

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Smilja T. Todorović

**UTICAJ DUGOTRAJNE DIJETALNE RESTRIKCIJE
NA INSULINSKI SIGNALNI PUT U MOZGU
PACOVA TOKOM STARENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Smilja T. Todorović

**THE EFFECT OF LONG-TERM DIETARY
RESTRICTION ON INSULIN SIGNALING
PATHWAY IN RAT BRAIN DURING AGING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Veliku zahvalnost dugujem:

Mojim divnim mentorima, dr Aleksandri Mladenović Đorđević i dr Selmi Kanazir, na usmeravanju, posvećenosti, svestranim idejama i savetima koji su doprineli realizaciji ove doktorske disertacije. Dr Selmi Kanazir na pruženoj prilici da postanem deo njenog tima i od nje naučim kako da se snađem u svetu nauke. Dr Aleksandri Mladenović Đorđević na strpljenju i vremenu koje je uložila u realizaciju ove teze, njenom kritičkom pogledu, ali pre svega na divnom prijateljskom odnosu kojim je bilo prožeto vreme provedeno u radu.

Dr Kosari Smiljanić, koja je bila tu za mene kada je bilo najpotrebnije i čiji humor mi je uvek nanosio osmeh na lice. Što je neko na koga uvek mogu da se oslonim i ko mi je obogatio život divnim prijateljstvom.

Kolegicama Kiki, Nataši, Desi i Vesni na izuzetno korisnim savetima, razmeni iskustava i druženju koje je obojilo dane mnogo lepšim bojama.

Mlađim kolegama, Mileni, Ireni, Željku i Vladi na vedroj atmosferi u laboratoriji uz koju je bilo uživanje raditi.

Dr Danijeli Laketi na konstruktivnim sugestijama u pisanju ove disertacije i pruženoj pomoći kada je bila najpotrebnija.

Devojkama iz laboratorije 30 na pozajmicama, lepoj saradnji i zanimljivom vremenu provedenom na psiho-kafi. Mojoj dragoj Ivi na divnom druženju.

Tijani, koja mi je tokom svih godina učenja pružala neprocenjivu emotivnu podršku i Mariji, bez čije pomoći i ljubavi bi bilo jako teško izvesti ovaj poduhvat.

Mom mužu i mojim momcima, bez kojih ništa ne bi imalo smisla. Koji me svaki dan podsećaju da je život satkan od ljubavi i smeha. I koji su istrpeli mnogo kako bi ova teza ugledala svetlost dana.

Posebno hvala mojim roditeljima, koji nikada nisu izgubili veru u mene i koji su me naučili da je ljubav osnova svega u životu.

Mojoj seki, kojoj posvećujem ovu tezu. I hrabrosti sa kojom stupa kroz život.

Uticaj dugotrajne dijetalne restrikcije na insulinski signalni put u mozgu pacova tokom starenja

SAŽETAK

Starenje je normalan, fiziološki proces koji obuhvata sve organe i organske sisteme i tokom koga se organizam suočava sa nizom strukturnih i funkcionalnih promena. Starenje mozga je izrazito kompleksan proces, predstavljen nizom sukcesivnih događaja koji postepeno rezultiraju gubitkom kognitivnih i motornih funkcija.

Postoji niz farmakoloških i sredinskih faktora koji su u stanju da odlože i/ili uspore mnoge od starosno-zavisnih procesa, a dijetalna restrikcija (DR) je jedna od najviše i najduže istraživanih. Mnogobrojni su eksperimentalni i epidemiološki podaci koji govore u prilog korisnih efekata restriktivnog režima ishrane, bez obzira da li se radi o svakodnevnoj, ili intermitentnoj dijeti, smanjenju količine hrane ili kalorija. Međutim, u poslednje vreme se sve više pojavljuju podaci koji dovode u pitanje univerzalnost korisnog dejstva dijete. Da bi ovakva intervencija postigla svoj optimalni efekat, neophodno je povesti računa o određenim specifičnostima prilikom uspostavljanja restriktivnog režima ishrane. Pre svega, pokazano je da stepen restrikcije igra bitnu ulogu u efektima koje ona proizvodi i da previše restriktivan režim ishrane može imati negativne posledice po organizam. Takođe, postoje indicije da nisu svi organski sistemi podjednako podložni procesima starenja, kao ni dejstvu dijete. Efekat dijete se može veoma razlikovati u zavisnosti od stepena i tipa restrikcije, pola i organa gde se efekat očekuje, kao i od starosti jedinke na koju se restriktivni režim primenjuje.

Prvi korak u istraživanju korisnih efekata restrikcije hrane koja je iznosila 60% prosečnog dnevnog unosa hrane, bio je ispitati efekat različitih dijetalnih režima, odnosno efekte DR koja je različito trajala i koja je započeta u različitim životnim dobima kod mužjaka Wistar soja pacova. Praćen je čitav niz parametara u aktivnosti životinja i detektovane su značajne razlike u njihovim fizičkim i kognitivnim preformansama, kako tokom starenja, tako i pod uticajem različitih režima ishrane. Dugotrajna dijetalna restrikcija otpočeta u adultnom dobu je dovela do poboljšanja u izvođenju motoričkih i kognitivnih testova i do sveukupnog poboljšanog stanja organizma, što se ogledalo u smanjenoj krhkosti ovih životinja. Nasuprot tome, restriktivni režimi istog tipa, ali kasnijeg početka i/ili kraćeg trajanja, pokazali su se kao neuspešni u pokušaju da se

izazovu korisni efekti i poboljša stanje organizma. Dijeta sa izrazito kasnim početkom i kratkog trajanja je dovela čak i do negativnih posledica po organizam, izazivajući dodatne poteškoće u habituaciji životinja i povećavajući njihovu krhkost.

Shodno detektovanim rezultatima, za dalji nastavak istraživanja je izabrana dijeta za koju je pokazano da daje nedvosmisleno dobar efekat i dalje je ispitivan njen uticaj na energetske metabolizam mozga. Smatra se da je narušavanje homeostaze energetskog metabolizma jedan od vodećih uzroka koji leži u osnovi brojnih neurodegenerativnih bolesti koje se javljaju tokom starenja. Ključnu ulogu u metabolizmu glukoze i održavanju energetske homeostaze imaju proteini insulinskog signalnog puta koji su odgovorni za regulaciju unosa hranjivih materija, zatim AMPK kao glavni energetski senzor ćelije i glukozni transporteri koji omogućavaju ulazak glukoze u mozak i nervne ćelije. Novija istraživanja ukazuju da pomenuti proteini imaju važnu ulogu u procesima koji leže u osnovi efekata DR na starosno-zavisne promene. Upravo zato, važan aspekt ove doktorske disertacije predstavljao je ispitivanje promena u ekspresiji glukoznih transportera, AMPK proteina, Neuropeptida Y, insulina, insulinskog receptora, supstrata insulinskog receptora i protein kinaze B. Ispitivanja su sprovedena na nivou kore prednjeg mozga, hipokampusu i hipotalamusu, struktura u kojima je pokazano da dolazi do znatnog narušavanja energetske homeostaze tokom starenja. Dobijene promene su sagledane u odnosu na promene relevantnih biohemijskih parametara u serumu, kao što su glukoza, insulin, holesterol i trigliceridi. Zaključeno je da dugotrajna dijetalna restrikcija dovodi do niza promena, koje uključuju povećanje nivoa NPY proteina i insulina, utišavanje insulinskog signalnog puta u hipotalamusu i hipokampusu, kao i do bolje snabdevenost kore velikog mozga i hipokampusu dovoljnom količinom energije. Sve ove promene su zajedno doprinele poboljšanju kognitivnih i motoričkih performansi životinja u dubokoj starosti. Rezultati ove doktorske disertacije upućuju na korisnost restriktivnog režima ishrane, ali istovremeno nameću limite u pogledu trenutka uvođenja ovakvog režima ishrane i dužine trajanja, uzimajući u obzir negativne efekte do kojih DR može dovesti u određenim slučajevima.

Ključne reči: mozak, dijetalna restrikcija, starenje, krhkost, motorička aktivnost, habituacija, prostorna memorija, energetska homeostaza, metabolizam glukoze, insulin

Nučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

The effect of long-term dietary restriction on insulin signaling pathway in rat brain during aging

ABSTRACT

Aging is a normal, physiological process that involves all organs and organic systems, and during which the organism faces a number of structural and functional changes. Brain aging is an extremely complex process, represented by a series of successive events that gradually result in loss of cognitive and motor functions.

There are a number of pharmacological and environmental factors that are able to postpone and / or slow down many of the age-dependent processes, and dietary restriction (DR) is one of the most investigated and most widely used experimental intervention in aging research. There are numerous experimental and epidemiological data that support the beneficial effects of a restrictive diet, regardless of the type: a daily reduction or intermittent diet, reduction in food or in calories, all of those approaches seem beneficial. Nevertheless, there is a body of data that challenges current premise about comprehensive DR usefulness. In order for DR to achieve its optimal effect, it is necessary to take certain specificities into account while establishing a restrictive dietary regime. First of all, it has been shown that the percentage of restriction plays an important role in the effects it induces, and that a very restrictive diet may have negative consequences for the organism. In addition, not all the body systems are equally susceptible to aging processes, nor to the beneficial effects of DR. The effect of the restrictive diet can vary greatly, depending on the degree and type of restriction, gender and organs examined, as well as the age of the individual to which the restrictive regimen is applied.

In order to investigate the effect of 60% DR on the energy homeostasis and insulin signaling in the brain, we first examined the effects of three different types of dietary restriction that varied in length and onset, on rat behavior during aging. The experiments were performed on 12-, 18- and 24-month-old male Wistar rats exposed to AL or DR type of feeding (60% of AL daily intake). A variety of parameters were monitored in the activities of animals and significant differences in their physical and cognitive performance were detected, both during aging and under the influence of different dietary regimes. Long-term dietary restriction that started in young adulthood

led to the improvement of motor and cognitive performances and to the reduced frailty. By contrast, restrictive regimes of the same type, but with late-onset and/or the shorter duration, have a less pronounced positive impact on motor and cognitive functions during aging. A diet that started at old age and had the shortest duration has even led to negative consequences, causing additional difficulties in the habituation of animals, and increased their frailty score.

Based on results mentioned above and the most favorable outcome of DR, we continued to investigate the longest dietary regime and its effect on brain metabolism during aging. Disruption of homeostasis in the brain energy metabolism is considered to be one of the leading causes that lie behind many age-related neurodegenerative diseases. The key proteins that regulate processes of glucose metabolism and energy homeostasis are: AMPK, as the main energy cell sensor, glucose transporters that facilitate glucose transport across the blood-brain-barrier and plasma membrane, and proteins involved in insulin signaling pathway, responsible for the regulation of nutrient intake. These proteins play an important role in processes involved in the effects of DR on age-dependent changes. For this reason, we examined changes in the expression of glucose transporters, AMPK protein, Neuropeptide Y, insulin, Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate, and Protein Kinase B. The analysis was performed in cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus, structures most severely affected by process of aging and also with important role in energy homeostasis. Relevant biochemical parameters in the serum were also investigated, such as glucose, insulin, cholesterol, and triglycerides. The most pronounced changes elicited by long-term restrictive regime were related to increased levels of insulin and NPY proteins, as well as attenuation of the insulin signal pathway in the hypothalamus and the hippocampus, and improved energy supply of cortex and hippocampus. All the above changes resulted in a significant improvement of cognitive and motor performances of 24 month-old animals. The results of this doctoral dissertation point to the usefulness of a restrictive diet, but at the same time impose certain limits, regarding the time point when the diet should be applied and also the duration of diet, taking into account the negative effects that DR may have in certain cases.

Key words: dietary restriction, aging, frailty, motor activity, habituation, spatial memory, glucose metabolism, energy homeostasis, insulin, brain

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Neurobiology

SKRAĆENICE

AB - Alchajmerova bolest

AL - *ad libitum*

ALS - amiotrofička lateralna skleroza

AMP - adenzin monofosfat

AMPA - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

AMPK - protein kinaza aktivirana adenzin-monofosfatom

AT - ukupno vreme provedeno u kretanju (engl. *ambulatory time*)

ATP - adenzin trifosfat

BDNF - moždani neurotrofinski faktor (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*.)

BSA - goveđi albumin seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CALERIE-1 - engl. *Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*

CNS - centralni nervni sistem

CR - kalorijska restrikcija, (engl. *Caloric Restriction*)

CST - cerebros spinalna tečnost

DR - dijetalna restrikcija

DT - ukupni pređeni put (engl. *distance traveled*)

FI - indeks krhkosti (engl. *frailty index*)

FR - restrikcija hrane (engl. *Food Restriction*)

FS – krhkost (engl. *Frailty Score*)

GAP43 - protein povezan sa rastom (engl. *Growth-Associated Protein 43*)

GLUT - glukozni transporteri (engl. *Glucose Transporters*)

Grb-2/ SOS - kompleks vezujućeg proteina receptora faktora rasta 2 i SOS proteina (engl. *Growth factor receptor binding protein 2/ Son-of-sevenless*)

HPA osa - hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa (engl. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*)

IF – periodično ili intermitentno gladovanje (engl. *Intermittent Fasting*)

IR - insulinski receptor

IRS - supstrati insulinskog receptora (engl. *Insulin Receptor Substrate*)

KMB - krvno moždana barijera

LTP - dugotrajna potencijacija (engl. *Long-Term Potentiation*)

MAPK - mitogen aktivirajuće protein kinaze (engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*)

mTOR - engl. *mammalian target of rapamycin*

NCAM - neuronalni ćelijski adhezioni molekul (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule*)

NIA - Nacionalni institut za starenje (engl. *National Institute on Aging*)

PB - Parkinsonova bolest

PI3K - fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB/Akt - protein kinaza B

PKC - protein kinaza C

POMC - proopiomelanokortin (engl. *Proopiomelanocortin*,)

IGF-IR - receptor faktora rasta sličnog insulinu (engl. *Insulin-like Growth Factor Insulin Receptor*)

ROS - reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SAB – spontane alteracije (engl. *Sponatenous Alterations*)

Shc - engl. *Collagen Containing Protein*

SPH - sinaptofizin (engl. *Synaptophysin*)

UW - Univezitet u Viskonsinu (engl. *University of Wisconsin*,)

WT – divlji soj (engl. *Wild Type*)

α -Syn - alfa sinuklein (engl. *α -Synuclein*)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Efekat starenja na centralni nervni sistem (CNS)	1
1.2. Dijetalna restrikcija	3
1.2.1. Mehanizmi delovanja DR	6
1.2.1.1. Detekcija hranljivih materija u krvi	6
1.2.1.2. Mikrobiom	7
1.2.1.3. Sinaptička plastičnost.....	7
1.2.1.4. Inflamacija.....	8
1.2.1.5. Reaktivne kiseonične vrste	9
1.2.2 DR protokoli	10
1.3. Krhkost (engl. <i>Frailty</i>)	12
1.4. Energetski metabolizam u mozgu	18
1.4.1. AMPK i glukozni transporteri u starenju.....	21
1.5. Insulin u mozgu	22
1.5.1. Fiziološke funkcije insulina u mozgu.....	25
1.5.2. Insulinski signalni put.....	26
1.5.3. Uticaj starenja na insulinski signalni put	29
1.5.4. Uticaj DR na insulinski signalni put.....	30
2. Cilj	32
3. Materijal i metode	34
3.1. Eksperimentalne životinje	34
3.2. Eksperimentalni dizajn	34
3.3. Testovi ponašanja	35
3.3.1. Test otvorenog polja	35
3.3.2. Y lavirint	37
3.3.3. <i>Frailty score</i> (FS)	38
3.4. Određivanje biohemijskih parametara u serumu pacova	39
3.5. Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova	40
3.5.1. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva	40
3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	42
3.5.3. Elektroforeza proteina	42

3.5.4. Elektrotransfer proteina	43
3.5.5. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - <i>Western blot</i> metoda	44
3.5.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova	45
3.6. Statistička obrada rezultata	46
4. Rezultati.....	47
4.1. Testovi ponašanja	47
4.1.1. Uticaj starenja i različitih režima ishrane na aktivnost životinja u testu otvorenog polja.....	47
4.1.2. Uticaj starenja i različitih režima ishrane na prostornu memoriju životinja u Y lavirintu	51
4.1.3. Uticaj različitih režima ishrane na <i>frailty score</i> (FS) kod životinja tokom starenja	53
4.2. Biohemijski parametri u serumu pacova	64
4.2.1. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR1 režima ishrane	64
4.2.2. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR2 i DR3 režima ishrane	66
4.3. Promene u koncentraciji AMPK, njegove fosforilisane forme i glukočnih transportera u hipokampusu i kori mozga pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane	67
4.4. Promene u koncentraciji proteina insulinskog signalnog puta u hipokampusu i hipotalamusu pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane.....	69
5. Diskusija	78
6. Zaključak.....	108
7. Literatura	111

1. UVOD

1.1. Efekat starenja na centralni nervni sistem (CNS)

Starenje je kompleksan proces, predstavljen nizom sukcesivnih događaja koji dovode do promena u normalnom, fiziološkom funkcionisanju organizma. Praćeno je strukturnim i funkcionalnim promenama u mozgu, koje postepeno rezultiraju gubitkom kognitivnih i motornih funkcija.

Najuočljivija promena tokom starenja je kontinuirano smanjenje volumena moždanog tkiva, uz istovremeno povećanje volumena moždanih komora i cerebrospinalne tečnosti (Raz i Rodrigue, 2006). Kod ljudi, nakon navršene 40-te godine, svaka dekada dovodi do smanjenja volumena mozga za 5%, a nakon 70-te godine života to smanjenje je još izraženije (Svennerholm i saradnici, 1997; Scahill i saradnici, 2003). Najizraženije promene u volumenu tokom starenja su primećene u hipokampusu, prefrontalnom korteksu, strijatumu, talamusu, delovima bazalnih ganglija, temporalnom delu kore velikog mozga i cerebelumu (Anderton, 2002; Barnes, 2003; Peters i saradnici, 2006).

Gubitak motornih performansi je posledica disfunkcionalnosti centralnog i perifernog nervnog sistema, kao i neuromišićnog sistema (Darling i saradnici, 1989; Diggles-Buckles, 1993; Tang i Woollacott, 1996; Contreras-Vidal i saradnici, 1998; Seidler i saradnici, 2002). Istraživanja su pokazala da regioni mozga odgovorni za motoričke radnje, kao što su prefrontalni i parijetalni region kore velikog mozga, primarna motorna i somatosenzorna kora i cerebelum, podležu starosno-zavisnim promenama i predstavljaju jedan od uzroka gubitka motornih performansi kod starih jedinki (Raz i saradnici, 1997; Good i saradnici, 2001; Jernigan i saradnici 2001; Resnick i saradnici, 2003; Salat i saradnici, 2004; Raz i saradnici, 2005).

Starosno-zavisne strukturne promene u mozgu nisu univerzalne, već se razlikuju između jedinki (Trollor i Valenzuela, 2001) i ne moraju uvek da budu praćene smanjenjem kognitivnih funkcija. Međutim, smanjenje sive mase u prefrontalnoj, parijetalnoj i temporalnoj moždanoj kori, sa neznatnim promenama u primarnoj motornoj i vizuelnoj moždanoj kori, predstavljaju strukturne promene praćene promenama u učenju i pamćenju (Raz i saradnici, 1997). Longitudinalne studije su pokazale da tokom života dolazi do linearnog smanjenja sive mase prefrontalnog regiona mozga, ali promene u

ostalim regionima su minimalne sve do 50-ih godina (DeCarli i saradnici, 2005). Ovakvi rezultati podržavaju pretpostavku da različiti regioni mozga različito podložni procesu starenja.

Mozak starih i mladih jedinki se razlikuje i po svom neurohemijskom sastavu. Najznačajnije promene su na nivou dopamina i narušenog dopaminskog signalnog puta. Počevši od ranog zrelog doba, tokom svake decenije života nivo dopamina opada za oko 10%, a dolazi i do smanjenja broja dopaminskih receptora i/ili slabijeg vezivanja dopamina za receptore (Nyberg i Bäckman, 2004), što sve zajedno rezultira lošijim kognitivnim i motornim performansama (Mukherjee i saradnici, 2002). Sem na nivou dopaminskog sistema, tokom starenja su detektovane i promene na nivou drugih neurotransmiterskih sistema poput serotoninskog, norepinefrinskog (Bickford, 1993; Gould i Bickford, 1996) i acetilholinskog (Drachman, 2006; Suchiang i Sharma, 2011), kao i na nivou moždanog neurotrofinskog faktora (engl. Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) (Gottfries, 1990, Mattson i saradnici, 2004; Sibille i saradnici, 2007).

Veliki broj istraživanja je pokazao da je starenje multifaktorijalan proces, koji uključuje mnogobrojne mehanizme. Smatra se da postoji devet ćelijskih pokazatelja starenja: (Picca i saradnici):

- 1) skraćivanje telomera
- 2) epigenetske promene
- 3) nestanak stem ćelija
- 4) ćelijska senescencija (prestanak deoba ćelija)
- 5) gubitak/slabljenje/smanjenje mitohondrijalnih funkcija
- 6) smanjena sinaptička plastičnost
- 7) disbalans proteostaze
- 8) poremećaj u detekciji hranljivih materija u krvi (eng. *nutrient sensing*)
- 9) promene u međućelijskoj signalizaciji

Zahvaljujući radu *Kenyon* i saradnika koji su na modelu *Caenorhabditis elegans* pokazali da je proces starenja plastičan, postalo je jasno da se proces starenja može ubrzati ili usporiti pomoću određenih sredinskih ili genetičkih faktora (Kenyon, 2010). Ovo je pokrenulo nove pravce u istraživanju i razvoju novih strategija koje mogu voditi smanjenju starosno-zavisnih promena.

1.2. Dijetalna restrikcija

Dijetalna restrikcija (DR) je daleko najispitivanija sredinska intervencija koja pokazuje sposobnost da uspori starosno-zavisne promene i poveća ne samo dužinu, već i kvalitet života (Speakman i Mitchell, 2011). DR predstavlja pažljivo balansirano smanjenje unosa hranljivih materija u vrednosti od 20-40%, u odnosu na tzv. ad libitum (AD), odnosno neograničeni unos hrane, ali bez izazivanja pothranjenosti. DR ima sposobnost produženja životnog veka kod mnogih vrsta, uključujući kvasce, voćnu mušicu, valjkaste crve, sisare i primat (Weindruch i Walford, 1986; Masoro, 2005). Pored toga DR pokazuje sposobnost da spreči, ili odloži početak mnogobrojnih starosno-zavisnih bolesti, kao što su neurodegenerativne bolesti, dijabetes tipa 2, kardiomiopatije i kancer (Most i sradnici, 2017) (Slika 1.1).

Prva studija koja je ispitivala uticaj DR-a je objavljena 1917. godine, kada su Osborn i saradnici (Osborne i saradnici, 1917) pokazali da restrikcija hrane ima pozitivan uticaj na dužinu života i razmnožavanje kod pacova. Pionirski rad MekKeja i saradnika iz 1935. godine, koji predstavlja kamen temeljac istraživanjima u oblasti uticaja DR na dužinu i kvalitet života (McCay i saradnici, 1935), pokazuje da je uvođenje dijetalne restrikcije od 40% odmah nakon prestanka sisanja kod pacova dovela do značajnog produžetka života. Nakon toga je pokazano da DR ima slične efekte i na druge, već pomenute vrste (Weindruch i Walford, 1986; Masoro, 2005).

U studijama efekata smanjenog unosa hrane su dosta korišćeni beskičmenjaci kao model sistemi, jer su usled svoje jednostavnosti i kratkog životnog ciklusa naročito pogodni za analizu molekularnih mehanizama DR (Fontana i saradnici, 2010; Kenyon, 2005). Međutim, beskičmenjaci nemaju mnogo sličnosti sa sisarima u metaboličkim, anatomskim i fiziološkim karakteristikama, pa je bilo neophodno pokazati efekat koji DR ima na složenije model sisteme. Istraživanja koja su usledila su pokazala da glodari predstavljaju izuzetno dobar i pouzdan model za određivanje uticaja DR na dužinu i kvalitet života sisara. Kod glodara redukcija prosečnog dnevnog kalorijskog unosa od 30% do 60% u odnosu na AL, započeta rano tokom života (6 meseci) dovodi do proporcionalnog povećanja dužine života od 30% do 60% (Yu i saradnici, 1985). DR započeta u adultnom dobu (12 meseci) produžava maksimalnu dužinu života, ali samo 10-20% (Weindruch i Walford, 1982). Pokazano je takođe, da DR ne samo da je produžila životni vek, već je značajno uvećala broj jedinki koje su doživele duboku starost bez ikakvih znakova bolesti (Omodei i Fontana, 2011). Speakman i saradnici su u svojoj reviji

prikazali pozitivne efekte DR-a na starosno-zavisne promene u većini organskih sistema kod ljudi (Speakman i saradnici 2011). Studije koje su ispitivale uticaj DR na kardiovaskularni sistem su pokazale da ovakav režim ishrane smanjuje incidencu srčanog udara, kao i da smanjuje rizik od arteroskleroze i ishemije srca. DR pokazuje pozitivno dejstvo na progresivni gubitak mišićne mase poznato kao sarkopenija, gubitak koštane mase tokom starenja i utiče na regulaciju imunskog sistema. U mozgu, DR smanjuje rizik od moždanog udara i potpomaže bržem oporavku nakon moždanog udara. Svoj efekat DR režim ispoljava i kod insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma, smanjujući hiperinsulinemiju i povećavajući osetljivost ćelija na insulin. DR utiče na smanjenje incidence kancera, kao i na poboljšane reparacionih mehanizmama DNK i time smanjuje oksidativna oštećenja koja nastaju kod miševa i pacova tokom starenja (Weindruch i Walford, 1982; Lipman i saradnici, 1989; Loft i saradnici, 1995; Dirx i saradnici, 2003). Dijetalna restrikcija ispoljava svoj koristan efekat i kod neurodegenerativnih oboljenja. Naime, pokazano je da neurodegenerativne promene moždanog tkiva koje su karakteristične za proces starenja često rezultuju oboljenjima kao što su Alchajmerova bolest (AB), Parkinsonova bolest (PB) i amiotrofička lateralna skleroza (ALS). Najupečatljivija odlika pomenutih neurodegenerativnih oboljenja je akumulacija proteinskih agregata (fosforilisani tau protein, amiloidne plake, depozicije α -sinukleina), disfunkcija mitohondrija i lizozoma i smanjena reciklaža oštećenih proteina u ćeliji. Dijetalna restrikcija smanjuje rizik od ovih oboljenja tako što stimuliše neuroprotektivne faktore i proteine stresa koji štite neurone od oksidativnih oštećenja i poboljšavaju proces autofagije (Mizushima i saradnici 2004, Alizerai i saradnici 2010, Mattson i saradnici 2001).

Mnogobrojne starosno-zavisne promene poput redistribucije masnih naslaga, pojave sedih i stanjivanja dlake, gubitka mišićnog tonusa i tonusa kože, karakteristične za ljude, primećene su i kod majmuna (*Macaca mulatta*), (Hudson i saradnici, 1996; Uno, 1997; Ramsey i saradnici, 2000; Raman i saradnici, 2005). Pored pomenutog, primećene su i manifestacije starosno-zavisnih oboljenja, kao što su dijabetes, neoplazije, sarkopenija, gubitak koštane mase i poremećaji u funkciji imunskog sistema, koje su karakteristične za proces starenja kod ljudi (Uno, 1997; Austd i saradnici, 2011; Colman i saradnici, 2014). U poslednjih 20-ak godina se vrše istraživanja na primatima kako bi se videlo da li i kod njih DR pokazuje iste pozitivne efekte kao i kod nižih organizama. Dve opsežne studije, jedna izvođena na Univezitetu u Viskonsinu (engl. University of

Wisconsin, UW), a druga na Nacionalnom institutu za starenje (engl. National Institute on Aging, NIA), koje su trajale više od 20 godina, dale su oprečne rezultate vezane za uticaj DR na rezus majmune. UW studija je pokazala da DR smanjuje stopu smrtnosti i odlaže početak kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, kancera i atrofije mozga (Colman i saradnici, 2009). Sa druge strane, u studiji sprovedenoj na NIA, DR nije pokazala statistički značajan efekat na zdravlje kod starijih jedinki i nije uticala na dužinu života u odnosu na kontrolne životinje (Mattison i saradnici, 2012). Neusaglašenost rezultata ove dve studije je otvorila brojna pitanja u oblasti starenja i efekata DR. Najveći broj studija koje objašnjavaju mehanizam delovanja i efekte DR na proces starenja je sproveden na nižim vrstama i moguće je da kod primata mehanizam i dejstvo DR-a ne podleže istim pravilima kao i kod drugih, jednostavnijih vrsta. Ipak, postoji mogućnost da su neusaglašeni rezultati ove dve studije posledica različitih eksperimentalnih uslova, kao što su DR protokol, sastav nutrijenata, genetika i vreme početka DR, te da upravo ovakve razlike mogu da dovedu do potpuno drugačijeg ishoda (Waughan i saradnici, 2017) kod različitih eksperimentalnih grupa.

Prva kontrolisana studija na ljudima, nazvana CALERIE-1 (engl. Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy) je rađena na zdravim ljudima, bez dijagnoze gojaznosti, u trajanju od 6 i 12 meseci (Heilbronn i saradnici, 2006; Racette i saradnici, 2006; Das i saradnici, 2007). Pokazano je da je smanjenje unosa hrane od 25% dovelo do poboljšanja ishoda po pitanju kardiovaskularnih bolesti i smanjenja nivoa markera oksidativnog stresa (Civitarese i saradnici, 2007; Lafevre i saradnici, 2009). Druga faza ove studije, nazvana CALERIE-2, u kojoj su ispitanici podvrgnuti 25% DR ili fizičkoj aktivnosti, je pokazala da je smanjenje težine, usled DR-a ili fizičke aktivnosti, nakon prve godine dovelo do poboljšanja insulinske osetljivosti, povećanog nivoa adiponektina i smanjenja nivoa serumskog leptina, insulina, LDL holesterola i C-reaktivnog proteina (Weiss i saradnici, 2006; Fontana i saradnici, 2007). Kada su ispitanici bili podvrgnuti 30% DR u trajanju od dve godine, pokazano je poboljšanje u metaboličkoj aktivnosti, smanjenje rizika od kardiovaskularnih oboljenja (Ravussin i saradnici, 2015), ali je detektovana i smanjena gustina kostiju, što treba imati u vidu kad se DR uvodi kod starijih osoba (Villareal i saradnici, 2016).

Značajni podaci o dejstvu DR u humanoj populaciji se očekuju iz podataka koji će se prikupiti na osnovu praćenja efekata dobrovoljno restriktivnog režima ishrane kod članova tzv. Društva kalorijske restrikcije (<https://www.crsociety.org/science/>). Naime,

članovi ovog društva će biti izloženi dejstvu restrikcije unosa hrane za 30% tokom 15 godina. Smatra se da ovakav način ishrane može smanjiti rizik od dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara, kancera i vaskularne demencije (Fontana i saradnici, 2004).

1.2.1. Mehanizmi delovanja DR

I pored mnogobrojnih istraživanja tokom poslednjih osamdeset godina, tačan mehanizam kojim DR ispoljava svoja korisna dejstva još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Dosadašnji podaci ukazuju da u slučaju nervnog sistema DR ispoljava pozitivni efekat tokom starenja tako što smanjuje oksidativni stres, poboljšava funkciju mitohondrija, aktivira protiv-zapaljenske procese, stimuliše neurogenezu i sinaptičku plastičnost (Fontán Lozano i saradnici, 2008; Gillette-Guyonnet i Vellas, 2008; Fusco i Pani, 2013; Lin i saradnici, 2014). (Slika1.1)

1.2.1.1. Detekcija hranljivih materija u krvi

U poslednje vreme se dosta značaja pridaje teoriji prema kojoj je mehanizam korisnog dejstva DR na neurone povezan sa detekcijom nutritivnog statusa. Naime, prema datoj teoriji, u slučaju smanjenje dostupnosti hrane, organizam koristi sve svoje kognitivne sposobnosti/resurse kako bi došao do nje. Sama smanjena dostupnost hrane dovodi do stresa niskog inteziteta, koji se po svojoj prirodi znatno razlikuje od drugih stresora, poput psihosocijalnog ili stresa nastalog usled imobilizacije. Takav odgovor organizma je poznat kao hormeza i odnosi se na fenomen da štetan agens u primenjen u niskoj koncentraciji dovodi do pozitivnih promena organizma, dok je u visokoj koncentraciji on štetan (Masoro, 2007) Hormeza uzrokovana smanjenom dostupnošću hrane aktivira određene signalne puteve, što na kraju rezultuje poboljšanjem moždanih funkcija (Mattson, 2003; 2015). Najvažniji signalni putevi koji se aktiviraju usled smanjene dostupnosti makronutrijenata (glukoze, amino-kiselina i masti), ili energetskog statusa ćelije (odnos AMP/ATP (adenozin monofosfata/adenozin trifosfata) ili NAD⁺/NADH) su mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*), protein kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (AMPK), sirtuinski i insulin/IGF-1 signalni put (Hadem i saradnici, 2019). Ovi signalni putevi su uključeni u regulaciju važnih procesa u ćeliji, poput autofagije, metabolizma glukoze i oksidativnog stresa (Koubova i Guarente,

2003). Svi ovi procesi zajedno dovode do poboljšanja neuronalne plastičnosti i kognitivnih procesa (Fusco i Pani, 2013).

1.2.1.2. Mikrobiom

Crevni mikrobiom predstavlja čitavu kolekciju gena mikroba unutar intestinalnog trakta – to je jedan dinamičan i složen ekosistem sačinjen od bakterija. Vrsta ishrane utiče na sastav mikrobioma u crevima i obratno, taj isti mikrobiom utiče na zdravlje čitavog organizma, uključujući i centralni nervni sistem (CNS). To je omogućeno dvosmernom komunikacijom između creva i mozga, tzv. mikrobiomskom crevno-moždanom osom (Rhee i saradnici, 2009; Leung i Thuret, 2015). Smatra se da crevno-moždana osa utiče na plastičnost mozga i kognitivne procese, ali za tačnim mehanizmom tog dejstva se još uvek traga. Istraživanje Zhang i saradnika iz 2013. godine je pokazalo da DR može da utiče na sastav mikrobioma (Zhang i saradnici, 2013). Naime, utvrđeno je da postoji razlika u sastavu mikrobioma između miševa koji su bili podvrgnuti DR režimu, odnosno smanjenom unosu kalorija od 30% u trajanju od 13 meseci i miševa koji su podvrgnuti visokokaloričnoj dijeti. DR miševi su u crevima imali više bakterijskih vrsta koji imaju blagotvorno dejstvo na dužinu života, kao što su *Lactobacillus*, a manje onih sa negativnim dejstvom. Polazeći od saznanja da dijetalna restrikcija može da menja sastav crevnog mikrobioma, i da mikrobiom ima uticaj na funkcije mozga, možemo pretpostaviti da je jedan od mehanizama dejstva DR na moždane funkcije upravo preko mikrobioma. Postoje dokazi da neki metaboliti iz creva, poput propionata i butirata, prolaze krvno moždanu barijeru (KMB) i utiču na ćelijsku signalizaciju, sintezu i otpuštanje neurotransmitera, što utiče na depresiju, anksioznost i koncentraciju insulina u periferiji (Borgo i saradnici, 2017). Rezultati druge studije ukazuju na uticaj mikrobioma na kognitivne funkcije preko imunskih, neuroendokrinih i metaboličkih puteva (Mayer i saradnici, 2014). Nedavna studija je pokazala da kada se pacijentima koji boluju od iritabilnog sindroma creva u kombinaciji sa blagom depresijom, da probiotik koji sadrži *Bifidobacterium longum*, dolazi do smanjenja depresije i da im se kvalitet života znatno poboljša, u odnosu na placebo pacijente (Pinto-Sanchez i saradnici, 2017).

1.2.1.3. Sinaptička plastičnost

Sinaptička plastičnost mozga, koja se odnosi na sposobnost mozga da reorganizuje postojeće neuronske mreže kako bi se prilagodio promenama, je takođe

ugrožena tokom starenja (Cabeza i saradnici, 1997; Della-Maggiore i saradnici, 2000; Grady i saradnici, 2003) Pokazano je da tokom starenja, dolazi do pada ekspresije tri važna sinaptička proteina: protein povezan sa rastom (engl. *Growth-Associated Protein 43*, GAP43), sinaptofizina (engl. *Synaptophysin*, SPH) i α -sinukleina (engl. *α -Synuclein*, α -Syn), u hipokampusu pacova, a da je DR sprečila starosno zavisne promene. Dugotrajna dijetalna restrikcija je povećala ekspresiju navedenih proteina za 50-60% u hipokampusu Wistar pacova starih 24 meseca i time je vratila nivo ovih proteina na vrednosti koje su detektovane kod mladih životinja (Mladenovic Djordjevic i saradnici 2009). Pored pomenutog, DR stabilizuje nivoe glutamatnih i AMPA receptora te na taj način ispoljava svoj efekat na procese učenja i pamćenja (Adams 2008, Yilmaz 2011) i dovodi do povećanja adultne neurogeneze (Lee 2000). Neuroprotektivno dejstvo DR-a u trajanju od tri meseca nakon tretmana kainičnom kiselinom je pokazano u hipokampusu, hipotalamusu i entorinalnoj kori velikog mozga. DR je u ovom modelu dovela do povećane ekspresije neuronalnog ćelijskog adhezionog molekula (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM), koji učestvuje u signalnom putu BDNF (Sharma and Kaur 2008).

Dijetalna restrikcija ne menja nivo neurotrofinskih faktora samo posredno, već i neposredno. Naime, pokazano je da BDNF, jedan od najvažnijih proteina uključenih u neurogenezu i sinaptičku plastičnost (Bramham i Messaoudi, 2005), opada sa starenjem te da pad njegove ekspresije vodi slabljenju kognitivnih funkcija (Perovic i saradnici 2012; Navarro-Martinez i saradnici, 2015). Sa druge strane, pokazano je da dugotrajna DR dovodi do porasta nivoa BDNF u hipokampusu i prefrontalnom delu moždane kore (Zaptan i saradnici, 2015), kao i da taj efekat zavisi od starosti životinje (Smiljanic i saradnici 2014).

1.2.1.4. Inflamacija

Tokom starenja, regulacija imunskog sistema se menja, što rezultuje hroničnom inflamacijom slabog intenziteta, za koju se smatra da leži u osnovi mnogih starosno-zavisnih bolesti (Franceschi i saradnici, 2007; Deleidi i saradnici, 2015). Mikroglijske ćelije kao rezidentne imunske ćelije CNS-a i mogu da budu uključene u neurodegenerativne promene moždanog tkiva tokom starenja (Wong, 2013). Naime, kada se aktiviraju, mikroglijske ćelije sekretuju proinflamatorne molekule koji učestvuju u procesu uklanjanja patogena i oštećenog tkiva, ali u toku starenja mogu da dovedu do

oštećenja i smrti neurona (Flanary i saradnici, 2007; Kettenmann i saradnici, 2011; Hefendehl i saradnici, 2014). Smanjujući aktivnost astrocita i mikroglijskih ćelija, a povećavajući ekspresiju neuroprotektivnih faktora, poput šaperona, DR reguliše inflamaciju u moždanom tkivu i na taj način suprimira razvoj neurodegenerativnih bolesti (Morgan i saradnici, 2007; Schafer i saradnici, 2015b).

1.2.1.5. Reaktivne kiseonične vrste

Moždano tkivo se odlikuje visokom metaboličkom aktivnošću i potrošnjom kiseonika, što za posledicu ima intenzivnu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Balaban i saradnici, 2005; Sohal i Weindruch, 1996) koje mogu da izazovu razna oštećenja. Primećeno je da nisu svi regioni mozga podjednako osetljivi na starosno-zavisna oštećenja uzrokovana ROS-om. Hipokampus, prednji delovi kore velikog mozga i amigdale pokazuju najveću osetljivost na ROS (Schmidt-Kastner i Freund, 1991; Wang i saradnici, 2005). Dijetalna restrikcija dovodi do smanjenja produkcije različitih kiseoničnih vrsta, povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima i poboljšane reparacije molekula koji su pretrpeli oksidativna oštećenja (Hadem i saradnici, 2019; Walsh i saradnici, 2014). Glutation se smatra jednim od najjačih antioksidanasa, i njegova uloga u detoksifikaciji ROS u mozgu je od izuzetnog značaja u suprimiranju oštećenja prouzrokovana od strane slobodnih radikala (Przedborski, 1996). Iako postoje oprečni rezultati, većina studija pokazuje da je regulacija glutaciona u mozgu, koji ima veoma važnu ulogu u procesu starenja mozga i neurodegenerativnim procesima (Przedborski, 1996), primarni nosilac efekata DR u oksidativnim oštećenjima (Dringen, 2000).



Slika 1.1. Dejstvo dijetalne restrikcije na procese u mozgu. DR dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija, sprečava neurodegeneraciju, smanjuje neuroinflamaciju, reguliše nivoe ROS i poremećaje u detekciji hranjivih materija u krvi. Preuzeto i modifikovano iz Hadem i saradnici, 2018.

1.2.2. DR protokoli

Uobičajeni eksperimentalni protokol za restrikciju hrane podrazumeva da postoje kontrolne, AL životinje, a nasuprot njima, životinje kojima je smanjen unos hrane za određeni procenat. Na ovaj način životinjama nije smanjen samo unos kalorija (kalorijska restrikcija, engl. Caloric Restriction, CR), već i ostalih makro- i mikronutrijenata, pa je u tom slučaju najbolje koristiti opšti izraz dijetalna restrikcija (DR), ili restrikcija hrane (engl. Food Restriction, FR), koji na taj način obuhvata i kalorijsku restrikciju. Tokom vremena, razvili su se različiti oblici dijetalnih režima, među kojima su u literaturi najčešća:

- 1) svakodnevna dijetalna restrikcija (DR), koja podrazumeva svakodnevnu redukciju hrane
- 2) intermitentna restrikcija, ili periodično gladovanje (engl. Intermittent Fasting, IF), kod koje postoji duži period potpune deprivacije hrane, nakon čega sledi period u kom životinje jedu neograničeno

3) variranje različitih makronutrijenata u okviru AL ishrane (de Cabo i saradnici, 2014; Solon-Biet i saradnici, 2015; Mattson i saradnici, 2016).

U režimu prvog tipa restrikcije se jedinkama smanjuje dnevni unos hrane za 20-40%, uz održavanje određene količine vitamina i minerala u organizmu. Najčešće se primenjuje stepen smanjenja od 40% se jer je eksperimentalno pokazano da smanjenje kalorija za više od 50% na samo da nema pozitivan efekat na organizam, već dovodi do povećane smrtnosti (Mattson, 2005). Režim periodičnog gladovanja najčešće podrazumeva da su životinje podvrgnute gladovanju svaki drugi dan, a da na dan hranjenja imaju neograničene obroke. Treba imati u vidu da taj period gladovanja ne mora biti 24h, već se može ograničiti vreme u okviru cirkadijalnog ritma kada životinja ima slobodan pristup hrani, te tako period gladovanja može biti od 16-24 sata (Chaix i saradnici, 2014; Longo i Panda, 2016). U poslednje vreme sve češće se nailazi na termin periodičnog gladovanja (Brandhorst i saradnici, 2015). Ovakav vid IF dijeta podrazumeva da životinje gladuju jedan ili nekoliko dana u nedelji, a takva nedelja se može ponavljati 2-4 puta u mesecu.

