 1, 2a, 2x in 2b. S črno je prikazanih 16 miši vitke linije, s sivo pa debele linije. Stolpični prikaz prikazuje aktivnost encima FFK.

6 RAZPRAVA

Na splošno ni bilo pomembnih vplivov genetske nagnjenosti na aktivnost encima SDH v mišičnih vlaknih (slika 10). Pri oksidativni kapaciteti SDH vidimo, da imajo vlakna tipa 2b najnižjo oksidativno kapaciteto. Prav tako vidimo, da imajo vlakna tipa 1 nekoliko nižjo oksidativno kapaciteto kot tipa 2a. Pri genetsko vitkih miših je bila aktivnost encima višja kot pri genetsko debelih miših. Opazili smo tudi značilno nižjo aktivnost encima SDH v vlaknih tipa 2b v primerjavi z vlakni tipa 2x. Pri genetsko debelih miših je bila oksidativna kapaciteta v vlaknih tipa 1 in 2b nižja kot pri genetsko vitkih miših, ne glede na tip krme.

Pri glikolitični kapaciteti FFK vidimo, da imajo najvišjo glikolitično kapaciteto vlakna tipa 2b, nato pa tipa 2x, medtem ko imajo najnižjo vlakna tipa 2a in 1 (slika 11). Vidimo tudi, da se na splošno pri debelih miškah glikolitična kapaciteta vlaken nekoliko poveča, kar je najbolj razvidno v vlaknih tipa 2b.

Več raziskav je pokazalo, da pride pri debelosti do pretvorbe mišičnih vlaken v hitrejše tipe, ki imajo nižji bazalni nivo presnove kot počasnejši tipi. Hkrati je v teh mišičnih vlaknih pogosto manj mitohondrijev, ki so lahko tudi oslabljeni (Heo idr., 2017). Prav tako sklepamo, da sta pri genetsko debelih miših k razvoju debelosti verjetno prispevala tako zmanjšan nivo bazalne presnove kot tudi motnje v uravnavanju apetita.

Naši rezultati podpirajo ugotovitve, da debelost vodi do preoblikovanja mišičnih vlaken v hitrejša, glikolitična tipa, ki imajo nižjo oksidativno kapaciteto. To je bilo dokazano leta 2002, ko so potrdili prisotnost večjega deleža vlaken tipov 2x in 2b v mišicah z debelostjo v primerjavi z vitkimi kontrolami (Tanner idr., 2002). Skeletne mišice imajo sposobnost prilagajanja na funkcijske zahteve in razpoložljivost hranil s spreminjanjem tipov mišičnih vlaken (Sullivan idr., 2020). Eden izmed možnih razlogov za povečano prisotnost glikolitičnih vlaken pri debelosti je lahko hiperglikemija (visok krvni sladkor, ki prizadene ljudi, ki trpijo za sladkorno boleznijo), ki pogosto spremlja to stanje. Povišane koncentracije glukoze v krvi naj bi sprožile prilagoditev mišičnih vlaken, ki nato za pridobivanje energije uporabljajo tisti substrat, ki je na voljo v večjih količinah (Tanner idr., 2002). Pri genetsko debelih miših se mišična vlakna pretvorijo v hitrejša tipa. Takšna sprememba, povezana z večjim deležem glikolitičnih vlaken in zmanjšano oksidativno sposobnostjo, vodi v zmanjšano inzulinsko občutljivost ter zmanjšan privzem glukoze iz krvi (Umek idr., 2021). Nasprotno pa smo pri genetsko vitkih miših zaznali povečano prisotnost počasnejših, bolj oksidativnih mišičnih vlaken. Te miši niso razvile debelosti, kar bi lahko predstavljalo prilagoditveni odziv na večjo razpoložljivost maščob in hkrati manjšo dostopnost ogljikovih hidratov. Pričakovano je bilo, da se bodo nekatere mišice, ki nosijo telesno težo, odzvale s hipertrofijo (povečanjem mišične mase zaradi rasti posameznih mišičnih vlaken), vendar so raziskave pokazale, da takšne spremembe niso nujno prisotne pri vseh mišičnih skupinah. Možno je, da se učinki povečane telesne mase in zmanjšane fizične aktivnosti med seboj izničijo, saj prva spodbuja rast mišičnih vlaken, medtem ko druga vodi v njihovo atrofijo. Poleg tega smo ugotovili, da je bila oksidativna kapaciteta mišičnih vlaken pri genetsko debelih miših nižja kot pri vitkih, kar sovpada s predhodnimi raziskavami, da se pri debelosti mišična vlakna preobrazijo v hitrejši, bolj glikolitični tip z nižjo oksidativno kapaciteto ter da je aktivnost encima SDH pri vitkih posameznikih večja kot pri debelih, kar predstavlja presnovno neugodne posledice debelosti (Tanner idr., 2002; Shortreed idr., 2009). Aktivnost encima SDH je bila pri miših najmanjša v vlaknih tipa 2b, največja pa v vlaknih tipa 2a, vmesne vrednosti je dosegla v vlaknih tipa 2x. Rezultat je bil pričakovan, saj je znano, da so vlakna tipa 2b glikolitična in imajo najmanjšo oksidativno kapaciteto, vlakna tipa 2x oksidativno-glikolitična, vlakna tipa 2a pa oksidativna in imajo največjo oksidativno kapaciteto med preučevanimi tipi vlaken (Schiaffino in Reggiani, 2011). Znano je, da so v nasprotju z ljudmi pri miših vlakna tipa 2a najbolj oksidativna, celo bolj kot vlakna tipa 1 (Wessel idr., 2010).