Do nedavno se smatralo da DR uvek deluje tako da usporava proces starenja, jer je takav efekat ove intervencije dokazan na različitim vrstama počev od kvasca pa sve do sisara. Drugim rečima, smatralo se da DR predstavlja zlatni standard za produženje životnog veka. Novija saznanja, koja su detaljno opisana u revijskom radu Vaughan i saradnika (2018), dovode do preispitivanja blagotvornih efekata DR na starenje (Vaughan i saradnici, 2018). Naime, pokazano je da efekat DR zavisi od mnoštva faktora poput: uticaja spoljašnje sredine (vreme izvođenja eksperimenata u odnosu na cirkadijalni ritam, okruženje u kom su smeštene životinje), vrste DR protokola koji se koristi i starosti jedinke u trenutku uvođenja restriktivnog režima. Takođe, bitnu ulogu može odigrati i na koji način se odredi AL kontrola. Naime, u teoriji, životinje koje pripadaju kontrolnoj, AL grupi imaju neograničen unos hrane. Treba imati na umu da kod glodara postoje sojevi kod kojih dolazi do prejedanja kada imaju neograničen pristup hrani i u tom slučaju, takve kontrolne životinje su gojazne, sa poremećenim metabolizmom glukoze (Martin i saradnici, 2010) i ne predstavljaju pravu kontrolnu grupu. U drugim slučajevima, AL kontrolom se naziva grupa koja dobija 100% prosečnog dnevnog unosa hrane. Ukoliko postoje razlike u eksperimentalnim postavkama u ovim faktorima, to bi moglo da objasni oprečne rezultate u nekim istraživanjima. Osim što postoje dva osnovna DR protokola - svakodnevno smanjenja unosa hrane i intermitentni režim, postoje i razlike u vremenu

kad se vrši hranjenje životinja, količini hrane koju životinja unosi i ukupnoj kalorijskoj vrednosti obroka. Svi ovi parametri mogu imati značajni uticaj na ishod eksperimenta (Vaughan i saradnici, 2018). Jedan od najvažnijih parametara pri određivanju DR protokola, jeste starost jedinke koja se podvrgava DR režimu. Literaturni podaci pokazuju da se životinje uglavnom stavljaju na DR režim:

- 1) u ranom dobu, što kod glodara podrazumeva period odmah nakon odvajanja od majki (nakon prestanka dojenja), pa sve do navršenih 6 meseci života,
- 2) u adultnom dobu, od 6-20-og meseca života,
- 3) u starijem dobu, što se kod glodara odnosi na period posle 20-og meseca života.

Još uvek ne postoji usvojen stav o tome koji je period života najbolji za početak restriktivnog režima, jer su rezultati oprečni. Razlike su verovatno posledica različitih DR protokola koji su korišćeni, soja i pola životinja kao i efekta dijeta koji se ispituje (na neurodegenerativne promene, kancer, dužinu života, kardiovaskularne promene itd.) (Vaughan i saradnici, 2018). Za sada, rezultati najvećeg broja istraživanja idu u prilog hipotezi da dugotrajna dijeta koja počinje u ranom adultnom dobu (kod glodara nakon navršenih 6 meseci) ima blagotvoran uticaj na većinu posmatranih starosno-zavisnih promena (Ingram i de Cabo, 2017).

1.3. Krhkost (engl. *Frailty*)

Trend povećanja dužine života (engl. *Lifespan*) koji ne uzima u obzir kvalitet života koji jedinka vodi, dovodi do fenomena poznatog kao „zamka dugovečnosti“. U literaturi se upravo iz tog razloga sve češće nailazi na pojam kvalitetnog, odnosno zdravog starenja (engl. *Healthspan*), a koje bi podrazumevalo period života u kom je organizam zdrav i bez bolesti (Sprott 2011).

Kako bi se razlikovale jedinke koje „zdravo“ stare od onih koje „nezdravo“ stare, uveden je pojam „frailty“, koji vodi poreklo od latinske reči „fragilis“ označavajući krhkost, nešto što je lako lomljivo. Imajući u vidu da u srpskom jeziku još uvek ne postoji opšteprihvaćena reč za engleski gerijatrijski izraz „frailty“, u daljem tekstu ćemo koristiti termin krhkost. Krhkost predstavlja starosno-zavisni multidimenzionalni sindrom, koji se odnosi na jedinke koje su najosetljivije na povrede i bolesti tokom starenja, kao rezultat kombinacije genetičkih, bioloških, fizičkih, psihičkih, socijalnih i sredinskih faktora (Fulop i saradnici, 2010). Pretpostavlja se da mehanizmi koji leže u osnovi ovog sindroma uključuju genetsku raznolikost među jedinkama iste vrste, prestanak deoba ćelija,

skraćivanje telomera, narušenu funkciju mitohondrija, povećano stvaranje slobodnih radikala i povećana oštećenja DNK (Fulop i saradnici, 2010). Upravo krhkost ukazuje na to da starost sama po sebi ne predstavlja bolest, već da se usled smanjenja kvaliteta života tokom starenja povećava broj bolesnih jedinki, odnosno da sa godinama broj krhkih jedinki sve više raste. Ukoliko je jedinka krhka, to znači da čak i najmanja komplikacija, poput urinarne infekcije, ili čak samo promene propisanih lekova, može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih tegoba, invaliditeta, gubitka samostalnosti u obavljanju svakodnevnih aktivnosti, a na kraju i smrtnog ishoda. Treba imati u vidu da krhkost nije osobina isključivo vezana za starije jedinke, jer i mlađe osobe koje su podložne bolestima mogu da budu u toj kategoriji, ali je prevashodno karakteristična za starost. Sa druge strane, ako je jedinka stara, ne znači da mora biti i krhka (Fulop i saradnici, 2010). Upravo je zato kreiran koncept krhkosti, da bi se objasnile razlike nakon gerijatrijske procene jedinki iste starosti (Rockwood i saradnici, 1994).

Vrlo važna odlika krhkosti je njena dinamična i reverzibilna priroda (Michel i saradnici, 2008), čime se otvara mogućnost primene određenih intervencija koje mogu da utiču na starosno-zavisne promene povezane sa krhkošću, na dužinu života i smanjenje incidence starosno-zavisnih bolesti (Colman i saradnici, 2014, Rizza i saradnici, 2014)

U literaturi nailazimo na dva osnovna pristupa određivanja stepena krhkost kod ljudi. Prvi je takozvani „Fridov krhki fenotip“ (engl. Fried frailty phenotype) (Fried, 2001), koji se izračunava na osnovu prisustva, odnosno odsustva takozvanih indikatora ili kriterijuma krhkosti: nevoljan gubitak kilograma, spor hod, iscrpljenost, slab stisak šake i nizak nivo fizičke aktivnosti. Ukoliko kod jedinke nije prisutan ni jedan od navedenih parametara, smatra se da nije krhka. Ako se kod jedinke detektuje prisustvo jednog ili dva indikatora onda se smatra da je u stanju blage krhkosti, dok se jedinka kod koje je prisutno tri ili više navedenih parametara, smatra krhkom. Ovakvim pristupom krhkost se može proceniti već pri prvom susretu sa pacijentom, što predstavlja inicijalni korak ka otkrivanju zdravstvenog problema pacijenta. Nedostatak ove metode je u tome što navedeni kriterijumi krhkosti ne daju uvid u pravi uzrok koji dovodi do njihovog ispoljavanja (Cesari i saradnici 2013), te na osnovu njih nije moguće odrediti adekvatnu terapiju. Sa druge strane „Rokvudov indeks krhkosti“ (engl. Rockwood frailty index, FI) koji su osmislili Rokvud i saradnici (Rockwood i saradnici, 1994), ocenjuje stepen krhkosti koristeći listu od 20 -70 potencijalnih nedostataka, odnosno deficita (. Rokvudov indeks se bazira na principu da „što više deficita jedna individua poseduje, veći je stepen

krhkosti“ (Mitnitski i saradnici, 2001), odnosno, FI predstavlja meru sposobnosti jedinke da akumulira nedostatke. Na ovaj način je svakoj individui omogućena multidimenzionalna gerijatrijska procena i adekvatna terapija. Uz adekvatnu kombinaciju ova dva pristupa može se dobiti kompletna informacija o proceni krhkosti kod starijih osoba i objasniti funkcionalno i fizičko propadanje jedinke u odsustvu konkretne bolesti (Cesari i saradnici 2013; Kanapuru i Ershler, 2009) i uspostaviti odgovarajuća terapiju.

Donedavno, istraživanja krhkosti nisu uopšte uključivala animalne modele i sva ispitivanja su bila vezana za gerijatrijsku procenu krhkosti. Međutim, imajući u vidu da su u poslednjih nekoliko decenija upravo istraživanja na model sistemima dovela do značajnog pomaka omogućivši nam uvid u evolutivno očuvane puteve koje stoje u osnovi procesa starenja, poboljšanja kvaliteta i dužine života, pojavila se potreba da se fokus prebaci na animalne modele i da se odredi stepen krhkosti kod životinja. U poslednjih nekoliko godina se ulažu veliki naponi kako bi se definisali adekvatni model sistemi i pristupi za ispitivanje krhkosti i određivanja nivoa krhkosti. Prvi korak su napravili Parks i saradnici (Parks i saradnici, 2012) kreirajući indeks krhkosti koji se sastoji od 31 parametra, a kojim bi se omogućilo izračunavanje stepena krhkosti kod miša. Ovaj FI uključuje nivo aktivnosti (ukupni pređeni put, brzinu i vertikalnu aktivnost), hemodinamička merenja (sistolni i dijastolni pritisak, otkucaji srca), strukturni sastav tela (procenat masti i minerala u telu), metabolički status, nivo hematokrita i uree, kao i procenu funkcionalnosti miocita uz pomoć invazivne metode izolacije. U istom radu, opisan je i neinvazivni 8-parametarski FI, zasnovan isključivo na nivou aktivnosti u testu otvorenog polja i težine životinje. Studija je pokazala dobru korelaciju između 8- i 31-parametraskog kliničkog FI (Parks i saradnici, 2012). Dve godine kasnije, Vajthed i saradnici (Whitehead i saradnici, 2014) su oformili klinički FI sastavljen od 30 i više parametara, za koji nisu bile neophodne invazivne tehnike, poput izolacija miocita i višestrukog rentgenskog snimanja, čime je omogućeno da se krhkost prati kroz longitudinalne studije, koje su od velike važnosti u oblasti starenja. Autori su pratili promenu izabranih parametara tokom starenja, u cilju detekcije onih koji odgovarajuće oslikavaju proces starenja, odnosno onih koji se sa starenjem pogoršavaju. Na osnovu toga, praćene su promene u pokrovnom sistemu (koža i rožnate tvorevine), mišićno-skeletnom sistemu, čulu vida, mirisa i sluha, digestivnom, urogenitalnom i respiratornom sistemu, telesnoj masi i temperaturi. Rezultati dobijeni na ovaj način su pokazali da postoji značajno povećanje FI kod starih u odnosu na mlade miševе. Iako miševi

predstavljaju najčešće korišćene animalne modele pri ispitivanju procesa starenja (Vanooren i Libert, 2013), pacovi takođe imaju izuzetno važnu ulogu u istraživanju procesa starenja, a pre svega kroz aspekt ponašanja i neurokognitivni aspekt (Gallagher i saradnici, 2011; Mitchell i saradnici, 2015). Usled potrebe da se krhkost odredi i u ovim animalnim model sistemima, već uspostavljeni FI do tada korišćen za miševе, je adaptiran i iskorišćen kako bi se prvi put izračunao FI kod pacova (Miller-Shukitt i saradnici, 2017).

U Tabeli 1.1. su predstavljeni kriterijumi za procenu fenotipske krhkosti u humanim i animalnim studijama i testovi za određivanje pomenutih kriterijuma u animalnim studijama. Tabela 1.2. prikazuje listu kriterijuma koji su korišćeni za određivanje indeksa krhkosti kod miševa.

Tabela 1.1. Kriterijumi i testovi za fenotipsku krhkost kroz vrste

Preuzeto i modifikovano iz Miller Shukitt-Hale i saradnici, 2017

Klinički kriterijumi	Kriterijumi za glodare	Testovi za FI kod miševa	Testovi za FI kod pacova
Slabost	Jačina stiska šake	Držanje za žičanu mrežu sa sve četiri šape	Držanje za žicu prednjim šapama
Sporost	Brzina hoda	Rotarod test	Rotarod test
Niska aktivnost	Fizička aktivnost	Točak za trčanje	Test otvorenog polja
Slaba izdržljivost	Izdržljivost	Test držanja za mrežu + rotarod	Test nakrivljene podloge

Tabela 1.2. Kriterijumi za određivanje FI kod miševa korišćenjem neinvazivnih metoda Preuzeto i modifikovano iz Whitehead i saradnici, 2014.

Sistem	Parametar	Potencijalni nedostatak
Promene na koži	Alopecija	Starosno-zavisni gubitak krzna
	Gubitak boje krzna	Promena boje krzna iz tamne ka svetloj
	Dermatitis	Upalni procesi na koži usled prekomernog češanja
	Gubitak brkova	Starosno-zavisno smanjenje u broju brkova

	Stanje krzna	Neuredno krzno koje nije glatko i sjajno
Fizičke promene	<p>Tumori</p> <p>Proširen abdomen</p> <p>Kifoza</p> <p>Ukrućenost repa</p> <p>Problemi u hodu</p> <p>Tremor</p> <p>Jačina stiska prednjih šapa</p> <p>Opšte stanje tela</p>	<p>Prisustvo tumora bilo gde u/na telu</p> <p>Uvećanje abdomena usled tumora, uvećanja organa ili unutrašnjeg sakupljanja tečnosti</p> <p>Zakrivljenost kičmenog stuba, uglavnom u vratnom/grudnom delu.</p> <p>Pogrebljeni položaj tela</p> <p>Rep je čvrst i kada se životinja kreće</p> <p>Pojava nekoordinisanog, krivudavog hoda</p> <p>Pojava nekontrolisanog drhtanja</p> <p>Slabiji stisak prednjih šapa</p> <p>Vidljivi znaci neuhranjenosti ili gojaznosti</p>
Vestibulokohlearne/auditorne promene	<p>Vestibularno oštećenje</p> <p>Gubitak sluha</p> <p>Katarakta</p> <p>Sekrecija i otečenost oka</p> <p>Mikroftalmija</p> <p>Prozirnost rožnjače</p> <p>Gubitak vida</p>	<p>Gubitak sposobnosti percepcije gravitacije i pokreta. Manifestuje se gubitkom ravnoteže, orijentacije i brzine</p> <p>Odsustvo reakcije na iznenadan zvuk</p> <p>Zamagljenost očnog sočiva</p> <p>Oči su natečene i pojavljuje se velika sekrecija iz oka</p> <p>Oči su male i uvučene</p> <p>Pojave belih fleka na rožnjači.</p> <p>Zamagljenost rožnjače</p>

	Refleks treptaja Postojanje sekreta u nosu	Manifestuje se gubitkom sposobnosti da dohvati tlo dok se drži za rep i spušta Izostanak refleksa treptaja pri naglom pokretu ka oku. Upućuje na poremećaje celokupnog vizuelnog sistema Pojava preteranog lučenja sekreta iz nosa
Digestivne/ urogenitalne promene	Malokluzija Rektalna prolapsa Vaginalni/uterusni/penilni prolaps Dijareja	Nepravilnosti u položaju i veličini zuba Ispupčenje rektuma odmah ispod repa Vagina/uterus prolaze kroz vulvu/vaginu. Kožica ne može da se prevuče preko penisa Ukoliko je na zidovima kaveza izmet, prostrika kaveza je zalepljena za izmet. Uočava se krv, izmet ili prostrika oko rektuma
Respiratorne promene	Dubina udaha	Problemi u disanju, šum pri udisanju/izdisanju, ubrzano disanje
Nelagodnost	Promene na licu životinje Piloerekcija	Grimase usled izazvanog bola/nelagodnosti. Nakostrešena dlaka usled poremećaja u simpatičkom nervnom sistemu
Drugo	Temperatura Težina	Smanjenje/povećanje temperature Smanjenje/povećanje težine

Pored ova dva opisana koncepta u definisanju merenja krhkosti i dalje se traga za još sveobuhvatnijom definicijom krhkosti, koja bi podrazumevala već opisane koncepte u kombinaciji sa dodatnim domenima ljudske aktivnosti. Oni, pored pomenute fizičke krhkosti, uključuju i kognitivne, fiziološke i socijalne domene (Panza i saradnici, 2015).

Na taj način bi ovaj multidimenzionalni sindrom uključio ne samo fizičku, već i kognitivnu i psihosocijalnu komponentu (Malmstrom i Morley, 2013; Panza i saradnici, 2011). Kognitivna krhkost se bavi „starenjem uma“ (engl. *Mindspan*), odnosno održavanjem mentalnih sposobnosti tokom starenja. Potreba za ovakvim konceptom proizilazi iz činjenice da je starosno-zavisno pogoršanje mentalnih sposobnosti jedan od najpogubnijih posledica starenja. Prvi put je pojam kognitivne krhkosti uveden od strane Paganini-Hill 2001. godine, a već 2006. godine je ovaj izraz prvi put korišćen kao klinički pokazatelj stanja kognitivne ranjivosti pri blagom kognitivnom oštećenju (engl. *Mild Cognitive Impairment*, MCI) (Paganini-Hill i saradnici, 2001). Pokazano je da fizička krhkost može biti uključena i u druge poremećaje koji se odlikuju opadanjem kognitivnih sposobnosti, kao što je Alchajmerova bolest, vaskularne demencije i demencije koje ne uključuju AB (Panza i saradnici, 2015). Na ovaj način je kognitivna krhkost definisana kao klinički instrument, te se pravovremenom detekcijom kognitivne krhkosti omogućava, ne samo identifikacija jedinki sa rizikom za opadanje kognitivne funkcije, već i razvitak intervencija koje mogu sprečiti kognitivno propadanje tokom starosti. Pretpostavlja se da periferna insulinska rezistencija, hiperglikemija, dijabetes tipa 2, metabolički sindrom, kao i gubitak telesne mase, predstavljaju važne parametre u definisanju kognitivne krhkosti, a koji u starijem dobu mogu da dovedu do kognitivnih oštećenja (Knopman i saradnici, 2007; Frisardi i saradnici, 2010; Panza i saradnici, 2012; Semprini i saradnici, 2013).

1.4. Energetski metabolizam u mozgu

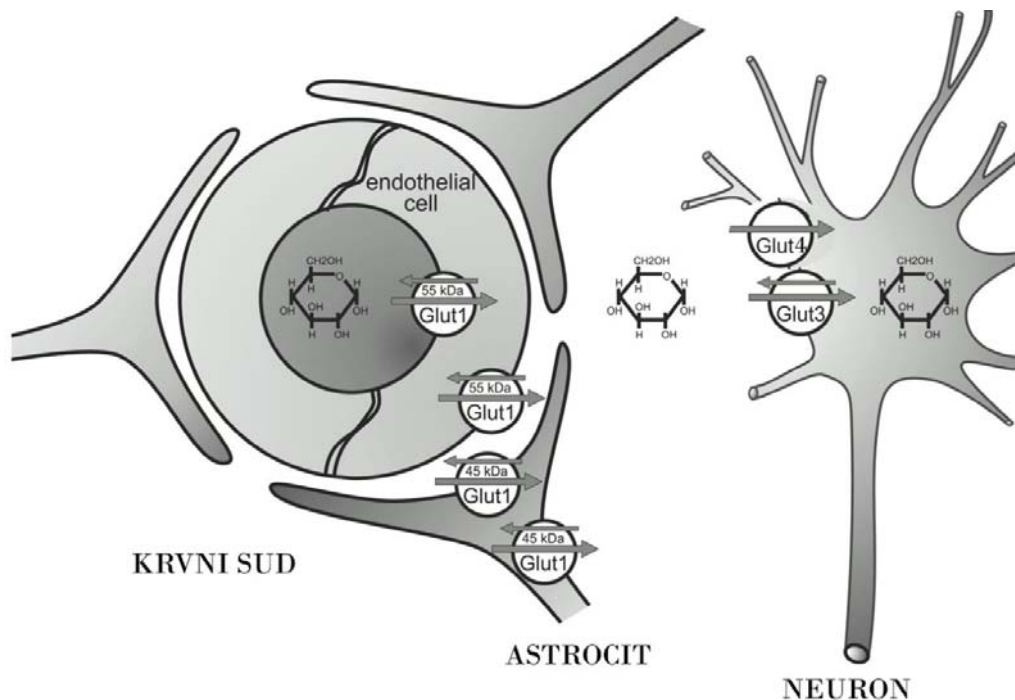
Opstanak svih živih organizama zavisi od njihove sposobnosti da kontrolišu energetski metabolizam kada je izvor nutrijenata redukovan. Protein koji ima ulogu unutarćelijskog energetskog senzora i odgovoran je za kontrolu metabolizma i energetskog balansa na nivou čitavog organizma je AMPK. Aktivacijom AMPK signalnog puta fosforilišu se specifični metabolički enzimi i kontroliše ekspresija gena, što za posledicu ima usklađivanje količine dostupnih izvora energije sa energetskim potrebama organizma (Hardie, 2012). AMPK svoju ulogu unutarćelijskog energetskog senzora obavlja tako što se aktivira u uslovima niskog energetskog statusa u ćeliji, odnosno kada je povećan AMP/ATP odnos (Witczak i saradnici, 2008) što može biti uzrokovano hipoksijom (Mungai i saradnici, 2011), ishemijom (Marsin i saradnici, 2000), toplotnim udarom, oksidativnim stresom (Wu i Wei, 2012), smanjenom količinom

nutrijenata ili produženom kontrakcijom mišića (Musi i saradnici, 2001). Visoka koncentracija AMP dovodi do njegovog vezivanja za kinazu i alosterične promene AMPK, s tim što puna aktivnost ovog enzima zavisi i od fosforilacije uzvodnih kinaza (Johnson i saradnici, 1996; Suter i saradnici, 2006). Sa druge strane, visok nivo ATP dovodi do njegovog vezivanja za AMPK i na taj način onemogućava vezivanje AMP, usled čega izostaje alosterična promena enzima i njegova aktivacija (Xiao i saradnici, 2007).

U svom aktivnom stanju, AMPK čuva energiju tako što aktivira kataboličke procese koji generišu ATP, kao što su preuzimanje glukoze u tkiva, glikoliza, oksidacija masnih kiselina i biogeneza mitohondrija, a isključuje ATP-zavisne anaboličke procese, poput glukoneogeneze, sinteze proteina, glikogena, holesterola i masnih kiselina. Pored toga, AMPK je odgovorna i za regulaciju sinteze mitohondrija, rast i proliferaciju ćelija, apoptozu i autofagiju (Viollet i saradnici, 2010). Ovaj enzim ima centralnu ulogu i u regulaciji apetita i hormonskog balansa, tako što u isto vreme kontroliše endokrini sistem, a i biva kontrolisan od strane mnogobrojnih hormona i citokina (Stark i saradnici, 2013).

U normalnim, fiziološkim uslovima, sve moždane aktivnosti u potpunosti zavise od glukoze kao izvora energije. Mozak obuhvata samo 2% ukupne telesne mase, a odgovoran je za skoro 25% ukupne potrošnje glukoze (Rossi i saradnici, 2001). Neuron koristi 70-80% ukupne energije, dok ostatak odlazi na potrebe glijskih ćelija, astrocita, oligodendrocita i mikroglije (Harris i saradnici, 2012; Hyder i saradnici, 2013). S obzirom na ove visoke energetske zahteve neurona i nemogućnost da sami stvaraju ili skladište glukozu, neophodan je kontinuiran transport glukoze kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i taj proces mora biti izuzetno dobro koordinisan. KMB je predstavljena kompleksnim spletom krvnih sudova koji, zahvaljujući specifičnim ćelijama, omogućava selektivni prolaz molekula između krvi i moždanog tkiva. Na taj način ona štiti mozak od supstanci koje se nalaze u krvi i koje bi mogle štetno delovati na funkcije mozga. Svoju funkciju KMB ostvaruje putem selektivnog transporta jona, signalnih molekula i esencijalnih nutrijenata, kao što je glukoza. Ključnu ulogu u transportu glukoze ima familija glukoznih transportera (*engl.* Glucose Transporters, GLUT's) (Scheepers i saradnici, 2004). Do sada je opisano četrnaest različitih izoformi transportera, koji sem glukoze imaju sposobnost prenosa laktoze, manoze, galaktoze, glukozamina i urata. Najbolje opisane glukozni transporteri su GLUT 1,2,3 i 4, a njihova uloga u kinetici i regulaciji prenosa glukoze je dobro okarakterisana (Thorens i Mueckler, 2010). Na

periferiji, GLUT1 je prisutan u različitim tipovima ćelija, a najviše je zastupljen u membrani eritrocita (Mueckler i Thorens, 2013). U mozgu, GLUT1 ima ključnu ulogu u preuzimanju glukoze i zastupljen je u endotelnim ćelijama mozga (Koranyi i saradnici, 1991; Simpson i saradnici, 2001; Yeh i saradnici, 2008) i astrocitima (McCall i saradnici, 1996). Ranije se smatralo da astrociti preuzimaju glukožu i pretvaraju je u laktat, koji biva dalje preuzet od strane neurona, služeći kao njihov osnovni izvor energije (Pellerin i saradnici, 2002). Otkriće uloge GLUT3 u mozgu je promenilo ovaj koncept, jer je pokazano da ovaj transporter, lokalizovan u neuropilu dendrita i aksona, omogućava direktno preuzimanje glukoze od strane neurona, bez posredstva astrocita (Simpson i saradnici, 2001; Thorens i Mueckler, 2010). U odnosu na ostale transportere, GLUT3 se karakterise visokim afinitetom za glukožu, čime je omogućeno održavanje visoke koncentracije glukoze u neuronima, čak i kada je njena koncentracija u međućelijskom prostoru niska (Cammandola i Mattson, 2017). Najveća koncentracija GLUT4 je zabeležena u masnom tkivu, srcu i skeletnim mišićima (Thorens i Mueckler, 2010). Osnovna karakteristika GLUT4 je da je insulin-zavisan, što znači da dovodi do transporta glukoze u uslovima povećane koncentracije insulina u cirkulaciji. Kada je koncentracija insulina niska, ovaj transporter se nalazi u citosolu, a kada se nivo cirkulatornog insulina poveća, dolazi do translokacije GLUT4 na površinu membrane, što omogućava unos glukoze u ćelije. Poremećaji u GLUT4-zavisnom transportu glukoze dovode do insulinske rezistencije i do dijabetesa tipa 2 (Kahn, 1996). U mozgu, GLUT4 je detektovan u hipokampusu, kori velikog mozga, cerebelumu i hipotalamusu (Vannucci i saradnici, 1998; Alquier i saradnici, 2006) i uglavnom je zastupljen u astrocitima, neuronima i endotelnim ćelijama (Kobayashi i saradnici, 1996), a često se eksprimira zajedno sa GLUT3 (Apelt i saradnici, 1999). Uloga GLUT4 u mozgu još uvek nije u potpunosti poznata, a najnovije studije ukazuju na moguću ulogu u metabolizmu glukoze u hipotalamusu (Ren i saradnici, 2015; Ren i saradnici, 2014) i u procesima učenja i pamćenja u hipokampusu (Pearson-Leary i McNay, 2016).



Slika 1.2. Prikaz lokalizacije glukoznih transportera na krvno-moždanoj barijeri. GLUT1 se nalazi na membrani endotelijalnih ćelija i astrocita. GLUT3 i GLUT4 su lokalizovani na membrani neurona. Preuzeto iz Duelli i Kuschinsky, 2001.

1.4.1. AMPK i glukoзни transporteri u starenju

Pokazano je da je smanjenje metabolizma glukoze rani pokazatelj fizioloških starosno-zavisnih promena (De Leon i saradnici, 1983; Small i saradnici, 2000; Mosconi i saradnici, 2008). Uočeno je da su hipokampus i kora velikog mozga izuzetno osetljivi na promene energetskeg statusa i da ta osetljivost raste sa starenjem. Starosno-zavisno smanjenje metabolizma glukoze u ćelijama ovih regiona je praćeno i lošijim performansama na testovima pamćenja i učenja kod pacova (Gage i saradnici, 1984). Sa starenjem opada aktivnost AMPK kao i sposobnost ovog enzima da suprimira oštećenja u tkivu (Reznick i saradnici, 2007). Moždani udar dovodi do znatnog povećanja aktivnosti AMPK kod mladih jedinki, dok kod starih ovaj efekat izostaje (Liu i saradnici, 2011a), što upućuje na zaključak da osetljivost AMPK signalnog puta opada u procesu starenja. Do danas još uvek nije poznat mehanizam koji bi objasnio starosno-zavisne promene u AMPK signalnom putu, ali se smatra da su u tom procesu ključni nutritivni faktori, hormoni, inflamatorni signali, kao i protein fosfataze koje imaju ulogu u suprimiranju aktivnosti AMPK, (Viollet i saradnici, 2010).

Istraživanja na miševima su pokazala da tokom starenja dolazi do promene u ekspresiji glukoznih transportera u hipokampusu (Ding i saradnici, 2013). Ekspresija

GLUT1 i GLUT3 opada sa starenjem, pri čemu je smanjena ekspresija GLUT3 u korelaciji sa pokazanim smanjenim preuzimanjem glukoze u mozak. U istoj studiji nije zabeležena starosno-zavisna promena u ekspresiji GLUT4, ali se menjala lokalizacija ovog transportera, u smislu njegove povećane translokacije na plazma membrani starih životinja (Ding i saradnici, 2013). Starosno-zavisno smanjenje preuzimanje glukoze i ekspresije GLUT3 je pokazano i kod pacova Fischer 344 soja (Mooradion i saradnici, 1991). Ovakve promene su pokazatelji da u toku starenja, mozak ne uspeva da se izbori sa smanjenom dostupnošću glukoze, što rezultuje poremećajima u energetskom metabolizmu. Promene u ekspresiji tokom starenja nisu bile specifične samo za tip glukoznog transportera već i za njihovu ćelijsku ekspresiju. Na primer, pokazano je da se ekspresija endotelnog GLUT1 smanjivala, a glijskog GLUT1 povećavala, što može da predstavlja potencijalni kompenzatorni mehanizam kod ovih životinja (Ding i saradnici, 2013).

Uloga AMPK da reguliše energetske promene uzrokovane stresom, kao njegova uloga glavnog regulatora sinteze i metabolizma mitohondrija, vodi ka pretpostavci da možda upravo ovaj enzim leži u osnovi pozitivnog delovanja dijetalne restrikcije. Tome u prilog idu i rezultati istraživanja rađenih na kulturi hipokampusnih ćelija, u kojoj je aktivacija AMPK rezultirala boljim preživljavanjem u uslovima smanjene dostupnosti glukoze, u odnosu na kontrolu (Culmsee i saradnici 2001). I ispitivanja na nižim organizmima, kao što su *Chaenorabditis Elegans* i voćna mušica, ukazuju na to da AMPK igra veoma važnu ulogu u dužini života (Apfeld i saradnici, 2004; Curtis i saradnici, 2006; Onken i Driscoll, 2010; Funakoshi i saradnici, 2011). Studije sprovedene na miševima su pokazale da različiti tipovi dijeta utiču na ekspresiju i aktivaciju AMPK (Dagon i saradnici, 2005, Hernandez i saradnici, 2017, Ma i saradnici, 2017; Tanegashima i saradnici, 2017, Dakic i saradnici, 2018), dok sa druge strane AMPK reguliše proteine koji su povezani s efektima DR kao što su sirtuini, FOXO familija transkripcionih faktora, mTOR kinaza. Takođe, pokazano je da je AMPK put jedan od načina na koji razni farmakološki agensi, mimetici DR, ispoljavaju svoje dejstvo (revija Canto i Auwerx, 2011).

1.5. Insulin u mozgu

Insulin se intenzivno izučava u poslednjih devedeset godina, te je do danas sakupljeno mnoštvo podataka, ponajviše o njegovoj ulozi u jetri, mišićima i masnom

tkivu. Insulin sintetišu ćelije pankreasa, a njegova osnovna funkcija je da omogućiti ćelijama preuzimanje glukoze iz cirkulacije i njeno korišćenje kao izvora energije. Koncentracija insulina se reguliše negativnom povratnom spregom. Naime, sekretovani insulin dovodi do preuzimanja glukoze u tkivima koje poseduju insulin-zavisni transporter, GLUT4. Preuzimanje glukoze u ćelije dovodi do smanjenja glukoze u cirkulaciji, što biva detektovano od strane insulin nezavisnog GLUT2 transportera u beta ćelijama pankreasa. Informacija o smanjenoj koncentraciji glukoze u krvi predstavlja signal da pankreas prestane sa lučenjem insulina.

Dugi niz godina se smatralo da insulin ne prolazi krvno-moždanu barijeru, te da je mozak nezavisan od insulina, ali su pedesetih godina prošlog veka prva istraživanja ukazala na postojanje insulina u mozgu (Banks i saradnici, 1997). Danas se zna da insulin u mozgu reguliše izuzetno važne procese. Dok je uloga insulina na periferiji prvenstveno u regulaciji metaboličkih puteva, njegova uloga u mozgu je mnogo kompleksnija i pored regulacije metabolizma (Santos i saradnici, 1999; Gasparini i Xu, 2003) obuhvata regulaciju apetita (Ikeda i saradnici, 1986; Konner i saradnici, 2009), procese učenja i pamćenja (Takadera i saradnici, 1993), proliferacije i preživljavanja neurona (Tanaka i saradnici, 1995; Plitzko i saradnici, 2001). Smatra se da narušena regulacija insulina igra ulogu u mnogobrojnim oboljenjima, poput dijabetesa i Alchajmerove bolesti (Frolich i saradnici, 1999; Sandyk, 1993). Danas se zna da insulin iz periferne cirkulacije prolazi KMB, ali se tačan način prolaska još uvek ne zna (Rhea i saradnici, 2018). Identitet insulinskog transportera još uvek ne zna u potpunosti i dugo se smatralo se da tu ulogu vrši insulinski receptor (IR) (Woods i Porte 1977; Banks i saradnici, 1997c). Noviji podaci ukazuju na to da se prolazak insulina kroz KMB odvija neometano i bez prisustva IR, što ukazuje na postojanje posebnog transportera za insulin na KMB (Rhea i saradnici, 2018). Regulacija prolaska insulina kroz KMB je karakteristična po tome što je insulinski transporter zasićen pri fiziološkim nivoima insulina u cirkulaciji i na taj način štiti mozak od prekomernog ulaska insulina.

Početno povećanje nivoa insulina na periferiji rezultuje pojačanim vezivanjem insulina za transporter i prolaskom insulina kroz KMB, što dovodi do veće koncentracije insulina u cerebrospinalnoj tečnosti (CST). Međutim, relativno brzo svi insulinski transporteri na KMB postanu zasićeni, te dodatno povećanje nivoa insulina na periferiji više ne rezultuje povećanim prolaskom kroz KMB (Banks, 2004). Interesantno je da KMB nije podjednako propustljiva za insulin u svim regionima mozga, već je najpropustljivija

u delovima mozga u kojima insulin igra značajnu ulogu. U tim delovima, insulin u CNS može biti unet i direktno, preko cirkumventrikularnih organa koji se odlikuju propustljivom krvno-moždanom barijerom. Ovakav način prolaska insulina detektovan je u regionu hipotalamusa, što omogućava bržu insulinsku regulaciju u ovom regionu mozga (Wallum et al.,1987; Weindl and Sofroniew,1981).

Takođe, pokazano je da propustljivost KMB i unos insulina u CNS zavisi i od stanja poput gladovanja (Strubbe i saradnici, 1988), prekomerne gojaznosti (Stein i saradnici, 1987; Kayiala i saradnici 2000) i tretmana deksametazonom (Baura i saradnici, 1996). Hronična hiperinsulinemija, koja je karakteristika bolesti kao što je dijabetes tipa II, dovodi do insulinske rezistencije, odnosno smanjuje količinu IR na plazma membrani, i na ta način smanjuje osetljivost ćelija za insulin. Kod ovakvih poremećaja, u serumu postoji visok nivo insulina kao i glukoze (Leahy, 2005). Hronična hiperinsulinemija dovodi i do smanjenog prolaska insulina kroz KMB (Duarte i saradnici, 2012). Nasuprot tome, postoje slučajevi gde je transport insulina kroz KMB pojačan, na primer u toku neonatalnog razvića (Frank i saradnici 1985), i u nekim slučajevima dijabetesa (Banks, 1997b).

Do nedavno se smatralo da je insulin u mozgu poreklom isključivo iz periferne cirkulacije, te da se u mozgu ne sintetiše. Međutim, u prethodne dve decenije je velikim brojem eksperimenta pokazano da mozak ima sposobnost sinteze insulina. U kulturi neurona dolazi do otpuštanja insulina nakon membranske depolarizacije izazvane veratridinom ili hiperkalemijom (Clarke i saradnici, 1986). Takođe, preproinsulinska mRNK 1 i 2 je detektovana *in vitro* i *in vivo*, tokom fetalnog razvoja pacovskog mozga, dok je imunoreaktivnost na insulin u pokazana u endoplazminom retikulumu, Goldžijevom kompleksu, citoplazmi, aksonima, dendritima i sinapsama neurona (Duarte i saradnici, 2012). Istraživanja ukazuju da se sinteza insulina odvija u piramidalnim neuronima hipokampusa, prefrontalnog i entorinalnog korteksa, i u hipotalamusu (Csajbók i Tamás, 2016; Dakic i saradnici, 2017). Stoga nije iznenađujuće da su korteks, hipokampus, hipotalamus i amigdale bogate insulinom i njegovim receptorom (Havrankova i saradnici, 1978). Interesatno je da sinteza insulina nije detektovana u glijskim ćelijama (Hoyer, 2003).

1.5.1. Fiziološke funkcije insulina u mozgu

Dobro je poznato da insulin deluje na energetski balans u organizmu. U zavisnosti od njegove koncentracije u mozgu, dejstvo insulina može biti anoreksigeno (inhibira unos hrane), ili oreksigeno (stimuliše unos hrane). Administracija insulina direktno u mozak dovodi do anoreksigenog efekta, odnosno, viša koncentracija insulina u mozgu dovodi do smanjenja nivoa serumskog insulina, povećanja nivoa glukoze u serumu, smanjenje apetita i telesne težine (Banks i saradnici, 2012). Nasuprot tome, smanjen nivo insulina u mozgu dovodi do povećanog unosa hrane i povećanja serumskog insulina. U skladu sa tim, uočeno je da gladovanje smanjuje transport insulina u mozak i na taj način zaustavlja anoreksigeni signal iz mozga (Banks, 2004).

Svoju funkciju u regulaciji unosa hrane, insulin ostvaruje uz pomoć neuropeptida u hipotalamusu. (Plum i saradnici, 2005). Jedan od ključnih peptida u ovom procesu je neuropeptid Y (NPY), koji je eksprimiran u arkuatnom jedru zajedno sa aguti srodnim peptidom (engl. *Aguti related peptid*, AgRP) (Mayer i Belsham, 2009). Negativni energetski bilans stimuliše aktivnost NPY, povećavajući njegovu koncentraciju u hipotalamusu, što rezultira povećanim unosom hrane. Sa druge strane, insulin kao anoreksigeni peptid dovodi do supresije aktivnosti NPY, dajući osećaj sitosti i samim tim smanjujući unos hrane. Detektovano je da se u procesu starenja nivo NPY u hipotalamusu smanjuje, pa se smatra da on ima ulogu u takozvanoj starosno-zavisnoj anoreksiji (Moyer, 2001). Istraživanja na pacovima su pokazala da tokom starenja nivo NPY opada, kao i da dolazi do starosno-zavisnih promene u gustini NPY receptora, u većem broju moždanih regiona, uključujući hipokampus i hipotalamus (Kowalski i saradnici, 1992, Cadacio i saradnici 2003, Kuruba i saradnici 2011; Veyrat-Durebex i saradnici, 2013).

Efekat NPY nije ograničen samo na regulaciju unosa hrane, niti je njegova lokalizacija ograničena na hipotalamus. U amigdalama NPY ima ulogu u anksioznom ponašanju i u regulaciji konzumacije alkohola (Thorsell i Heilig 2002). U hipokampusu NPY učestvuje u procesima učenja i pamćenja, gde može imati kako inhibitorne, tako i stimulativne efekte. (Gotsche i Woldby, 2015). Rezultati velikog broja studija ukazuju na važnu ulogu ovog neuropeptida u ispoljavanju efekata DR. Pokazano je da DR dovodi do povećanja NPY u arkuatnom nukleusu (Minor i saradnici 2009, Bi, 2007). Smatra se da DR svoj antikancerogeni efekat ostvaruje upravo putem dejstva na NPY (Minor i saradnici 2011; Chiba i saradnici 2014), a centralna administracija NPY ostvaruje slične

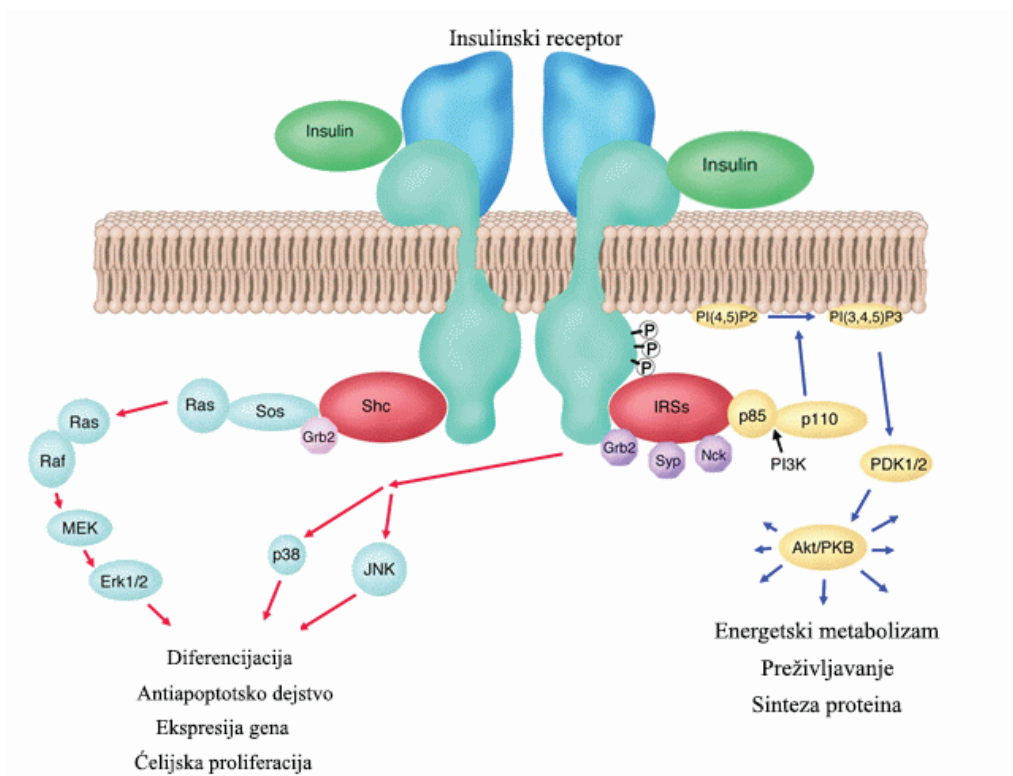
efekte kao i DR - smanjuje telesnu temperaturu i koncentraciju glukoze u krvi, a povećava koncentraciju glukokortikoida u cirkulaciji (Minor i saradnici 2009).