7 ZAKLJUČEK

Potrdili smo prvi dve hipotezi, tretjo pa v večini. Glikolitična in oksidativna kapaciteta tipov mišičnih vlaken sta se razlikovali med tipi mišičnih vlaken genetsko debelih miši in genetsko vitkih miši. Dokazali smo tudi, da imajo mišična vlakna genetsko debelih miši nižjo oksidativno kapaciteto kot mišična vlakna genetsko vitkih miši. Pri tretji hipotezi, da imajo mišična vlakna

genetsko debelih miši višjo glikolitično kapaciteto kot mišična vlakna genetsko vitkih miši pa je prišlo do odstopanj pri vlaknih tipa 1, pri ostalih pa lahko potrdimo dano hipotezo.

Čeprav je bila raziskava skrbno načrtovana in izvedena, ima določene pomanjkljivosti. Ker so bile miši nameščene v kletkah po dve ali tri skupaj, ni bilo mogoče natančno spremljati, koliko hrane je zaužila posamezna miš. Poleg tega je bila hrana ves čas prosto dostopna, kar pomeni, da vse miši niso zaužile enake količine. Smiselno bi bilo raziskavo ponoviti tako, da bi vsaki miš ponudili enako količino izokalorične hrane z različno sestavo makrohranil. Rezultati, pridobljeni na mišici plantaris, se ne morejo neposredno prenesti na druge skeletne mišice, saj se te med seboj razlikujejo glede funkcije in sestave mišičnih vlaken. Zato predlagamo, da se analize strukturnih in biokemijskih lastnosti mišičnih vlaken razširijo tudi na druge mišice. Čeprav bi izvedba podobne raziskave na ljudeh zagotovo prinesla bolj relevantne rezultate, je preučevanje vpliva debelosti na skeletne mišice pri človeku izjemno zahtevno, saj je potrebno upoštevati številne okoljske dejavnike, ki jih ni mogoče popolnoma nadzorovati, poleg tega pa etični standardi onemogočajo odvzem vzorcev mišičnega tkiva zdravim posameznikom.

Priloga 1. Kopija etičnega dovoljenja Etične komisije za poskuse na živalih Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varnost rastlin.



REPUBLIKA SLOVENIJA
**MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO**

UPRAVA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA VARNO HRANO,
VETERINARSTVO IN VARSTVO RASTLIN
Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
Območni urad Ljubljana
Dunajska 22, 1000 Ljubljana

T: 01 234 45 50
F: 01 234 45 70
E: OU-Ljubljana.uvhvvr@gov.si
www.uvhvvr.gov.si

Številka: U34401-23/2020/6
Datum: 22.10.2020

Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, izdaja v upravni zadevi izdaje dovoljenja za izvajanje postopkov na živalih na podlagi 207. člena Zakona o splošnem upravnem postopku (Uradni list RS, št. 24/06 - uradno prečiščeno besedilo, 105/06 - ZUS-1, 126/07, 65/08, 8/10 in 82/13, v nadaljevanju ZUP), v povezavi s 21. členom Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3 in ZZZiv-D, Uradni list RS, št. 38/13, 92/20) in na vlogo stranke Univerze v Ljubljani, Biotehniške fakultete, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, št. Z-00906/20-9-TP z dne 25.8.2020, naslednje

DOVOLJENJE za projekt

- Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana se na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, dovoli izvajanje postopkov na živalih znotraj projekta z naslovom »Vpliv RNA variant na fenotipsko raznolikost pri živalskih modelih« za namen translacijske ali uporabne raziskave z namenom ocene, odkrivanja, uravnavanja ali spreminjanja fizioloških stanj.
- Dovoljeno je uporabiti 32 miši:
 - 16 miši, samcev linije FHI (vitka), starosti 3 – 14 tednov
 - 16 miši, samcev linije FLI (debela), starosti 3 – 14 tednov
 Izvor: Center za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale
- Mesto izvajanja: Center za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale.
- Udeleženci v projektu:
Vodja: prof.dr. Simon Horvat, univ.dipl.inž.zoot.
Izvajalci: prof.dr. Simon Horvat univ.dipl.inž.zoot. in Katja Skulj, dr.vet.med.
Oskrbniki: Ana Jakopič, univ.dipl.inž.zoot., Katja Skulj, dr.vet.med. in Urška Hostnik, vet.teh.
- V organizaciji iz tretje točke izreka te odločbe je določena strokovnjakinja za dobrobit živali doc.dr. Pirman Tatjana, univ.dipl.inž.zoot. in njena namestnica znan.sod.dr. Martina Perše, dr.vet.med. iz UL MF.
- V postopkih se lahko uporabljajo laboratorijske živali, ki izvirajo iz odobrene vzrejne organizacije.
- Živalim mora biti zagotovljeno zdravstveno varstvo, ustrezno bivališče, hrana, voda in oskrba, prilagojena fiziološkim in etološkim potrebam živali, v skladu s predpisi. Pogoje oskrbe in nastanitve mora vsak dan preverjati pristojna, v ta namen imenovana oseba. Oskrbovalec živali mora poskrbeti, da je tehnična oprema vsaj enkrat dnevno pregledana in da so morebitne okvare odpravljene v najkrajšem možnem času.
- Kletke z živalmi v postopku morajo biti označene s podatki o identifikaciji in izvoru živali ter namenu nastanitve.

9. Postopki morajo biti izvedeni po opisu, ki je naveden na vlogi, z najmanjšim možnim številom živali, z najmanjšo sposobnostjo občutenja bolečin, trpljenja, stiske ali trajnih poškodb.
10. Usmrtitev živali mora biti izvedena na strokoven in predpisan način.
11. Odstranjevanje trupel živali v postopku mora biti izvedeno v skladu s predpisi. Pri izjemnem odstranjevanju živalskih trupel morajo biti le ta shranjena v posebej za to namenjeni zamrzovalni napravi, ki je na zunanji strani vrat označena z vodoravno rdečo črto širine 10 cm in zaklenjena. Živalska trupla morajo biti zapakirana in označena.
12. Voditi je potrebno ostale predpisane evidence na obrazcih.
13. Vodja poskusa oz. projekta mora po zaključku projekta pripraviti poročilo o izvedenih poskusih znotraj projekta na obrazcu G iz Priloge 1 Pravilnika, ki mora biti na vpogled uradnemu veterinarju na njegovo zahtevo.
14. Strokovnjakinja za dobrobit živali mora pripraviti letno poročilo o usmrtitvah živali na obrazcu J iz Priloge 1 Pravilnika in ga do konca februarja za preteklo leto posredovati v pisni ali elektronski obliki na GU UVHVVR.
15. Letno poročilo o opravljenih poskusih, vključno s podatki o težavnosti stopnji poskusov mora strokovnjakinja za dobrobit živali poslati na obrazcu za poročanje in v skladu z navodili za poročanje ter ga do konca februarja za preteklo leto posredovati v pisni ali elektronski obliki na GU UVHVVR.
16. To dovoljenje velja **31.10.2022**.
17. Stroške postopka, ki znašajo **170,00 EUR** mora stranka plačati **v roku petnajst (15) dni** po pravnomočnosti te odločbe v korist proračuna RS, Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, z navedbo drugi stroški, na naslov UVHVVR, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana, na TRR 01100-8450047751, sklic 11 23370-7141009-93010, **potrdilo o plačilu pa mora stranka takoj po opravljenem plačilu poslati na UVHVVR, OU Ljubljana, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana**, sicer jih po izteku tega roka prisilno izterja pristojni organ Ministrstva za finance RS.