Prisustvo insulina i njegovog receptora u hipokampusu ukazuje na njegovu ulogu u procesima učenja i pamćenja, što je i pokazano u velikom broju studija (revija Zhao i saradnici, 1999). Tako je visoka koncentracija insulinskog receptora detektovana u regionima mozga koji učestvuju u procesima učenja i pamćenja, poput hipokampusa, amigdala i kore velikog mozga (Werther i saradnici, 1989; Marks i saradnici, 1990). Delovanjem na neurone hipokampusa, insulin dovodi do aktivacije glutamatnih NMDA receptora, a smanjenja aktivnosti AMPA receptora, koji imaju važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja. Uz to, insulin povećava ekspresiju glavnih inhibitornih receptora u mozgu, GABA A receptora, na postsinaptičkoj membrani i membrani dendrita (Wan i saradnici, 1997), a utiče i na ekspresiju PSD95 proteina uključenog u sinaptičku plastičnost (Kleinriders i saradnici, 2014). Pokazano je da utišavanje gena za IR u hipokampusu pacova dovodi do poremećaja u prostornoj memoriji, verovatno putem smanjenja sinaptičke plastičnosti u hipokampusu (Grillo i saradnici, 2015). Mikroinjeciranje insulina u hipokampus pacova dovodi do poboljšanja prostorne memorije, a administracija insulina u cerebrospinalnu tečnost mozga pacova stimuliše konsolidaciju memorije (Babri i saradnici, 2007). Sa druge strane, blokada insulinskog signalnog puta rezultuje smanjenim performansama u prostornoj memoriji (McNay i saradnici, 2010). Insulin ima ulogu i u prevenciji gubitka kognitivnih sposobnosti nakon ishemije, moždane lezije i farmakološke inhibicije. Naime, pri lediranju hipokampusa pacova dolazi do ozbiljnih poremećaja u procesima učenja i pamćenja, ali ako se insulin primeni pre lezije, životinje pokazuju znatno manji gubitak kognitivnih sposobnosti (Zhao i saradnici, 2004). Kod Alchajmerove bolesti je narušena aktivnost insulina, kako na periferiji, tako i u mozgu, a u studiji koju su objavili 2008 godine, de la Monte i saradnici idu i korak dalje, nazivajući Alchajmerovu bolest dijabetesom tipa 3 (de la Monte i Wands, 2008).

1.5.2. Insulinski signalni put

Insulin svoje dejstvo u mozgu ispoljava vezujući se za insulinski receptor, koji je lociran na površini plazma membrane i koji poseduje tirozin-kinaznu aktivnost (Werner i LeRoith, 2014) (Slika 3). Insulinski receptori u CNS-u i na periferiji imaju vrlo slične kinetičke i farmakološke karakteristike (LeRoith i saradnici, 1988, Zahniser i saradnici

1984). Neuronalni IR se razlikuje od perifernog u tri karakteristike, prva je u tome što IR u neuronima nema egzon 11 i označava se kao IR-A. Pored neurona adulta, ova izoforma je karakteristična za embrione. IR-B izoforma koja sadrži egzon 11 se predominantno nalazi u jetri, masnom tkivu i glijaskim ćelijama. Skeletni mišići sadrže jednaku količinu i IR-A i IR-B izoforme (Gralle, 2017). Druga karakteristika se odnosi na osobine perifernih IR-A i IR-B da pokazuju negativnu kooperativnost u kojoj vezivanje drugog molekula insulina dovodi do disocijacije prvog molekula. Neuronalna IR-A izoforma ne pokazuje negativnu kooperativnost. Treća važna razlika predstavlja nivo glikozilacije IR, koji je u manji u neuronima nego u glijji i periferiji (Gralle, 2017). Na osnovu ovih karakteristika se može pretpostaviti da je način vezivanja insulina za IR u mozgu drugačiji od one na periferiji.



Slika 1.3. Prikaz insulinskog signalnog puta (objašnjenje u tekstu). Preuzeto i modifikovano iz Van den Berghe, 2004.

Visoke koncentracije insulinskog receptora i njegove iRNK su detektovane u horoidnom pleksusu, olfaktornim bulbusima, piriformnom korteksu, amigdalama, hipokampusu, hipotalamusu i cerebrealnom korteksu (Havrankova i saradnici, 1978;

Unger i saradnici, 1989; Wozniak i saradnici, 1993). Primećeno je da je IR zastupljeniji u neuronima u odnosu na gliju (Unger i saradnici, 1989).

Insulinski receptor se sastoji od dve α i dve β subjedinice. Vezujuća mesta za insulin se nalaze na α subjedinicama, koje su locirane na spoljnoj površini plazma membrane. β subjedinice čine transmembranski i unutarćelijski deo receptora i poseduju tirozin-kinaznu aktivnost. Vezivanje insulina za α subjedinice receptora dovodi do promene njegove konformacije i brze autofosforilacije unutarćelijskih β subjedinica, što dalje vodi fosforilaciji familije proteina pod nazivom supstrati insulinskog receptora (engl. *Insulin Receptor Substrate*, IRS) (Taha i Klip, 1999). Do sada je detektovano 4 člana IRS familije, IRS1, 2, 3 i 4. U mozgu su zastupljene IRS1 i IRS2 i smatra se da su ove dve izoforme odgovorne za najveći broj efekata insulina, s tim što je nedavno otkriveno da se u hipotalamusu eksprimira IRS4 izoforma, koja je karakteristična za fazu embrionskog razvoja (Kleinriders i saradnici, 2014). Prvi je okarakterisan IRS1, te se dosta zna o njegovoj funkciji u insulinskom signalnom putu (Boura-Halfon i Zick, 2009; Sun i saradnici, 1992). Smatra se da je IRS1 pre svega odgovorna za rast mozga, dok je IRS2 uključena u razvoj mozga, mada se efekti ove dve izoforme u velikoj meri preklapaju. Fosforilisani IRS dalje aktivira fosfatidilinozitol 3-kinazu (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) preko SH2 domena, a PI3K dalje dovodi do fosforilacije i aktivacije protein kinaze C (PKC) i protein kinaze B (PKB/Akt) (Duarte i saradnici, 2012). Aktivacija ovog puta je odgovorna za metaboličke efekte insulina, za preživljavanje neurona, odnosno inhibiciju apoptoze (Heidei i saradnici, 2006, Boura-Halfon i Zick 2009), a noviji radovi ukazuju i na ulogu ovog puta u učenju i pamćenju (McNay i saradnici, 2010).

Pored pomenutog, postoji i drugi insulinski signalni put, koji uključuje aktivaciju *Shc* proteina (engl. *Collagen Containing Protein*, Shc), a koji dalje prenosi signal na kompleks vezujućeg proteina receptora faktora rasta 2 i SOS proteina (engl. *Growth factor receptor binding protein 2/ Son-of-sevenless*, Grb-2/ SOS). Ovaj kompleks omogućava aktivaciju Raf/Ras kompleksa i preko njega mitogen aktivirajuće protein kinaze (engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*, MAPK). Smatra se da je ovaj signalni put uključen u procese sinaptičke plastičnosti i ćelijske smrti (Johnson-Farley i saradnici 2006; Hetman i saradnici 1999; Sweatt 2001; Boura-Halfon i Zick 2009).

Postoji i treći, alternativni signalni put u kom dolazi do interakcije između PI3K/Akt i MAPK puta. Ova interakcija se odvija na nivou Grb2/SOS kompleksa, koji

se u ovom slučaju vezuje za IRS, a ne Shc. Ovaj signalni put vodi ka inaktivaciji Ras/Raf i ERK $\frac{1}{2}$ (Aksamitiene i saradnici, 2012). Ovakva interakcija signalnih puteva omogućava ćeliji da procesuirala i dekodira signale koji dolaze sa različitih receptora i koji su uzrokovani različitim spoljašnjim signalima.

1.5.3. Uticaj starenja na insulinski signalni put

U toku starenja dolazi do značajnih promena u insulinskom signalnom putu. Mnogobrojne studije koje su se bavile ispitivanjem starosno-zavisnih promena IR na nivou celog organizma su dale oprečne rezultate, u zavisnosti od organizma, tkiva i eksperimentalnih tehnika. Saznanja koja se odnose na promene u insulinskom signalnom putu u mozgu u toku normalnog, fiziološkog starenja za sada su malobrojna. Post-mortem studija na mozgovima starih ljudi je pokazala da dolazi do smanjenja koncentracije insulina u kori velikog mozga, kao i da se sa starenjem narušava sposobnost IR da vezuje insulin (Frolich i saradnici 1998). Uz to, starenje vodi smanjenju ekspresije IR na krvno-moždanoj barijeri, i ovaj proces je znatno izraženiji kod jedinki kod kojih postoji periferna hiperinsulinemija, ili insulinska rezistencija (Kullmann i saradnici, 2016). Istraživanja na pacovskim animalnim modelima su međutim, pokazala da starenje ne dovodi do promena u ukupnoj količini IR, već dovodi do smanjenja u količini fosforilisane forme IR, i to u cerebelumu i kori prednjeg mozga (Fernandes i saradnici, 2001), a istraživanje sprovedeno na pustinjским miševima je pokazalo da dolazi do pada u koncentraciji ukupnog IR u čitavom hipokampusu (Park i saradnici, 2009).

Poremećaji u insulinskom signalnom putu mogu dovesti do patoloških stanja kao što su insulinska rezistencija i dijabetes tipa II. U animalnim modelima dijabetesa tipa II pokazano je da u hipokampusu dolazi do slabljenja sinaptičke funkcije i smanjene neurogeneze što može biti uzrok kognitivnih poremećaja kod ovih životinja. (Mattson, 2010). Klinički je pokazano da kod osoba starijih od 64 godine, sa insulinskom rezistencijom i dijagnozom dijabetesa tipa II, dolazi do znatnog pogoršanja kognitivnih funkcija u odnosu na zdrave osobe istog godišta (Plum i saradnici, 2005). Pored toga što starije osobe obolele od dijabetesa tipa II često pate od demencije, one imaju veći rizik oboljevanja od Alchajmerove bolesti (AB).

1.5.4. Uticaj DR na insulinski signalni put

Veliki broj animalnih i humanih studija su pokazale da DR dovodi do povećanja periferne insulinske osetljivosti (Anson i saradnici, 2003; Cerqueira i saradnici, 2011, Larson-Meyer i saradnici 2006; Weiss i saradnici, 2006) time što suprimira aktivnost insulinskog signalnog puta. Studija na miševima je pokazala da DR u trajanju od 30 nedelja dovodi do smanjenja u ekspresiji proteina uključenih u insulinski signalni put u mozgu (Ma i saradnici, 2014), dok je intermitentna dijeta u trajanju od 6 nedelja, u mozgu miševa dovela do smanjene aktivnosti Akt proteina, uključenog u signalni put insulina (Jianghua i saradnici 2011). Smanjena aktivnost insulinskog signalnog puta dovodi do boljeg preživljavanja stem ćelija, usporavanja starenja *in vitro* (Rafalski and Brunet, 2011) i produženja životnog veka *in vivo* (Masternak i saradnici, 2009). Zahvaljujući brojnim eksperimentalnim dokazima, kao i kliničkim ispitivanjima, došlo se do značajnih otkrića o ulozi koju insulin ima u produženju životnog veka. Studije sprovedene na beskičmenjacima su pokazale da crvi i mušice eksprimiraju insulinu-slične peptide i da mutacija koja smanjuje njihovu ekspresiju produžava život ovih životinja (Bartke, 2008). U animalnim modelima kičmenjaka situacija je nešto složenija, verovatno je razlog tome kompleksnost mehanizama koji leže u osnovi dugovečnosti. Kod kičmenjaka mutacije gena koji su uključeni u signalni put insulina sa jedne strane dovode do produžetka života u odnosu na kontrolne, odnosno normalne WT (engl. *Wild Type*) životinje, a sa druge dovode do razvitka dijabetesa, hiperlipidemije, patoloških promena u jetri, a često i do letalnih ishoda (Selman i saradnici 2003). FIRKO miševi sa utišanim genom za IR u masnom tkivu, imaju za 18% duži životni vek od svojih WT kontrola (Blucher i saradnici, 2003). Utišavanje IRS2 gena kod miševa dovodi do skraćanja životnog veka (Selman i saradnici, 2008), dok utišavanje IRS1 gena povećava životni vek i smanjuje starosno-zavisne promene na koži, u kostima, u imunskom sistemu i u motoričkim funkcijama miševa (Taguchi i saradnici, 2007).

Pokazano je da restrikcija hrane utiče na promene u metabolizmu glukoze i insulina, smanjujući njihove nivoe u cirkulaciji i time DR dovodi do mnogobrojnih pozitivnih efekata u organizmu (Masoro, 2005; Martin i saradnici, 2006; Hadem i saradnici, 2018). Niži nivoi glukoze i insulina dovode do bolje iskorišćenosti dostupne energije i efektivnijeg odgovora ćelija na insulin-zavisno preuzimanje glukoze. Pokazano je da visok nivo glukoze u cirkulaciji vremenom dovodi do povećane glikozilacije proteina koja uzrokuje njihovo oštećenje, a ukoliko je i nivo insulina visok, dolazi do

razvijanja patoloških promena koje se nalaze u osnovi metaboličkog sindroma, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti. Nasuprot tome DR, redukcijom nivoa glukoze i insulina, smanjuje ovakve promene i dovodi do poboljšanja insulinske osetljivosti kod pacova (Martin i saradnici, 2006), a pokazana je povećana insulinska osetljivost u kori velikog mozga i hipokampusa kod majmuna nakon dugotrajnog restriktivnog režima ishrane (Willette i saradnici, 2012). Nedavno je pokazano da DR utiče i na povećanje insulin-zavisnog preuzimanja dopamina u repatom jedru, putamenu i *nucleus accumbens*-u kod pacova (Kumry i saradnici 2017).

Srazmerno povećanju starih ljudi u populaciji, raste i broj bolesti u kojima je poremećen energetska metabolizam, uključujući neurodegenerativne bolesti i kognitivne poremećaje. S obzirom na to da je mozak ključni organ u regulaciji energetskog metabolizma na nivou celog organizma, detaljnija ispitivanja procesa preuzimanja glukoze i insulinskog signalnog puta u mozgu nam mogu otkriti ključne tačke u kojima bi terapijske intervencije mogle ublažiti starosno-zavisne promene.

2. CILJ

Proces starenja dovodi do strukturalnih i funkcionalnih promena u mozgu, koje rezultiraju postepenim gubitkom motoričkih i kognitivnih sposobnosti. Sa razvojem i napretkom terapija koje produžavaju životni vek, zabeležen je i porast u broju starosno-zavisnih bolesti kod ljudi. Narušavanje homeostaze energetskeg metabolizma predstavlja jedan od vodećih uzroka koji leži u osnovi brojnih neurodegenerativnih bolesti koje se javljaju tokom starenja. Primarnu ulogu u održavanju energetskeg statusa neuralnih ćelija imaju proteini koji omogućavaju preuzimanje glukoze u ćeliju, poput glukoznih transportera, AMPK proteina i proteina insulinskog signalnog puta. Zna se da dijetalna restrikcija ostvaruje neuroprotektivno dejstvo time što odlaže starosno-zavisne promene u mozgu i poboljšava kognitivne i motoričke sposobnosti jedinke, ali se još uvek nedovoljno zna o ulozi koju dijetalna restrikcija ima na promene u energetskeg statusu ćelija mozga u toku starenja. Takođe, smatra se da DR može ispoljiti i negativne efekte u zavisnosti od starosne dobi u kojoj počinje i dužine trajanja.

Cilj ove disertacije bio je da se ispita kakav efekat različiti tipovi dijetalne restrikcije imaju na promene u kognitivnim i motoričkim sposobnostima pacova, i kakav efekat ima dugotrajna restrikcija hrane na proteine koji učestvuju u metabolizmu glukoze u hipokampusu, kori prednjeg mozga i hipotalamusu pacova u toku starenja. U skladu sa navedenim, postavljeni su sledeći specifični ciljevi istraživanja:

1. Ispitati uticaj starenja i različitih režima ishrane na aktivnost i proces habituacije kod mužjaka pacova Wistar soja u testu otvorenog polja
2. Ispitati efekat starenja i različitih režima ishrane na kognitivne parametre Wistar pacova u test Y lavirinta
3. Odrediti *frailty score (FS)*, odnosno stanje krhkosti svih ispitivanih AL starosnih grupa i analizirati uticaje sva tri režima ishrane na FS
4. Odrediti nivo glukoze, insulina, holesterola i triglicerida u serumu u toku starenja i nakon dejstva različitih režima ishrane
5. Ispratiti promene proteina uključenih u preuzimanju glukoze u mozgu (GLUT1, GLUT3 i GLUT4), kao i glavnog energetskeg senzora ćelije (AMPK), u hipokampusu i kori prednjeg mozga Wistar pacova tokom starenja i pod uticajem dijetalne restrikcije

6. Ispitati da li starenje i dugotrajni režim ishrane deluju na ekspresiju proteina uključenih u insulinski signalni put (insulin, IR β , IRS1 i Akt) i na ekspresiju oreksigenog peptida NPY u hipokampusu i hipotalamusu Wistar pacova

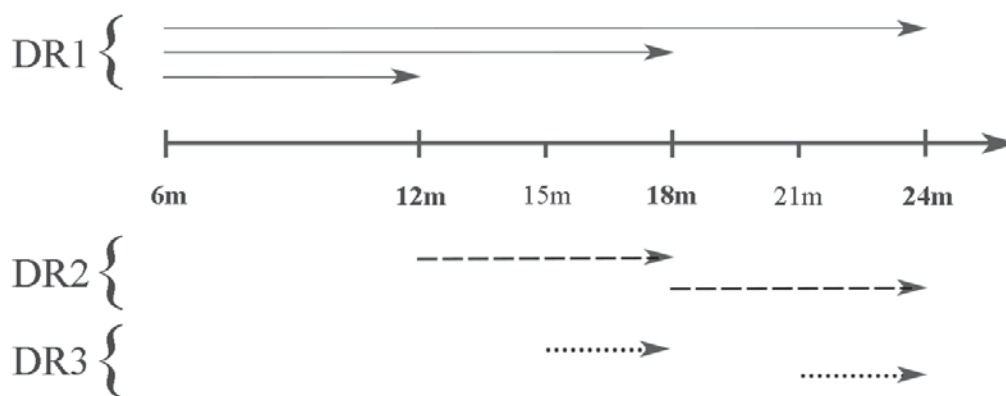
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* (n=67) iz vivarijuma Instituta za biološka istaživanja "Siniša Stanković" (IBISS). Životinje su u toku eksperimenta gajene po 2-4 u kavezu, pri standardnim uslovima u prostoriji (temperatura: 23±2 °C; relativna vlažnost vazduha: 60-70%), sa svetlosnim režimom 12h svetlost/12h mrak i slobodnim pristupom vodi. Svi eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog komiteta IBISS-a (rešenje broj 05-06/14).

3.2. Eksperimentalni dizajn

Starost životinja na početku eksperimenta je bila 6 meseci. Nakon toga, životinje su podeljene u dve osnovne grupe u zavisnosti od količine hrane koju su dobijale. Prosečna dnevna potrošnja hrane po životinji određena je nakon sedmodnevnog merenja količine konzumirane hrane. Prva grupa je označena kao *ad libitum* (AL) grupa i tokom čitavog eksperimenta je imala neograničen pristup hrani, dok je druga grupa, označena kao DR, podvrgnuta dijetalnoj restrikciji (DR). Količina hrane koju je ova grupa životinja dobijala je iznosila 60% prosečnog dnevnog unosa hrane AL grupe. Sve eksperimentalne grupe su hranjene standardnom briketiranom hranom (45% ugljeni hidrati; 5% masti; 20% proteini). DR grupa je dalje podeljena na tri podgrupe, u zavisnosti od vremena početka i dužine trajanja restriktivnog dijetalnog režima (Slika 3.1). DR1 režim je uveden kad su životinje imale navršenih 6 meseci života i trajao je sve dok životinje nisu napunile 12, 18 odnosno 24 meseca. DR2 režim ishrane je počeo sa navršenih 12, odnosno 18 meseci života i trajao je 6 meseci. DR3 režim je počeo kad su životinje imale 15, odnosno 21 mesec i trajao je 3 meseca. Uzimajući u obzir da je vremenski period između izvođenja eksperimenta na DR1, odnosno DR2 i DR3 grupama životinja bio dug, bilo je neophodno uvesti dve AL kontrolne grupe, odgovarajuće za svaku DR kohortu. Prva AL (AL1) grupa je bila kontrola za DR1 tretman, dok je druga AL grupa (AL2) služila kao kontrola za DR2 i DR3 tretman. Sve eksperimentalne životinje bez obzira na tip ishrane su bile podvrgnute testovima ponašanja u trenutku kada su dostigle odgovarajuću starost (6, 12, 18 ili 24 meseca), a broj životinja po eksperimentalnoj grupi je varirao od 8-22. Životinje su hranjene svakoga dana u 15h, dok su testovi ponašanja rađeni u prepodnevnom časovima, pre hranjenja životinja.



Slika 3.1. Shematski prikaz različitih dijetalnih režima

Životinje iz svih eksperimentalnih grupa su odmah nakon završetka testova ponašanja žrtvovane brzom dekapitacijom u trenutku dostizanja određene starosti, tj. 12, 18 i 24 meseca. Na isti način su žrtvovane i životinje stare 6 meseci, koje su predstavljale kontrolnu grupu za ispitivanje efekata starenja.

3.3. Testovi ponašanja

3.3.1. Test otvorenog polja

Motorna aktivnost životinja je merena u Opto-Varimex kavezima (*Columbus Instruments, OH*) u prostoriji koja je zvučno i svetlosno izolovana (Slika 3.2). Iznad centra arene je postavljeno svetlo jačine 150 luksa, a svaki kavez dimenzija 44.2x43,2x20cm je opremljen sa 15 infracrvenih predajnika/prijemnika koji su postavljeni na X i Y osi, na visini od 3 cm iznad poda kaveza. Sa obe strane kaveza je postavljen jedan niz predajnika/prijemnika na visini od 8cm iznad poda, koji detektuju vertikalne pokrete životinje (izdizanje na zadnje noge). Svaki prekid zraka stvara električni impuls koji se registruje digitalni brojač. Analiza podataka je izvršena *Auto-Track* softverom (*Columbus Instruments, OH*). Na svaku 1/10 sekunde podaci sa Opto-Varimex jedinice su analizirani i izvršena je kategorizacija aktivnosti životinje. Lokomotorna aktivnost je detektovana u slučaju da životinja prekine tri infracrvena zraka zaredom. Vertikalna aktivnost je detektovana kada životinja prekine zrak predajnicima/prijemnicima koji su postavljeni 8cm iznad poda aparature, dok se uspravlja na zadnje noge.



Slika 3.2. Opto Varimex kavezi za praćenje motoričke aktivnosti kod glodara (Laboratorija 56, IBISS)

Životinjama je dozvoljeno da istražuju test arenu tokom 40 minuta, 5 dana zaredom. U okviru tih 5 ispitivanih dana praćene su lokomotorna, vertikalna aktivnost i habituacija. Lokomotorna aktivnost odgovara putu koji životinja pređe u toku jedne sesije (perioda u kojem se registruje aktivnost životinje u test areni, u ovom slučaju 40 minuta) i izražena je u u cm, a vertikalna aktivnost odgovara ponašanju životinje koja slobodno ili oslonjena na zid arene stoji na zadnjim ekstremitetima i istražuje okolinu.

Kada se životinja stavi u nepoznato okruženje, u ovom slučaju arenu, ona ima tendenciju da istražuje prostor tokom određenog vremenskog perioda, nakon čega dolazi do pada njene vertikalne i lokomotorne aktivnosti (Leussis i Bolivar 2009). Ovo smanjenje motorne aktivnosti je poznato pod nazivom habituacija i smatra se najjednostavnijim oblikom učenja. Pad aktivnosti u toku jedne sesije predstavlja unutarasesijsku habituaciju, dok smanjenje aktivnosti kroz eksperimentalne dane predstavlja međusesijsku habituaciju. U našim eksperimentima je međusesijskom habituacijom praćena aktivnost životinja u toku 40 minuta, 5 dana zaredom, dok je kod unutarsesijske habituacije praćena aktivnost prvih i poslednjih 5 minuta istog dana, u toku svih 5 dana.

3.3.2. Y lavirint

Y lavirint se sastoji od tri kraka (dimenzija 50x25x16 cm) napravljenih od neprovidnog pleksiglasa i međusobno postavljenih pod uglom od 120° (Slika 3.3). Test se sastoji iz dva dela. U prvom delu eksperimentalnoj životinji je dozvoljeno da slobodno istražuje dva kraka lavirinta (označeni kao 1. I 2. Krak) tokom 10 minuta, dok je treći krak zatvoren. Nakon desetominutnog istraživanja, životinja se vraća u svoj kavez na sat vremena. Nakon isteka tog vremena životinja se ponovo stavlja u Y lavirint i dozvoljava joj se da slobodno istražuje sva tri kraka lavirinta tokom 10 minuta, odnosno ovga puta otvara se i treći, takozvani “nepoznati” ili novi krak, koji je prethodno bio nedostupan za istraživanje. Beleži se broj ulazaka u svaki krak, kao i vreme provedeno u svakom kraku.



Slika 3.3. Y lavirint za za ispitivanje prostorne memorije glodara (Laboratorija 56, IBISS)

Na osnovu broja ulazaka u krake izračunavaju se spontane alteracije (engl. *Spontaneous Alterations*, SAB). Spontane alteracije reflektuju urođenu sklonost životinja (naročito glodara) da ispituju različite krake, odnosno da alteriraju krak lavirinta u koji ulaze i koji žele da ispituju. Sa obzirom da ni u jednom kraku lavirinta nije bila prisutna “nagrada”, već je životinja samo spuštена u Y lavirint, alteracije su označene kao “spontane”. Za računanje SAB prvo se svakom kraku dodeli oznaka, prvom se dodeli oznaka A, drugom B i trećem C. Zatim se beleži se redosled ulaska životinje u svaki krak,

npr. Životinja je prvo ušla u krak C, pa A, pa B što je zabeleženo kao CAB. Nakon toga je potrebno ustanoviti koji tripleti su uspešni (tri uzastopna ulaska u različite krake, tj. krake koje životinja nije prethodno posetila), sa dozvoljenim preklapanjima. Ukoliko je redosled ulaska u krake CABBABCBCACBA, kao uspešni tripleti se uzimaju CAB (1), ABC (2), BCA (3) ACB (4) CBA (5) tj oni u kojima nema ponavljanja dva kraka. Zatim se pristupa izračunavanju formule za SAB prema formuli (Hughes, 2004):

broj uspešnih tripleta (u ovom slučaju 5)

ukupan broj ulazaka u krake – jedan (13-1)

Analizom ponašanja životinja u Y lavirintu, ustanovljeno je da nema značajnih razlika u ponašanju među životinjama iz AL1 i AL2 kohorte te su dalje životinje odgovarajuće starosti iz obe kohorte objedinjene i na taj način su formirale zajedničke starosne AL grupe (AL 12, 18 i 24 meseca stare).

3.3.3. *Frailty score* (FS)

Za računanje stepena krhkosti, odnosno frailty score (FS) kod naših životinja, za osnovu je uzeta publikacija Gomez-Cabrera i saradnika (Gomez-Cabrera i saradnici, 2017) koji su za računanje FS uveli takozvani „Valencia score“, a koji predstavlja modifikovanu verziju rada Fried i saradnika o fenotipskoj krhkosti iz 2001. godine. U ovoj doktorskoj disertaciji njihove metode su preuzete i adaptirane tako da se formira jedinstven fizičko-kognitivni FS koji u sebi sadrži parametre fizičke izdržljivosti (izračunate na osnovu težine životinja i rezultata iz testa otvorenog polja i) i parametre kognitivnog statusa (na osnovu rezultata dobijenih u testu Y lavirinta). Iz testa otvorenog polja su korišćene vrednosti detektovane tokom prvih 10 minuta registracije i to za sledećih 5 parametara : ukupni pređeni put (engl. *distance traveled*, DT), ukupno vreme provedeno u kretanju (engl. *ambulatory time*, AT), procenat vremena provedenog u kretanju u odnosu na ukupno vreme (T/AT), prosečna brzina kretanja životinje (DT/AT) i njena vertikalna/eksploratorna aktivnost. Iz testa u Y lavirintu je korišćeno sledećih 5 parametara: ukupan broj ulazaka u sve krakove lavirinta, broj ulazaka u treći krak, procenat ulaska u treći krak u odnosu na ukupan broj ulazaka u sve krakove, vreme provedeno u trećem kraku i broj spontanih alteracija. Kao jedanaesti parametar za računanje FS je uzeta težina životinja.

Posebno je računat FS tokom starenja, a posebno uticaj različitih dijetalnih režima na FS. Prvi korak u određivanju granice za krhkost je formiranje tzv. zbirne grupe

eksperimentalnih životinja, koja se sastoji od svih eksperimentalnih AL i/ili DR grupa koje želimo da poredimo. S obzirom na to da su zbog dugog trajanja eksperimenta uvedene dve kontrolne (AL) kohorte, za FS u toku starenja su kombinovane životinje odgovarajuće starosti iz obe kohorte (za objašnjenje videti eksperimentalni dizajn) pa je tako dobijena zbirna grupa od 12 meseci AL1+AL2, 18 meseci AL1+AL2 i 24 meseca AL1+AL2. Za računanje uticaja dijete na FS, u istu zbirnu grupu su stavljene životinje na dijeti i odgovarajuća starosna kontrola: 12 meseci AL1+DR1, 18 meseci AL1+DR1, 24 meseca AL1+DR1 i 12 meseci AL2+DR2+DR3, 18 meseci AL2+DR2+DR3, 24 meseca AL2+DR2+DR3.

Drugi korak u određivanju granice za krhkosti je računanje tzv. prelomne tačke (engl. *cutt off point*). Prateći metodu Gomez-Cabrera i saradnika, u okviru svake zbirne grupe i za svaki od jedanaest parametara je izračunata vrednost od 20% najlošijih rezultata za svaki parametar (na primer, za lokomotornu aktivnost se unesu podaci svih životinja 12 meseci AL i DR, a Graph Pad program odredi graničnu vrednost za 20% najlošijih rezultata u okviru ove zbirne grupe). Zatim se odredi broj životinja iz AL i iz DR grupe koje su imale vrednost ispod te granične, odnosno čiji su rezultati spadali u 20% najlošijih rezultata. Data vrednost je predstavljala granicu krhkosti tj. prelomnu tačku: sve životinje čiji su ispitivani parametri imali vrednost u tih najnižih 20% su smatrane krhkim, odnosno smatrane su pozitivnim za dati i kriterijum krhkosti. Nakon određivanja prelomne tačke za svaki parametar u okviru zbirne grupe, nastupa sledeći korak u kome treba za svaku pojedinačnu eksperimentalnu grupu (AL i DR) i parametar odrediti broj životinja koje se nalaze ispod prelomne tačke. Finalni korak je određivanje FS, gde je neophodno objediniti rezultate za sve parametre za svaku pojedinačnu grupu i ustanoviti koliko u kojoj grupi ima fragilnih jedinki. To je urađeno na sledeći način: ukupan broj testova (parametara) koje životinje u svakoj pojedinačnoj grupi nisu prošle (A) je podeljen sa ukupnim brojem testova (parametara) koje su životinje uspešno prošle iz iste pojedinačne grupe (B) i izraženo u procentima (Videti Rezultate, Tabela 5 i 6).

3.4. Određivanje biohemijskih parametara u serumu pacova

Za biohemijske analize prikupljena je krv iz tela životinje. Serum je izolovan na sledeći način: krv je ostavljena da koaguliše 30 min na sobnoj temperaturi, a potom je centrifugirana 15 min na 1500 rpm. Supernatant je prebačen u sterilne epruvete i zamrznut (-20°C). Nivo insulina u serumu pacova određen je radioimunoesejem (RIA INS PEG

test) a nivoi ostalih biohemijskih parametara (glukoza, holesterol i trigliceridi) određeni su spektrofotometrijskom analizom u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP, Zemun, Srbija).

3.5. Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova

3.5.1. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva

Za imunoblot analizu korišćeno je po 5 životinja u svakoj eksperimentalnoj grupi. Postupak disekcije korteksa, hipokampusa i hipotalamusa mozga žrtvovanih životinja, rađen je na ledu, kako bi se sprečilo dejstvo proteolitičkih enzima. Nakon disekcije, tkiva su čuvana na -70°C do dalje upotrebe. Proteini su izolovani iz zamrznutog tkiva, a ceo proces je obavljen na ledu. Eksperimentalni uzorci nisu spajani i dobijeni rezultati se odnose na pojedinačne životinje. Tkivo je homogenizovano u 10 zapremine pufera za liziranje, u staklenom homogenizeru zapremine 2 ml. Kao pufer za liziranje korišćen je RIPA pufer (Tabela 3.1) kome je neposredno pred upotrebu dodat kompletan koktel proteaznih inhibitora (Roche, Mannheim, Germany), kao i fosfatazni inhibitori (Tabela 3.1). Na ovaj način su izolovani ukupni protein iz tkiva. Homogenati su sonifikovani i centrifugirani na $16000\times g$, 30 minuta na 4°C , a supernatant sa solubilnim proteinima uzet je za dalje analize. Do daljih analiza, uzorci su čuvani na -70°C .

Tabela 3.1. Rastvori i puferi korišćeni u eksperimentalnim procedurama

Rastvori	Sastav i proizvođač
Pufer za liziranje	<u>RIPA pufer:</u> 50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1% NP-40 0.5% Triton X-100 0.1% SDS 1 mM EDTA 1 mM EGTA) <u>Proteazni inhibitori</u>

	<p>Roche, Mannheim, Germany</p> <p><u>Fosfatadni inhibitori:</u></p> <p>25 mM NaF</p> <p>5 mM Na₄P₂O₇</p> <p>2 mM Na₃VO₄</p>
Određivanje koncentracije proteina	<p><u>Micro BCA Protein Assay Kit</u></p> <p>Pierce Inc., Rockford, USA</p>
Rastvor luminola	<p><u>Za 100 ml radnog rastvora:</u></p> <p>1 ml luminola</p> <p>0,44 ml p-kumarinske kiseline u DMSO</p> <p>10 ml 1M Tris-HCl, pH 8.5</p> <p>88,6 ml Mili-Q H₂O</p>
Gelovi za elektroforezu	<p><u>Gel za razdvajanje:</u></p> <p>5-10% akrilamid / bisakrilamid (29:1) (Sigma)</p> <p>1,5 M Tris pH 8.8</p> <p>10% SDS</p> <p>10% amonijum persulfat (ICN)</p> <p>1% tetrametiletilendiamin (Serva)</p> <p><u>Gel za koncentrisanje:</u></p> <p>4% akrilamid / bisakrilamid (29:1)</p> <p>0,5 M Tris-HCl, pH 6.8</p> <p>10% SDS</p> <p>10% amonijum persulfat</p> <p>1% tetrametiletilen diamin</p>
Pufer za uzorke (2× Lemli pufer)	<p>31.25 mM Tris pH 6.8</p> <p>10% glicerol</p> <p>1% SDS</p> <p>5% 2-merkaptotanol</p> <p>0.025% bromfenol plavo</p>

Pufer za elektroforezu	192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3 0.1% SDS
Pufer za transfer proteina	20% metanol 192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3
TBST pufer	<u>Tris pufer sa dodatkom deterdženta</u> 20 mM Tris pH 7.6 137 mM NaCl 0,05% Tween 20
Ponceau S boja	<u>Radni rastvor:</u> 1% Ponceau S boja 5% glacijalna sirćetna kiselina

3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Pierce-u pomoću komercijalnog kompleta (Micro BCA Protein Assay Kit; Pierce Inc., Rockford, USA), tzv. Mikrometodom, po uputstvu proizvođača. Koncentracija proteina u pripremljenim uzorcima određena je metodom zasnovanom na svojstvu bicinoninske kiseline da detektuje Cu^{1+} koji se formira redukcijom Cu^{2+} u prisustvu proteina u alkalnoj sredini. Uzorci su prvo razblaženi 10 puta ($5\mu\text{l}$ uzorka i $45\mu\text{l}$ mQH₂O), a zatim je $10\mu\text{l}$ tako razblaženog uzorka dodato u $115\mu\text{l}$ mQH₂O i $125\mu\text{l}$ boje iz kita. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h na 37°C očitana je apsorbanca uzoraka na 562 nm, korišćenjem ELISA čitača (Bio-Rad Laboratories). Za standardnu krivu korišćene su poznate koncentracije goveđeg albumin seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA; Sigma).

3.5.3 Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima sa natrijum-dodecilsulfatom (engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) u tzv. diskontinualnom sistemu (za detalje videti Laemmli, 1970). Za nalivanje gelova debljine 0.75 mm i samu elektroforezu korišćena je aparatura za elektroforezu HoferTM SE 260 (Amersham Biosciences). Za nalivanje uzoraka korišćeni su češljici od 15 i od 10 bunarića. U

aparaturu je prvo je naliven gel za razdvajanje (finalne koncentracije 8% ili 10%), a zatim gel za koncentrisanje (Tabela 3.1).

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa dvostrukim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina. Na taj način je određeno da je za ispitivanje ekspresije insulina, NPY-a, IR β , fosfo-IR β , IRS1, fosfo-IRS1, Akt-a i fosfo-Akt-a bilo potrebno naneti po 20 μ g ukupnih proteina, a po 15 μ g za ispitivanje ekspresije AMPK, fosfo AMPK, GLUT1,3 i 4. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2xLaemmli (Tabela 3.1) dodat uzorku u odnosu 1:1 (v/v). Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem na 95°C tokom 5 minuta, sem uzoraka za GLUT receptore, fosfo-IR β i fosfo-IRS1 koji nis prolazili kroz proces dodatne denaturacije. Kao standard za molekulsku težinu proteina korišćeni su obojeni marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* (10-180 kDa; #26616, Termo Fischer Scientific) i *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (10-260kDa, #26625, Termo Fischer Scientific). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (Tabela 3.1), pod konstantnim naponom od 120/150 V, dok boja ne stigne do kraja gela.

3.5.4. Elektrotransfer proteina

Prenos (transfer) proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (polivinildifluorid) membranu (Millipore, Immobilon-P) je rađen korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Nakon završene elektroforeze gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa keramičke ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (Tabela 3.1), gde je ostavljen narednih 15 minuta (tzv. ekvilibracija gela). PVDF membrana (isečena u dimenzijama gela) je prvo isprana u destilovanoj vodi u trajanju od 10 minuta, a zatim prebačena u posudu sa puferom za transfer gde je ekvilibrisana narednih 15 minuta. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sunđer) su takođe adekvatno pripremljene potapanjem u pufer za transfer tokom 30 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i stavljanja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen tokom 70 minuta, pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi. Po završenom transferu membrane su fiksirane u 70% metanolu pa osušene na sobnoj temperaturi bez ikakvog dodatnog ispiranja. Neposredno

pred dalju analizu, membrane su držane u destilovanoj vodi tokom 20 minuta, bojene Ponceau S bojom (Tabela 3.1), a zatim skenirane radi vizuelizacije proteinskih traka i dalje kvantifikacije proteina.

3.5.5. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - *Western blot* metoda

Radi dalje imunološke detekcije proteina membrane su inkubirane u rastvorima odgovarajućih antitela uz lagano mešanje. Prethodno su membrane inkubirane u blokirajućim rastvorima u trajanju od 1h na klackalici na sobnoj temperaturi kako bi se umanjila mogućnost nesepecifičnog vezivanja antitela za membranu. Kao blokirajući agens je korišćeno 5% mleko (Santa Cruz) rastvoreno u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween-(Tabela 3.1) ili 3% goveđi serum albumin za fosfo-antitela (*Bovine Serum Albumin, BSA*, Sigma-Aldrich). Primarna antitela su razblažena samo u TBST-u, uz izuzetak fosfo-antitela i AMPK, koja su razblažena u 3% BSA. Spisak korišćenih primarnih antitela, kao i korišćenih razblaženja naveden je u Tabeli 3.2. Nakon inkubacije sa pojedinačnim primarnim antitelima preko noći na +4C, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween-20. Potom su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti-zec, Santa Cruz) obeleženim peroksidazom rena, u TBST-u (razblaženje 1: 5000) 1 h na sobnoj temperaturi.

Za detekciju hemiluminescentnog signala, sekundarnim antitelima obeleženim peroksidazom rena je najpre ponuđen supstrat koji u sebi sadrži luminol (komercijalni komplet - *Western blotting detection reagents, chemiluminescent*, GE Healthcare). Membrana je inkubirana u supstratu 2 minuta, očeđena i izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost (Kodak) u trajanju od 1 do 30 minuta. Filmovi su razvijeni odmah i skenirani radi dalje analize.

Tabela 3.2. Spisak korišćenih primarnih antitela

Specifičnost	Poreklo i tip antitela	Kataloški broj	Proizvođač	Razblaženje
insulin	zec, poliklonsko	sc-9168	Santa Cruz	1:500
NPY	zec poliklonsko	sc-28943	Santa Cruz	1:500
IR β	zec poliklonsko	sc-711	Santa Cruz	1:500

fosfo- IR β	zec poliklonsko	ab 60946	Abcam	1:250
IRS1	zec poliklonsko	sc-559	Santa Cruz	1:500
fosfo-IRS1	zec poliklonsko	ab 66153	Abcam	1:250
AMPK α	zec poliklonsko	#5831	Cell Signaling	1:1000
fosfo-AMPK	zec poliklonsko	#4188	Cell Signaling	1:2000
GLUT1	zec poliklonsko	ab 652	Abcam	1:1000
GLUT3	zec poliklonsko	ab 41525	Abcam	1:8000
GLUT4	zec poliklonsko	ab 654	Abcam	1:2000

3.5.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet hemiluminescentnog signala na skeniranim filmovima određen je densitometrijskom kvantitativnom analizom korišćenjem programskog paketa Image Quant (Version 5.2, GE Healthcare). Dobijene vrednosti svakog uzorka normalizovane su najpre u odnosu na odgovarajuću internu kontrolu, koja je nalivena za svaku membranu kako bismo mogli upoređivati uzorke sa različitih membrana. Interna kontrola predstavlja proteinski uzorak celog mozga pacova, koji je procesuiran na isti način kao i svi ostali proteinski uzorci i naliven je u poseban bunarić u istoj koncentraciji kao i uzorci ispitivanih struktura. Zatim su te dobijene vrednosti normalizovane u odnosu na vrednosti koje su dobijene za odgovarajući *Ponceau S* (35-110kDa), koji predstavlja endogenu kontrolu za nanesenu količinu totalnih proteina, čime su dobijene relativne vrednosti nivoa proteina. Radi lakšeg prikaza rezultata, dalje su rezultati imunoblot analize transformisani, time što su sve vrednosti AL i DR grupe podeljene sa srednjom vrednošću odgovarajuće starosne AL grupe, čime je postignuto da sve vrednosti budu blizu jedinice (na primer, vrednost za svaku životinju iz 12m AL i DR grupe je podeljena sa jednom brojkom koja predstavlja srednju vrednost 12m AL grupe. Takav način računanja je primenjen u svakoj starosnoj grupi). Efekat starenja i dijetalne restrikcije na ekspresiju ciljnog proteina izražavan je kao promena optičke gustine specifične proteinske trake u odnosu na vrednosti dobijene za odgovarajuće starosne kontrole.

3.6. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu podataka korišćen je softverski paket GraphPad Prism Software (San Diego, CA). Prvo su sve dobijene vrednosti testirane na normalnost raspodele koristeći D'Agostino Pirsonov test.

Za analizu intersesijske habituacije (lokomotorna i vertikalna aktivnost) korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjima (starenje i dani su uzeti kao faktori), praćena Tukijevim *post hoc* testom sa višestrukim poređenjem. Rezultati su prikazani kao p vrednost i F vrednost ($F_{(DFn, DFd)}$, DFn označava broj eksperimentalnih grupa minus 1 (n-1); DFd označava (broj uzoraka po grupi-1) x broj grupa). Za statističku obradu intrasesijske habituacije korišćen je parni t-test. Poređenje odgovarajućih starosno-zavisnih AL i DR grupa u testu otvorenog polja je odrađeno pomoću neparametarskog Men-Vitni (*engl.* Mann-Whitney) *U*-testa jer dobijene vrednosti nisu pokazale normalnu raspodelu. Za analizu efekta starenja i različitih režima ishrane u testu Y lavirinta je korišćena dvofaktorska ANOVA, a potom i Tukijev *post hoc* test sa višestrukim poređenjem. Svi podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (*engl.* *Standard Error of Mean*, SEM). Analiza podataka za *frailty score* je urađena pomoću Pirsonovog Hi-kvadrat testa, a za pojedinačne parametre pomoću G-testa sa Vilijamsonovom korekcijom za mali broj uzoraka.

Dobijeni podaci biohemijskih parametara i *Western blot* analize nisu pokazali normalnu raspodelu, te su analizirani pomoću neparametarskog Men-Vitni *U*-testa.