Obrazložitev:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, je dne 8.9.2020 naslovila na pristojni upravni organ Vlogo za izdajo dovoljenja za poskus, št. Z-00906/20-9-TP z dne 25.8.2020, z naslovom »Vpliv RNA variant na fenotipsko raznolikost pri živalskih modelih«, po določilih Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur.l. RS, št. 37/13, 89/14, v nadaljevanju Pravilnika). Priloge k vlogi so bile netehnični povzetek projekta na Obrazcu D, obrazložitev strokovnjakinje za dobrobit živali, kopije potrdila (certifikata) o usposobljenosti oskrbovalke živali v projektu ter poročilom mentorja o strokovni usposobljenosti Urške Hostnik in potrdilo o plačilu upravne takse. Projekt je bil odobren s strani ARRS, šifra projekta J4-2548. Določeni postopki iz projekta ARRS bodo izpeljani tudi v okviru doktorske naloge mlade raziskovalke in tekočega raziskovalnega programa P4-0220 (Primerjalna genomika in genomska biodiverziteteta 1.1.1999 – 21.12.2025).

Na podlagi določil drugega odstavka 21. člena Zakona o zaščiti živali, je bila vloga pod št. U34401-23/2020/1 dne 9.9.2020 posredovana Etični komisiji za poskuse na živalih, ki jo obravnavala na 82. dopisni seji in na vlogo za projekt z naslovom »Vpliv RNA variant na fenotipsko raznolikost pri živalskih modelih«, kot sklep podala pozitivno oceno. Izdelano je bilo strokovno mnenje poročevalca, ki je podal sklepno mnenje, da je vloga za izdajo dovoljenja ustrezno opisana in znanstveno utemeljena.

V raziskovalnem projektu bo vlagatelj na modelu miši za debelost in vitkost s pomočjo novih genomskih metod, WTSS-seq (ang. whole transcriptome start site sequencing) in WTTS-seq (whole transcriptome termini site sequencing), iskali dodatne mehanizme in dejavnike, ki bi lahko pojasnili problem manjkajočega deleža dednosti pri debelosti. Raziskava bo omogočila nov vpogled v procese na ravni transkriptoma, ki so z debelostjo povezana alternativna mesta

poliadenilacije (APA) in/ali alternativna mesta začetka transkripcije na 5'koncu. Vsi postopki so dobro in natančno opisani. 32 miši v različnih skupinah bodo imele različno krmo in vodo na voljo. Drugih aplikacij ali rokovanj z njimi ne bo, razen tehtanja enkrat na teden. Pri starosti 14. tednov bodo miši usmrčene z uporabo cervikalne dislokacije, ki ji bo sledila izkrvavitev ter odvzem tkiv (maščobno tkivo) za nadaljne raziskave. Poskus je uvrščen med blage poskuse.