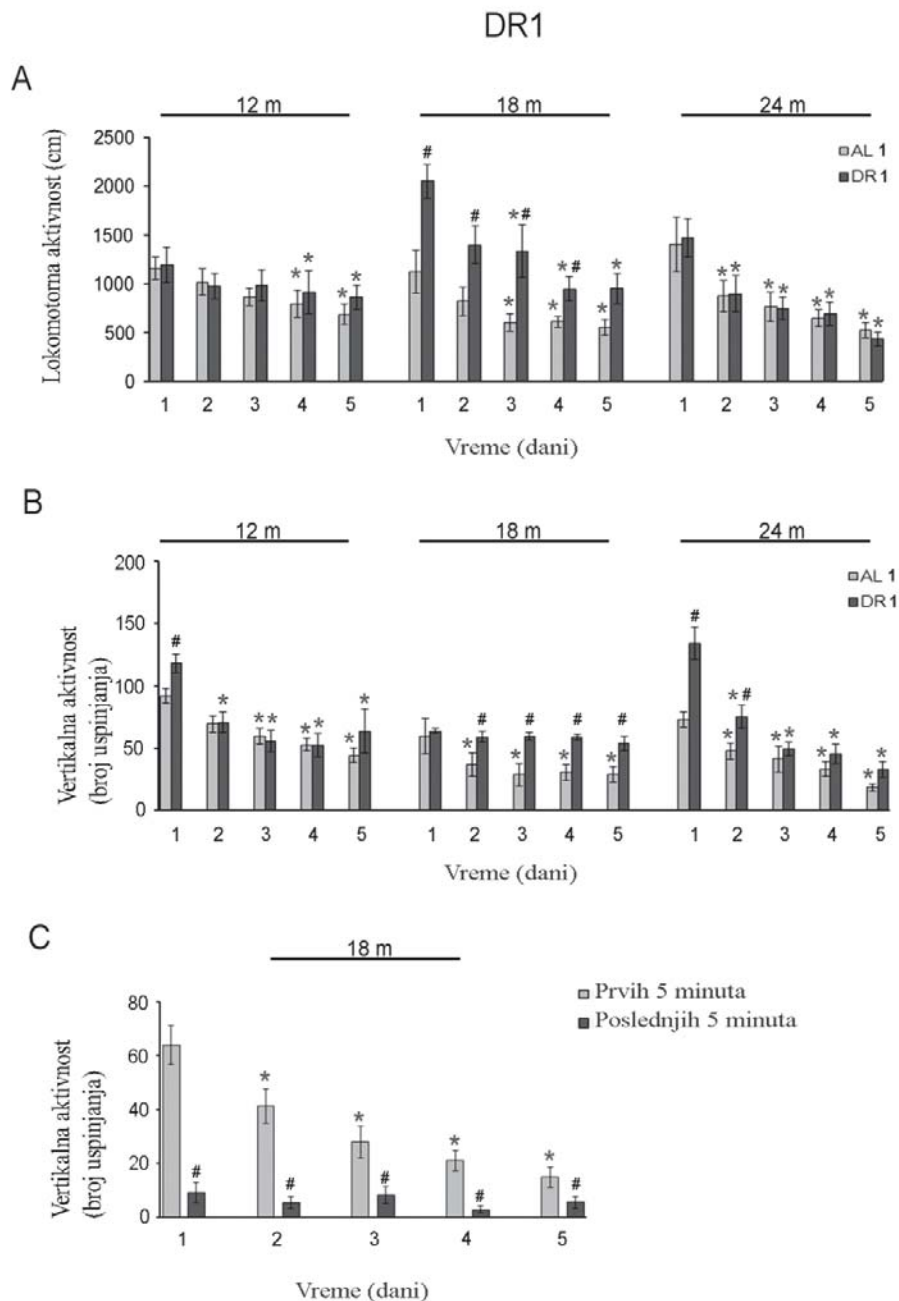
Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Testovi ponašanja

4.1.1. Uticaj starenja i različitih režima ishrane na aktivnost životinja u testu otvorenog polja

Pomoću testa otvorenog polja praćene su lokomotorna, vertikalna aktivnost, kao i habituacija (Slika 1-4). Statistička analiza nije pokazala značajan uticaj starenja na lokomotornu i eksploratornu aktivnost ni u jednoj od ispitivanih grupa (AL1, AL2, DR1, DR2, DR3) (Slika 4.1 i 4.2)

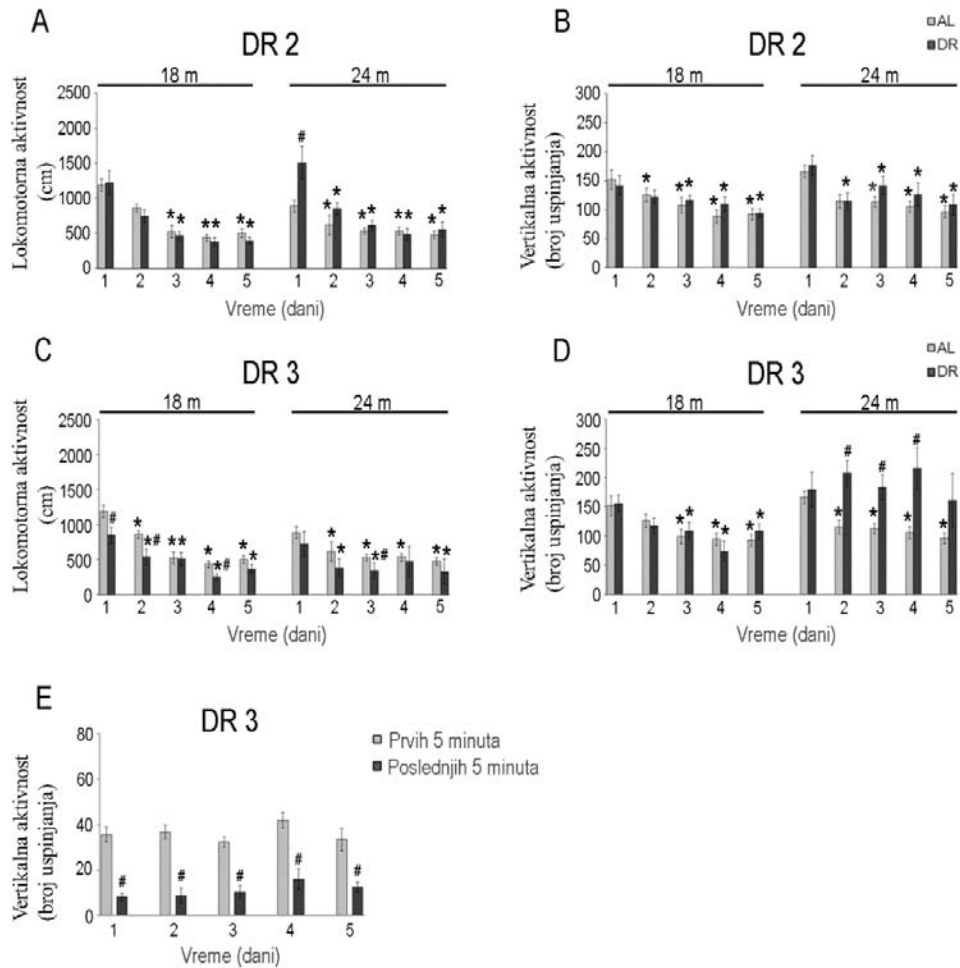


Slika 4.1. Lokomotorna i vertikalna aktivnost 12, 18 i 24 meseca starih *ad libitum* (AL1) i životinja na dijetalnoj restrikciji (DR1) u testu otvorenog polja. (A) Međusesijska habituacija lokomotorne i (B) vertikalne aktivnosti AL1 i DR1 životinja u testu otvorenog polja, merena tokom 40 minuta i tokom 5 sukcesivnih dana. (C) Među- i unutarsesijska habituacija DR1 grupe životinja starih 18m u prvim i poslednjih 5 minuta sesije tokom 5 dana. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška. * $p < 0.05$ u odnosu na prvi dan iste grupe, # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Poređenjem aktivnosti DR1 grupe i odgovarajuće AL1 kontrole, došlo se do zaključka da dijetalna restrikcija znatno utiče na lokomotornu i vertikalnu aktivnost

životinja. Naime, DR1 režim je doveo do povećanja lokomotorne aktivnosti kod 18 meseci starih životinja i to tokom prva četiri dana ispitivanja (1.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0104$, 2.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0350$, 3.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0379$, 4.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0175$, slika 1A). Prvog dana to povećanje je iznosilo 82%, drugog dana 85% a trećeg čak 170%. Vertikalna aktivnost je bila značajno izraženija u prvom danu kod DR1 životinja starih 12 (povećanje od 28%) i 24 meseca (povećanje od 83%), a od drugog dana i kod 18mDR1 životinja (1.dan 12m AL1/DR1 $p=0.0099$; 2.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0390$; 24m AL1/DR1 $p=0.0260$; 3.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0092$; 24m AL1/DR1 $p=0.0316$; 4.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0019$; 5.dan 18m AL1/DR1 $p=0.0278$, slika 1B).

Detektovana aktivnost životinja je pokazala da je vreme imalo značajan efekat na lokomotornu (AL1: $F_{(4,76)}=20.6$, $p<0.0001$, DR1: $F_{(4,80)}=11.34$, $p<0.0001$) i vertikalnu aktivnost (AL1: $F_{(4,76)}=35.21$, $p<0.0001$, DR1: $F_{(4,84)}=34.62$, $p<0.0001$) kod AL1 i životinja izloženih DR1 restriktivnom režimu ishrane (Slika 1). Pad ukupne aktivnosti je uočen kod svih starosnih grupa bez obzira na režim ishrane i ukazuje na normalnu habituaciju. Izuzetak su predstavljale 18 meseci stare DR1 životinje kod kojih je detektovano odsustvo međusesijske habituacije u vertikalnoj aktivnosti. Urađena je dodatna analiza vertikalne aktivnosti pomenute grupe tokom prvih i poslednjih 5 minuta svake sesije i to kroz svih 5 dana (Slika 1C). Ova analiza je pokazala da 18 meseci stare DR1 životinje ipak pokazuju kako međusesijsku (posmatrajući prvih 5 minuta svakog dana, $F_{(2,319,13,92)}=39.57$, $*p<0,0001$), tako i unutarsesijsku habituaciju (posmatrajući prvih i poslednjih 5 minuta svake sesije) ($\#p<0.05$).



Slika 4.2. Lokomotorna i vertikalna aktivnost 18 i 24 meseca starih *ad libitum* (AL2) i životinja na dijetalnoj restrikciji (DR2 i DR3) u testu otvorenog polja. (A) Međusesijska habituacija lokomotorne i (B) vertikalne aktivnosti AL2 i DR2 životinja i (C) lokomotorne i (D) vertikalne aktivnosti AL2 i DR3 životinja u testu otvorenog polja, merena tokom 40 minuta i tokom 5 sukcesivnih dana. Među- i unutarsetsijska habituacija DR3 grupe životinja starih 24m u prvih i poslednjih 5 minuta sesije tokom 5 dana (E). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška. * $p < 0.05$ u odnosu na prvi dan iste grupe, # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Uticaj DR2 režima ishrane se ogledao u povećanju lokomotorne aktivnosti od 70% u toku prvog dana kod najstarije grupe životinja ($p < 0.05$, slika 2A, svetlosivi stubići). Statistička analiza testa otvorenog polja pokazala je da životinje na DR2 režimu, kao i odgovarajuće AL2 kontrole pokazuju normalnu habituaciju tokom testiranja (Slika 4.2A,B), odnosno da lokomotorna i vertikalna aktivnost kod obe grupe značajno opada sa vremenom (lokomotorna aktivnost: AL2: $F_{(4,180)} = 28.45$, $p < 0.0001$; DR2:

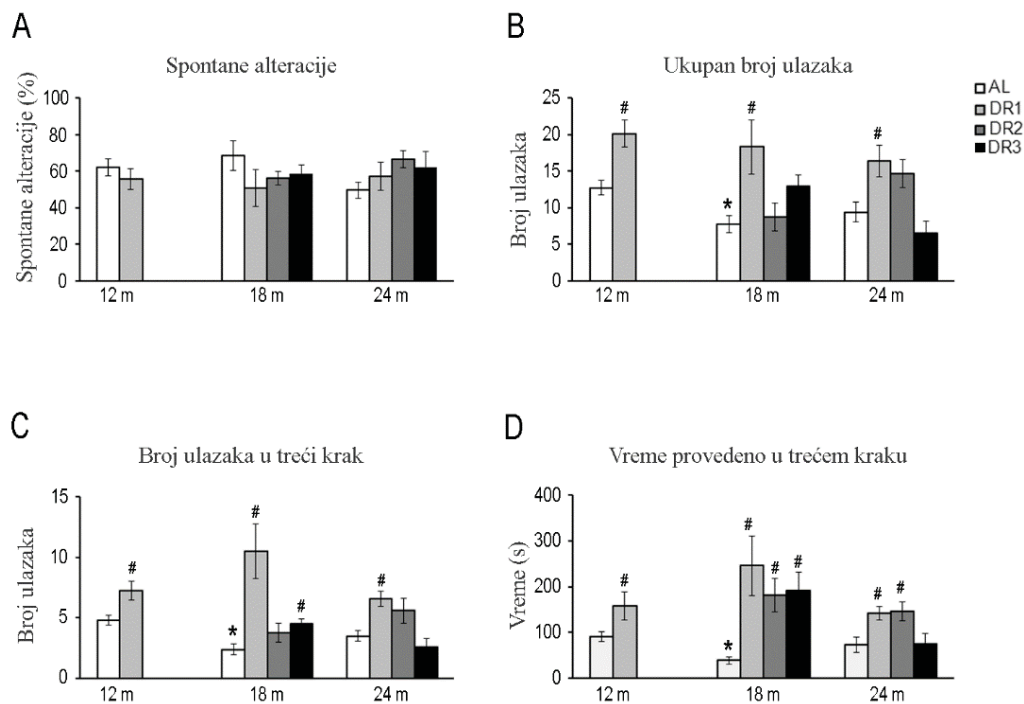
$F_{(4,128)}=37.90$, $p<0.0001$; vertikalna aktivnost: AL2: $F_{(4,180)}=29.21$, $p<0.0001$; DR2: $F_{(4,148)}=10.25$, $p<0.0001$).

Prilikom analize ponašanja životinja koje su najkraće bile na restriktivnom režimu, odnosno DR3 grupe, primećeno je da su obe starosne grupe životinja izložene DR3 režimu ishrane prešle značajno kraći put u odnosu na odgovarajuću starosnu AL2 grupu životinja ($p<0.05$), što ukazuje na potencijalno negativno dejstvo ove kratke dijeta. Za razliku od lokomotorne aktivnosti, gde je uočen pad kod DR3 pacova u odnosu na odgovarajuću *ad libitum* kontrolu, vertikalna aktivnost 24m starih DR3 životinja je bila izraženija u odnosu na kontrolu ($p<0.05$; slika 4.2D).

Uočena je normalna habituacija lokomotorne aktivnosti kod obe ispitivane starosti ($F_{(4,64)}=9.293$, $p<0.0001$; slika 2C). Međutim, dok je vertikalna aktivnost kod životinja starih 18 meseci ($F_{(1,16)}=9.181$, $*p<0.008$; slika 4.2D) opadala kroz dane na način uobičajen za normalnu habituaciju, najstarija grupa životinja (24m) nije pokazala očekivani pad vertikalne aktivnosti kroz dane (Slika 4.2D, crni stubići), odnosno nije normalno habituirala. Odsustvo međusesijske habituacije je uočeno kod ove grupe i pri analizi samo prvih 5 minuta detektovane vertikalne aktivnosti kroz eksperimentalne dane (Slika 4.2E, svetlosivi stubići). Međutim, daljom analizom prvih i poslednjih 5 minuta u okviru svake sesije zasebno, ustanovljeno je da postoji pad u aktivnosti u okviru svake sesije, odnosno da je prisutna unutar-sesijska habituacija ($\#p<0.05$, slika 4.2E).

4.1.2. Uticaj starenja i različitih režima ishrane na prostornu memoriju životinja u Y lavirintu

Koristeći Y lavirint kao test ponašanja, analizirane su spontane alteracije, ukupan broj ulazaka u sva tri kraka Y lavirinta, broj ulazaka u treći (nepoznati) krak, i vreme provedeno u trećem kraku, kod životinja u toku starenja i pod uticajem različitih režima dijetalne restrikcije.



Slika 4.3. Ponašanje 12, 18 i 24 meseca starih *ad libitum* (AL) i životinja na dijetalnoj restrikciji (DR1, DR2 i DR3) u Y lavirintu. (A) Spontane alteracije, (B) ukupan broj ulazaka, (C) broj ulazaka u treći krak i (D) vreme provedeno u trećem kraku. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška. * $p < 0.05$ u odnosu na 12 meseci staru AL grupu, # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Korišćenjem dvofaktorske ANOVA statističke analize je pokazano da starenje kao proces ima značajan uticaj na ukupan broj ulazaka ($F_{(2,67)}=10.61$, $p < 0.001$), broj ulazaka u treći krak ($F_{(2,68)}=3.500$, $p=0.0375$), kao i na vreme koje životinja provodi u trećem kraku ($F_{(1,53)}=4.375$, $p=0.0413$) (slika 4.3B-D, beli stubići). *Tukey post hoc* testom je pokazano da u poređenju sa 12 meseci starom AL grupom dolazi do smanjenog broja ulazaka starijih AL životinja (18 i 24m) u sva tri kraka ($p=0.0286$), ulazaka u treći krak ($p=0.0008$) i vremena koje ove životinje provode u trećem kraku ($p=0.0351$).

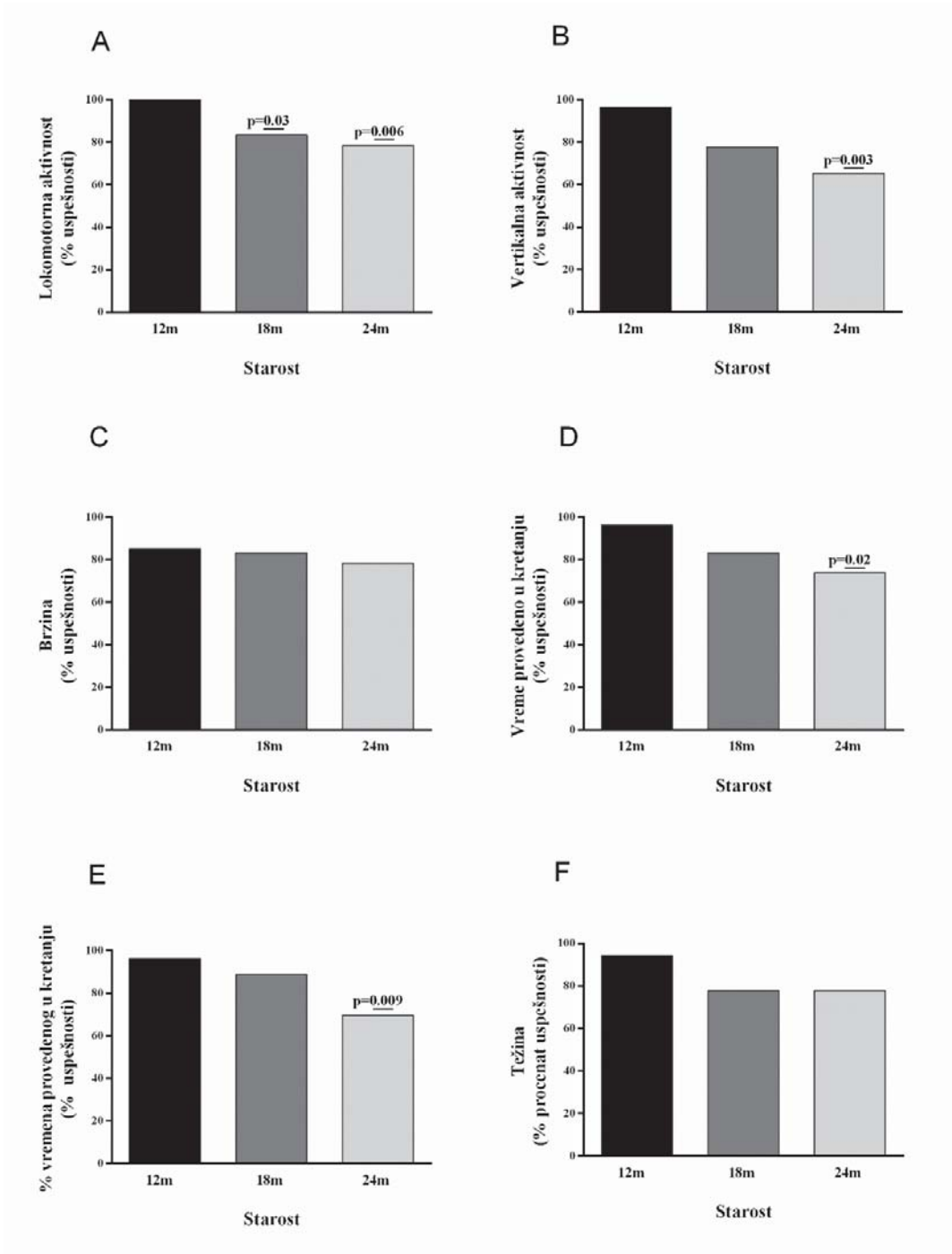
Dvofaktorska ANOVA je takođe pokazala da različiti dijetalni režimi ishrane nemaju uticaja na broj spontanijih alteracija, odnosno promena kraka u koji životinje ulaze u Y lavirintu (slika 4.3A). Nasuprot tome, ukupan broj ulazaka u krake ($F_{(3,56)}=8.515$, $p < 0.001$), broj ulazaka u treći krak ($F_{(3,54)}=15.74$, $p < 0.001$) i vreme koje su životinje provodile u trećem kraku ($F_{(3,53)}=19.48$, $p < 0.001$) su bili značajno izmenjeni pod uticajem različitih načina ishrane (slika 4.3B,C svetlosivi stubići).

Tukey's post hoc testom je pokazano da je DR1 režim značajno povećavao ukupan broj ulazaka u sva tri kraka, kod 12 mDR1 za 57%, 18mDR1 za 136% a kod 24mDR1 za

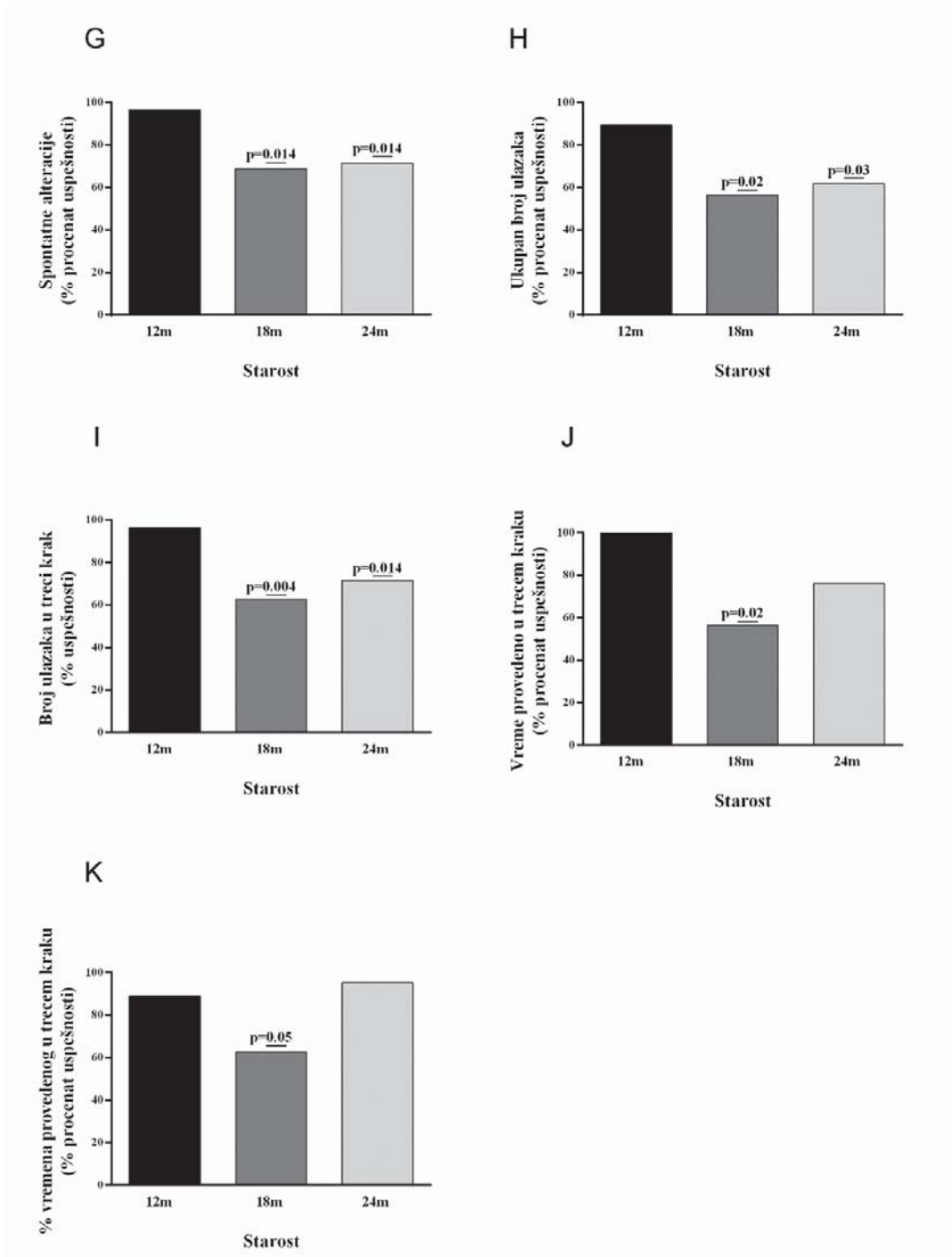
112% (12 meseci: $p=0.0166$; 18 meseci: $p=0.0015$; 24 meseca: $p=0.048$). Značajan je bio i uticaj DR1 na broj ulazaka u treći krak (12 meseci: $p=0.0119$, 18 meseci: $p=0.0001$, 24 meseca: $p=0.042$) i to povećanje je kod 12m iznosilo 81%, kod 18m 342%, a kod 24m starih životinja je iznosilo 113% u poređenju sa odgovarajućom starosnom AL grupom. DR1 i DR2 režimi su produžili vreme provedeno u trećem, nepoznatom kraku u svim ispitivanim starosnim grupama u odnosu na odgovarajuću kontrolu (12 meseci: DR1 $p=0.043$; 18 meseci DR1 i DR2: $p<0.0001$ i $p<0.0001$; 24 meseca DR1 i DR2: $p=0.0176$, $p=0.0094$) (slika 3D). Restriktivni režim ishrane koji je najkraće trajao (DR3) je doveo do promena samo kod životinja starih 18 meseci, kod kojih je detektovan povećan broj ulazaka u treći krak za 89% ($p=0.00251$), kao i duže vreme koje su životinje provele u istraživanju trećeg kraka (391%) ($p<0.0001$) (slika 4.3C i D).

4.1.3. Uticaj različitih režima ishrane na *frailty score* (FS) kod životinja tokom starenja

Da bismo bolje shvatili kakav uticaj različiti režimi ishrane mogu imati na motoričke i kognitivne sposobnosti kod pacova u toku starenja, formirali smo takozvani *frailty score* (FS) na osnovu 10 parametara dobijenih iz testova otvorenog polja i Y lavirinta. Ovim parametrima je priključena i težina, kao 11-ti parametar. Proces izračunavanja je veoma složen i sastojao se iz dve faze. U prvoj fazi je bilo potrebno odrediti kako starenje i pojedinačni režimi ishrane utiču na svaki parametar ponaosob (slika 4.4-4.6). Zatim je u drugoj fazi određen *frailty score* (FS) na osnovu pomenutih pojedinačnih parametara (slika 4.7).



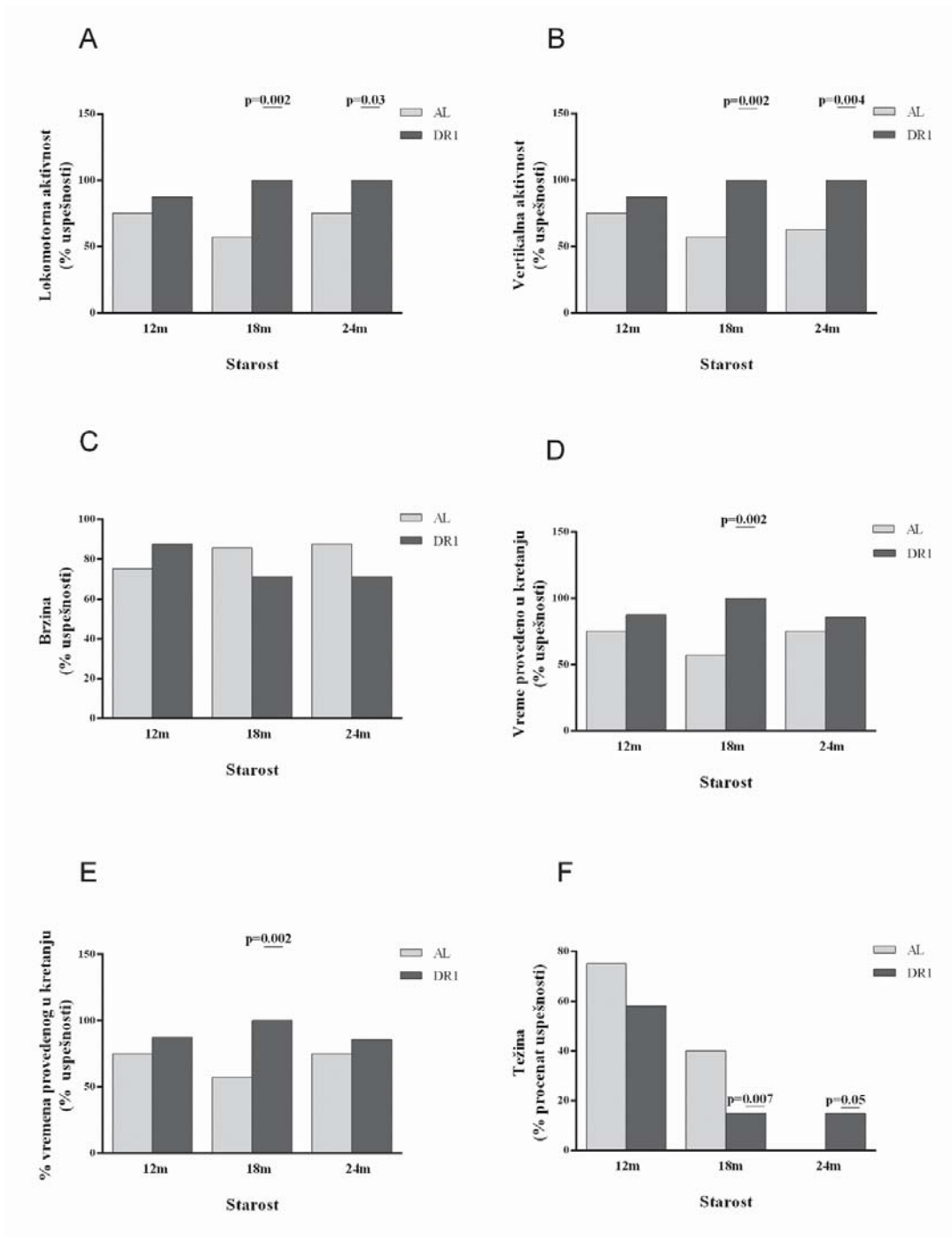
Slika 4.4. *Frailty score* parametri (FS) tokom starenja Wistar pacova dobijeni u testu otvorenog polja. A) promene u lokomotornoj aktivnosti B) promene u vertikalnoj aktivnosti C) brzina D) vreme provedeno u kretanju E) procenat vremena provedenog u kretanju F) težina životinja 12, 18 i 24 meseci starih AL pacova. * $p < 0.05$ u odnosu na 12 meseci staru AL kontrolu.



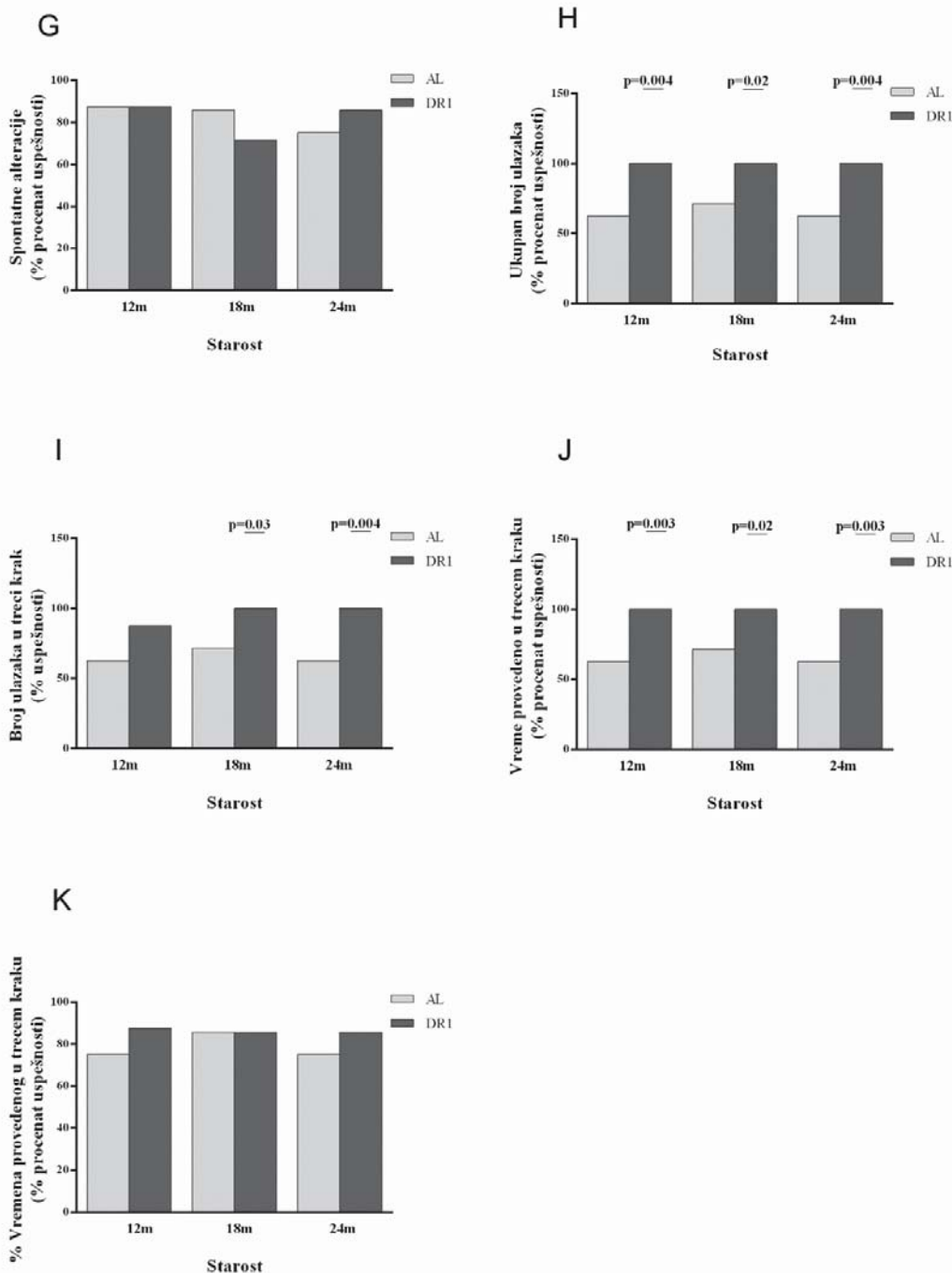
Slika 4.5. Frailty score parametri (FS) tokom starenja Wistar pacova dobijeni u testu Y lavirinta. A) spontane alteracije (SAB) B) ukupan broj ulazaka C) broj ulazaka u treći krak D) vreme provedeno u trećem kraku E) procenat ulaska u treći krak 12, 18 i 24 meseci starih AL pacova. *p<0.05 u odnosu na 12 meseci staru AL kontrolu.

Rezultati su pokazali da tokom starenja dolazi do povećanja broja životinja koje su ispunjavale kriterijum krhkosti u devet parametara od analiziranih 11 (Slika 4.4 i 4.5). Životinje stare 18 meseci nisu uspešno prošle test lokomotorne aktivnosti (p=0.03),

spontanih alteracija ($p=0.014$), ukupnog broja ulazaka ($p=0.02$), broja ulazaka u treći krak ($p=0.004$), vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.02$) i procenta vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.03$) (slika 4.4.A i 4.5.A,B,C,D). Najstarija analizirana grupa životinja (24m) nije prošla testove lokomotorne ($p=0.006$) i vertikalne aktivnosti ($p=0.003$), vremena provedenog u kretanju ($p=0.002$), procenta vremena provedenog u kretanju ($p=0.009$), spontanih alteracija ($p=0.014$), ukupnog broja ulazaka ($p=0.03$) i broja ulazaka u treći krak ($p=0.014$), (slika 4.4A,B,D,E i 4.5A,B,C).



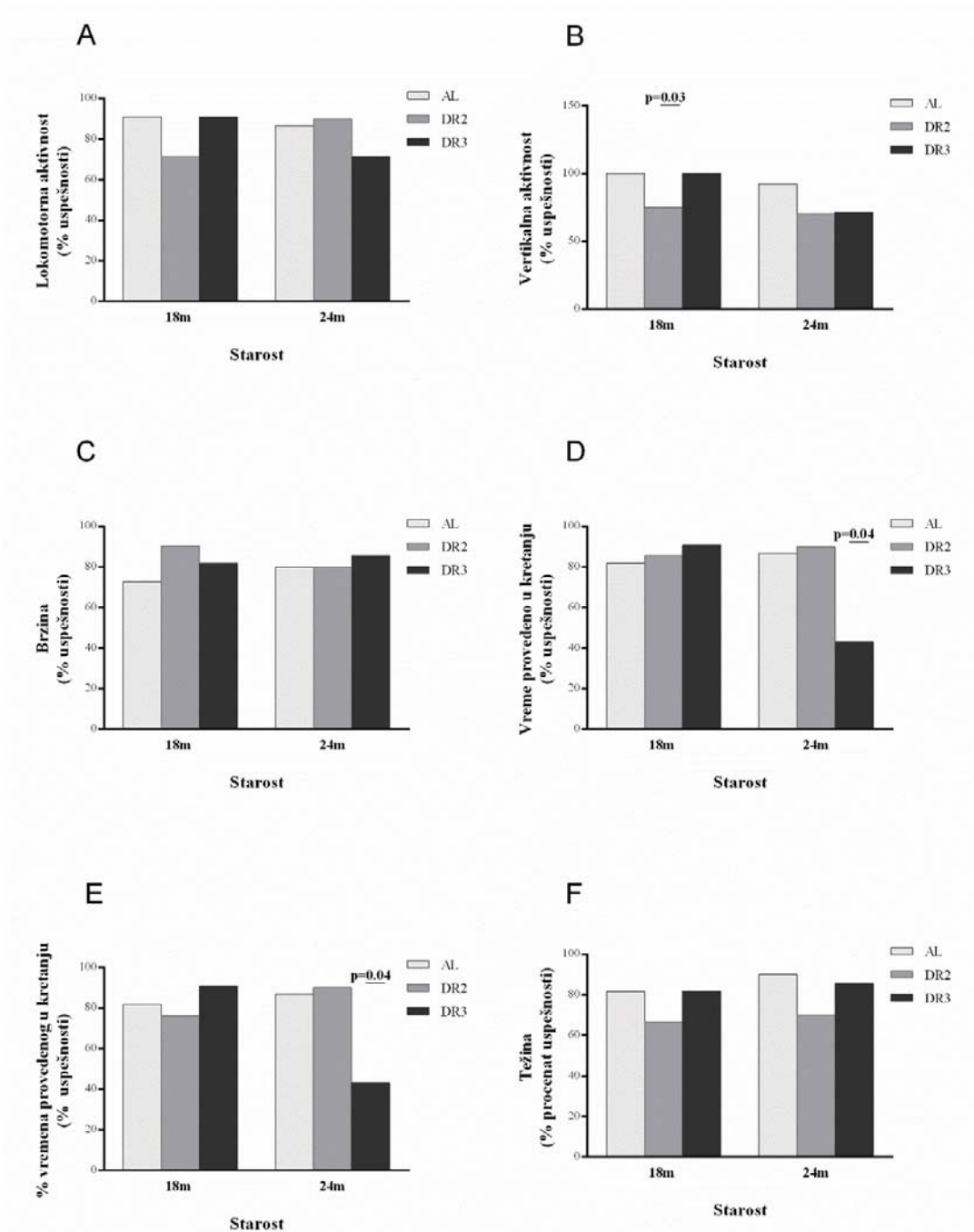
Slika 4.6. Parametri korišćeni za računanje *Frailty score* (FS) kod Wistar pacova na DR1 režimu ishrane dobijeni u testu otvorenog polja A) promene u lokomotornoj aktivnosti B) promene u vertikalnoj aktivnosti C) brzina D) vreme provedeno u kretanju E) procenat vremena provedenog u kretanju F) težina životinja 12, 18 i 24 meseca starih pacova. $p < 0.05$ u odnosu na 12 meseci staru AL1 kontrolu



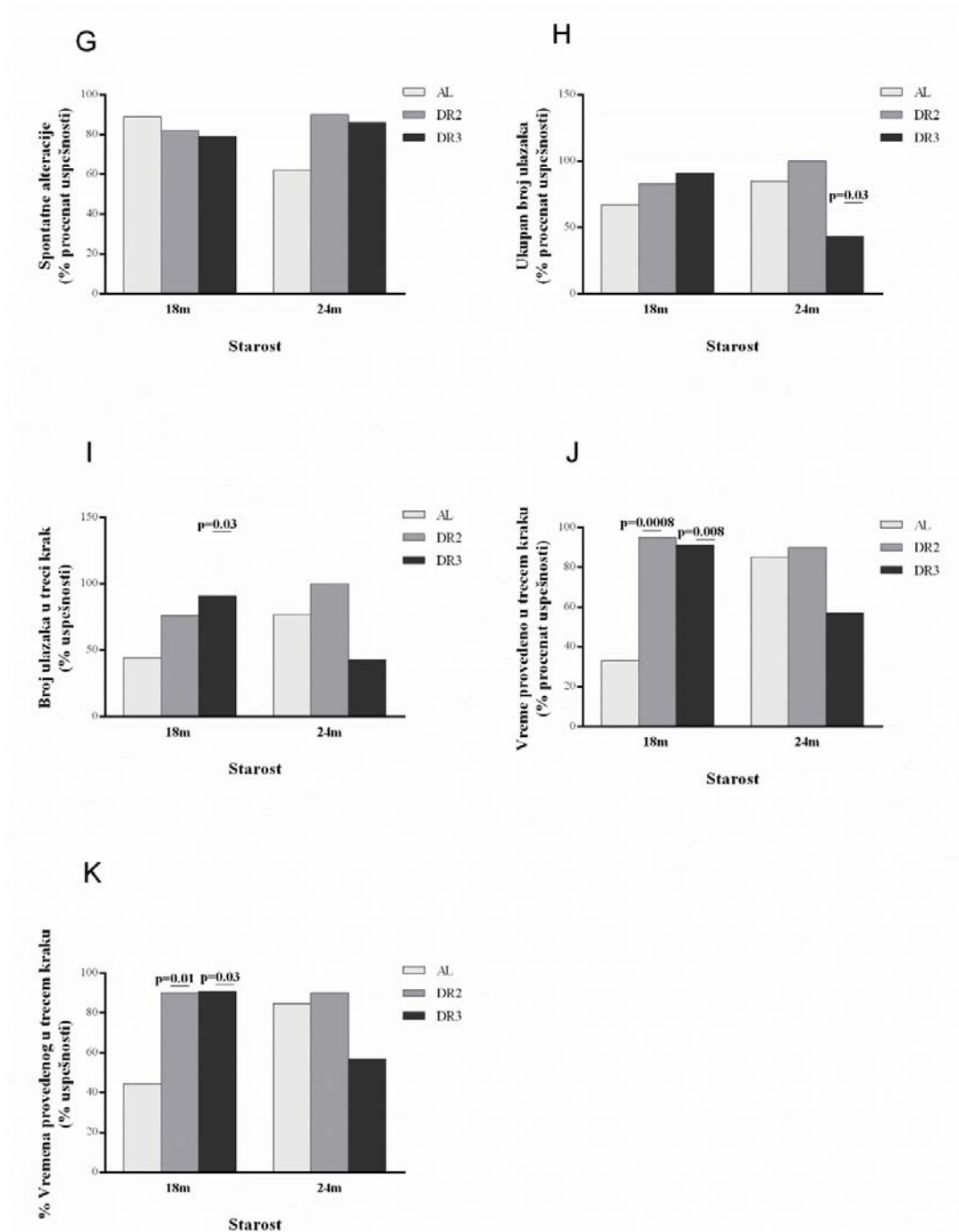
Slika 4.7. Parametri korišćeni za računanje *Frailty score* (FS) kod Wistar pacova na DR1 režimu ishrane dobijeni u testu Y lavirinta A) spontane alteracije B) ukupan broj ulazaka C) broj ulazaka u treći krak D) vreme provedeno u trećem kraku E) procenat ulaska u treći krak 12, 18 i 24 meseca starih pacova. $p < 0.05$ u odnosu na 12 meseci staru AL1 kontrolu

Pozitivan efekat dijetalne restrikcije najdužeg trajanja, prethodno detektovan u testu otvorenog polja i Y lavirinta, se ogledao i u uspešnosti ovih životinja da prođu većinu ispitivanih testova izabranih da definišu stepen krhkosti, odnosno frailty score

(Slika 4.6 i 4.7). Pozitivan efekat DR1 režima se detektovao već u prvoj ispitivanoj staosnoj grupi, odnosno kod 12 meseci starih DR1 životinja. u testovima broja ulaska u treći krak ($p=0.004$) i vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.003$) (Slika 4.7B,D). Životinje stare 18 meseci, koje su počevši od šestog meseca starosti bile izložene DR1 režimu ishrane u trajanju od godinu dana, su uspešno prošle testove lokomotorne ($p=0.002$) i vertikalne ($p=0.002$) aktivnosti, test vremena provedenog u kretanju ($p=0.002$), procenta vremena provedenog u kretanju ($p=0.002$), ukupnog broja ulazaka ($p=0.02$), broja ulazaka u treći krak ($p=0.03$) i vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.02$) (slika 4.6A,B,D,E, i 4.7B,C,D, tamni stubići). Jedini parametar u kom su životinje iz ove dijetalne grupe pokazale loš rezultat je promena težine, gde je pokazano da su životinje stare 18 meseci na DR1 ishrani imale manju težinu od odgovarajuće AL kontrole ($p=0.02$) (Slika 4.6F). Najstarija grupa životinja koja je pod DR1 restriktivnim režimom provela 18 meseci, je uspešno prošla testove lokomotorne ($p=0.003$) i vertikalne aktivnosti ($p=0.004$), ukupnog broja ulazaka ($p=0.004$), broja ulazaka u treći krak ($p=0.004$) i vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.003$) i imala manju promenu težine u odnosu na odgovarajuću AL kontrolu ($p=0.005$), (slika 4.6A,B,D,F i 4.7B,C,D).



Slika 4.8. Parametri korišćeni za računanje *Frailty score* (FS) kod Wistar pacova na DR2 i DR3 režimu ishrane dobijeni u testu otvorenog polja A) promene u lokomotornoj aktivnosti B) promene u vertikalnoj aktivnosti C) brzina D) vreme provedeno u kretanju E) procenat vremena provedenog u kretanju F) težina životinja 18 i 24 meseca starih pacova. $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL2 kontrolu



Slika 4.9. Parametri korišćeni za računanje *Frailty score* (FS) kod Wistar pacova na DR2 i DR3 režimu ishrane dobijeni u testu Y lavirinta **A**) spontane alteracije **B**) ukupan broj ulazaka **C**) broj ulazaka u treći krak **D**) vreme provedeno u trećem kraku **E**) procenat ulaska u treći krak 18 i 24 meseca starih pacova. $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL2 kontrolu

Efekat DR2 i DR3 režima ishrane se mogao uočiti samo kod životinja starih 18 meseci i samo u nekim parametrima. Vreme provedeno u trećem kraku ($p=0.0008$) i procenat vremena provedenog u trećem kraku ($p=0.01$) su bili značajno povećani kod

DR2 grupe (slika 4.9D,E). DR3 režim ishrane je imao, osim na ova dva parametra, pozitivan efekat i na broj ulazaka u treći krak ($p=0.03$) (slika 4.9C,D,E). Sa druge strane, u DR2 grupi, životinje stare 18 meseci su pokazale negativan rezultat u testu vertikalne aktivnosti ($p=0.003$) (slika 4.9B), a u DR3 grupi, 24 meseca stare životinje u vremenu provedenom u kretanju ($p=0.04$), procentu vremena provedenog u kretanju ($p=0.04$) i ukupnom broju ulazaka u treći krak (slika 4.8D,E i 4.9B).

Tabela 4.1. Prikaz načina određivanja *Frailty score* (FS) kod 12, 18 i 24 meseca starih AL1 i DR1 Wistar pacova. Za svaki parametar korišćen u računanju FS je predstavljen broj životinja koje su imale vrednosti ispod prelomne tačke (u najnižih 20%). Računanje FS: za svaku eksperimentalnu grupu je podeljen broj testova koji nisu položile sa ukupnim brojem testova i takav FS je predstavljen kao procenat.

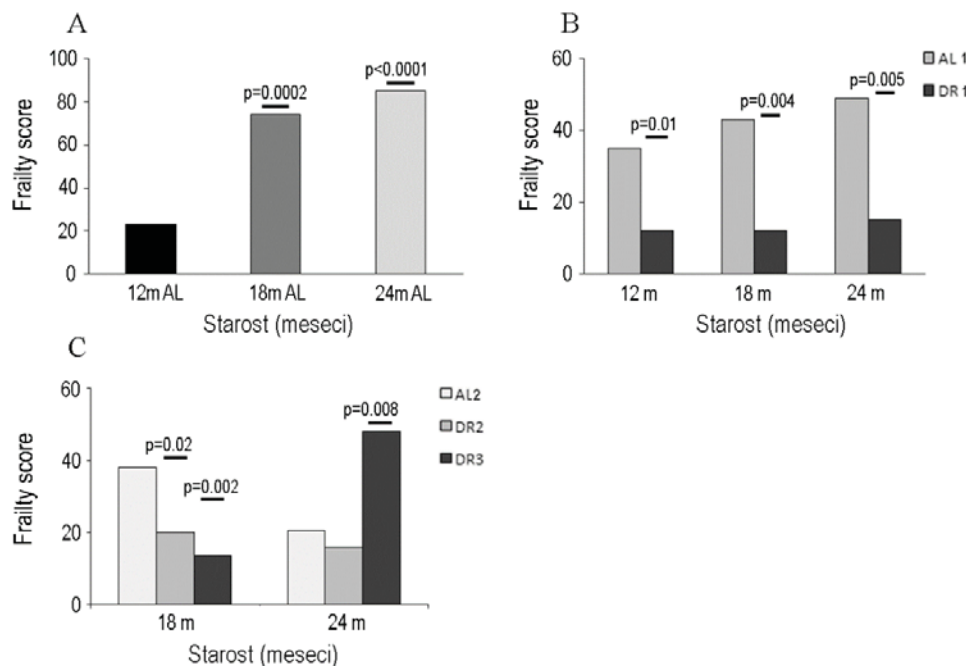
		12 meseci		18 meseci		24 meseci	
		AL1	DR1	AL1	DR1	AL1	DR1
Broj životinja ispod prelomne tačke (u najnižih 20%)	Lokomotorna aktivnost	2	1	3	0	2	0
	Vertikalna aktivnost	2	1	3	0	3	0
	Brzina	2	1	1	2	1	2
	Vreme provedeno u kretanju	2	1	3	0	2	1
	% vremena provedenog u kretanju	2	1	3	0	2	1
	Težina	1	1	2	3	5	4
	SAB	1	1	1	2	2	1
	Ukupan broj ulazaka	3	0	2	0	3	0
	Broj ulazaka u 3. krak	3	1	2	0	3	0
	Vreme provedeno u 3. kraku	3	0	2	0	3	0
	% broja ulaska u 3. krak	2	1	1	1	2	1
Ukupan broj testova koje su životinje pale (A)		23	9	23	8	28	10
Ukupan broj testova koje su životinje prošle (B)		65	77	53	66	57	66
(A/B)		0.35	0.12	0.43	0.12	0.49	0.15
Frailty score (A/Bx100)		35	12	43	12	49	15

Tabela 4.2. Prikaz načina određivanja *Frailty score* (FS) kod 18 i 24 meseca starih AL2 i DR2 i DR3 Wistar pacova. Za svaki parametar korišćen u računanju FS je predstavljen broj životinja koje su imale vrednosti ispod prelomne tačke (u najnižih 20%). Računanje FS: za svaku eksperimentalnu grupu je podeljen broj testova koji nisu položile sa ukupnim brojem testova i takav FS je predstavljen kao procenat.

		18 meseci			24 meseci		
		AL2	DR2	DR3	AL2	DR2	DR3
Broj životinja ispod prelomne tačke (u najnižih 20%)	Lokomotorna aktivnost	1	5	1	2	1	2
	Vertikalna aktivnost	0	5	0	1	3	2
	Brzina	3	1	2	3	2	1
	Vreme provedeno u kretanju	2	3	1	2	1	3
	% vremena provedenog u kretanju	2	4	1	2	1	3
	Težina	2	2	2	1	3	1
	SAB	1	2	4	5	1	1
	Ukupan broj ulazaka	3	3	1	2	0	4
	Broj ulazaka u 3. krak	5	4	1	3	0	4
	Vreme provedeno u 3. kraku	6	1	1	2	1	3
% broja ulaska u 3. krak	5	2	1	2	2	1	
Ukupan broj testova koje su životinje pale (A)		30	32	15	25	15	25
Ukupan broj testova koje su životinje prošle (B)		79	161	111	122	95	52
(A/B)		0.38	0.20	0.14	0.20	0.16	0.48
Frailty score (A/Bx100)		38	20	14	20	16	48

Uzimajući u obzir analizu svakog parametra ponaosob, izračunat je FS. Prvo je izračunat ukupan broj životinja koje su pale testove u svakoj AL i DR eksperimentalnoj grupi i za svaku starost i na taj način je dobijena vrednost A u Tabeli 4.1 i 4.2. Zatim je izračunata vrednost B, odnosno ukupan broj testova koje su životinje položile (uspešno prošle). Konačan FS je dobijen deljenjem broja palih sa brojem položenih testova za svaku grupu životinja (A/B). Prilikom računanja FS u toku starenja, objedinjene su obe kohorte AL životinja, jer se vrednosti praćenih parametara nisu značajno razlikovale (detaljno objašnjenje je dato u materijalu i metodama). Rezultati su pokazali da je u odnosu na 12 meseci, starenje 3.5 puta povećalo FS (221%) kod 18 ($p=0.0002$) i čak 4 puta (269%) kod 24 ($p<0.0001$) meseca starih životinja (Slika 4.10A). Dijetalni režimi ishrane su takođe pokazali značajan uticaj na stanje krhkosti, odnosno vrednost FS kod životinja. Najbolje rezultate je pokazao DR1 režim, smanjujući FS kod 12 meseci starih

životinja za 66%, kod 18 meseci 72% i kod najstarije grupe 70% u odnosu na svoju odgovarajuću starosnu kontrolu (12 meseci $p=0.01$, 18 meseci $p=0.04$, 24 meseca $p=0.05$; slika 4.10B). Drugim rečima, sve DR1 životinje su bile manje krhke u odnosu na odgovarajuće AL kontrole. DR2 i DR3 režim ishrane su smanjili FS samo kod 18 meseci starih životinja, DR2 za 47%, a DR3 za 64% (DR2 $p=0.2$, DR3 $p=0.002$, slika 4.10C). Dodatno, DR3 režim je kod najstarije grupe životinja imao negativan efekat, povećavajući procenat fragilnih životinja više nego duplo (slika 4.10C).



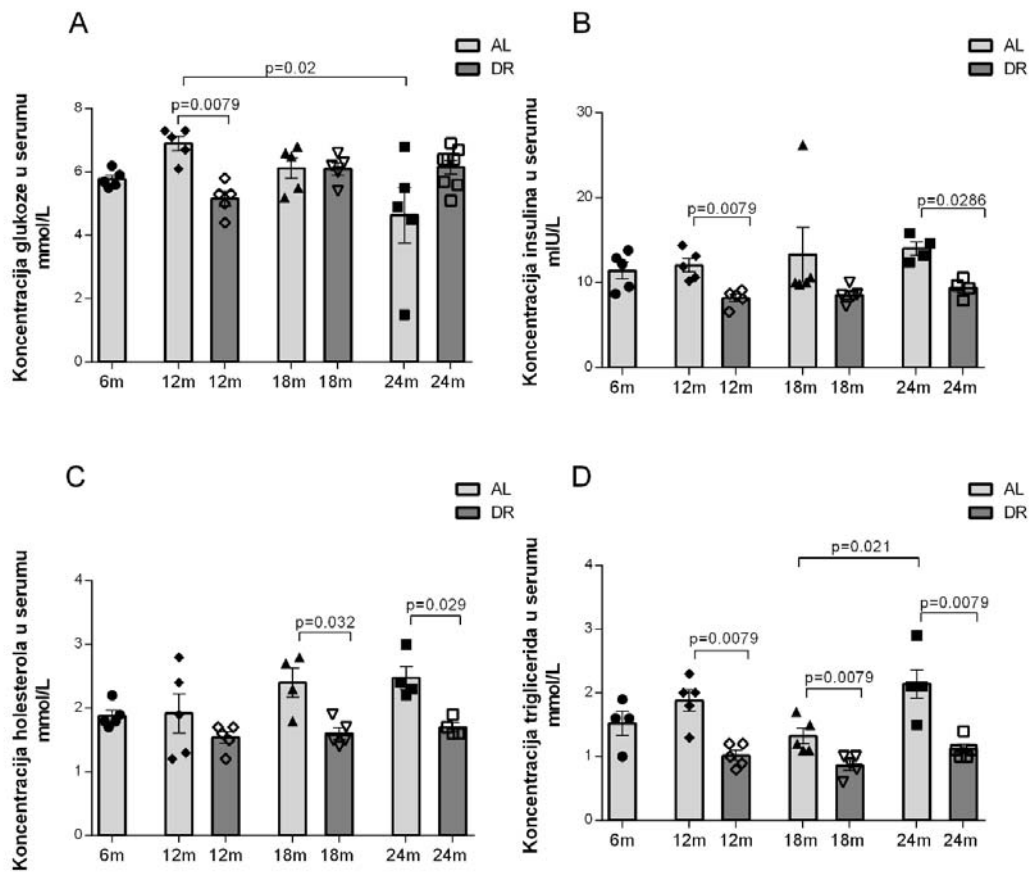
Slika 4.10. (A). Grafički prikaz FS kod AL životinja tokom starenja. (B) Grafički prikaz FS kod DR1 životinja tokom starenja. (C) Grafički prikaz FS kod AL, DR2 i DR3 životinja tokom starenja. $p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću AL kontrolu

4.2. Biohemijski parametri u serumu pacova

4.2.1. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR1 režima ishrane

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije praćen je na nivou biohemijskih parametara u serumu pacova. Na slici 4.11 su predstavljene vrednosti glukoze, insulina, holesterola i triglicerida u serumu pacova koji su bili podvrgnuti AL1 ili DR1 tipu ishrane u toku starenja. Kao što je već bilo pomenuto, usled dugog vremenskog perioda između izvođenja eksperimenta na DR1, odnosno DR2 i DR3 grupama životinja, bilo je neophodno uvesti dve AL kontrolne grupe. Prva AL (AL1) grupa je bila kontrola za DR1 tretman, dok je druga AL grupa (AL2) služila kao kontrola za DR2 i DR3 tretman. Ispitivanja su pokazala da tokom starenja dolazi do pada koncentracije glukoze od 48%

kod 24m starih životinja u odnosu na 12m ($p=0.02$) i do rasta koncentracije triglicerida od 62% u najstarijoj grupi u odnosu na 18m stare životinje ($p=0.021$) (Slika 4.11A i D). Kad je u pitanju uticaj dijetalne restrikcije, serumske analize su pokazale da kod 12m starih životinja, DR1 dovodi do značajnog smanjenja koncentracije glukoze (25%) ($p=0.0079$), insulina (32%) ($p=0.0079$) i triglicerida (84%) ($p=0.0079$) u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu (Slika 4.11A, B, D). Dugotrajna dijetalna restrikcija primenjena u ovoj studiji je u grupi životinja starih 18m uzrokovala smanjenje holesterola (50%) ($p=0.032$) i triglicerida (53%) ($p=0.079$) u serumu, a kod najstarije grupe pacova dovela do smanjenja insulina (33%) ($p=0.0286$), holesterola (30%) ($p=0.029$) i triglicerida (48%) ($p=0.0079$) (Slika 4.11A-D).

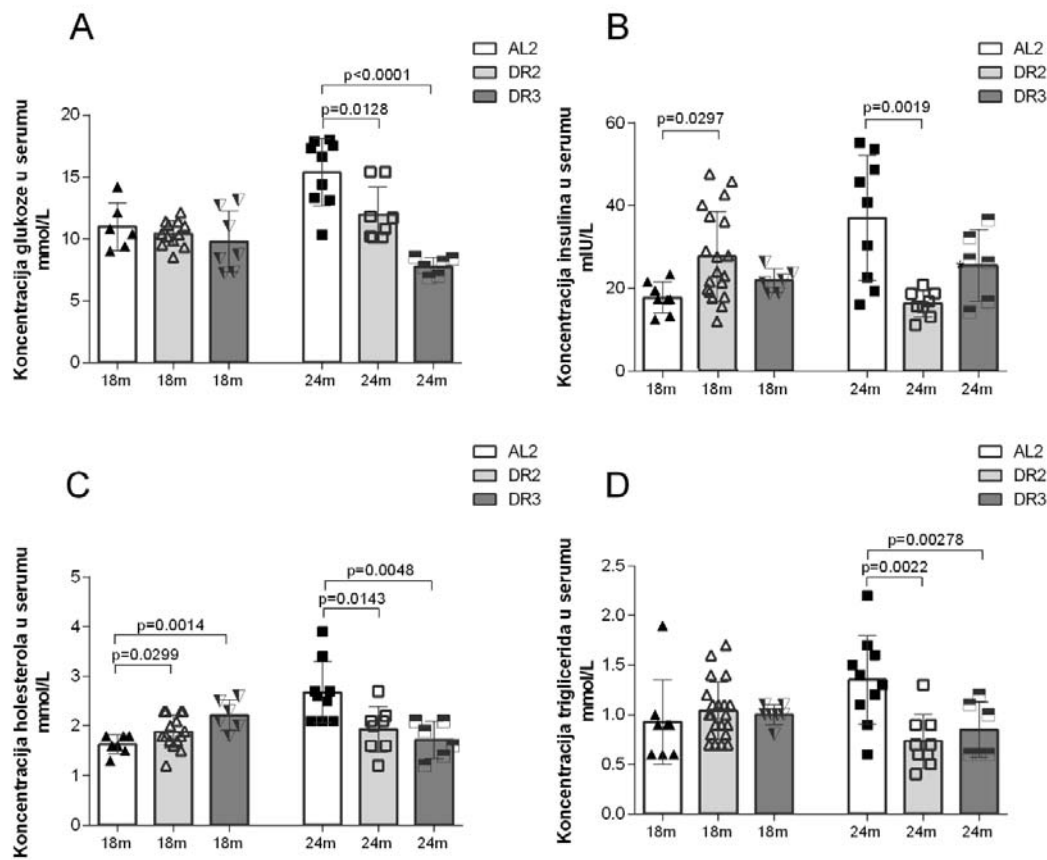


Slika 4.11. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR1 režima ishrane. (A) Koncentracija glukoze, (B) insulina, (C) holesterola i (D) triglicerida je izražena u odgovarajućim jedinicama i predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna greška. $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu

4.2.2. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR2 i DR3 režima ishrane

Na slici 4.12 su predstavljene vrednosti glukoze, insulina, holesterola i triglicerida u serumu pacova koji su bili podvrgnuti DR2 i DR3 tipu dijeta u toku starenja. Pod dejstvom DR2 režima ishrane došlo je do povećanja insulina od 72% ($p=0.0297$) i nešto manjeg ali statistički značajnog povećanja holesterola (18%) ($p=0.0299$) u grupi pacova starih 18m (Slika 4.12B i 4.12C). DR2 režim je kod najstarijih, 24 meseca starih, životinja doveo do promene u svim ispitivanim parametrima, uključujući smanjenje glukoze (22%) ($p=0.0128$), insulina (57%) ($p=0.0019$), holesterola (30%) ($p=0.0143$) i triglicerida (48%) ($p=0.0022$) (Slika 4.12A-E).

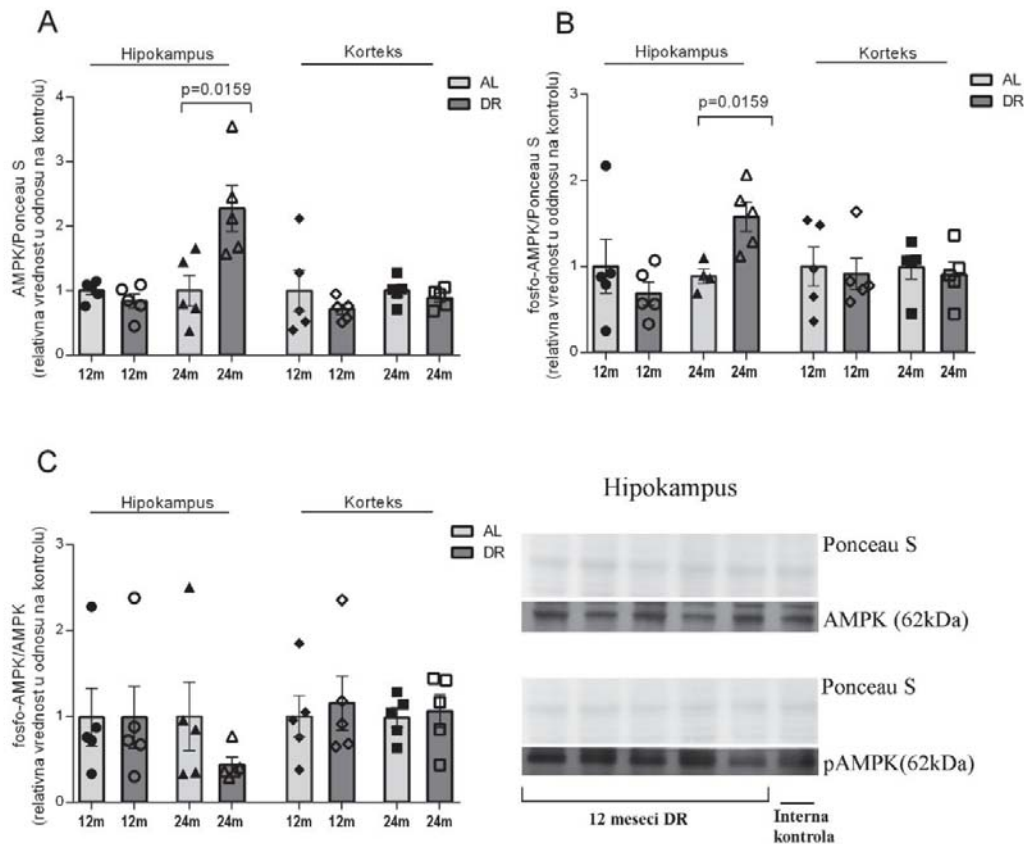
Biohemijska analiza seruma je pokazala da je najkraći režim ishrane doveo do povećanja holesterola od 38% kod 18m ($p=0.0014$) ali je kod 24m starih životinja smanjio nivo holesterola za 34% ($p=0.0048$) starih životinja (Slika 4.12C). Pored toga, kod 24m starih životinja DR3 režim je doveo do 50% smanjenja koncentracije glukoze ($p<0.0001$), holesterola (37%) ($p=0.0048$) i triglicerida (37%) ($p=0.00278$) (Slika 4.12A, D) u odnosu na odgovarajuću starosnu AL2 kontrolu.



Slika 4.12. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR2 i DR3 režima ishrane. (A) Koncentracija glukoze, (B) insulina, (C) holestrola i (D) triglicerida je izražena u odgovarajućim jedinicama i predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna greška. $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu

4.3. Promene u koncentraciji AMPK, njegove fosforilisane forme i glukoznih transportera u hipokampusu i kori prednjeg mozga pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane

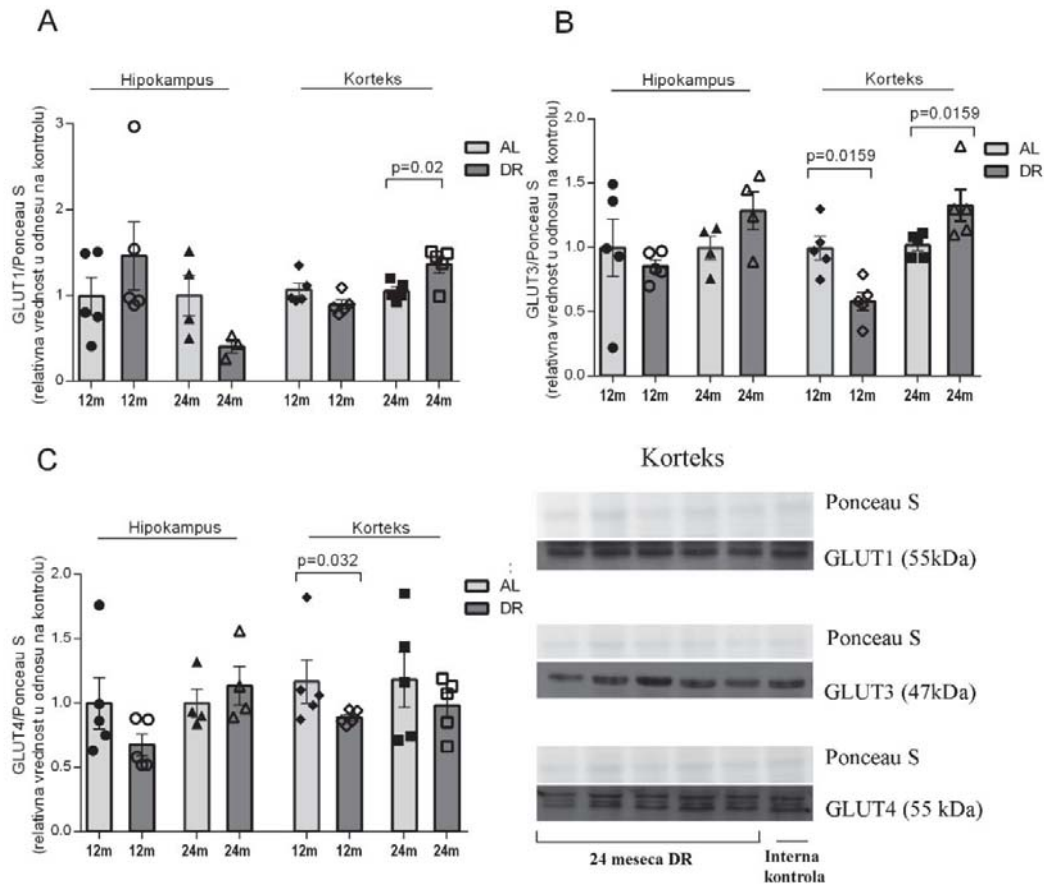
Kako bismo ispitali kakav uticaj DR1 režim ishrane ima na energetski balans, prvo smo pratili promene u ekspresiji ukupne i fosforilisane forme AMPK, kao glavnog energetskog senzora ćelije. Na slici 4.13 je prikazana analiza zastupljenosti AMPK i njene fosforilisane forme u kori velikog mozga i hipokampusu toku starenja i pod uticajem DR1. Statističkom analizom podataka je utvrđeno da DR1 režim dovodi do povećanja ekspresije AMPK (povećanje od 127%) i fosfo-AMPK (povećanje od 77%) proteina u hipokampusu najstarije grupe životinja, u poređenju sa starosno-odgovarajućom kontrolom (AMPK: $p = 0.0159$; fosfo-AMPK: $p = 0.0159$) (Slika 4.13A, B). Za razliku od hipokampusu, u kori mozga nisu detektovane statistički značajne promene (Slika 4.13A, B, C).



Slika 4.13. (A) Nivo ekspresije AMPK, (B) njegove fosforilisane forme (fosfo-AMPK) i (C) odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-AMPK/ukupni AMPK) u hipokampusu i kori mozga pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Nivo ekspresije proteina praćen je Western blot metodom. Intenzitet traka određen je denzitometrijski, primenom ImageQuant 5.0 softverskog paketa, a optička gustina normalizovana je u odnosu na optičku gustinu Ponceau S bojenja membrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

Imajući u vidu da mozak koristi glukozu kao osnovni izvor energije, radi daljeg ispitivanja energetskeg statusa je analizirana ekspresija familije GLUT transportera u mozgu (Slika 4.14). Metodom Western blota praćene su promene u ekspresiji GLUT1, GLUT3 i GLUT4 transportera kod 6m, 18m i 24m starih AL1 i DR1 životinja u kori mozga i hipokampusu (Slika 4.14A-C). Starenje nije dovelo do značajne promene u ekspresiji ni jednog od navedenih transportera, ni u jednoj ispitivanoj strukturi (Slika 4.14A-C). Nasuprot tome, analiza efekata restriktivnog režima ishrane je pokazala da DR1 dovodi do značajnog smanjenja u ekspresiji GLUT3 ($p=0.0159$) i GLUT4 ($p=0.032$)

transportera (smanjenje GLUT3 od 61%, GLUT4 od 32%) u kori mozga 12 meseci starih životinja u odnosu na AL1 kontrolu (Slika 4.14B, C). U najstarijoj grupi životinja je primena restriktivnog režima ishrane uzrokovala povećanje u ekspresiji GLUT1 od 30% ($p=0.02$) i GLUT3 ($p=0.0159$) transportera od 44%, u odnosu na starosno-zavisnu kontrolu (Slika 4.14A, B).



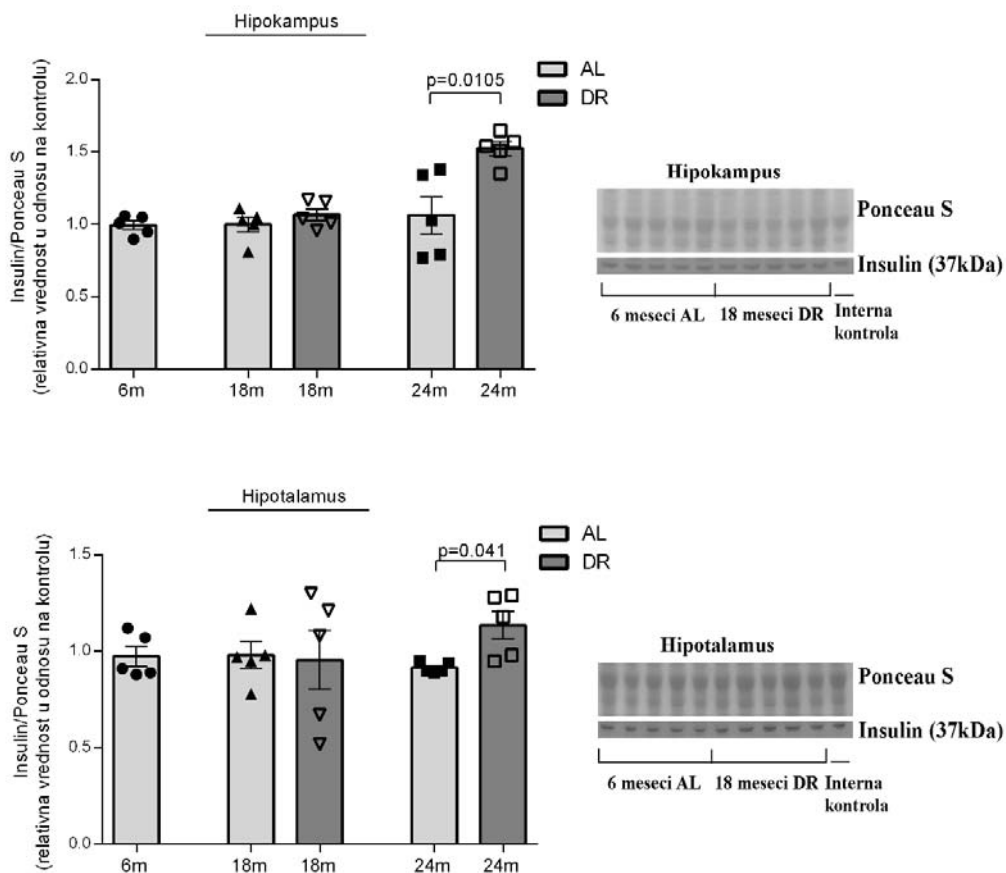
Slika 4.14. (A) Nivo ekspresije GLUT1, (B) GLUT3 i (C) GLUT4 transportera u hipokampusu i kori mozga pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

4.4. Promene u koncentraciji proteina insulinskog signalnog puta u hipokampusu i hipotalamusu pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na komponente insulinskog signalnog puta u mozgu praćen je na nivou proteina insulina, insulinskog receptora i njegove fosforilisane forme, IRS1 i njegove fosforilisane forme, Akt kinaze i njene

fosforilisane forme u hipokampusu i hipotalamusu pacova. Ekspresija navedenih proteina praćena je imunoblot metodom.

Nivo ekspresije insulinskog proteina u hipokampusu je ispitivana tokom starenja i pod uticajem dugotrajne dijetalne restrikcije (DR1) (Slika 4.15A). Starenje nije dovelo do promena u ispitivanim proteinima hipokampusu ni u jednoj starosnoj grupi. Uvedeni režim ishrane je doveo do povećanja kolićine insulina u hipokampusu kod 24m DR1 životinja u poređenju sa njihovom starosno zavisnom kontrolom (Slika 4.15A) ($p=0.0105$).



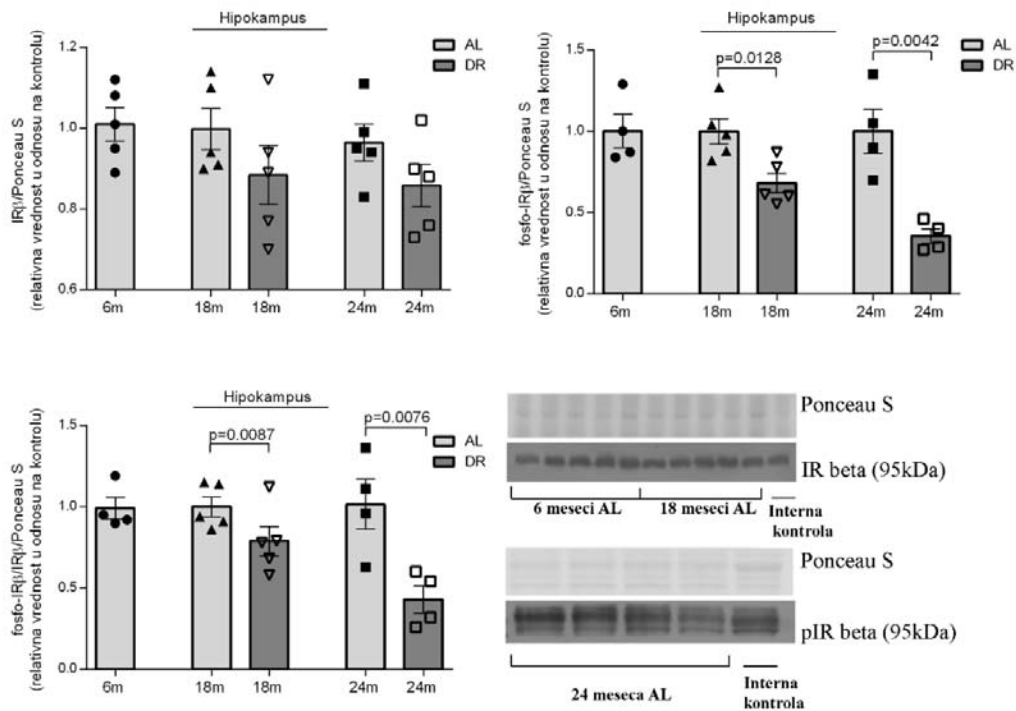
Slika 4.15. (A) Nivo proteinske ekspresije insulina u hipokampusu i (B) hipotalamusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

Starenje nije menjalo ekspresiju insulinskog proteina u hipotalamusu ni u jednoj ispitivanoj eksperimentalnoj grupi (Slika 4.15B). Pod dejstvom DR1 režima ishrane,

ekspresija insulina u hipotalamusu je, kao i u hipokampusu, bila povećana kod životinja starih 24 meseca (Slika 4.15B)($p=0.041$).

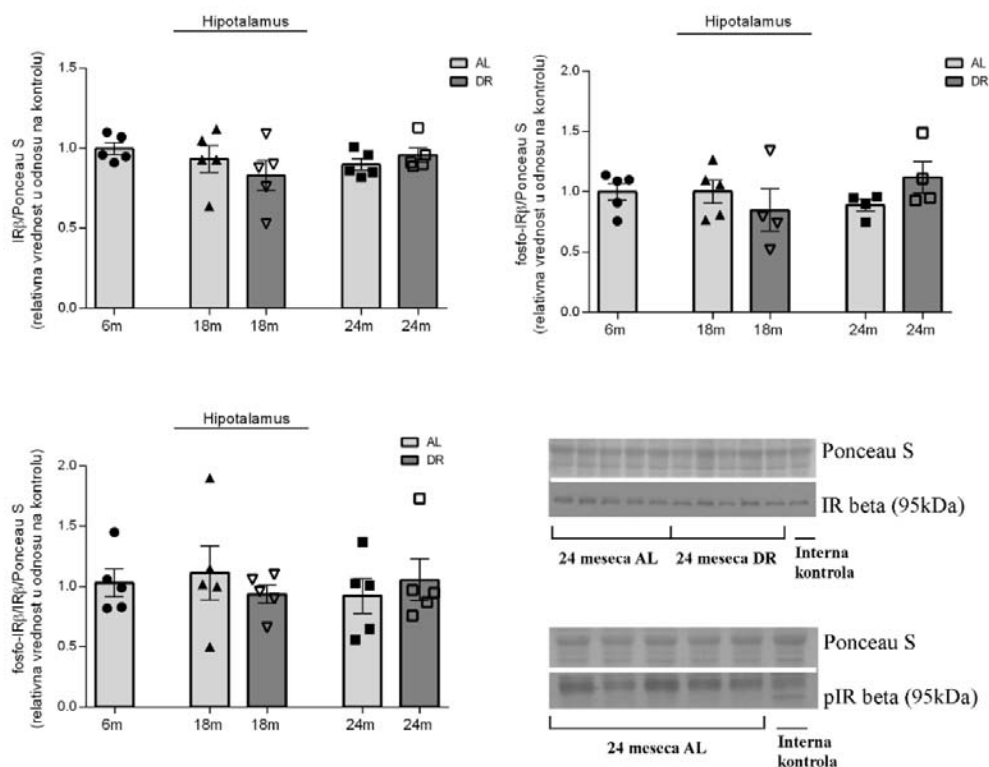
Dalje je praćena zastupljenost ukupnog IR β , njegove aktivne, tj. fosforilisane forme, kao i odnos fosforilisane i ukupne forme proteina koji ukazuje na promenu u aktivaciji samog proteina (fosfo-IR β /ukupni IR β) (Slika 4.16 i 4.17).

U hipokampusu starenje nije dovelo do promena u nivou ekspresije IR β ni u jednoj analiziranoj starosnoj grupi. Pod dejstvom DR1 režima, *Western blot* metodom i daljom statističkom analizom je konstatovan pad u ekspresiji fosfo-IR β , kod 18 meseci (pad od 30%) i kod 24 meseca starih životinja (pad od 65%). Detektovan je pad i u odnosu fosfo-IR β /IR β , što ukazuje na smanjenu aktivaciju IR β u obe starosne grupe, a kod ukupne forme IR β uočen je samo trend, bez statističke značajnosti (Slika 4.16A-C) (fosfo-IR β : $p=0.0128$ za 18m, $p=0.0042$ za 24m; fosfo-IR β /ukupni IR β : $p=0.0087$ za 18m, $p=0.0076$ za 24m).



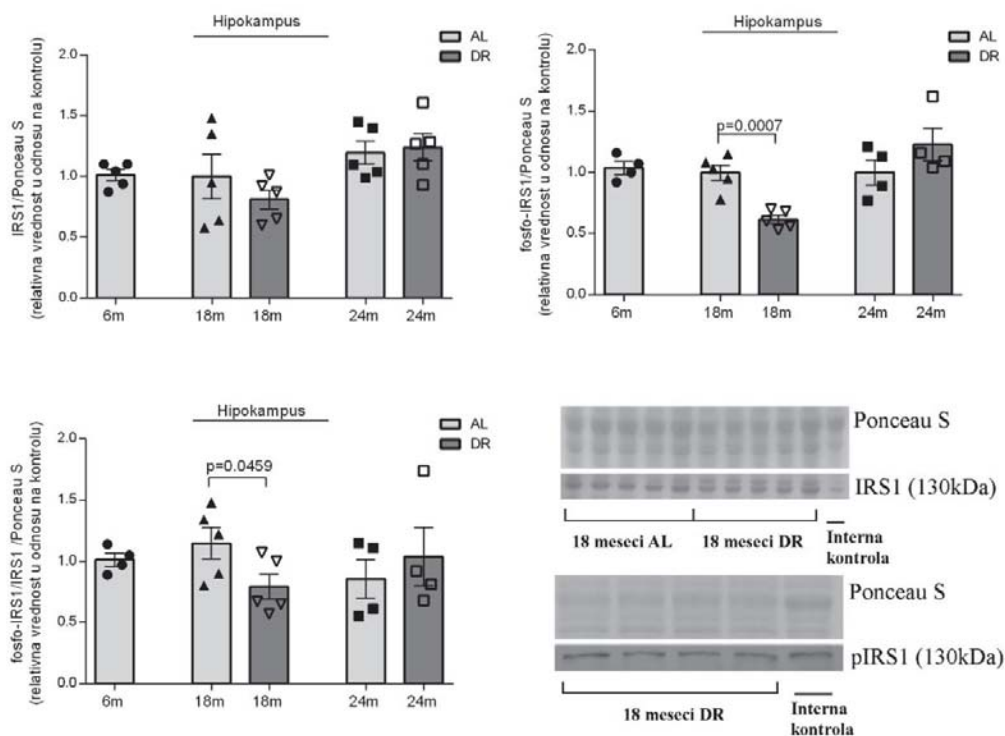
Slika 4.16. (A) Nivo ekspresije proteina insulinskog receptora (IR β), (B) njegove fosforilisane forme (fosfo-IR β) i (C) odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-IR β /ukupni IR β) u hipokampusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

Za razliku od hipokampusa, u hipotalamusu ni starenje, ni dijetalni režim ishrane nisu imali značajan uticaj na ekspresiju IR β , njegove fosforilisane forme pa je i aktivacija IR β ostala prilično uniformna kako tokom starenja, tako i pod uticajem različitih režima ishrane (Slika 4.17).