Miši bodo med postopkom nastanjene v polikarbonatnih kletkah s posamičnim prezračevanjem (IVC kletke), vsi postopki bodo potekali v Centru za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale, ki je v sklopu Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, s strani pristojnega organa, odobrena vzrejna organizacija (miši in podgane) in uporabniška organizacija (uporaba laboratorijskih glodalcev). Za izvajanje postopkov na živalih je zagotovljena potrebna oprema in druga sredstva za oskrbo živali. Poskrbljeno je za zdravstveno varstvo živali in zagotovljeno usposobljeno osebje za izvedbo ter nadzorovanje postopkov. Živali bodo usmrčene na predpisan način, s strani ustrezno izobraženih ter usposobljenih oseb. Za shranjevanje in odstranjevanje ŽSP je poskrbljeno.

V poskusih se lahko uporabljajo živali tistih vrst, ki so bile vzrejene ali gojene oz. skotene in rejene kot laboratorijske živali, kar določa 4. člen Pravilnika. Vsi udeleženci v poskusu morajo biti ustrezno izobraženi in usposobljeni, kot določata 13. in 14. člen Pravilnika. Vsaka žival mora imeti zagotovljeno nastanitev in okolje, hrano, vodo in oskrbo primerno vrsti živali, njenemu zdravju in optimalnemu počutju. Pogoje oskrbe in nastanitve mora nadzorovati v ta namen imenovana oseba, kot določa 10. člen Pravilnika. Označitev kletk je opisana v 8. členu Pravilnika. Poskusi morajo biti izvedeni z najmanjšim možnim številom živali z najmanjšo sposobnostjo občutenja bolečin, trpljenja, stiske ali trajnih poškodb. Usmrnitev živali mora biti po 30. členu in Prilogi 5 Pravilnika, izvedena na predpisan, strokoven način, o čemer mora biti vodena predpisana evidenca. Varno skladiščenje in neškodljivo odstranjevanje trupel in živalskih odpadkov določa Pravilnik o zbiranju, prevozu, skladiščenju, ravnanju uporabi in odstranjevanju živalskih trupel kot vrste živalskih stranskih proizvodov, ki niso namenjeni prehrani ljudi (Uradni list RS, št. 122/07), v povezavi z določilom Uredbe Evropskega Parlamenta in Sveta (ES) 1069/2009 (UL L 300). O shranjevanju trupel in o oddaji živalskih trupel je potrebno voditi predpisano evidenco. Voditi je potrebno vse ostale predpisane evidence na obrazcih iz Priloge 6, ki je sestavni del Pravilnika ter poročati pristojnim organom kot to določa 35. člen Pravilnika.

Dovoljenje je izdano v skladu z 21. členom Zakona o zaščiti živali. V primeru ugotovitve neizpolnjevanja predpisanih pogojev, pristojni organ dovoljenje odvzame, kot določa šesti odstavek 21. člena navedenega Zakona.

V skladu s prvim odstavkom 118. člena Zakona o splošnem upravnem postopku ter Prilogo 8 Pravilnika o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živali (Ur.l. RS, št. 89/14), je v izreku odločeno o stroških postopka. Ker gredo po določilih prvega odstavka 113. člena ZUP stroški, ki nastanejo med postopkom ali zaradi postopka v breme tistega, na katero zahtevo se je postopek začel je 17. točka izreka te odločbe utemeljena.

Vloga je bila plačana z upravno takso, kot to določa Zakon o upravnih taksah (ZUT-UPB5, Uradni list RS, št. 106/10, 14/15 – ZUUJFO, 84/15 – ZzeIP-J in 32/16 – ZUT-I).

Pouk o pravnem sredstvu: Zoper to odločbo je dovoljena pritožba na Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Dunajska cesta 22, Ljubljana, v roku 15 dni po prejemu odločbe. Pritožba se vložijo pisno, ustno na zapisnik, priporočeno po pošti ali po elektronski pošti, podpisana z varnim elektronskim podpisom, pri organu, ki je odločbo izdal na prvi stopnji (UVHVVR, Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, OU Ljubljana, Dunajska

22, 1000 Ljubljana), s priloženim potrdilom o plačilu 18,10 EUR upravne takse, po tar.št. 2 ZUT-I, ki se nakaže na naslov UVHVVR, Dunajska c. 22, 1000 Ljubljana, račun št. SI56 0110 0100 0315 637, referenca 11 23370-7111002-9301.