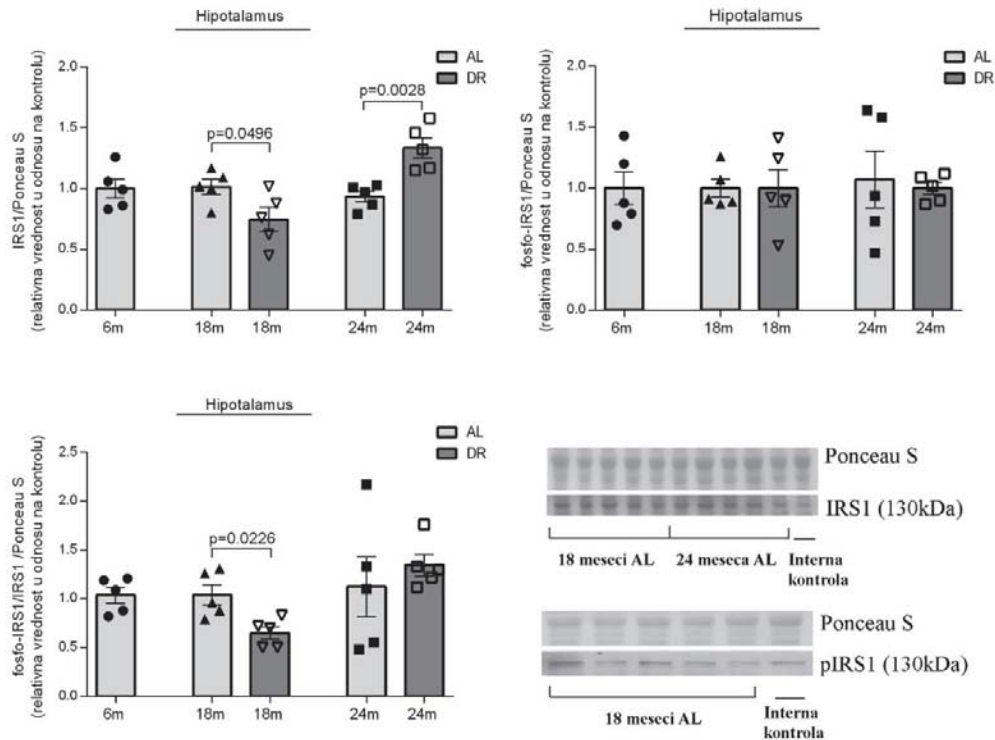
Slika 4.17. Nivo ekspresije proteina insulinskog receptora (IR β) (A), njegove fosforilisane forme (fosfo-IR β) (B) i odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-IR β /ukupni IR β) (C) u hipotalamusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

U regionu hipokampusa, starenje nije dovelo do promena u nivou IRS1 proteina ni u jednoj ispitivanoj eksperimentalnoj grupi (Slika 4.18A). Dugotrajni dijetalni režim ishrane (DR1) je u hipokampusu doveo do smanjenja ekspresije fosfo-IRS1 od 61% kod 18m starih životinja u odnosu na njihovu AL grupu ($p=0,0007$) (Slika 4.18B). Odnos ukupne i fosfo-forme IRS1 receptora kod ove grupe životinja je takođe pokazao statistički značajan pad od 68%, što upućuje na smanjenu aktivaciju IRS1 proteina ($p=0.0459$) (Slika 4.18C).



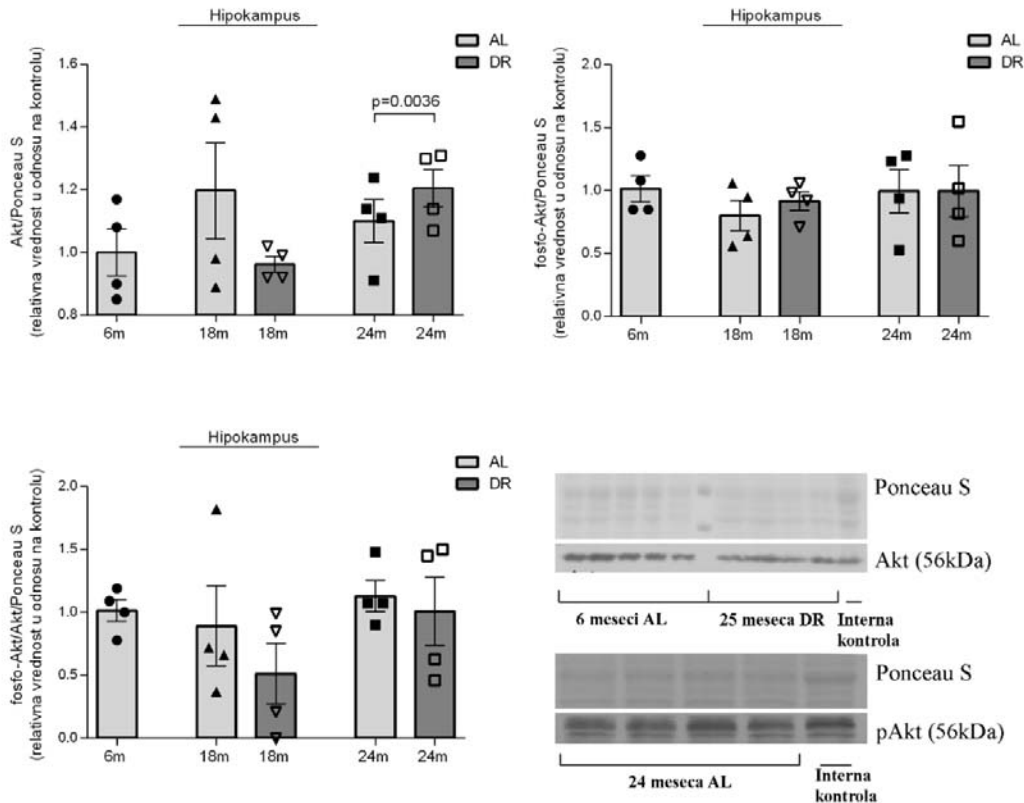
Slika 4.18. Nivo ekspresije proteina IRS1 (A), njegove fosforilisane forme (fosfo-IRS1) (B) i odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-IRS1/ukupni IRS1) (C) u hipokampusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

Ni u hipotalamusu, slično hipokampusu, nije uočen uticaj starenja na ekspresiju IRS1 proteina (Slika 4.19). Uočava se statistički značajno smanjenje ovog proteina od 74% kod 18m starih životinja koje su bile izložene dugotrajnoj dijetalnoj restrikciji (DR1) u odnosu na 18m stare životinje hranjene *ad libitum* ($p=0.0496$). Kod ove grupe životinja je uočen i statistički značajno smanjenje od 62% u odnosu ukupne i fosforilisane forme IRS1 ($p=0.0226$) (Slika 4.19A, C). U najstarijoj grupi životinja uočeno je povećanje ukupnog IRS1 pod dejstvom DR1 režima (povećanje od 41%), ali je izostala aktivacija samog proteina ($p=0.0028$) (Slika 4.19A).



Slika 4.19. (A) Nivo ekspresije proteina IRS1, (B) njegove fosforilisane forme (fosfo-IRS1) i (C) odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-IRS1/ukupni IRS1) u hipotalamusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

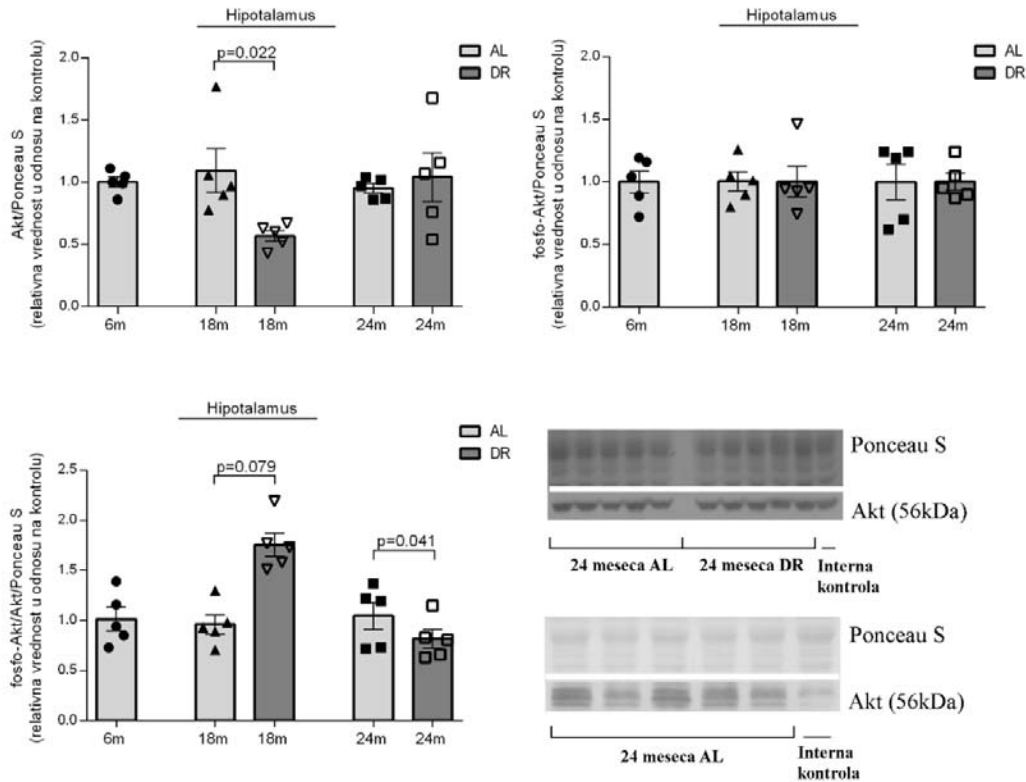
Dodatno, u okviru insulinskog signalnog puta pratili smo ekspresiju Akt kao i njegove fosforilisane forme, i na osnovu dobijenih vrednosti odredili odnos fosforilisane (aktivirane) forme prema ukupnoj ekspresiji Akt proteina (Slika 4.20 i 4.21).



Slika 4.20. (A) Nivo ekspresije Akt proteina, (B) njegove fosforilisane forme (fosfo-Akt) i (C) odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-Akt/ukupni Akt) u hipokampusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

U hipokampusu, starenje nije dovelo do značajnih promena u ekspresiji Akt, kao ni njegove fosforilisane forme (Slika 4.20). Uticaj DR1 se ogledao u povećanju Akt kod najstarije grupe pacova (Slika 4.20A).

U hipotalamusu je tokom starenja ekspresija Akt proteina ostala na stabilnom nivou (Slika 4.21). Promene u ukupnom Akt-u i njegovoj aktivaciji prate detektovane promene IRS1 proteina istog regiona (Slika 4.21A-C). Dijetalni režim ishrane je doveo do smanjenja nivoa ukupnog Akt-a kod 18m starih životinja od 58% ($p=0.022$) (Slika 4.21A), dok je detektovani odnos fosfo - /ukupni Akt ukazao na statistički značajno povećanje aktivacije ovog proteina od 82% u 18m DR1 grupi ($p=0.0408$) u odnosu na AL kontrolu (Slika 4.21C).



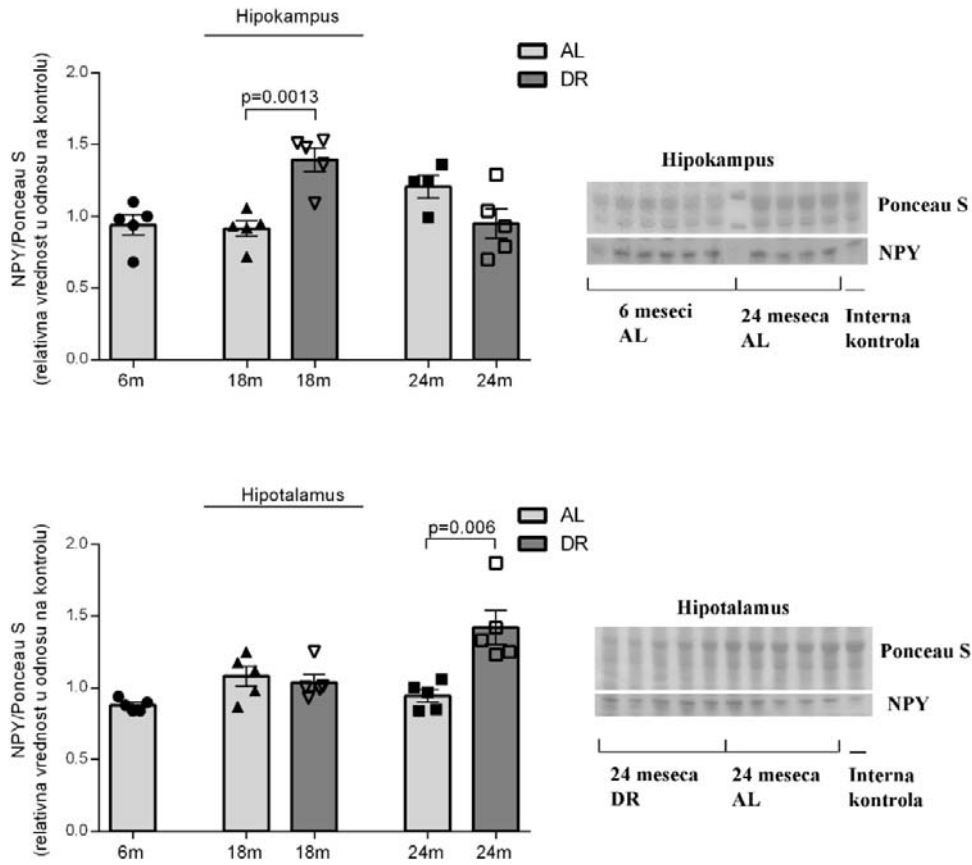
Slika 4.21. (A) Nivo ekspresije Akt proteina, (B) njegove fosforilisane forme (fosfo-Akt) i (C) odnosa ukupne i fosfo-forme (fosfo-Akt/ukupni Akt) u hipotalamusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

Pored insulinskog signalnog puta, hteli smo da ispitamo da li starenje i dijeta utiču na oreksigene/anoreksigene signale u hipokampusu i hipotalamusu pacova. U tom pogledu, pored insulina kao oreksigenog peptida, ispitili smo promene neuropeptida Y koji ima suprotno, anoreksigeno dejstvo.

Western blot metodom je pokazano da u hipokampusu ne dolazi do značajnih promena u nivou NPY tokom starenja životinja (Slika 4.22A). Dijetalni režim ishrane je u hipokampusu doveo do povećanja nivoa NPY od 52% u grupi 18m DR1 ($p = 0.0013$) u odnosu na starosno-odgovarajuću kontrolu (Slika 4.22A).

Jednofaktorskim ANOVA testom je analizirana promena ekspresije NPY proteina tokom starenja u hipotalamusu i rezultati su pokazali da nema promene nivoa NPY proteina kod AL životinja. (Slika 4.22B). Analizom efekata DR režima na ekspersiju

NPY, pokazano je da jedino kod najstarije grupe životinja (24m) DR deluje povećanjem nivoa NPY u hipotalamusu (povećanje od 50%) ($p=0.006$).



Slika 4.22. (A) Nivo ekspresije NPY proteina u hipokampusu i (B) hipotalamusu pacova pod uticajem starenja i DR1 režima ishrane. Rezultati su transformisani radi lakšeg prikaza i izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti ekspresije proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (videti Materijal i metode). $p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot.

5. DISKUSIJA

Zahvaljujući napretku medicine ljudski životni vek je danas znatno produžen, što je dovelo do progresivnog starenja ukupne svetske populacije - naime, procenat ljudi starijih od 60 godina u 2012. godini je iznosio 11.5%, dok se za 2050. godinu predviđa da će taj procenat biti čak 22% (<http://unfpa.org/ageingreport/>). Međutim, produženje životnog veka ima i svoje negativne posledice. Smatra se da sa starenjem ljudi postaju krhki i podložniji bolestima (Fulop i saradnici, 2010), te zato produženje životnog veka neizostavno vodi povećanom riziku od starosno-zavisnih bolesti, poput dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, kancera, gojaznosti, autoimunskih bolesti i poremećaja u kognitivnim i motoričkim funkcijama (Jaul i Barron, 2017). Povećani udeo starih ljudi u ukupnoj populaciji vodi uvećanju incidence pomenutih bolesti, što predstavlja veliki socijalni i ekonomski teret. U tom smislu, neophodno je pronaći način na koji bi ljudi zdravo starili, čime bi se poboljšao kvalitet života starijih osoba i ujedno smanjio rizik od pojave starosno-zavisnih bolesti.

Pokazano je da različite genetičke, farmakološke i dijetalne intervencije mogu da utiču na proces starenja (Fontana i Partridge, 2015). Dijetalna restrikcija je jedna od do sada najviše ispitivanih sredinskih intervencija, a za koju je pokazano da dovodi ne samo do produžetka, već i do poboljšanja kvaliteta života (Speakman and Mitchell, 2011). Vremenom su se razvili različiti oblici dijetne koje se razlikuju kako u pogledu specifičnih nutrijenata koje obuhvataju (proteinske i ketogene dijetne, dijetne sa smanjenim unosom masnoće, ugljenih hidrata, dijetne obogaćene različitim makro- i mikronutrijentima), tako i u frekvenci unosa hrane (gladovanje, svakodnevni redukovani unos hrane, intermitentna dijeta) i u dužini trajanja (kratkotrajne i dugotrajne dijetne, uključujući one koje traju ceo život), a koje su se veoma razlikovale u efektima koje proizvode. Dalja istraživanja su pokazala da dugotrajna dijeta koja podrazumeva smanjeni unos kalorija, a ne specifičnih nutrijenata, pokazuje najbolje efekte na produžetak dužine života (Masoro, 2005). Sem ovog, najupečatljivijeg efekta restriktivnog unosa hrane, postoje i drugi, mnogobrojni pozitivni efekti DR. Ovaj režim utiče na smanjenje incidence kancera, kao i na poboljšane reparacionih mehanizama DNK i time smanjuje oksidativna oštećenja koja nastaju kod miševa i pacova tokom starenja (Weindruch i Walford, 1982; Lipman i saradnici, 1989; Loft i saradnici, 1995; Dirx i saradnici, 2003). Animalne i humane studije su pokazale da restrikcija hrane dovodi do poboljšanja kognitivnih i motoričkih funkcija (Campbell i

Richardson, 1988; Gould i saradnici 1995; Masoro i saradnici, 2005; Ishihara i saradnici, 2005; Pons i saradnici 2018) i da stimuliše proces neurogeneze i sinaptičke plastičnosti (Fontán Lozano i saradnici, 2008; Gillette-Guyonnet i Vellas, 2008; Mladenovic i saradnici, 2010; Perovic i saradnici, 2012; Fusco i Pani, 2013; Lin i saradnici, 2014; Smiljanic i saradnici, 2015). Takođe, krhkost koja se povećava sa starenjem, može biti suprimirana pod uticajem DR ukoliko je primenjena u određenom periodu života, što je pokazano kako kod ljudi tako i u animalnim modelima (Fulop i saradnici, 2010; Manal i saradnici, 2015; Kane i saradnici, 2016; Todorović i saradnici, 2018). Dijetalna restrikcija ispoljava svoj koristan efekat i kod neurodegenerativnih oboljenja koje se karakterišu akumulacijom proteinskih agregata, kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest i amiotrofička lateralna skleroza. U ovim bolestima DR smanjuje oksidativna oštećenja neurona, poboljšava proces autofagije (Mizushima i saradnici 2004, Alizerai i saradnici 2010, Mattson i saradnici 2001) i na taj način odlaže vreme nastanka i/ili smanjuje progresiju neurodegenerativnih oboljenja (Mattson i saradnici 2001, Masoro, 2005). Animalne i humane studije su pokazale da smanjenje unosa hrane znatno poboljšava zdravstveno stanje i kod gojaznih jedinki, povećavajući insulinsku osetljivost i lipidni status (Mercken i saradnici, 2011).

Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi efekata DR-a su kompleksni i još uvek nisu u potpunosti istraženi. Između ostalog, smatra se da DR indukuje ćelijski odgovor koji dovodi do modifikacije specifičnih signalnih puteva uključenih u inflamacioni odgovor ćelije, reparacione mehanizme i modulaciju metabolizma. Istraživanja navode na pretpostavku da su ključni signalni putevi odgovorni za efekte DR oni koji učestvuju u detekciji hranjivih materija u krvi, poput insulinskog i AMPK signalnog puta (Hadem i saradnici, 2018). Restriktivni režim ishrane reguliše aktivnost insulinskog signalnog puta (Giani i saradnici, 2008; Lu i saradnici 2011; Ma i saradnici, 2012; Boucher i Kleinridders, 2014), koji je uključen u regulaciju unosa hrane preko specijalizovanih ćelija hipotalamusa (Banks, 2006), a u ćelijama hipokampusa je uključen u procese učenja i pamćenja (Zhao i saradnici, 1999).

Međutim, pri uspostavljanju dijetalnog režima treba posebno voditi računa o određenim faktorima, kao što su starost jedinke u momentu početka dijeta, zdravstveno stanje jedinke, dužina trajanja dijeta, kao i stepen redukcije, jer literaturni podaci sve češće ukazuju i na negativne efekte smanjenog unosa hrane (Ingram i de Cabo, 2017). Negativan efekat DR je uočen u procesu zarastanja rana, kao i tokom odbrane organizma

od infektivnih agenasa, virusa, bakterija i parazita. Takođe, pokazano je da DR može da dovede do smanjene gustine i jačine kostiju, kao i da efekat zavisi od stepena redukcije hrane i od starosti u trenutku kada je DR primenjena. Već dugo postoje kontroverze oko pitanja kom starosnom dobu DR postiže najbolji efekat, odnosno, postoji li starosna granica kada dejstvo DR na dužinu i kvalitet života postaje negativno. Ako posmatramo dužinu života kod glodara, najveći broj studija ukazuje na to da 60% DR koja je počela u periodu od 6-12. meseca starosti ima najbolje efekte na produžetak životnog veka (Weindruch i Waldorf, 1982; Yu i saradnici, 1985; Pugh i saradnici, 1999). Međutim, ukoliko se 60% DR uvede vrlo rano, u 28. danu života pacova, izaziva negativne efekte koji se ogledaju u poremećenoj signalizaciji dopaminskog sistema i povećanom anksioznom i depresivnom ponašanju (Jahng i saradnici, 2007). Ista vrste dijete u trajanju od dva meseca je kod 4 nedelje starih Wistar pacova dovela do promena u neurogenezi u hipokampusu i poremećaja u prostornoj memoriji (Cardoso i saradnici, 2016). Negativne efekte dijete može imati i ako se sa njom započne „prekasno“, odnosno u starom životnom dobu. Režim koji podrazmeva 60% dnevnog unosa hrane (60%DR) započet u 24. mesecu starosti je uzrokovao smanjenje životnog veka kod tri različita soja miša, a slični efekti su pokazani i kod pacova soja Sprague-Dawley, soja kod kojeg DR značajno produžava životni vek kada je započeta u ranijem dobu (Ross, 1977; Forster i saradnici, 2003). Nešto manje restriktivan režim ishrane (70% od AL unosa) uveden u 18. i 26. mesecu života, nije pokazao nikakav uticaj na dužinu života, kao ni na učestalost pojave tumora kod Fischer pacova, dok isti režim započet u 12. mesecu dovodi do produžetka života (Lipman i saradnici, 1998). Restriktivni režim ishrane uveden tokom druge godine života pacova doveo je do povećanja insulinske osetljivosti i glukoze tolerancije, ali nije uspeo da poboljša sekreciju insulina u pankreasu i insulinski signalni put u mišićima (Park i saradnici, 2006, Pires i saradnici, 2014). Sa druge strane, dijete uvedena u kasnijem dobu može imati korisno dejstvo, ali izgleda je ono organ-specifično, pa tako ispitivanje promena u srcu i bubrezima pokazuju da kasno uvedena DR ima pozitivne efekte na ove organe, smanjujući patološke promene asocirane sa starenjem (Ingram i de Cabo, 2017). Kad je mozak u pitanju situacija nije jasna, jer sa jedne strane, DR uvedena u 18. i 24. mesecu kod pacova dovodi do povećanja nivoa antioksidanasa, šaperona i sinaptičkih proteina. Sa druge strane, 60%DR u trajanju od tri meseca nije uspela da zaštiti dopaminske neurone od male doze toksina i uzrokovala je smanjenje ukupnog dopamina u strijatumu miševa starih 15 meseci. (Morgan i saradnici, 2003; Sharma i Kaur, 2008).

Negativno dejstvo DR režima koji je primenjen kod starih životinja se ogleda i u povećanoj krhkosti i smanjenim kognitivnim performansama kod pacova, što je pokazano i u našoj studiji. Naime, primena 60% DR na životinje stare 21 mesec, nakon 3 meseca je dovela do znatnog povećanja krhkosti i poremećaja u procesu pamćenja. Isto smanjenje u količini hrane ali produženog delovanja (6 meseci) je dovelo do blagog poboljšanja starih životinja u testovima ponašanja, bez uticaja na krhkost, dok je dijeta započeta u 6. mesecu imala znatno bolje rezultate. Ova dugotrajna dijeta je imala pozitivan uticaj na sve praćene parametre: eksploratornu aktivnost, Y lavirint a dovela je i do značajnog smanjenja krhkosti kod starih pacova (Todorović i saradnici, 2018).

Kako bismo produbili znanje o uticaju DR na promene koje može da izazove kada je uvedena u različitim periodima života, hteli smo podrobnije da ispitamo uticaj različitih trajanja DR tretmana kao i uvođenja DR u različitim starosnim dobima, na kognitivne i motoričke aktivnosti Wistar pacova, kao i na njihovu krhkost. U tom smislu, rezultati ove teze dobijeni su u eksperimentima u kojima su jedinke različite starosti podvrgnute dijetalnom režimu različitog trajanja, u kom su životinje bile pod uticajem 60% DR, što je ujedno i najčešći eksperimentalni pristup u studijama koje se bave uticajem DR (Speakman, 2011; Chung i saradnici, 2013). Naknadno smo izabrali režim koji je pokazao najbolje rezultate, DR1, da u njemu ispitamo energetske homeostazu i insulinski signalni put u mozgu, kao jedan od tri potencijalna mehanizma pomoću kojih DR ispoljava svoj efekat na dužinu i kvalitet života (Masoro, 2000).

Motoričke i kognitivne sposobnosti eksperimentiranih životinja smo pratili uobičajnim testovima ponašanja. Test otvorenog polja je jedan od najčešće korišćenih testova za praćenje ponašanja kod životinja i omogućava efikasnu analizu motoričkih funkcija, sposobnosti životinje da istražuje okolinu, kao i analizu kognitivnog statusa životinje. Poredeći lokomotornu i vertikalnu aktivnost životinja starih 6, 18 i 24 meseca, nismo uočili starosno-zavisno smanjenje ovih aktivnosti ni kod jedne od ispitivanih grupa (AL1 i AL2). Literaturni podaci o uticaju starenja na promene u spontanoj lokomotornoj i eksploratornoj aktivnosti životinja su kontradiktorni i ukazuju da različiti faktori kao što su soj životinja i vremenski okvir testiranja mogu imati veliki uticaj na ishod rezultata. Iako izvestan broj studija pokazuje da dolazi do starosno-zavisnog opadanja aktivnosti životinja (Gage i saradnici, 1984; Yu i saradnici, 1985; Altun i saradnici, 1987), postoje studije koje su dale drugačije rezultate. Naime, pokazano je da starenje dovodi do smanjene lokomotorne aktivnosti WAG/RIJ soja pacova za vreme noćne faze ali ne i u

toku dnevne faze (Willig i saradnici, 1987), dok kod Wistar pacova nije uočena starosno-zavisna razlika u spontanoj lokomotornoj aktivnosti ni u noćnoj, niti u dnevnoj fazi ispitivanja (Zhang i Sannajust, 2000). Slično je pokazano i na miševima, pri čemu tri različita soja nisu pokazala promenu u eksploratornoj aktivnosti sa starenjem (Lhotellier i saradnici, 1993). U skladu sa rezultatima pomenutih ustražavanja, naši rezultati nisu pokazali da dolazi do smanjenja opisanih aktivnosti sa starenjem. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da starenje može uzrokovati različite fiziološke promene kod različitih sojeva pacova i miševa i da male promene u eksperimentalnom dizajnu mogu dovesti do značajnih razlika u rezultatima.

Prostorna habituacija predstavlja najosnovniji oblik učenja i definiše se kao smanjenje eksploratorne aktivnosti bez uticaja spoljašnjih stimulusa tokom vremena (Leuiss i Bolivar, 2006). Ukoliko se testiranje habituacije odvija kontinuirano, u okviru jedne sesije (u toku jednog dana), onda se takva habituacija označava kao unutarsesijska, a ukoliko postoji ponovljeno izlaganje istoj sredini (kroz dane), onda se označava kao međusesijska habituacija. U suštini, unutarsesijska habituacija je mera adaptivnosti životinje, a međusesijska se odnosi i na sposobnost životinje da pamti prethodno izlaganje testu (Muller i saradnici, 1994), odnosno reflektuje njenu sposobnost učenja i pamćenja. Životinje podvrgnute testu otvorenog polja u našoj studiji su pokazale normalnu međusesijsku habituaciju, kako lokomotorne tako i vertikalne aktivnosti, koja se nije menjala sa starenjem, što je u skladu sa literaturnim podacima (Fralely i Springer, 1981b; Soffie i saradnici, 1992; Ammassari-Teule i saradnici, 1994; Frick i saradnici, 2000). Izuzetak su predstavljale DR1 grupa starosti 18 meseci i DR3 grupa životinja stara 24 meseca, jer su njihove vertikalne aktivnosti bile visoke tokom svih 5 ispitivanih dana. U literaturi postoje podaci da vremenski interval u toku kog se prati habituacija može da utiče na ishod habituacije odnosno, da ukoliko se analizira ponašanje životinje u kraćem vremenskom intervalu, ona može pokazati habituaciju ali se taj proces može izgubiti ukoliko je vremenski interval duži (Leuiss i Bolivar, 2006). Iz ovog razloga smo naknadno analizirali međusesijsku habituaciju, posmatrajući samo prvih 5 minuta svakog dana. Ovakva analiza je pokazala da 24mDR1 grupa pokazuje smanjenje aktivnosti kroz dane, odnosno da je habituacija prisutna, dok je taj proces u potpunosti izostao kod DR3 grupe. Proverom nivoa aktivnosti životinja tokom prvih i poslednjih 5 minuta svakoga dana, ustanovljeno je da postoji unutarsesijska habituacija u svim ispitivanim danima kod obe grupe životinja, odnosno dolazi do smanjenja aktivnosti u toku dana. To navodi na

zaključak da sve životinje u ovom eksperimentu, bez obzira na starost i tretman, pokazuju relativno normalnu adaptiranost, ali da pacovi najstarije DR3 grupe imaju poteškoće u pamćenju jer nisu u stanju da prizovu u sećanje prethodno izlaganje testu. Ovakav rezultat navodi na zaključak da DR3 režim, odnosno dijeta koja počne u starijem dobu i traje relativno kratko, može imati negativne posledice na sposobnost učenja i pamćenja.

Smatra se da dugotrajna DR uvedena u ranijem periodu života dovodi do boljih fizičkih performansi i da može ublažiti starosno-zavisne promene u motoričkim aktivnostima, što je pokazano u velikom broju studija (Yu i saradnici, 1985; Jucker i saradnici, 1988; Martin i saradnici, 2006; Carter i saradnici, 2009; Ribeiro i saradnici, 2012). Međutim, postoje i drugačiji podaci koje ukazuju na smanjene motoričkih performansi nakon primene ovakvog režima ishrane (Pitsikas i saradnici, 1990). Što se tiče efekata dijeta koja je uvedena u kasnijem periodu života, podaci nisu tako usaglašeni, već variraju između vrsta, pa čak i između sojeva životinja (Geng i saradnici, 2007; Singh i saradnici, 2011; Kuhla i saradnici, 2013). Uz navedeno, treba napomenuti da, ne samo početak, već i dužina trajanja dijeta ima važnu ulogu u ishodu koji će restrikcija hrane dati (Yamamoto i saradnici, 2009). Naši rezultati pokazuju da efekti smanjenog unosa hrane u velikoj meri zavise od dužine trajanja dijeta, kao i od starosti životinje u trenutku uvođenja dijetalnog režima. Daleko najbolji efekat je pokazao dugotrajni restriktivni režim ishrane (DR1), povećavajući eksploratornu aktivnost kod 18 meseci starih životinja i vertikalnu aktivnost kod 12 i 24 meseci starih životinja. Sa druge strane, DR2 režim je svoje pozitivne efekte pokazao isključivo na nivou lokomotorne aktivnosti, povećavajući dužinu predjenog puta u testu otvorenog polja kod najstarije grupe životinja. Nasuprot DR1 i DR2 režimima, dijetalna restrikcija najkraćeg trajanja i kasnog početka je imala negativne posledice, smanjujući lokomotornu aktivnost kod 18 i 24 meseca starih životinja. Uz to, uočeni porast vertikalne aktivnosti kod 24 meseca starih životinja DR3 grupe ne govori o pozitivnom efektu ovog režima ishrane. Kao što je već pomenuto, ove životinje nisu pokazale sposobnost habituacije, tako da je zabeležena viša aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu verovatno posledica njihovog otežanog pamćenja a ne boljeg kognitivnog statusa.

Uzimajući u obzir sve navedene studije, možemo zaključiti da za najoptimalnije rezultate DR treba da počne kod adultnih jedinki (6-12. meseca) i da traje do kraja života. Sve pomenuto ukazuje da su u ranom i kasnom životnom dobu jedinke mnogo osetljivije na stres izazvan restrikcijom hrane, što nije slučaj kod zrelih, adultnih jedinki. Podaci iz

literature ukazuju na to da uvođenje DR u kasnijem periodu života, u nekim slučajevima pokazuje pozitivan, a u drugim negativan uticaj kako na dužinu života, tako i na starosno-zavisne promene. Razlog u ovakvom neslaganju podataka verovatno leži u razlikama samih sojeva životinja, dužine DR i procesa, odnosno starosnih promena na kojima se želi ispitati dejstvo dijeta.

Test ponašanja u Y lavirintu oslikava urođenu potrebu glodara da istraži nepoznati prostor i shodno tome, koristi se za ispitivanje prostorne memorije životinja. Ovakav oblik memorije uključuje percepciju i specifične kognitivne performanse, kako bi životinja uspela da pamti određeni prostor, koji upoznaje tokom vremena (Wahl i saradnici, 2017). Starenje uzrokuje pad u kognitivnim performansama i uz pomoću različitih lavirint testova u literaturi su dobro opisane starosno-zavisne promene u prostornoj memoriji (Jucker i saradnici, 1988; Shukitt-Hale i saradnici, 2004; Haider i saradnici, 2014; McQuail i saradnici, 2015). U našim eksperimentima, starenje je dovelo do očekivanog pada u ukupnoj eksploratornoj aktivnosti životinja, kako lokomotornoj, tako i vertikalnoj. Tokom starenja je uočeno i smanjenje ukupnog broja ulazaka u sva tri kraka, broja ulazaka u treći krak, kao i vreme koje je provedeno u trećem kraku kod 18 meseci starih životinja. Kod najstarije grupe pacova postoji trend u smanjenju ovih performansi, ali one nisu statistički značajne. Razlog odsustva značajnih promena kod 24 meseca stare grupe pacova najverovatnije leži u činjenici da sa starenjem heterogenost ispitivane grupe raste i samim tim postoje veće varijabilnosti između životinja, pa statistički značajan efekat može da izostane (Gage i saradnici, 1984). Lavirint testovi su izuzetno pogodni za ispitivanje uticaja dijetalne restrikcije na kognitivne performanse kod glodara (Wahl i saradnici, 2017), a pokazali su da efekti restriktivnog režima ishrane nisu univerzalni i da zavise od velikog broja faktora, kao što je starost životinje u momentu početka dijetalnog režima, količine redukcije hrane, vrste režima, pola, kao i samog soja životinje. Kod postnatalnih miševa, korišćenjem Y lavirinta je pokazano da uvođenje rigoroznog DR režima može dovesti do poremećaja u prostornoj memoriji, dok 80% i 70% DR dovodi do poboljšanja u prostornoj memoriji postnatalnih mužjaka, ali ne i ženki (Wu i saradnici, 2002; Fu i saradnici 2017). U toku starenja Fischer pacova, dugotrajna 60%DR uvedena već od prvog meseca života, poboljšala je prostornu memoriju kod životinja starih 18 i 24 meseca, ali ne i kod najstarije, 30 meseci stare grupe životinja (Stewart i saradnici, 1989). Isti režim u toku starenja Fischer pacova uticao je na poboljšanje fizičke, ali ne i kognitivne aktivnosti (Carter i saradnici, 2009). Interesanto je

i dejstvo periodične intermitentne dijetе, tokom koje su životinje nekoliko dana sedmično podvrgnute IF dijeti, a ostalim danima imaju neograničen pristup hrani i taj ciklus se ponavlja 1-4 puta mesečno. Ovakva dijeta uvedena u 17. mesecu života nakon 6 meseci je dovela do poboljšanja prostorne memorije kod starih pacova (Brandhorst i saradnici, 2015).

Ispitujući kognitivne performanse u prostornoj memoriji pacova, uočili smo pozitivan efekat DR-a na proces starenja, a taj efekat je zavisio od dužine trajanja dijetе i starosti životinje na početku dijetе. Najizraženiji efekat dijetе uočen je kod DR1 grupe životinja, gde su životinje pod tretmanom pokazale povećan ukupan broj ulazaka, broj ulazaka u treći krak kao i povećano vreme provedeno u ispitivanju prostora koji im je nepoznat, odnosno nov i to kod obe starije starosne grupe. Ovakav rezultat ukazuje da je DR1 režim ishrane povećao ne samo lokomotornu, već i vertikalnu aktivnost starih životinja, ispoljavajući jedan opšti koristan efekat tokom starenja. Situacija je bila potpuno drugačija u DR2 i DR3 eksperimentalnim grupama, gde je kod starih jedinki DR2 režim poboljšao samo vreme provedeno u trećem kraku, dok je DR3 režim ishrane imao pozitivan uticaj samo na 18 meseci stare životinje. Predstavljeni rezultati naših eksperimenata ukazuju da efekat dijetе na kognitivni status u toku starenja izuzetno zavisi od starosne dobi kad je dijeta počela, kao i od dužine trajanja dijetalne intervencije, te da najoptimalniji efekat na prostornu memoriju ima dugotrajna dijeta kada je uvedena kod adultnih jedinki.

Uočili smo jasnu korelaciju u ponašanju životinja u testu otvorenog polja i u Y lavirintu, i to kod sva tri režima ishrane. DR1 režim je uticao na očuvanje kako kognitivnih, tako i fizičkih performansi kod starih jedinki. Tome u prilog govori ne samo povećana lokomotorna aktivnost u testu otvorenog polja, već i povećana generalna aktivnost uočena u Y lavirintu, koja se ogleda u povećanom broju ulaska u sva tri kraka lavirinta, dok povećan broj ulazaka u nepoznat, treći krak i duže vreme provedeno u njemu reflektuju njihovu povećanu radoznalost i eksploratornu aktivnost. Pozitivan uticaj DR2 režima bio je znatno slabiji i u testu otvorenog polja i u testu Y lavirinta, sa tim što najstarija grupa životinja imala malo bolje rezultate. Životinje pod DR3 režimom su imale najlošijih rezultate, kako u generalnoj aktivnosti, tako i u prostornoj memoriji i ne samo to, ovaj režim doveo do slabije performanse životinja u odnosu na njihovu kontrolu. Slična korelacija je pokazana i u studiji u kojoj su Wistar pacovi sa visokom aktivnošću u testu otvorenog polja imali bolju prostornu memoriju i obratno, manje aktivni pacovi

su pokazali lošije performanse u Y lavirintu (Wetzel i Matthies, 1982), a ovakva analogija je primećena i kod miševa (Wetzel i Matthies, 1982; Onaolopo i Onaolopo, 2013).

U poslednje vreme je u fokusu istraživanja procesa starenja pre svega uticaj različitih intervencija na kvalitet života, tj. na „zdravo“ starenje, što bi označavalo period u kom je jedinka zdrava i bez bolesti. U tu svrhu se uvodi pojam krhkosti, kao mera poređenja „zdravog“ starenja i onog u kom je jedinka podložna bolestima i ima smanjen kvalitet života. Do nedavno, koristeći Fridov fenotip (Fried i saradnici, 2001) i Rokvudov indeks krhkosti (Rockwood i saradnici, 1994), krhkost je bila ispitivana u gerijatrijskim studijama, odnosno na humanoj populaciji. U poslednjih par godina se fokus istraživanja počeo polako prebacivati na animalne modele, pri čemu je prvo indeks krhkosti, odnosno FS, okarakterisan kod miša (Whitehead i saradnici 2014; Liu i saradnici, 2014), a zatim i kod pacova (Shukitt-Hale i saradnici, 2017; Yorke i saradnici, 2017). Prema metodi „*Valencia score*“ koju su razvili Gomez-Cabrebra i saradnici (2017), a koja je bazirana na Fridovoj proceni krhkosti kod ljudi, mi smo uradili procenu krhkosti odnosno, izračunali smo *frailty score* (FS) Wistar pacova tokom starenja i detaljnije ispitali uticaj različitih DR režima na starenje (Todorović i saradnici, 2018). Analizirajući fizičke i kognitivne parametre krhkosti, uočili smo da kod starih pacova dolazi do pogoršanja u 9 od analiziranih 11 parametara (lokomotorna i eksploratorna aktivnost, vreme provedeno u kretanju, procenat vremena provedenog u kretanju, spontane alteracije, ukupni broja ulazaka, broja ulazaka u treći krak, vreme provedeno u trećem kraku i procenat vremena provedenog u trećem kraku) i posledičnim povećanjem FS kod 18 i 24 meseca starih životinja. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima studije na Fischer pacovima kod kojih je pokazano povećanje FI u toku starenja (Yorke i saradnici, 2017). Iako su korišćeni različiti parametri za procenu krhkosti, naša i studija na Fischer pacovima su pokazale prvo značajno povećanja krhkosti kod životinja starih 18 meseci. Druga studija koja se bavila ispitivanjem krhkosti na pacovima, je pokazala da u 18. mesecu života 20% ispitivanih životinja pokazuje znake krhkosti (Miller i saradnici, 2017). Takođe, studija koja se bavila ispitivanjem prostorne memorije tokom starenja je pokazala da u 18. mesecu dolazi do prvog značajnog pogoršanja memorije kod tri različita soja pacova (Wyss i saradnici, 2000), što ukazuje da starost od 18 meseci predstavlja neku vrstu prelomne tačke u starenju pacova, odnosno trenutak kada je njihov organizam najpodložniji starosno-zavisnim promenama, a verovatno i poslednji momenat kada se mogu primeniti intervencije koje usporavaju starosno-zavisne promene.