Barbara Tomše, dr.vet.med.
uradna veterinarica I

Vročiti:

- UL BF, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana za Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale – po ZUP
- po e-poti na naslov: Tatjana.Pirman@bf.uni-lj.si

Vložiti:

- v zadevo

Priloga 2. Kopija odločbe Etične komisije za poskuse na živalih Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varnost rastlin.



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

UPRAVA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA VARNO HRANO,
VETERINARSTVO IN VARSTVO RASTLIN
Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
Območni urad Ljubljana
Dunajska 22, 1000 Ljubljana

T: 01 234 45 50
F: 01 234 45 70
E: OU-Ljubljana.uvhvvr@gov.si
www.uvhvvr.gov.si

Številka: U34401-23/2020/13
Datum: 5.5.2021

Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, izdaja v upravni zadevi izdanega dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih, na podlagi 207. člena Zakona o splošnem upravnem postopku (Uradni list RS, št. 24/06, 105/06 – ZUS-1, 126/07, 65/08, 8/10 in 82/13, v nadaljevanju ZUP) v povezavi z 21. členom Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3, ZZZiv-D, Uradni list RS, št. 38/13, 92/20, v nadaljevanju Zakon o zaščiti živali) in na vlogo stranke Univerze v Ljubljani, Biotehniške fakultete, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, št.Z-00429/21-9-TP z dne 26.3.2021, naslednjo

ODLOČBO

- Vlogi Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Oddeka za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale o spremembi Dovoljenja za projekt, št. U34401-23/2020/6 z dne 22.10.2020, s trajanjem do 31.10.2022, znotraj projekta z naslovom »Vpliv RNA variant na fenotipsko raznolikost pri živalskih modelih«, Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo UL BF, vodje prof. dr. Simon Horvata, univ.dipl.inž.zoot. se ugotovi in navedeno dovoljenje se dopolni in spremeni.
- Dovoljenje se spremeni tako, da se v 2. točki izreka navedenega dovoljenja dovoli uporabiti še:
 - 24 miši, samcev linije FHI (vitka) in FLI (debela) iz lastne vzreje
 - 32 miši, samic linije FHI (vitka) in FLI (debela) iz lastne vzreje.
- Med udeležence v projektu se pod 4. točko izreka navedenega dovoljenja dodata:
Izvajalka: Špela Mikec, mag.bioteh.
Oskrbovalka živali: Tadeja Snedec, mag.bioteh. in Špela Mikec, mag.bioteh.
Obe osebi sodelujeta v projektu pod nadzorom mentorja.
- Vodja projekta mora o udeležencih, ki bodo delo pod mentorstvom v projektu izvajali pred opravljenim praktičnim delom osnovnega usposabljanja oz. brez predpisanega potrdila o usposobljenosti, obvestiti Glavni urad UVHVVR, na elektronski naslov: tina.aric@gov.si**
- Stroške postopka, ki znašajo 170,00 EUR mora stranka plačati v roku petnajst (15) dni po pravomočnosti te odločbe v korist proračuna RS, Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, z navedbo drugi stroški, na naslov UVHVVR, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana, na TRR 01100-8450047751, sklic 11 23370-7141009-93010, **potrdilo o plačilu pa mora stranka takoj po opravljenem plačilu poslati na UVHVVR, OU Ljubljana, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana**, sicer jih po izteku tega roka prisilno izterja pristojni organ Ministrstva za finance RS.

Obrazložitev:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddeka za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, je dne 6.4.2021 naslovila na pristojni upravni organ Vlogo za spremembo dovoljenja za odobren projekt št. U34401-23/2020/6, št. Z-00429/21-9-TP z dne 26.3.2021, s prilogami: Obrazec E: Vloga za spremembo oz. podaljšanje odobrenega projekta, Obrazec Č: Vloga za odobritev projekta (prvotna z

označenimi spremembami), Obrazec F: Poročilo o izvedenih postopkih znotraj projekta, Obrazec J: Obrazložitev strokovnjaka za dobrobit živali in potrdilo o plačilu upravne takse.