Malo se zna o uticaju dijetete na stepen krhkosti, a naša studija je prva pokazala kako različiti režimi ishrane menjaju FS u procesu starenja kod pacova. Jedina animalna studija koja se još bavila uticajem dijetete na krhkost je pokazala je da DR počev od 6. meseca starosti, dovodi do smanjenog FI u 19. mesecu života miša (Kane i saradnici, 2016), odnosno da dijetalni režim ishrane smanjuje krhkost. Naši rezultati potvrđuju ova zapažanja i ukazuju na sličnost kojom miševi i pacovi prolaze kroz starosno zavisne promene u krhkosti, kao i na efikasnost kojom dijetalna restrikcija može uticati na ove promene. Međutim, treba naglasiti da, kao i slučaju efekata DR na motorne i kognitivne sposobnosti životinja, ni na nivou krhkosti nisu svi dijetalni režimi imali isti ishod. DR1 dijeta je kod Wistar pacova dovela do smanjenja FS kod sve tri ispitivane starosne grupe u poređenju sa AL životinjama i dovela je do poboljšanja u 7 od 11 ispitivanih parametara koji su korišćeni za procenu FS, a koji su obuhvatali kako fizičke, tako i kognitivne sposobnosti. Opisani rezultati ukazuju na to da ovaj vid ishrane predstavlja intervenciju koja može rezultirati povećanjem kvaliteta života kod starih jedinki. U prilog tome ukazuje i nedavno objavljena studija na majmunima, gde su životinje koje su bile podvrgnute 60% redukciji hrane od desete, pa sve do perioda 23-28. godine života pokazivale manji stepen krhkosti i bolje preživljavanje (Yamada i saradnici, 2018). Sa druge strane, možemo reći da su protektivni efekti DR2, a posebno DR3 režima ishrane na kvalitet života diskutabilni. Dijeta u trajanju od 6 meseci (DR2) je smanjila FS samo kod 18 meseci starih životinja, dok na najstariju grupu pacova starosti dve godine nije imala uticaj. Efekat ove dijetalne intervencije se može uočiti i iz analize promena pojedinačnih parametara krhkosti: ova dijeta je dovela do poboljšanja u samo 2 od 11 parametara, a pokazala je i negativan uticaj na parametar vertikalne aktivnosti, koji oslikava radoznalost i želju životinje za istraživanjem i predstavlja važan vid njenih kognitivnih sposobnosti. S obzirom da kod 24 meseca starih jedinki nije bilo promena, možemo reći da uvođenje dijetalne restrikcije nakon adultnog perioda, odnosno nakon 12. meseca života kod pacova, ima uslovno koristan efekat, koji se može postići samo ukoliko se takav režim ishrane uvede do neke određene starosti, nakon čega restrikcija hrane više ne dovodi do pozitivnih promena. Drugim rečima, dijetalna intervencija koja počinje u 18. mesecu koja je pokazana kao prelomna tačka u starenju, i traje 6 meseci, u našoj studiji ne pokazuje koristan efekat na dalji kvalitet života jedinke. Donekle sličan efekat je uočen i pri primeni DR3 tipa restrikcije, naime, ukoliko se ovakav vid ishrane uvede u 15. mesecu života, dakle ponovo pre prelomne tačke, izvesni pozitivni efekti se

mogu uočiti, pa je tako najkraći režim ishrane (DR3) doveo do smanjenja FS kod 18 meseci starih životinja. Međutim, dalje pomeranje vremenske tačke u kojoj se dijeta uvodi, je prouzrokovalo znatno povećanje FS kod najstarije grupe pacova, odnosno imalo je negativne efekte na jedinke. Naime, ovaj režim, uveden u tački od 21 mesec starosti je uticao negativno na čak 4 parametra kod najstarije grupe životinja (vreme i procenat vremena u kretanju, ukupan broj ulazaka i vreme u 3. kraku). Ovakvi rezultati podržavaju teoriju da kratkotrajna dijeta, uvedena u starijoj dobi, nema pozitivan efekat na proces starenja, već naprotiv, da dodatno može da ugrozi stanje organizma koje je kompromitovano samim procesom starenja. Ovi podaci su u korelaciji sa podacima iz testa otvorenog polja, gde je DR3 dijeta dovela do smanjene fizičke aktivnosti i poteškoća u pamćenju i u saglasnosti sa rezultatima ranije publikovane studije u kojoj je restriktivni režim od 60% uveden kod tri različita soja starih miševa (17, 21-24 meseca) doveo do povećane smrtnosti, koja je smanjena nakon vraćanja AL režima ishrane (Forster i saradnici, 2003).

Opisani podaci u testu otvorenog polja, Y lavirinta i proceni krhkosti ukazuju da dugotrajna dijeta koja počinje u adultnom periodu ima najbolji efekat na kognitivne i motoričke starosno-zavisne promene kod pacova. Dijeta uvedena u kasnijem periodu života takođe pokazuje izvesne pozitivne efekte, ali u daleko manjoj meri u odnosu na dijete koja počinje kod adulta. Važno je istaći i da su naši rezultati ukazali i na moguće negativne posledice dijete, ukoliko počne kasno u životu, kada je organizam mnogo podložniji starosno-zavisnim promenama. Ovi rezultati u velikoj meri doprinose boljem razumevanju efekata dijetalne restrikcije i načina na koji dijetalna intervencija može da utiče na produženje života i poboljšanja kvaliteta života. Da bi slika bila upotpunjena, trebalo bi još ispratiti smrtnost životinja pod uticajem različitih režima ishrane, jer smo na ovaj način stekli uvid u to kako DR utiče na zdravo starenje, ali nemamo uvid u to kakav efekat ima na dužinu života. Na žalost, zbog samog dizajna eksperimenta, nismo bili u mogućnosti da ispitamo da li postoje razlike u smrtnosti pod uticajem različitih dijetalnih režima.

U ovoj studiji su praćene i promene biohemijskih parametara, kako u starenju, tako i pod dejstvom sva tri redukovana režima ishrane. Starenje je dovelo do očekivanog pada koncentracije glukoze u serumu pacova, promene koja je već dobro opisana u literaturi kako kod pacova, tako i kod miševa (Van Liew i saradnici, 1993; Srofano i saradnici, 1998; Smiljanić, 2014). Postoje i oprečni rezultati koji pokazuju povećanje

serumske glukoze ali od 3. do 12. meseca starosti kod Wistar pacova, što ipak ne uključuje duboku starost koja je praćena u našim eksperimentima (Ghezzi i saradnici). Neophodno je pomenuti da postoje i znatan broj studija na miševima i pacovima, u kojima starenje nije uzrokovalo promene u nivou serumske glukoze (Harris i saradnici 1994; Ding i saradnici, 2011; Quintas i saradnici, 2012). Takođe, postoje i studije koje su zabeležile promene u glukozi specifične za pol, odnosno, opisano je starosno-zavisno smanjenje glukoze kod mužjaka, ali i povećanje kod ženki pacova (Van Liew i saradnici, 1993).

Za razliku od glukoze i detektovanog starosno-zavisnog pada, nivo insulina u našoj studiji nije pratio promene u nivou glukoze, već je ostao nepromenjen tokom starenja. Podaci u literaturi o promenama serumskog insulina u toku starenja su kontradiktorni, kako u pogledu korelacije sa promenama serumskog nivoa glukoze, tako i u pogledu samih starosno-zavisnih efekata na nivo insulina. Nivo insulina se nije menjao sa starenjem kod 4, 12 i 24 meseca starih Brown Norway pacova (Gordon i saradnici, 2011), dok je kod miševa primećen starosno-zavisni porast insulina, ali samo u određenom periodu života. Naime, porast nivoa insulina je detektovan od 9-12 meseca života, nakon čega je koncentracija insulina ostala nepromenjena. Detektovane promene nisu bile korelisane sa promenama u nivou glukoze (Ding i saradnici, 2011). S obzirom da povećani nivoi glukoze i insulina tokom starenja ukazuju na starosno-zavisne poremećaje u metabolizmu glukoze i vode ka povećanom riziku od metaboličkog sindroma i posledično dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti (Ghezzi i saradnici, 2012; Brewer i saradnici, 2016), možemo reći da Wistar pacovi korišćeni u našem eksperimentu odolevajući ovakvim starosnim promenama, predstavljaju odličnu kontrolu u ispitivanju uticaja DR na proces starenja. Promene biohemijskih parametara u toku restriktivnog režima ishrane su istraživane u velikom broju studija. Dugotrajni režim ishrane (DR1) u našoj studiji je doveo do smanjenja koncentracije glukoze i insulina kod 12 meseci starih pacova, i do smanjenja nivoa insulina kod 24 meseca starih životinja. U literaturi je dobro opisan uticaj DR-a na smanjenje serumskog nivoa glukoze i insulina (Van Liew i saradnici, 1993; Harris i saradnici, 1994; Argentino i saradnici, 2005; Smiljanić, 2012). Usled brojnih starosno-zavisnih bolesti koje su povezane sa visokim nivoom glukoze i insulina, jedan od korisnih efekata redukovanoog režima ishrane se upravo ogleda u smanjenju nivoa ovih parametara u cirkulaciji, što vodi ka povećanju insulinske osetljivosti (Martin i saradnici, 2006). Iako u našoj studiji DR1 restrikcija nije dovela do smanjenja serumske glukoze kod 18 i 24 meseca DR1 životinja, treba istaći da ona ostala

na nivou koji je zabeležen kod životinja starih 6 meseci i koji je u opsegu normalnih vrednosti za ove životinje. To se posebno odnosi na najstariju grupu životinja, jer je DR uspela da održi nivo glukoze koji je prisutan kod mladih životinja. Pokazano je da starosno-zavisni pad koncentracije glukoze u hipokampusu Fischer pacova dovodi do slabijih performansi u prostornoj memoriji, a da naknadna sistemska aplikacija glukoze kod 24 meseca starih životinja dovodi do povećanja nivoa glukoze u hipokampusu i boljih rezultata u testu prostorne memorije i izjednačavanja sa rezultatima mladih jedinki starih 3 meseca (McNay i Gold, 2001). Iako su u našim eksperimentima praćene promene nivoa glukoze samo u serumu, uočena usaglašenost između nivoa glukoze u serumu i hipokampusu nas navodi na zaključak da održanje nivoa sistemske glukoze na nivou koji je zabeležen kod mladih jedinki predstavlja izuzetno koristan efekat restriktivnog režima ishrane. Studija rađena na Wistar-Kyoto pacovima (Yanai i saradnici, 2004), koji su sa 2,5 meseca života stavljeni na dugotrajni režim ishrane, je pokazala da su životinje na DR režimu imale slabije kognitivne performanse u odnosu na AL kontrole tokom skoro čitavog života (od 7-24. meseca starosti) Nakon injeciranja glukoze, njihove performanse su se značajno popravile. Važno je napomenuti da su u pomenutoj studiji praćene i promene u serumskoj glukozi i da je DR koja je počela kod 2,5 meseca starih životinja dovela do značajnog smanjenja nivoa glukoze u svim ispitivanim starosnim tačkama. Upravo ovde možemo podvući razliku, jer je naš DR1 režim, koji je počeo tek sa 6 meseci starosti, održavao nivo glukoze u toku starenja u opsegu koje imaju jedinke stare 6 meseci i pozitivno uticao na kognitivne performanse kod starih jedinki. Treba istaći da nivo insulina kod životinja na DR koji je donekle nizak kod obe starije grupe, ide u prilog pretpostavci da je nepromenjena koncentracija glukoze kod ovih životinja pre specifični kompenzatorni mehanizam dijete koji može ležati u osnovi očuvanja kognitivnih sposobnosti tokom starenja. Kraći dijetalni režimi su doveli do sličnih promena, smanjivši serumsku glukozu kod najstarije grupe životinja, a samo je DR2 režim doveo i do smanjenja u koncentraciji insulina kod najstarije grupe životinja, ali je doveo i do povećanja insulina u 18. mesecu života. Iz literature je poznato da je hiperinsulinemija karakteristična za obolele od dijabetesa, kod prekomerne gojaznosti i kod specifičnih tumora. Na osnovu takvih podataka možemo pretpostaviti je da je u periodu od 12-18 meseci, dijeta privremeno izbacila sistem iz ravnoteže, možda delujući kao prevelik stres koji je doveo do povećanog lučenja insulina, kao što je pokazano u studiji u kojoj su

pacovi Sprague-Dawley bili izloženi stresu u trajanju od 28 dana, koji je izazvao povećanje kortikosterona i insulina u serumu (Morakinyo i saradnici, 2016).

Sledeći niz serumskih biohemijskih parametara ispitivanih u ovoj studiji je vezan za lipidni statut jedinki. Jedinke sa povećanim nivoima serumskih lipida imaju veći rizik od kardiovaskularnih oboljenja i od moždanog udara. Hronično povećanje nivoa serumskog holesterola predstavlja vodeći uzrok kardiovaskularnih oboljenja (Schober i saradnici, 2007; Jokinen, 2014), dok povećan nivo serumskih triglicerida vodi ka povećanom riziku od kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara, pri čemu ovaj rizik raste sa starenjem (Tanne i saradnici, 2001; Chapman i saradnici, 2011). Pokazano je da DR dovodi do pozitivnih efekata na lipidni status životinja, time što smanjuje starosno-zavisne promene lipidnog statusa kod životinja koje bile na visokokaloričnoj dijeti (Masoro i saradnici, 1983; Gao i saradnici, 2017)

Ispitivanja lipidnog profila u našim eksperimentima su pokazala negativan uticaj starenja, koje je bilo praćeno povećanim nivoom triglicerida u serumu Wistar pacova. Slične promene su zabeležene i kod Fišer pacova, kao i u humanim studijama (Van Liew i saradnici, 1993; Smiljanić, 2012; Xia i saradnici, 2017). Za razliku od triglicerida, koncentracija ukupnog holesterola u serumu je ostala nepromenjena. Rezultati različitih istraživanja koja su se bavila uticajem starosti na promenu ukupnog serumskog holesterola su kontradiktorni. Dok većina studija ukazuje na povećanje (Van Liew i saradnici, 1993; Smiljanić, 2012), postoje studije na miševima i pacovima u kojima se nivo holesterola ne menja sa starenjem (Scrofano i saradnici, 1998; Hubert 2000). Uz prethodno opisane promene glukoze i insulina u serumu, izostanak povećanja nivoa serumskog holesterola primećen u starenju, dodatno ukazuje na to da Wistar pacovi korišćeni u našoj studiji ne pokazuju znake patoloških promena koje su povezane sa starenjem, sa izuzetkom povećanja nivoa triglicerida.

Jedna od najčešće DR indukovanih promena kod glodara u opisanih u literaturi je smanjena koncentracija serumskih lipida (Van Liew i saradnici, 1993; Hubert i saradnici, 2000), što je u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, dugotrajna DR1 je dovela do smanjenja koncentracije triglicerida u svim ispitivanim starosnim grupama, kao i ukupnog holesterola u serumu 18 i 24 meseca starih pacova. Ovakva promena još jednom naglašava koristan efekat restriktivnog režima ishrane, i pokazuje koliko efektan može biti uticaj dugotrajne restrikcije hrane, odnosno

koliko količina konzumirane hrane može menjati lipidni profil u serumu i posledično delovati na rizik od kardiovaskularnih oboljenja i moždanog udara.

Kraći dijetalni režimi, DR2 i DR3 su su isto doveli do smanjenja holesterola i triglicerida ali samo u najstarijoj grupi životinja, dok su kod 18 meseci starih jedinki prouzrokovali povećanje serumskog holesterola. Pojava da se pod uticajem redukovanog režima ishrane nivo serumskog holesterola povećava je već opisana u literaturi kod mužjaka i ženki Sprague-Dawley pacova koje su bili pod 45%DR režimom od 4. nedelje pa do 23 meseca starosti (Hubert, 2000). Naime, u prvih 7 nedelja DR je doveo do povećanja serumskog holesterola, ali se njegov nivo nakon 6. meseca starosti više nije značajno razlikovao od AL kontrola. Moguće je da je kod životinja smanjeni režim ishrane prouzrokovao stres, koji je rezultirao povećanjem pomenutih parametara, ali su one uspele da se adaptiraju nakon određenog vremena. Poznato je da na povećani gubitak masnog tkiva uzrokovanog dijetom organizam može da reaguje kao stres, povećanom sintezom endogenog holesterola, ili smanjenjeme katabolizma LDL/HDL, usled čega je zabeleženo povećanje ukupnog holesterola (Liu i saradnici, 2014). Za razliku od pomenute studije na Sprague-Dawley pacovima, naše životinje se nisu adaptirale na isti način, što je najverovatnije posledica starosti, budući da kod starih životinja dolazi do poremećaja u regulaciji hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne ose (engl. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*, HPA) ose koja reguliše odgovor indukovani stresom (Sutanto i Kloet, 1994, Sapolsky i saradnici, 1983). Treba uzeti u obzir da je u ovoj grupi primećeno i povećanje insulina u serumu, što takođe može biti uzrok hroničnog stresa prouzrokovanog kraćim dijetalnim režimom koji počinje u kasnijem dobu života.

Naši rezultati pokazuju da i u pogledu regulacije nivoa biohemijskih parametara dugotrajni režim ishrane daje najbolje efekte, smanjujući nivoe glukoze i insulina kod 12 i 24 meseca starih pacova, a holesterola i triglicerida kod većine ispitivanih grupa. S obzirom da povećani nivoi serumske glukoze, insulina, holesterola i triglicerida predstavljaju rizik od kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma, moždanog udara i dijabetesa, može se zaključiti da DR1 pokazuje protektivno dejstvo smanjivanjem ovih parametara u serumu pacova (Tanne i saradnici, 2001; Schober i saradnici, 2007; Jokinen, 2014; Cira i saradnici, 2015; Chapman i saradnici, 2011; Ghezzi i saradnici, 2012; Brewer i saradnici, 2016). Kraći dijetalni režimi su smanjili nivoe pomenutih biohemijskih parametara samo kod najstarije grupe životinja, dok su kod 18 meseci starih životinja doveli do povećanja insulina i holesterola, što je inače karakteristično za visoko kaloričnu

dijetu. Zato je neophodno uvideti važnu ulogu dužine trajanja i vremena početka restrikcije hrane u prevenciji starosno-zavisnih promena.

Dugotrajna DR je dovela do izraženih korisnih promena u nivou ukupne aktivnosti, kognitivnom statusu i smanjila je krhkost životinja, a uz to je pozitivno uticala na promene u biohemijskim markerima koji su povezani sa velikim brojem starosno-zavisnih bolesti. Kraći dijetalni režimi su pokazali znatno slabiji pozitivan efekat na kognitivne i motoričke sposobnosti, kao i na biohemijske parametre, a najkraći režim je čak doveo i do povećanja krhkosti u odnosu na AL kontrolu. Usled odsustva značajnih korisnih efekata DR2 i DR3 režima u odnosu na dugotrajnu DR1, odlučili smo da za detaljniju analizu energetskeg statusa mozga odaberemo DR1 tip restrikcije. Zbog toga smo ispitali uticaj starenja i DR1 režima na promene u AMPK i glukoznim receptorima u kori prednjeg mozga i hipokampusu, kao i na insulinski signalni put i ekspresiju NPY peptida u hipokampusu i hipotalamusu pacova. Ovi regioni mozga su izabrani preventivno zbog svoje uloge u energetskom metabolizmu, kao i zbog toga što je poznato da sa starenjem u njima dolazi do izraženih promena, a ujedno pokazuju i najbolji odgovor na restrikciju hrane (Mladenović Đorđević i saradnici, 2010; Perović i saradnici, 2013; Mladenović Đorđević i saradnici, 2014; Smiljanić i saradnici, 2015). Naime, hipokampus i kora prednjeg mozga su strukture koje imaju važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja i karakterišu se izuzetno visokom potrošnjom energije (Gage i saradnici, 1984; Sengupta, 2010). Samim tim ove dve strukture su veoma osetljive na smanjeni metabolizam glukoze koji je karakterističan za proces starenja (Camandola i Mattson, 2017). Upravo zato su kora prednjeg mozga i hipokampus pacova izabrani za ispitivanje promena pod uticajem starenja i DR na ekspresiju proteina AMPK i glukoznih transportera. Uloga hipotalamusa u energetskom metabolizmu se odnosi na njegovu ulogu u regulaciji unosa hrane, u čemu važnu ulogu ima insulinski signalni put (Plum i saradnici, 2005), a sve je više podataka koji ukazuju na ulogu insulinskog puta i u procesima učenja i pamćenja i smatra se da to dejstvo insulin ostvaruje upravo u hipokampusu (Zhao i saradnici, 1999; McNay i saradnici, 2010). Iz tog razloga smo odlučili da istražimo kakav efekat starenje i dijetalna restrikcija imaju na insulinski signalni put u hipokampusu i hipotalamusu.

U normalnim, fiziološkim uslovima, glukoza predstavlja osnovni izvor energije u moždanom tkivu. U procesu starenja, dolazi do promena u regulaciji metabolizma glukoze, a usled svojih visokih energetskeg zahteva, ćelije hipokampusu i kore prednjeg

mozga su veoma osjetljive na promene energetskeg statusa (Camandola i Mattson, 2017). Poremećaji u održavanju energetske homeostaze mogu ugroziti zdravo starenje i dovesti do nastanka starosno-zavisnih bolesti. AMPK predstavlja jedan od osnovnih regulatora energetskeg metabolizma. Redukcija nivoa ATP-a u uslovima smanjene energije dovodi do aktivacije AMPK koja aktivira kataboličke procese, a inhibira procese koji troše veliku količinu energije, dovodeći do poboljšanja energetskeg statusa organizma. U organizmu AMPK ima veoma kompleksnu ulogu jer, pored regulacije energetske homeostaze CNS-a, preko neuro-humoralnih signala utiče i na regulaciju energetske homeostaze u perifernim tkivima. Kada su u pitanju starosno-zavisne promene bazalnih nivoa AMPK u normalnom, fiziološkom starenju, rezultati u literaturi su kontradiktorni i uglavnom uključuju istraživanja na skeletnim mišićima, jetri i u srcu (Reznik 2007b; Qiang i saradnici, 2007; Turdi i saradnici, 2010; Hua i saradnici, 2011; Li i saradnici, 2012; Hardman, 2014; Zhang i saradnici, 2014). Jedina studija koja opisuje promene u nivou fosfo-AMPK u mozgu u normalnim, fiziološkim uslovima govori o povećanom nivou kod starih miševa (Liu i saradnici 2012). Istraživanja koja su za cilj imala ispitivanje starosno-zavisne promene u jačini odgovora AMPK nakon određene stimulacije su pokazala da sa starenjem dolazi do smanjenog odgovora AMPK na stimulaciju, odnosno njene smanjene aktivacije. Naime, eksperimentalno prouzrokovana hipoksija jetre, ishemija mozga i aktivacija AMPK u skeletnim mišićima pomoću farmakoloških supstanci dovela je do aktivacije AMPK kod mladih, ali ne i kod starih jedinki (Mulligan i saradnici 2005; Reznick i saradnici, 2007; Liu i saradnici, 2012). Ispitujući nivoe AMPK u kori prednjeg mozga i hipokampusa kod Wistar pacova u našoj studiji, nismo uočili starosno-zavisne promene kako u ukupnoj, tako ni u fosforilisanj formi AMPK. Treba istaći da u našim eksperimentima nisu odvojeno praćene promene pojedinačnih AMPK α 1 i AMPK α 2 izoformi, već samo ukupna AMPK α . U literaturi se mogu naći podaci da starenje različito utiče na promene ove dve izoforme AMPK i dok se jedna izoforma u toku starenja smanjuje, druga se povećava (Hardman i saradnici, 2014). Upravo to može biti uzrok izostanka starosno-zavisne promene u aktivnosti i ukupnom nivou AMPK. Sa druge strane, moguće je da naši rezultati govore u prilog tome da je moždano tkivo relativno zaštićeno od promena u energetskeg statusu u toku normalnog fiziološkog starenja i da, i ako ima promena u AMPK između starih i mladih jedinki, one se jedino mogu uočiti ako izvedemo sistem iz ravnoteže.

Poremećaji u aktivnosti AMPK su povezane sa dugotrajnim povećanjem unosa kalorija i posledičnom insulinskom rezistencijom, gojaznošću i bolestima poput dijabetesa tipa II i kardiovaskularnih bolesti, što je dokumentovano u velikom broju studija (Salminen i Kaarniranta, 2012). Sa druge strane, smatra se da je AMPK signalni put jedan od važnih medijatora pozitivnih efekata dijetalne restrikcije i da DR stimuliše aktivnost AMPK putem insulinskog i SIRT signalnog puta, kao i aktivacijom adipocita (Jeon, 2016). U našoj studiji, dugotrajna dijetalna restrikcija je dovela do povećanja ukupne i fosforilisane forme AMPK u hipokampusu, dok je ovaj efekat u kori prednjeg mozga izostao, što ukazuje na regionalnu specifičnost u efektima DR. Veća osetljivost hipokampusa na efekte DR u odnosu na koru mozga je prethodno pokazano u mnogobrojnim studijama (Mladenović Đorđević i saradnici, 2010; Perović i saradnici, 2013; Mladenović Đorđević i saradnici, 2014; Smiljanić i saradnici, 2015). Jedno od objašnjenja bi moglo biti da DR1 režim ishrane nema efekata na AMPK signalni put u kori prednjeg mozga, ili da svoje korisne efekte u ovoj strukturi ispoljava preko drugih signalnih puteva. U hipokampusu, kod 24 meseca starih životinja DR režim je doveo do dvostrukog povećanja ukupnog i fosfo-AMPK nivoa. Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima istraživanja u kojima je 60% DR povećala nivo AMPK u hipokampusu u istoj meri kao i DR1 režim ishrane u našim eksperimentima. U pomenutoj studiji je pokazano da ovo povećanje nivoa AMPK za posledicu ima povećanu neurogenezu i bolje kognitivne performanse kod miševa (Dagon i saradnici, 2005). I druga istraživanja su pokazala da povećana aktivnost AMPK ima neuroprotektivno dejstvo u hipokampusu (Culmsee i saradnici, 2001), a pokazano je da pomaže i u preživljavanju astrocita nakon ishemije i indukovane apoptoze (Blazquez i saradnici, 2001; Almeida i saradnici, 2004). To navodi na pretpostavku da uočeno povećanje u ekspresiji AMPK u hipokampusu naših pacova može biti jedan od faktora koji leže u osnovi boljih kognitivnih sposobnosti koje su ove životinje pokazale u testu Y lavirinta i otvorenog polja. Novija istraživanja ukazuju na to da AMPK dovodi do povećanja adultne neurogeneze (Potts i Lim, 2012; Voloboueva i saradnici, 2017) kao i da adultna neurogeneza u hipokampusu može doprineti poboljšanju procesa učenja i pamćenja (Deng i saradnici, 2010; Marin-Burgin i Schinder, 2012; Cameron i Glover, 2014). Slično je pokazano i kod miševa, gde injeciranje potentnog aktivatora AMPK dovodi do povećane adultne neurogeneze u dentatnom girusu i boljih rezultata u testu prostorne memorije (Kobilo i saradnici, 2011). Međutim, treba napomenuti da aktivacija AMPK nema uvek pozitivne efekte i da u

slučaju znatno restriktivnije dijetete (DR životinje dobijaju 40% od unosa AL) dolazi do prekomerne aktivacije AMPK, kod koje su nivoi tri puta veći u odnosu na kontrolu, što je dovedeno u vezu sa smanjenom neurogenezom i pogoršanjem u izvođenju kognitivnih zadataka kod miševa (Dagon i saradnici, 2005). Takođe, smatra se da je jedan od uzroka smanjene plastičnosti u hipokampusu kod pacijenata obolelih od AB i uočena hiperaktivnost AMPK, te da inhibicija aktivnosti AMPK umanjuje negativne promene u procesima učenja i pamćenja koje su karakteristične za AB (Ma i saradnici, 2014). Slični rezultati su dobijeni i u mišjem modelu epilepsije (Potter i saradnici, 2010), dok su istraživanja *in vitro* i *ex vivo* pokazala da je AMPK odgovorna za snabdevenost neurona dovoljnom količinom energije u toku sinaptičke aktivnosti (Marinangeli i saradnici, 2018). U ovom slučaju je pokazano da inhibicija AMPK dovodi do poremećaja u procesu dugotrajne potencijacije (engl. *Long-Term Potentiation*, LTP) koji leži u osnovi formiranja memorije. Sve navedeno upućuje na potencijalnu ulogu AMPK u procesima učenja i pamćenja putem regulacije sinaptičke plastičnosti hipokampusa. Važno je istaći da je neophodan fini balans u nivou aktivacije AMPK, jer umereno povećanje ove kinaze, kao što je zabeleženo i u našem eksperimentu, verovatno dovodi do pozitivnih efekata na molekularnom nivou, pospešujući proces neurogeneze i sinaptičke plastičnosti, putem kojih deluje i na složene procese učenja i pamćenja. Sa druge strane, suviše jak odgovor AMPK bi mogao da prouzrokuje potpuno suprotan efekat na proces neurogeneze i kognicije.

Kako je starenje praćeno promenama u nivou glukoze u cirkulaciji i u regulaciji preuzimanja glukoze u mozak (Craft 2006), sledeći korak u ispitivanju je bio određivanje nivoa glukoznih transportera u mozgu. Analizirali smo nivoe GLUT1, GLUT3 i GLUT4 transportera u hipokampusu i kori prednjeg mozga, kod pacova starih 6, 12, 18 i 24 meseca. Uočili smo da i pored uticaja na smanjenje glukoze u serumu, starenje nije uticalo na ekspresiju pomenutih proteina ni u jednom ispitivanom regionu. To bi mogao biti pokazatelj da je mozak, zahvaljujući KMB, dobro zaštićen od promena u perifernoj cirkulaciji (Keaney i Campbell, 2015), a već opisan izostanak promena u AMPK u toku starenja, ide u prilog ovoj pretpostavci. U literaturi postoji malo podataka o promenama glukoznih transportera sa starenjem, a kod istraživanja koja su se bavila ovom temom, rezultati su kontradiktorni. Kod pustinjskih miševa, starenje je smanjilo ekspresiju GLUT1 u hipokampusu u 18. i 24. mesecu starosti (Lee i saradnici, 2018), dok je kod miševa nakon 12. meseca života uočen pad u nivou hipokamalne izoforme GLUT1 koja

je predominantno u endotelnim ćelijama (55kDa), ali ne i GLUT1 izoforme specifične za astrocite (44kDa) (Ding i saradnici, 2013). Kod pacova starih 21 mesec nije došlo do promene u nivou proteina, ni informacione RNK za GLUT1 u mozgu, masnom tkivu, kao ni u skeletnim mišićima, što je u skladu i sa našim podacima (Oka i saradnici, 1992). Starenje nije uticalo na nivo GLUT3 u hipokampusu džerbila, ali je dovelo do smanjenja u hipokampusu miševa. Zabeleženi pad u ekspresiji GLUT3 kod miševa je detektovan od 3-12. meseca, a nakon toga je ostao nepromenjen do 15. meseca (Ding i saradnici, 2013; Lee i saradnici, 2018). Starosno-zavisne promene u koncentraciji GLUT 4 nisu detektovane u hipokampusu, dok je u masom tkivu i skeletnim mišićima starenje dovelo do pada u koncentraciji ovog transportera (Oka i saradnici, 1992; Ding i saradnici, 2013). Imunohistohemijska analiza ekspresije GLUT3 transportera je pokazala da se nivo GLUT3 u toku starenja menja u specifičnim delovima hipokampusa, poput dentatnog girusa i CA3 regiona (Fattoretti i saradnici, 2001). To upućuje na pretpostavku da su promene u ekspresiji glukočnih transportera vrlo specifične i ograničene na određene subregione mozga, te da je za detekciju promena u nivou GLUT-ova podesnija imunohistohemijska metoda, koja u odnosu na Western blot omogućava detekciju proteina u specifičnim regionima mozga.

U normalnim, fiziološkim uslovima mozak u potpunosti zavisi od glukoze kao osnovnog izvora energije. GLUT1 su eksprimirani kako u endotelnim ćelijama KMB, što im daje ključnu ulogu u preuzimanju glukoze u mozak, tako i na astrocitima, omogućavajući im da preuzmu glukozu iz parenhima. Sa druge strane, GLUT3 receptori su karakteristični za neurone i aktiviraju se pri vrlo niskim koncentracijama glukoze u mozgu, što osigurava da neuroni uvek imaju izvor energije. Astrociti uz pomoć GLUT1 preuzimaju glukozu i od nje sintetišu laktat ali su sposobni da laktat sintetišu i iz glutamata koji preuzimaju iz parenhima. Još uvek je diskutabilno da li neuroni kao osnovni izvor energije koriste laktat, ili sami neuroni putem vrlo osetljivih GLUT3 preuzimaju glukozu čak i kada je njena koncentracija u ćelijskom parenhimu izuzetno niska (Bennarroch, 2014). Pored GLUT 1 i GLUT3, u specifičnim regionima mozga, kao što su acetilholinski neuroni prednjeg mozga, nalazi se insulin-zavisan GLUT4 transporter i obično se eksprimira zajedno sa GLUT3 receptorom. Uloga insulin-zavisnih GLUT4 receptora u mozgu još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali veruje se da se oni aktiviraju kada su energetske potrebe u specifičnim regionima mozga visoke (Mueckler i Thorens, 2013). Nedavno je pokazano da miševi kojima je utišan gen za GLUT4 u

čitavom mozgu pokazuju simptome insulinske rezistencije, ali da blokada GLUT4 samo u hipokampusu, a ne i u ostalim moždanim regionima, dovodi do poremećaja u kognitivnim performansama, bez efekata na insulinsku rezistenciju (Pearson-Leary i McNay, 2016; Reno i saradnici, 2017). Ovaj podatak može ukazati na to da GLUT4 u specifičnim regionima mozga može imati funkcije koje nisu u vezi sa insulinskim metabolizmom. Mi nismo detektovali promene u nivoima glukoernih transportera u hipokampusu, već samo u kori prednjeg mozga, što ukazuje na to da dugotrajna restrikcija hrane ne utiče na energetski status hipokampusa, barem ne na nivou glukoerne homeostaze. Isto tako je moguće da Western blot metoda nije dovoljno senzitivna za detekciju suptilnih promena do kojih možda dolazi u ekspresiji glukoernih transportera pod uticajem DR, ili su pak te promene ograničene na vrlo specifične subregione hipokampusa (Fattoretti i saradnici, 2001). Kod 12 meseci starih DR1 životinja je primećeno smanjenje u nivoima GLUT3 i GLUT4 proteina u kori prednjeg mozga. Uočeno smanjenje nivoa insulina u cirkulaciji je u skladu sa detektovanim smanjenjem nivoa ekspresije GLUT4 (Mueckler i Thorens, 2013), ali usled smanjene glukoze u perifernoj cirkulaciji očekivano je povećanje, a ne smanjenje u ekspresiji GLUT3. Međutim, ovakva promena je već zabeležena kod pacova izloženih dijetalnom režimu ishrane, kod kojih je dijeta u trajanju od samo 7 dana smanjila nivo glukoze u serumu i dovela do smanjenja GLUT3 u mozgu (Cheng i saradnici, 2003). Moguće je, da u ovom slučaju, GLUT3 nije prva karika u snabdevanju neurona glukoerom, već to čine astrociti putem laktata. Kod najstarije grupe pacova je došlo do povećanja u ekspresiji GLUT1 i GLUT3 receptora, što ukazuje na to da DR kod starih životinja u kori prednjeg mozga dovodi do povećane potrebe neurona za energijom. Moguće je i da je ovo povećanje u nivou glukoernih transportera imalo uticaja na očuvanost kognitivnih performansi u Y lavirintu kod ovih životinja, jer je pokazano da je starosno-zavisno smanjenje metabolizma glukoze u ćelijama hipokampusa i kore prednjeg mozga praćeno i lošijim performansama na testovima pamćenja i ućenja kod pacova (Gage i saradnici, 1984; McNay i Gold, 2001; Yanai i saradnici, 2004).

DR1 režim je imao pozitivno dejstvo na energetski metabolizam samo nakon 18 meseci trajanja odnosno, kod najstarije grupe životinja, povećavajući nivoe AMPK i njegove fosforilisane forme u hipokampusu i GLUT3 i GLUT4 transportera u kori prednjeg mozga. S obzirom na to da kod životinja starih 18 meseci, koje su bile na DR režimu godinu dana, nisu uočene promene u pomenutim proteinima, ovo je još jedna

potvrda da dugotrajna dijetalna restrikcija ima koristan efekat kod starih jedinki samo ako je dovoljno dugo trajala. Uz opisane nivoe glukoze koji su ostali na nivou mladih jedinki, i uočene promene u energetsom metabolizmu na proteinskom nivou, možemo reći da je dugotrajna DR uticala na snabdevenost kore prednjeg mozga i hipokampusa dovoljnom količinom energije, što je se verovatno kasnije pokazalo kroz poboljšanje kognitivnih i motoričkih performansi životinja u dubokoj starosti (Gage i saradnici, 1984; Dagon i saradnici, 2005).

Istraživanja iz pedesetih godina prošlog veka su pokazala da je mozak insulin-zavisan organ (Ghasemi i saradnici, 2013). Insulin prolazi KMB (Banks i Kastin, 1985; Miller i saradnici, 1994), a sve više istraživanja u poslednjih dvadesetak godina ukazuje na to se mali deo insulina sintetiše i u samom mozgu (Clarke i saradnici, 1986; Devaskar i saradnici, 1993; Schester i saradnici, 1996; Dakic i saradnici, 2017). Insulin svoj efekat u mozgu ostvaruje vezujući se za insulinski receptor i/ili za receptor insulinu-sličnog faktora rasta (engl. *Insulin-like Growth Factor Insulin Receptor*, IGF-IR) koji su locirani u plazma membrani, a dalji prenos signala se odvija preko IRS1-PI3K-Akt signalne kaskade (Vadas i saradnici, 2011). Na ovaj način insulin učestvuje u regulaciji aktivnosti proteina GSK3 beta, FoxO familije transkripcionih faktora i mTOR signalnog puta (Fernandes i Torres-Aleman, 2014), koji imaju važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, autofagiji, neurogenezi i energetsom metabolizmu (Salcedo-Tello i saradnici, 2011; Kim i saradnici, 2012). Postoji još jedan signalni put preko kog insulin može učestvovati u regulaciji ćelijske proliferacije, diferencijacije i organizacije citoskeleta, a pokazano je i da dolazi do preklapanja ovog signalnog puta sa PI3K putem (Aksamitiene i saradnici, 2012; Kleinriders i saradnici, 2014).

Jedna od negativnih karakteristika procesa starenja je hronična aktivacija insulinskog puta, čime se razvija insulinska rezistencija (Roberts i saradnici, 2013). To je slučaj kod hiperinsulinemije i dijabetesa tipa II, koje su u pozitivnoj korelaciji sa povećanim rizikom od bolesti i povećanom stopom smrtnosti. I pored mnoštva podataka, još uvek se intenzivno traga za tačnim objašnjenjem uzročno-posledične veze između insulinskog signalnog puta i procesa starenja. Može se reći da starenje dovodi do disfunkcionalnosti, odnosno hronične aktivacije insulinskog puta i posledično, insulinske rezistencije koja je u osnovi mnogobrojnih patoloških stanja. Poremećaji ovog signalnog puta su uočeni i u neurodegenerativnim bolestima, jer je pokazano da patološke karakteristike Alchajmerove bolesti karakterišu i eksperimentalno indukovani moždani

dijabetes, te se može reći da AB može da se posmatra kao dijabetes tipa III, forma dijabetesa koja uključuje i mozak (de la Monte i Wands, 2008).

Mi smo pratili promene u ekspresiji proteina insulina i njegovog receptora IR, IRS1, Akt-a, kao i njihove aktivne, odnosno fosforilisane forme, i uočili da u hipokampusu i hipotalamusu Wistar pacova starenje nije dovelo do promena u ekspresiji proteina insulinskog signalnog puta. Dosadašnji eksperimentalni podaci o uticaju starenja na promene u insulinskom signalnom putu su vrlo raznoliki, a razlike su verovatno posledica i soja životinja, eksperimentalnog pristupa, kao i tkiva na kome su eksperimenti rađeni (Fulop i saradnici, 2003; Bartke, 2008, Liu i saradnici, 2017). Najobimnija istraživanja na ovu temu su sprovedena na skeletnim mišićima i jetri, a mnogo su manje zastupljena istraživanja na mozgu. U jetri i skeletnim mišićima pacova starenje nije dovelo do promene u nivou ukupnog IR, već je detektovano samo smanjenje fosfo-IR, dok se nivo IRS1 smanjio počev već od 5. meseca života i ostao na datom nivou do 20. meseca (Carvalho i saradnici, 1996). Istraživanja na Wistar pacovima ukazuju da starenje praćeno od prvog dana života pacova pa do do 13. meseca života ne dovodi do promena u ukupnom IR u kori prednjeg mozga i cerebelumu, ali smanjuje ekspresiju fosfo-IR (Fernandes i saradnici, 2001). Sa druge strane, kod miševa je starenje dovelo do smanjenja u broju receptora u čitavom mozgu, ali i do povećanja afiniteta ovog receptora za insulin (Zaia i Piantanelli, 2000), a isti efekat na IR je pokazan i u hipokampusu pustinjских miševa (Park i saradnici, 2009). Dodatno, ispitali smo uticaj starenja na promene NPY peptida u istim moždanim regionima i vremenskim tačkama, ali ni u koncentraciji ovog peptida nismo uočili starosno-zavisne promene. Literatura je i u slučaju NPY oprečna, naime kod Sprague Dawley pacova je detektovano smanjenje nivoa NPY tokom starenja, kao i smanjeno otpuštanja ovog peptida pri depolarizaciji membrane (Sahu i saradnici, 1988), dok kod pacova soja Fischer nisu uočene promene u nivou NPY tokom starenja (Li i saradnici, 1998). Studija na Brown-Norway pacovima je pak pokazala da je smanjenje u ekspresiji NPY vremenski specifično, pa je tako pad u iRNK za NPY detektovan samo u periodu od 3-13. meseca života (Gruenewald i Matsimoto, 2001).

Ako uzmemo u obzir da na molekularnom nivou nismo uočili starosno zavisne promene ni u jednom ispitivanom proteinu (AMPK, GLUT-ovi, IR, IRS1, Akt, insulin i NPY) i da je starenje dovelo samo do blagog smanjenja glukoze i triglicerida u 24. mesecu, možemo pretpostaviti da kod Wistar pacova starenje ne dovodi do promena u

proteinima koji su uključeni u energetske metabolizam i ispitivani insulinski signalni put u mozgu. Međutim, treba imati u vidu da je regulacija insulinskog puta izuzetno kompleksna i da insulin može ispoljiti svoje dejstvo i putem druge signalne kaskade, te je starenje je moglo uzrokovati promene u nekim od proteina koji nisu praćeni u našoj studiji.

Smatra se da dijetalna restrikcija dovodi do povećanja dužine života, ali što je možda još važnije, do kvalitetnijeg i zdravijeg života, i do smanjenja rizika od pojave starosno-zavisnih oboljenja. Uz to, sve je više dokaza koji idu u prilog teoriji da su Alchajmerova bolest i drugi oblici demencije povezani sa insulinskom rezistencijom ali ne na periferiji, već u mozgu (de la Monte i Wands, 2008, Benedict i Grillo, 2018). Uticaj DR na insulinsku osetljivost može zavisiti od opšteg stanja organizma. Naime, longitudinalna studija na starim majmunima koji su bili podvrgnuti dugotrajnom DR režimu (12-17 godina) je pokazala da dolazi do povećanja insulinske osetljivosti u kori velikog mozga i u hipokampusu (Willette i saradnici, 2012), dok DR tretman na gojaznim majmunima u trajanju od dva meseca nije doveo do smanjenja nivoa insulinskog receptora u kori velikog mozga (Mitchell i saradnici 2012). Smatra se da u osnovi smanjene insulinske osetljivosti stoji poremećena regulacija insulinskog signalnog puta (Giani i saradnici, 2008; Boucher i Kleinridders, 2014). Usled toga, moguće je da DR ispoljava svoj efekat na insulinsku osetljivost tako što reguliše aktivnost proteina uključenih u ovaj signalni put. Iz tog razloga smo pokušali da ispitamo da li dugotrajni DR1 režim dovodi do promena u proteinima insulinskog signalnog puta u mozgu.

Efekti dugotrajne DR na insulinski signalni put u našim eksperimentima su bili regionalno- i starosno-specifični, odnosno zavisili su od ispitivane regije mozga i starosne dobi životinje. Kod životinja starih 12 meseci nisu detektovane DR indukovane promene u insulinskom signalnom putu, niti uticaj DR na ekspresiju NPY u hipokampusu i hipotalamusu. U hipokampusu ovih životinja nisu uočene ni promene u AMPK putu, niti u ekspresiji glukoznih transportera, a s obzirom na to da je jedina uočena promena kod ove grupe životinja bila na nivou glukoznih transportera u kori prednjeg mozga, restrikcija hrane je u ovoj starosnoj dobi imala vrlo specifičan regionalni efekat. Moguće je da je kora prednjeg mozga podložnija uticaju DR u mlađem dobu. Tome u prilog idu i istraživanja uticaja DR na promene BDNF-a u starenju rađeni u našoj laboratoriji u kojima je pokazano da DR kod 12 meseci starih životinja isto dovodi do promena u nivou proteina u kori mozga, ali ne i u hipokampusu (Smiljanić i saradnici, 2015).