Iz dopolnitve vloge je razvidno, da želi vlagatelj v projektu z naslovom »Vpliv RNA variant na fenotipsko raznolikost pri živalskih modelih«, povečati število samcev in razširiti študijo še na samice, saj bo s tem študija pridobila še na razlikah med spoloma. Del živali je bilo že uporabljenih in na osnovi prvih rezultatov ugotovljeno, da bi bili rezultati študije še bolj relevantni z vključitvijo drugega spola in dodatnih samcev zaradi zmanjšanja vpliva sezone. Na razmnoževanje, še posebej pri FLI liniji ima sezona velik vpliv. Predlagani novi udeleženci v projektu imata ustrezno izobrazbo in opravljeno osnovno usposabljanje v letu 2020 oz. opravljen tečaj za delo z živalmi in uspešno opravljen preizkus znanja, vendar pa zaradi razmer Covid-19, nista mogli opraviti praktičnega dela usposabljanja.

Na podlagi določil petega odstavka 21. člena Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3, Ur. list RS, št. 38/13), je bila vloga pod št. U34401-23/2020/10 dne 9.4.2021 posredovana Etični komisiji za poskuse na živalih (v nadaljevanju EK), ki jo je obravnavala na 87. seji dne 20.4.2021 in podala pozitivno oceno.

Zakon o zaščiti živali v sedmem odstavku 21. člena, v povezavi z 29.. členom Pravilnika o pogojih za izvajanje postopkov na živalih (Ur.l. RS, št. 32/21, v nadaljevanju Pravilnika) predvideva med drugim tudi spremembo dovoljenja, zato je OU Ljubljana, UVHVVR odločil kot izhaja iz 1., 2. in 3. točke izreka te odločbe. Vsi udeleženci v projektu morajo biti ustrezno izobraženi in usposobljeni, kot določata 15 in 16. člen Pravilnika. Zaradi trenutne situacije v zvezi z epidemijo Covid-19, udeleženci osnovnega usposabljanja, dela predpisanega praktičnega izobraževanja na MF UL v letu 2020, niso mogli opraviti. Zato se v skladu z odločitvijo Glavnega urada UVHVVR (dopis št. U34401-31/2020/7 z dne 19.2.2021), potrdilo iz enajstega odstavka 18. člena Pravilnika, izda naknadno ter se dovoli udeležbo v projektu dvema udeleženkama, pod mentorstvom ker sta opravili teoretični del predpisanega usposabljanja za izvajalce, oskrbovalce, ki je bil organiziran na MF UL, decembra 2020.

V skladu s prvim odstavkom 118. člena ZUP in četrtem odstavkom 26. člena ter Prilogo 4 Pravilnika, je v izreku odločeno o stroških postopka. Ker gredo po določenih prvega odstavka 113. člena ZUP stroški, ki nastanejo med postopkom ali zaradi postopka v breme tistega, na katero zahtevo se je postopek začel, je 5. točka izreka te odločbe utemeljena.

Vloga je bila plačana z upravno takso, kot to določa Zakon o upravnih taksah (ZUT-UPB5, Uradni list RS, št. 106/10, 14/15 – ZUUJFO, 84/15 – ZzelP-J in 32/16 – ZUT-I).

Pouk o pravnem sredstvu: Zoper to odločbo je dovoljena pritožba na Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Dunajska cesta 22, Ljubljana, v roku 15 dni po prejemu odločbe. Pritožba se vložijo pisno, ustno na zapisnik, priporočeno po pošti ali po elektronski pošti, podpisana z varnim elektronskim podpisom, pri organu, ki je odločbo izdal na prvi stopnji (UVHVVR, Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, OU Ljubljana, Dunajska 22, 1000 Ljubljana), s priloženim potrdilom o plačilu 18,10 EUR upravne takse, po tar.št. 2 ZUT-I, ki se nakaže na naslov UVHVVR, Dunajska c. 22, 1000 Ljubljana, račun št. SI56 0110 0100 0315 637, referenca 11 23370-7111002-93010



Barbara Tomše, dr.vet.med.
uradna veterinarica I

Vročiti:

- UL BF, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana za Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale – po ZUP
- po e-poti na naslov: Tatjana.Pirman@bf.uni-lj.si

Vložiti: - v zadevo

8 LITERATURA

- Almond, R. E., Cawthorne, M. A., & Enser, M. (1988). Muscles of diabetic (db/db) mice: fibre size, fibre type and the effects of a thermogenic, beta-adrenoceptor agonist. *International Journal of Obesity*, *12*(1), 81–91.
- Álvarez-Castro, P., et al. (2011). Función endocrina en la obesidad. *Endocrinol Nutr*, *58*, 422–432.
- Björnholm, M., & Zierath, J. R. (2005). Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochemical Society Transactions*, *33*(Pt 2), 354-357.
- Boden, G. (2003). Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *111*(3), 121-124.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *105*(2), 141-150.
- Graf, C., & Ferrari, N. (2019). Metabolic health - The role of adipo-myokines. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), 6159.
- Maltin, C. A. (2008). Muscle development and obesity: Is there a relationship? *Organogenesis*, *4*(3), 158-169.
- Martinez-Huenchullan, S., McLennan, S. V., Verhoeven, A., Twigg, S. M., & Tam, C. S. (2017). The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. *Obesity Reviews*, *18*(7), 776-790.
- Maxwell, L. C., Faulkner, J. A., & Murphy, R. A. (1982). Relationship among fibre type, myosin ATPase activity and contractile properties. *Histochem J*, *14*(6), 981-997.
- Pati, S., Irfan, W., Jameel, A., Ahmed, S., & Shahid, R. K. (2023). Obesity and cancer: A current overview of epidemiology, pathogenesis, outcomes, and management. *Cancers (Basel)*, *15*(2), 485.

- Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M. E., Rubio-Ruiz, M. E., Manzano-Pech, L., & Guarnier-Lans, V. (2021). Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1786.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447-1531.
- Sousa, L. G. O., Marshall, A. G., Norman, J. E., Fuqua, J. D., Lira, V. A., Rutledge, J. C., & Bodine, S. C. (2021). The effects of diet composition and chronic obesity on muscle growth and function. *Journal of Applied Physiology* (1985), 130(1), 124-138.
- Straight, C. R., Toth, M. J., & Miller, M. S. (2021). Current perspectives on obesity and skeletal muscle contractile function in older adults. *Journal of Applied Physiology* (1985), 130(1), 10-16.
- Stuart, C. A., McCurry, M. P., Marino, A., South, M. A., Howell, M. E. A., Layne, A. S., et al. (2013). Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(5), 2027–2036.
- Suriano, F., Vieira-Silva, S., Falony, G., et al. (2021). Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*, 9(1), 147.
- Tanner, C. J., Barakat, H. A., Lynis Dohm, G., Pories, W. J., MacDonald, K. G., Cunningham, P. R. G., Swanson, M. S., & Houmard, J. A. (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282, 1191–1196.
- Tomlinson, D. J., Erskine, R. M., Morse, C. I., Winwood, K., & Onambélé-Pearson, G. (2016). The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. *Biogerontology*, 17(3), 467-483.
- Umek, N., Horvat, S., Cvetko, E., Kreft, M., Janáček, J., Kubínová, L., Stopar Pintarič, T., & Eržen, I. (2019). 3D analysis of capillary network in skeletal muscle of obese insulin-resistant mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 152(5), 323-331.
- Umek, N., Horvat, S., & Cvetko, E. (2021). Skeletal muscle and fiber type-specific intramyocellular lipid accumulation in obese mice. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6), 730-738.
- Uranga, R. M., & Keller, J. N. (2019). The complex interactions between obesity, metabolism and the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 513.

Volčanšek, Š., & Pfeifer, M. (2014). Metabolic benefits of physical activity. *Zdravniški vestnik*, 83(9).

World Health Organization. (2022). *Obesity causes cancer and is major determinant of disability and death, warns new WHO report*. <https://www.who.int/europe/news/item/03-05-2022-obesity-causes-cancer-and-is-major-determinant-of-disability-and-death--warns-new-who-report>

World Health Organization. (9.6. 2021). *Obesity and overweight fact sheet*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

World Health Organization. (9.6. 2021). *Obesity*. https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1