Prva promena u insulinskom putu pod dejstvom DR se u hipokampusu uočava tek kod životinja koje su joj bile izložene u trajanju od 12 meseci, odnosno kod 18 meseci starih pacova. Kod njih je detektovano smanjenje fosforilisane forme IR i IRS1 i njihova smanjena aktivacija, što ukazuje na ukupnu smanjenu aktivnost insulinskog signalnog puta. Slični rezultati su objavljeni u studiji u kojoj je 70% DR u trajanju od 30 nedelja dovela do smanjene aktivnosti insulinskog signalnog puta kod miševa starih 14 meseci, putem smanjenja količine IR, IRS1, PI3K i Akt proteina u hipokampusu (Ma i saradnici, 2014). Intermitentna dijeta u trajanju od 6 nedelja je takođe dovela do smanjene aktivnosti Akt i GSK3 beta proteina, uključenih u signalni put insulina i to u mozgu miševa starih 6 meseci (Lu i saradnici 2011). Pomenuti eksperimenti ukazuju da različiti dijetalni režimi sa potpuno različitim metaboličkim konceptom dovode do sličnih promena u insulinskoj homeostazi. Pokazano je da dijetalna restrikcija dovodi do povećanja insulinske osetljivosti u ćelijama jetre, adipocita i skeletnih mišića pacova (Barzilai i saradnici, 1998; Escriva i saradnici, 2007; Prasannarong i saradnici, 2012). Shodno tome, moguće je da uočeno smanjenje aktivnosti insulinskog puta kod životinja iz našeg eksperimenta može biti odraz povećanja insulinske osetljivosti koja je nastala kao posledica restriktivnog režima ishrane (Giani i saradnici, 2008; Boucher i Kleinridders, 2014). Podaci iz literature ukazuju na postojanje veze između pojave insulinske rezistencije u mozgu i poremećaja u kognitivnim sposobnostima koje se javljaju tokom starenja, kao i na sposobnost DR da umanja, odnosno spreči ovakve promene (Stranahan i Mattson, 2011; Cetinkalp i saradnici, 2014; Ma i saradnici, 2015; Su i saradnici, 2016). Tome u prilog ide i uočeno poboljšanje kognitivnih performansi pacova iz našeg eksperimenta, jer su DR1 životinje stare 18 meseci imale bolje rezultate u testovima Y lavirinta od AL kontrola. Navedeni podaci ukazuju na mogućnost da je smanjena aktivnost insulinskog signalnog puta detektovana kod pacova starih 18 meseci pod dejstvom dijetalne restrikcije, dovela do povećanja insulinske osetljivosti i posledično do boljih rezultata u testu prostorne memorije.

Slično detektovanim promenama u hipokampusu, u hipotalamusu 18 meseci starih životinja uočeno je smanjenje ukupne forme IRS1 kao i njene aktivnosti pod dejstvom DR, koji je doveo i do smanjenje nivoa Akt proteina. Ovakav efekat dijetne na hipotalamus se može objasniti anoreksigenom ulogom koju insulin ima u regulaciji unosa hrane. Takvo dejstvo insulin ostvaruje regulacijom ekspresije nekoliko neuropeptida u hipotalamusu (Plum i saradnici, 2005). Postoje dve grupe neurona hipotalamusa koji

detektuju promene u energetsom statusu, prvu grupu čine neuroni koji sintetizuju proteine Aguti i NPY koji se aktiviraju pri niskim koncentracijama glukoze i insulina. Ovo posledično dovodi do oreksigenog signala, tj. povećava se potreba organizma za unosom hrane. Sa druge strane, povećana koncentracija insulina na periferiji dovodi do blagog povećanja koncentracije insulina u mozgu, koji se vezuje za IR na tzv POMC neuronima, odnosno neuronima hipotalamusa koji sintetizuju protein proopiomelanokortin (engl. *Proopiomelanocortin*, POMC). Na taj način se pokreće IRS-PI3K-Akt signalna kaskada i anoreksigeni signal, odnosno njihovom aktivacijom se stimulišu procesi koji dovode do smanjenog unosa hrane u organizam (Gerozissis i Rouch 2001; Steculorum i saradnici, 2014; Hadem i saradnici, 2018). Pošto vezivanje insulina za specifične neurone hipotalamusa dovodi do sinteze anoreksigenih peptida i smanjene potrebe za hranom, sistem je pod dijetalnom restrikcijom reagovao tako što je smanjio nivo/aktivnost proteina uključenih u insulinski signalni put u hipotalamusu 18 meseci starih životinja.

Kod životinja starih 24 meseca, DR je imala nešto drugačije efekte nego kod mlađe grupe. Kao prvo, primećeno je povećanje insulina u tkivu hipokampusa i hipotalamusa. Zna se da je prolazak insulina iz periferne cirkulacije u mozak pod strogom kontrolom insulinskog transportera, a važna njegova odlika je da je zasićen serumskim nivoom insulina koji ne dovodi do hipoglikemije (Woods i Porte 1977; Banks i saradnici, 1997c). Zahvaljujući tome, pokazano je da povećanje serumskog insulina ili uopšte ne dovodi, ili dovodi do blagog povećanja insulina u cerebrospinalnoj tečnosti, kao i u intersticijalnoj tečnosti (Stanley i saradnici, 2016). Uzimajući u obzir uočeno smanjenje insulina u serumu 24 meseca DR grupe životinja, detektovano povećanje nivoa insulina u hipokampusu i hipotalamusu kod ovih pacova može biti posledica *de novo* sinteze insulina. Pokazano je da se sinteza insulina ne odvija samo u neuronima, već i u endocitnim ćelijama, koje verovatno luče sintetisani insulin u cerebrospinalnu tečnost i ona dalje prenosi insulin do specifičnih regiona mozga kojima je insulin potreban (Devaskar i saradnici, 1993; Devaskar i saradnici, 1994; Hoyer, 2003; Tarrach i saradnici, 2016; Matsumae i saradnici, 2016; Dakić i saradnici, 2017). U hipokampusu pacova starih 24 meseca DR je, kao i kod životinja starih 18 meseci, smanjila količinu fosfo-IR, kao i aktivaciju ovog proteina, ali sa druge strane, dovela je do povećanja ukupnog Akt-a. Moguće je da je sistem reagovao na DR tako što je povećao stabilnost ovog proteina, ne utičući na njegovu aktivnost za koju je neophodna fosforilacija specifičnih mesta u peptidnom lancu (Liao i Hung, 2010). Takođe, pokazano je da SIRT familija proteina

reguliše kako aktivaciju, tako i sintezu Akt proteina (Pillai i saradnici, 2014), a zna se da DR ostvaruje svoje efekte delom preko SIRT signalnog puta (Hadem i saradnici, 2018). S obzirom na to da je DR dovela do smanjene aktivnosti IR, moguće je da su povećana stabilnost i/ili sinteza Akt-a pre posledice efekta dejstva DR preko SIRT signalnog puta, nego preko insulinskog signalnog puta.

U hipotalamusu najstarije grupe životinja dijeta je dovela do povećanja stabilnosti i/ili sinteze IRS1 proteina. S obzirom da nema promena u ostalim proteinima ovog insulinskog signalnog puta, moguće je da IRS učestvuje u nekim drugim funkcijama u nervnom tkivu, jer je pokazano da postoji i u neuronima koji ne ekspimiraju IR i IGF-IR (Sun i saradnici, 1993; Fernandes i saradnici, 2001).

Dugotrajni restriktivni režim ishrane je doveo do promene u ekspresiji NPY u hipokampusu 18 meseci i hipotalamusu 24 meseca starih pacova. U hipokampusu 18 meseci starih životinja dijeta je dovela do povećanja nivoa NPY, a ovakav efekat DR je već zabeležen kod pacova (Cardoso i saradnici, 2014). Ovaj rezultat ide u prilog pretpostavljenom korisnom dejstvu dijete koje je zapaženo u ovoj starosnoj dobi, jer se zna da NPY učestvuje u konsolidaciji prostorne memorije i dovodi do povećane neurogeneze (Decressac i saradnici, 2011; Gøtzsche i Woldbye, 2016). Imajući u vidu da postoje indikacije koje stavljaju NPY na mesto medijatora u procesima koji dovode do pozitivnih efekata DR (Botelho i Cavadas, 2015), njegove uloge u procesu učenja, pamćenja i neurogeneze u hipokampusu, moguće je da i ovaj neuropeptid ima ulogu pozitivnom efektu DR1 režima na poboljšanje prostorne memorije koju smo uočili kod pacova starih 18 meseci.

U hipotalamusu najstarije grupe životinja dijeta je dovela do povećanja nivoa NPY proteina. Povećanje nivoa oreksigenog peptida NPY kod najstarije grupe životinja, ukazuje na njihovu povećanu potrebu za energijom. Životinje 24 meseca starosti na DR1 režimu ishrane su pokazale manji gubitak kilograma od svojih AL kontrola kada smo posmatrali pojedinačne parametre pri određivanju FS. Poznato je kod starih jedinki česta pojava takozvana anoreksija u starenju, kada dolazi do naglog gubitka kilograma i opšteg slabljenja organizma koji postaje podložniji bolestima (Wolden-Hanson, 2006). Moguće je da je organizam koji je pod dugotrajnom restrikcijom hrane u stanju da, kada postigne određenu starost, poveća nivo NPY u hipotalamusu i time aktivira oreksigene signale. Na taj način jedinka unosi dovoljnu količinu hrane i održava optimalnu telesnu težinu, te smanjuje rizik od bolesti koje neuhranjenost vodi sa sobom.

Sumirajući sve navedene promene, možemo zaključiti da je dugotrajni restriktivni režim ishrane u našim istraživanjima uticao na regulaciju insulinskog signalnog puta, pri čemu je taj efekat bio najizraženiji nakon godinu dana trajanja restrikcije, odnosno kod životinja starih 18 meseci. U ovoj starosnoj tački, DR je i u hipokampusu i hipotalamusu dovela do smanjenja aktivnosti komponenti insulinskog puta. Možemo pretpostaviti da je na taj način, DR u hipokampusu doprinela boljoj insulinskoj osetljivosti što je moglo uticati na poboljšanje kognitivnog statusa životinja u testu prostorne memorije. Uz to, povećanje NPY u hipokampusu, koje je povezano sa neurogenezom i boljim kognitivnim funkcijama, isto može biti jedan od faktora koji leže u osnovi boljih rezultata ovih životinja uočenih u testovima ponašanja. Promene koje je DR uzrokovala u hipotalamusu 18mDR1 pacova se odnose na anoreksigeno dejstvo insulina, koje je smanjeno pod dijetom, jer bi u suprotnom moglo da dovede do prekomernog gubitka težine i povećanja krhkosti. Kod najstarije grupe životinja, DR nije dovela do tako jasnih promena u regulaciji insulinskog puta u hipokampusu i moguće je da je ovde aktiviran drugi signalni put koji uključuje Grb-SOS-Ras-MAP proteine. U hipotalamusu ovih životinja DR je povećala nivoe NPY, verovatno da bi zaustavila prekomerni gubitak telesne mase koje je karakteristično za proces starenja i koji može dovesti do anoreksije. Interesantno je pomenuti povećanje insulina u hipokampusu i hipotalamusu ovih životinja, čije poreklo može biti *de novo* sinteza od strane neurona i, što je verovatnije, endimskih ćelija (Dakic i saradnici, 2017). U tom slučaju, endimске ćelije bi nosintetisani insulin mogle lučiti u cerebrospinalnu tečnost koja ga onda distribuira u tkiva kojima je potreban.

Podaci dobijeni u ovoj tezi su pokazali da pacovi Wistar soja stare na normalan, fiziološki način, te da ne pokazuju patološke promene sa starenjem. Promene koje jesu uočene i po čemu su se pacovi stari 24 meseca razlikovali od mladih jedinki su se pre svega odnosile na kognitivne performanse detektovane u Y lavirintu, kao i na stanje krhkosti. Energetski metabolizam nije pokazivao značajne promene sa starenjem. Naime, jedine promene zabeležene tokom procesa starenja su bile na nivou serumskih triglicerida, dok su insulin i glukoza ostali u granicama normale. Insulinski signalni put takođe nije pokazivao značajne promene u svojim komponentama tokom starenja. Sve navedeno ukazuje na to da su ove životinje pretrpele blagi starosno - zavisni pad u procesima učenja i pamćenja i da je njihova krhkost povećana sa starenjem, ali da ove promene nisu uzrokovane poremećajima energetskog balansa, jer su metabolizam glukoze i insulina u mozgu ostali očuvani. Iako naši rezultati nisu pokazali značajne

promene na molekularskom nivou tokom starenja, literatura pokazuje da su neke od promena u signalnim putevima ispitivanim u ovoj tezi primećene samo u specifičnim subregionima hipokampusa, što Western blot tehnikom nije bilo moguće detektovati. Stoga bi primena osetljivije metode, kao što je imunohistohemija, omogućila detekciju potencijalnih suptilnih promena u specifičnim regionima mozga.

U prvom delu teze je ispitan potencijalni protektivni uticaj različitih restriktivnih režima ishrane na starosno-zavisne promene u aktivnosti i krhkosti Wistar pacova. Primenjena su tri različita režima, koji su se razlikovali u dužini trajanja i starosnoj dobi u kojoj su započeli. Najduži dijetalni režim, koji je počeo kod adultnih pacova je neprikosnovenno pokazao najbolje rezultate u svim testovima. Doveo je do poboljšanja u motoričkim funkcijama, pozitivno je delovao na kognitivni aspekt u toku starenja i što je jako važno, znatno je smanjio krhkost kod starih pacova. Sa druge strane, uticaj kraćeg, DR2 režima se ogledao u blagom poboljšanju kognitivnih i motoričkih sposobnosti kao i krhkosti, ali ne u svim starosnim dobima. Najkraći režim ishrane je doveo do poremećaja u procesima učenja i pamćenja kao i povećane krhkosti kod najstarije grupe životinja.

Kako bismo produbili znanje o načinu na koji DR1 režim deluje na proces starenja i ustanovili da li su promene koje DR unosi u energetske metabolizam u mozgu vezane sa detektovanim poboljšanjem aktivnosti i stanja krhkosti, ispitane su promene u metabolizmu glukoze i insulinskom signalnom putu u mozgu pacova. Izabrani su kora prednjeg mozga, hipokampus i hipotalamus, kao strukture ključne kako za metabolizam, tako i za procese učenja, pamćenja i generalno aktivnosti životinja. Praćenjem promena u ekspresiji AMPK i glukoznih transportera, primećeno je da je dugotrajna DR uticala na snabdevenost kore prednjeg mozga i hipokampusa dovoljnom količinom energije, što se kasnije i pokazalo kroz poboljšanje kognitivnih i motoričkih performansi životinja u dubokoj starosti. Smanjenje nivoa proteina uključenih u insulinski signalni put i povećanje NPY peptida u hipokampusu starih životinja izloženih DR1 režimu je takođe moglo imati uticaja na uočeno poboljšanje u procesima učenja i pamćenja. Povećanje nivoa NPY i utišavanje insulinskog signalnog puta u hipotalamusu su omogućavali da životinje ne zapadnu u starosnu anoreksiju, koja je jedan od glavnih uzroka povećane krhkosti i smrtnosti kod starih životinja. Interesantan efekat DR na povećanje insulina u hipokampusu i hipotalamusu kod najstarije grupe životinja ukazuje na mogućnost *de novo* sinteze insulina i to bi trebalo detaljnije istražiti, koristeći imunohistohemijske metode koje mogu detektovati subpopulacije neurona u kojima postoji naznaka sinteze insulina.

Dugotrajna dijetalna restrikcija ispitivana u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazala širok spektar pozitivnih efekata. Oni se ogledaju u poboljšanju motoričkih i kognitivnih funkcija, smanjenju krhkosti i nivoa serumskih parametara vezanih za metabolizam glukoze i lipidni status, kao i održavanju optimalnog nivoa energetskeg metabolizma mozga i aktivnosti insulinskog signalnog puta pacova tokom starenja. Sve navedeno upućuje na to da je smanjeni unos hrane izuzetno važan preduslov za kvalitetan život u toku starenja. Ovakav vid ishrane održava energetske stabilnost u regionima mozga odgovornim za procese učenja i pamćenja, što vodi ka očuvanju kognitivnih sposobnosti tokom starenja. Da bi se postigao takav efekat, restriktivni režim ishrane treba da počne u adultnoj dobi života i da traje do duboke starosti, u suprotnom, postoji mogućnost da efekti izostanu ili čak budu negativni.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata se mogu izvući sledeći zaključci:

1. Tokom starenja je došlo do statistički značajnog povećanja krhkosti, kako kod 18, tako i kod 24 meseca starih Wistar pacova i do značajnog smanjenja nivoa glukoze i povećanje nivoa triglicerida u serumu ovih životinja. Starenje nije uticalo na aktivnost Wistar pacova u testu otvorenog polja, na proces habituacije, kao ni na ponašanje životinja u Y lavirintu. Starosno-zavisne promene nisu uočene u ekspresiji ni u jednom od ispitivanih proteina.
2. Dijetalni režimi ishrane su pokazali različit efekat na aktivnost u testu otvorenog polja u zavisnosti od dužine trajanja i starosne dobi životinje u trenutku uvođenja restriktivnog režima. Dugotrajni režim (DR1) je ispoljio znatno bolje dejstvo na aktivnost životinja u testu otvorenog polja, u odnosu na oba kraća dijetalna režima (DR2 i DR3). Kod Wistar pacova je dugotrajni režim ishrane doveo do povećanja lokomotorne aktivnosti u 18. mesecu starosti i povećanja vertikalne aktivnosti kod svih ispitivanih starosnih grupa. DR2 režim je nakon 6 meseci doveo do poboljšanja lokomotorne aktivnosti samo kod najstarije grupe životinja, a DR3 režim je nakon 3 meseca dejstva doveo do negativnih efekata, time što je doveo do smanjenja lokomotorne aktivnosti kod 18m starih pacova, dok je kod najstarije eksperimentalne grupe, pored smanjenja lokomotorne aktivnosti doveo i do izostanka međusesijske habituacije u vertikalnoj aktivnosti.
3. U testu Y lavirinta DR1 je ispoljila najbolji efekat, utičući pozitivno na prostornu memoriju kod Wistar pacova u svim ispitivanim starosnim grupama, a jedini parametar na koji DR1 nije uticao su spontane alteracije. Kraći režimi, DR2 i DR3, su pokazali znatno slabiji efekat u poboljšanju kognitivnih performansi u testu Y lavirinta. DR2 je povećao vreme koje su 24 meseca stare životinje provele u ispitivanju novog kraka, dok je DR3 režim povećao vreme provedeno u novom kraku i ukupan broj ulazaka u sva tri kraka kod pacova starih 18 meseci.
4. DR1 režim ishrane je smanjio krhkost pacova kod 12, 18 i 24 meseca starih životinja. Smanjenje krhkosti pod dejstvom DR2 i DR3 režima se moglo uočiti samo kod 18 meseci starih životinja, a DR3 režim ishrane je još jednom ispoljio negativne efekte, povećavajući krhkost najstarije grupe pacova.

5. Dugotrajni DR1 režim je doveo do promene u nivou serumskih parametara, dovodeći do smanjenja:

- nivoa glukoze kod 12 meseci starih pacova
- nivoa insulina kod 12 i 24 meseca starih pacova
- nivoa holesterola kod 18 i 24 meseca starih pacova i
- nivoa triglicerida u svim ispitivanim starostima.

DR2 i DR3 režimi su smanjili nivoe glukoze, insulina, holesterola i triglicerida kod najstarije eksperimentalne grupe, dok su kod 18 meseci starih životinja doveli do povećanja nivoa insulina (DR2) i nivoa holesterola (DR2 i DR3)

6. Sumirajući efekte tri različita tipa restriktivnih dijetalnih režima na ponašanje životinja u testovima koji ispituju motoričke i kognitivne sposobnosti, na nivo krhkosti tokom starenja i na promene nivoa biohemijskih parametara u serumu, možemo zaključiti da je dugotrajni restriktivni režim ishrane (DR1) doveo do znatno boljih rezultata u pomenutim parametrima od režima kraćeg trajanja (DR2 i DR3). Takođe, najkraći DR3 režim je doveo do pogoršanja određenih aspekata memorije kod najstarije grupe pacova i znatno povećao njihovu krhkost.

7. DR1 režim je doveo do regionalno specifičnih promena u ekspresiji AMPK i GLUT proteina:

- U hipokampusu je doveo do povećanja sinteze AMPK i fosfo-AMPK kod 24 meseca starih pacova
- U kori velikog mozga je smanjio nivoe GLUT3 i GLUT4 kod pacova starih 12 meseci, a povećao ekspresiju GLUT1 i GLUT3 kod pacova starih 24 meseca

8. Uticaj dugotrajnog restriktivnog režima na aktivnost komponenata insulinskog puta je bio starosno- i regionalno-specifičan:

- Kod 18 meseci starih pacova DR1 režim je doveo do promena u aktivnosti insulinskog signalnog puta, delujući na smanjenje:
 - ukupne i fosforilisane forme IR β , IRS1 u hipokampusu
 - aktivacije IRS1 i nivoa ukupnog Akt proteina u hipotalamusu
- Kod 24 meseca starih pacova, DR1 režim je doveo do:
 - povećanja nivoa insulina u hipokampusu i hipotalamusu
 - smanjenja nivoa fosforilisane forme IR β i njegove aktivacije i povećanja nivoa Akt proteina u hipokampusu

- do povećanja ekspresije i/ili stabilnosti IRS1 proteina u hipotalamusu
9. Ekspresija NPY proteina se nije menjala tokom starenja, dok je DR1 režim povećao nivo ovog oreksigenog peptida u hipokampusu 18 meseci starih pacova i u hipotalamusu najstarije grupe životinja

7. LITERATURA

Adamo M, Raizada MK, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 1989; 3(1-2):71-100.

Adams MM, Shi L, Linville MC, Forbes ME, Long AB, Bennett C, Newton IG, Carter CS, Sonntag WE, Riddle DR, Brunso-Bechtold JK. Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Exp Neurol.* 2008; 211(1):141-9.

Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(1):139-46.

Alirezaei M, Kemball CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL, Kiosses WB. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy.* 2010; 6(6):702-10.

Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(1):45-51.

Alquier T, Leloup C, Arnaud E, Magnan C, Pénicaud L. Altered Glut4 mRNA levels in specific brain areas of hyperglycemic-hyperinsulinemic rats. *Neurosci Lett.* 2001;308(2):75-8.

Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, Lovestone S, Killick R, Simons P, Cowen T. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(8):2103-14.

Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav.* 2007; 92(5):911-23.

Amigo I, Kowaltowski AJ. Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state. *Redox Biol.* 2014; 2:296-304.

Ammassari-Teule M, Fagioli S, Rossi-Arnaud C. Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol Behav.* 1994; 55(2):341-5.

Anderton BH. Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123(7):811-7.

Anna Picca, Vito Pesce and Angela Maria Serena Lezza. Does eating less make you live longer and better? An update on calorie restriction. *Clin Interv Aging*. 2017; 12: 1887–1902.

Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10):6216-20.

Apelt J, Mehlhorn G, Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J Neurosci Res*. 1999; 57(5):693–705.

Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3004-9.

Argentino DP, Dominici FP, Al-Regaiey K, Bonkowski MS, Bartke A, Turyn D. Effects of long-term caloric restriction on early steps of the insulin-signaling system in mouse skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60(1):28-34.

Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB, Aiken JM. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *Faseb Journal*. 1997; 11(7):573-81.

Aveleira CA, Botelho M, Carmo-Silva S, Pascoal JF, Ferreira-Marques M, Nóbrega C, Cortes L, Valero J, Sousa-Ferreira L, Álvaro AR, Santana M, Kügler S, Pereira de Almeida L, Cavadas C. Neuropeptide Y stimulates autophagy in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(13):E1642-51.

Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO. Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male Wistar rats. *Brain Cogn*. 2007; 64(1):86-91.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):483-95

Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood–brain barrier to insulin. *Peptides*. 1997;18(10):1577-84.

Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides*. 1997;18(8):1257-62.

Banks WA, Kastin AJ. Differential permeability of the blood– brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides*. 1998;19(5):883-9.

Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther*. 2012 Oct;136(1):82-93.

Banks WA. Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 5:234S-237S.

Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3):5-12.

Barnes C. Long-term potentiation and the ageing brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003; 358(1432):765-72.

Bartke A, Masternak MM, Al-Regaiey KA, Bonkowski MS. Effects of dietary restriction on the expression of insulin-signaling-related genes in long-lived mutant mice. *Interdiscip Top Gerontol*. 2007;35:69-82.

Bartke A. Insulin and aging. *Cell Cycle*. 2008;7(21):3338-43.

Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest*. 1998;101(7):1353-61.

Baura GD, Foster DM, Kaiyala K, Porte D Jr, Kahn SE, Schwartz MW. Insulin transport from plasma into the central nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs. *Diabetes*. 1996; 45(1):86-90.

Beatty WW, Clouse BA, Bierley RA. Effects of long-term restricted feeding on radial maze performance by aged rats. *Neurobiol Aging*. 1987 Jul-Aug;8(4):325-7.

Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1212:97-113.

- Bellush LL, Wright AM, Walker JP, Kopchick J, Colvin RA. Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiol Behav.* 1996;60(2):541-7.
- Benarroch EE. Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. *Neurology.* 2014;82(15):1374-9.
- Benedict C, Grillo CA. Insulin Resistance as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease: A State-of-the-Art Review. *Front Neurosci.* 2018; 12:215.
- Bi S. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in energy homeostasis. *Peptides.* 2007;28(2):352-6.
- Bickford P. Motor learning deficits in aged rats are correlated with loss of cerebellar noradrenergic function. *Brain Res.* 1993;620(1):133–8.
- Biessels GJ, Deary IJ, Ryan CM. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.* 2008;7:184–190.
- Blázquez C, Geelen MJ, Velasco G, Guzmán M. The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.* 2001; 489(2-3):149-53.
- Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science.* 2003; 299(5606):572-4.
- Bond NW, Everitt AV, Walton J. Effects of dietary restriction on radial arm maze performance and flavor memory in aged rats. *Neurobiol Aging.* 1989;10(1):27–30.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M. Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging.* 2004; 25(3):333-40.
- Borgo F, Riva A, Benetti A, Casiraghi MC, Bertelli S, Garbossa S, Anselmetti S, Scarone S, Pontiroli AE, Morace G, Borghi E. Microbiota in anorexia nervosa: the triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLoS One.* 2017; 12(6):e0179739.
- Botelho M, Cavadas C. Neuropeptide Y: An Anti-Aging Player? *Trends Neurosci.* 2015. 38(11):701-711.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(1):a009191.

Boura-Halfon S, Zick Y Chapter 12 serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm.* 2009; 80:313-49.

Boyd FT Jr, Raizada MK. Effects of insulin and tunicamycin on neuronal insulin receptors in culture. *Am J Physiol.* 1983; 245(3):C283-7.

Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 2005; 76(2):99-125.

Brandhorst S, Choi IY, Wei M et al. A periodic diet that mimics fasting promotes multi-system regeneration enhanced cognitive performance and health span. *Cell Metab.* 2015;22(1):86–99.

Brewer RA, Gibbs VK, Smith DL. Targeting glucose metabolism for healthy aging. *Nutr Healthy Aging.* 2016;4(1):31-46.

Cabeza R, Grady CL, Nyberg L, McIntosh AR, Tulving E, Kapur S, Jennings JM, Houle S, Craik FI. Age-related differences in neural activity during memory encoding and retrieval: a positron emission tomography study. *J Neurosci.* 1997; 17(1):391-400.

Cadacio CL, Milner TA, Gallagher M, Pierce JP. Hilar neuropeptide Y interneuron loss in the aged rat hippocampal formation. *Exp Neurol.* 2003; 183(1):147-58.

Camandola S, Mattson MP. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J.* 2017; 36(11):1474-1492.

Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol.* 2014;66:53-81.

Campbell BA, Richardson R. Effects of chronic dietary restriction on sensory-motor function and susceptibility to stressor stimuli in the laboratory rat. *Exp Gerontol.* 1988;23(4-5):417-27.

Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology (Bethesda).* 2011;26(4):214-24.

Cardoso A, Marrana F, Andrade JP. Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2016; 133:214-224.

Cardoso A, Silva D, Magano S, Pereira PA, Andrade JP. Old-onset caloric restriction effects on neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons and on cholinergic varicosities in the rat hippocampal formation. *Age (Dordr).* 2014; 36(6):9737.

Carter CS, Leeuwenburgh C, Daniels M, Foster TC. Influence of Calorie Restriction on Measures of Age-Related Cognitive Decline: Role of Increased Physical Activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009; 64(8):850-9.

Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunez AI, Velloso LA, Staad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol3-kinase in liver and muscle rats. *Endocrinology* 1996; 137:151–9.

Cerqueira FM, da Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Chausse B, Romano RL, Garcia CC, Colepicolo P, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Long-term intermittent feeding but not caloric restriction leads to redox imbalance insulin receptor nitration and glucose intolerance. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(7):1454-60.

Cesari M, Gambassi G, van Kan GA, Vellas B. The frailty phenotype and the frailty index: different instruments for different purposes. *Age Ageing.* 2014; 43(1):10-2.

Cetinkalp S, Simsir IY, Ertek S. Insulin resistance in brain and possible therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(4):553-64.

Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab.* 2014; 20:991–1005.

Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Tybjærg-Hansen A, Watts GF; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J.* 2011; 32(11):1345-61.

Cheng CM, Kelley B, Wang J, Strauss D, Eagles DA, Bondy CA. A ketogenic diet increases brain insulinlike growth factor receptor and glucose transporter gene expression. *Endocrinology* 2003; 144(6):2676-2682.

Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Sci Rep.* 2014; 4:4517.

Chung KW, Kim DH, Park MH, Choi YJ, Kim ND, Lee J, Yu BP, Chung HY. Recent advances in calorie restriction research on aging. *Exp Gerontol.* 2013; 48:1049-1053.

Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 2007;4:e76.

Clarke DW, Mudd L, Boyd FT Jr, Fields M, Raizada MK. Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J Neurochem.* 1986; 47(3):831-6.

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009; 325(5937):201-4.

Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Weindruch R. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008; 63(6):556-9.

Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 2014; 5:3557.

Contreras-Vidal JL, Teulings HL, Stelmach GE. Elderly subjects are impaired in spatial coordination in fine motor control. *Acta Psychol (Amst).* 1998; 100(12):25–35.

Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006; 20(4):298-301.

Csajbók ÉA, Tamás G. Cerebral cortex: a target and source of insulin? *Diabetologia.* 2016; 59(8):1609-15.

Culmsee C, Monning J, Kemp BE, Mattson MP. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. 2001; 17(1):45-58.

Curtis R, O'Connor G, DiStefano PS. Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (*aak-2*) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell*. 2006; 5(2):119-26.

Dagon Y, Avraham Y, Magen I, Gertler A, Ben-Hur T, Berry EM. Nutritional status, cognition, and survival: a new role for leptin and AMP kinase. *J Biol Chem*. 2005; 280(51):42142-8.

Dakic T, Jevdjovic T, Lakic I, Djurasevic SF, Djordjevic J, Vujovic P. Food For Thought: Short-Term Fasting Upregulates Glucose Transporters in Neurons and Endothelial Cells But Not in Astrocytes. *Neurochem Res*. 2018. doi: 10.1007/s11064-018-2685-6.

Dakic TB, Jevdjovic TV, Peric MI, Bjelobaba IM, Markelic MB, Milutinovic BS, Lakic IV, Jasnic NI, Djordjevic JD, Vujovic PZ. Short-term fasting promotes insulin expression in rat hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 2017; 46(1):1730-1737.

Darling WG, Cooke JD, Brown SH. Control of simple arm movements in elderly humans. *Neurobiol Aging*. 1989;10(2):149-57.

Das SK, Gilhooly CH, Golden JK, Pittas AG, Fuss PJ, Cheatham RA, Tyler S, Tsay M, McCrory MA, Lichtenstein AH, Dallal GE, Dutta C, Bhapkar MV, Delany JP, Saltzman E, Roberts SB. Long-term effects of 2 energy restricted diets differing in glycemic load on dietary adherence, body composition, and metabolism in CALERIE: a 1-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85:1023-1030.

Gruenewald, David & Matsumoto, Alvin. (2001). 57. Hypothalamic Changes Relevant to Reproduction in Aging Male Rodents. 10.1016/B978-012351830-9/50059-7.

de Cabo R, Carmona-Gutierrez D, Bernier M, Hall MN, Madeo F. The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell*. 2014;157(7):1515-1526

de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2008 Nov;2(6):1101-13.

- de Leon MJ, Ferris SH, George AE, Reisberg B, Christman DR, Kricheff II, Wolf AP. Computed tomography and positron emission transaxial tomography evaluations of normal aging and Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3(3):391-4.
- DeCarli C, Massaro J, Harvey D, Hald J, Tullberg M, Au R, Beiser A, D'Agostino R, Wolf PA. Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal. *Neurobiol Aging.* 2005; 26(4):491-510.
- Decressac M, Wright B, David B, Tyers P, Jaber M, Barker RA, Gaillard A. Exogenous neuropeptide Y promotes in vivo hippocampal neurogenesis. *Hippocampus.* 2011; 21(3):233-8.
- Deleidi M, Jäggle M, Rubino G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front Neurosci.* 2015; 9:172.
- Della-Maggiore V, Sekuler AB, Grady CL, Bennett PJ, Sekuler R, McIntosh AR. Corticolimbic interactions associated with performance on a short-term memory task are modified by age. *J Neurosci.* 2000; 20(22):8410-6.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(5):339-50.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(11):8445-54
- Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept.* 1993; 48(1-2):55-63.
- Buckles V.D. (1993) Age-Related Slowing. In: Stelmach G.E., Hömberg V. (eds) *Sensorimotor Impairment in the Elderly. NATO ASI Series (Series D: Behavioural and Social Sciences)*, vol 75. Springer, Dordrecht
- Ding F, Yao J, Rettberg JR, Chen S, Brinton RD. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS One.* 2013; 8(11):e79977.

Ding J, Kopchick JJ. Plasma biomarkers of mouse aging. *Age (Dordr)*. 2011 Sep;33(3):291-307.

Dirx MJ, Zeegers MP, Dagnelie PC, van den Bogaard T, van den Brandt PA. Energy restriction and the risk of spontaneous mammary tumors in mice: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2003; 106(5):766-70.

Drachman DA. Aging of the brain entropy and Alzheimer disease. *Neurology*. 2006; 67(8):1340-52.

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000; 62(6):649-71.

Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*. 2012; 2012:384017.

Escrivá F, Gavete ML, Fermín Y, Pérez C, Gallardo N, Alvarez C, Andrés A, Ros M, Carrascosa JM. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol*. 2007;194(1):131-41.

Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Di Stefano G, Casoli T, Gracciotti N, Solazzi M, Pompei P. Quantitative immunohistochemistry of glucose transport protein (Glut3) expression in the rat hippocampus during aging. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(5):671-2.

Fernandes ML1, Saad MJ, Velloso LA. Effects of age on elements of insulin-signaling pathway in central nervous system of rats. *Endocrine*. 2001 Dec;16(3):227-34.

Fernandez AM, Hernandez-Garzón E, Perez-Domper P, Perez-Alvarez A, Mederos S, Matsui T, Santi A, Trueba-Saiz A, García-Guerra L, Pose-Utrilla J, Fielitz J, Olson EN, Fernandez de la Rosa R, Garcia Garcia L, Pozo MA, Iglesias T, Araque A, Soya H, Perea G, Martin ED, Torres Aleman I. Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes*. 2017; 66(1):64-74.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13:225–239.

Fischer KE, Austad SN. The development of small primate models for ageing research. *ILAR J*. 2011;52(1):78-88.

Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ. Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res.* 2007; 10(1):61-74.

Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:6659–6663.

Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell.* 2015;161(1):106-118.

Fontana L, Villareal DT, Weiss EP, et al. Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized: controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293:E197–E202.

Fontán-Lozano A, López-Lluch G, Delgado-García JM, Navas P, Carrión AM. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 2008; 38(2):167-77.

Forbes-Hernández TY, Giampieri F, Gasparrini M, Afrin S, Mazzoni L, Cordero MD, Mezzetti B, Quiles JL, Battino M. Lipid Accumulation in HepG2 Cells Is Attenuated by Strawberry Extract through AMPK Activation. *Nutrients.* 2017 16;9(6). pii: E621.

Forster MJ, Morris P, Sohal RS. Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality of mice. *FASEB J.* 2003; 17:690-692.

Fraley SM, Springer AD. Memory of simple learning in young middle-aged and aged C57/BL6 mice. *Behav. Behav Neural Biol.* 1981; 31(1):1-7.

Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(1):92-105.

Frank HJ, Jankovic-Vokes T, Partridge WM, Morris WL. Enhanced insulin binding to blood–brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. *Diabetes.* 1985; 34(8):728-33.

Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J. Reference memory anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*. 2000; 95(1):293-307.

Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol Med Sci*. 2001; 56:M146-56.

Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, Capurso C, Santamato A, Sancarolo D, Vendemiale G, Pilotto A, Panza F (2010) Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 9, 399-417.

Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 1998;105(4-5):423-38.

Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:290–293.

Fu Y, Chen Y, Li L, Wang Y, Kong X, Wang J. Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice. *Int J Dev Neurosci*. 2017; 60:8-15.

Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, McElhaney J, Loeb M, Mitnitski A, Pawelec G. Aging frailty and age-related diseases. *Biogerontology*. 2010;11(5):547-63.

Fulop T, Larbi A, Douziech N. Insulin receptor and ageing. *Pathol Biol (Paris)*. 2003; 51(10):574-80.

Funakoshi M, Tsuda M, Muramatsu K, Hatsuda H, Morishita S, Aigaki T. A gain-of-function screen identifies *wdb* and *lkb1* as lifespan-extending genes in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 405(4):667-72.

Fusco S, Pani G. Brain response to calorie restriction. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(17):3157-70.

Gage FH, Kelly PA, Björklund A. Regional changes in brain glucose metabolism reflect cognitive impairments in aged rats. *J Neurosci*. 1984; 4(11):2856-65.

Gallagher M, Stocker AM, Koh MT. Mindspan: lessons from rat models of neurocognitive aging. *ILAR J.* 2011; 52:32–40

Gao HT, Cheng WZ, Xu Q, Shao LX. Dietary restriction reduces blood lipids and ameliorates liver function of mice with hyperlipidemia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2017; 37(1):79-86.

Gardner EM. Caloric Restriction Decreases Survival of Aged Mice in Response to Primary Influenza Infection. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 688-694.

Gasparini L1, Xu H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26(8):404-6.

Geng YQ, Guan JT, Xu MY, Xu XH, Fu YC. Behavioral study of calorie-restricted rats from early old age. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2007; 2007:2393-2395

Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, de Mello MA. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr.* 2012 Apr 27;4(1):16.

Giani JF, Bonkowski MS, Muñoz MC, Masternak MM, Turyn D, Bartke A, Dominici FP. Insulin signaling cascade in the hearts of long-lived growth hormone receptor knockout mice: effects of calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63(8):788-97.

Gillette-Guyonnet S, Vellas B. Caloric restriction and brain function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11(6):686-92.

Gomez-Cabrera MC, Garcia-Valles R, Rodriguez-Mañas L, Garcia-Garcia FJ, Olaso Gonzalez G, Salvador-Pascual A, Tarazona-Santabalbina FJ, Viña J. A New Frailty Score for Experimental Animals Based on the Clinical Phenotype: Inactivity as a Model of Frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72: 885-891.

Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage.* 2001; 14(1 Pt 1):21– 36.

Gordon CJ, Rowsey PJ, Bishop BL, Ward WO, Macphail RC. Serum biomarkers of aging in the Brown Norway rat. *Exp Gerontol.* 2011;46(11):953-7.

Gottfries CG. Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. *J Neurosci Res.* 1990;27(4):541–7.

Gøtzsche CR, Woldbye DP. The role of NPY in learning and memory. *Neuropeptides.* 2016; 55:79-89.

Gould TJ, Bickford PC. The effects of aging on cerebellar beta-adrenergic receptor activation and motor learning in female F344 rats. *Neurosci Lett.* 1996;216(1):53–6.

Gould TJ, Bowenkamp KE, Larson G, Zahniser NR, Bickford PC. Effects of dietary restriction on motor learning and cerebellar noradrenergic dysfunction in aged F344 rats. *Brain Res.* 1995; 684(2):150-8.

Grady CL, McIntosh AR, Craik FI. Age-related differences in the functional connectivity of the hippocampus during memory encoding. *Hippocampus.* 2003;13(5):572–586.

Gralle M. The neuronal insulin receptor in its environment. *J Neurochem.* 2017; 140(3):359-367.

Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wrihten SA, Green AJ, Wilson SP, Sakai RR, Kelly SJ, Wilson MA, Mott DD, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes.* 2015; 64(11):3927-36.

Hadem IKH, Majaw T, Kharbuli B, Sharma R. Beneficial effects of dietary restriction in aging brain. *J Chem Neuroanat.* 2019; 95:123-133.

Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Liaquat L, Madiha S. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age (Dordr).* 2014; 36(3):9653.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(4):251-62.

Hardman SE, Hall DE, Cabrera AJ, Hancock CR, Thomson DM. The effects of age and muscle contraction on AMPK activity and heterotrimer composition. *Exp Gerontol.* 2014; 55:120-8.

Hardman SE. The Effects of Aging on Skeletal Muscle AMPK Activation and an Analysis of Chronic AICAR Treatment on the Aging Phenotype (Dissertation). Department of Physiology and Developmental Biology, Brigham Young University, 2014; 1-111.

Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron*. 2012; 75(5):762-77.

Harris SB, Gunion MW, Rosenthal MJ, Walford RL. Serum glucose, glucose tolerance, corticosterone and free fatty acids during aging in energy restricted mice. *Mech Ageing Dev*. 1994; 73(3):209-21.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978; 272(5656):827-9.

Hefendehl JK, Neher JJ, Sühs RB, Kohsaka S, Skodras A, Jucker M. Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell*. 2014; 13(1):60-9.

Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006; 295:1539–1548.

Heni M, Hennige AM, Peter A, et al. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21594.

Hernandez AR, Hernandez CM, Campos KT, Truckenbrod LM, Sakarya Y, McQuail JA, Carter CS, Bizon JL, Maurer AP, Burke SN. The Antiepileptic Ketogenic Diet Alters Hippocampal Transporter Levels and Reduces Adiposity in Aged Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(4):450-458.

Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1999; 274(32):22569-80.

Hoyer S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*. 2003; 36 Suppl 1:S62-7.

Hoyer, S. (2003) Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*, 36, S62–S67.

Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, Wold LE, Nunn JM, Ren J. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Basic Res Cardiol*. 2011; 106(6):1173-91.

Hubert MF, Laroque P, Gillet JP, Keenan KP. The Effects of Diet, ad Libitum Feeding, and Moderate and Severe Dietary Restriction on Body Weight, Survival, Clinical Pathology Parameters, and Cause of Death in Control Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci*. 2000; 58(1):195-207.

Hudson JC, Baum ST, Frye DM, Roecker EB, Kemnitz JW. Age and sex differences in body size and composition during rhesus monkey adulthood. *Aging (Milano)*. 1996; 8(3):197-204.

Hyder F, Rothman DL, Bennett MR. Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(9):3549-54.

Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte D Jr, Woods SC. Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite*. 1986; 7(4):381-6.

Ingram DK, de Cabo R. Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res Rev*. 2017; 39:15-28.

Ishihara H, Wenying F, Kouda K, Nakamura H, Kohno H, Nishio N, Sonoda Y. Effects of dietary restriction on physical performance in mice. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*. 2005; 24(3):209-13.

Jahng JW, Kim JG, Kim HJ, Kim BT, Kang DW, Lee JH. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res*. 2007; 1150:100–107.

Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front Public Health*. 2017; 5: 335.

Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med*. 2016; 48(7):e245.

Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J, Hesselink JR. Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(4):581–94

Johnson LN, Noble ME, Owen DJ. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. 1996; 85(2):149-58.

Johnson-Farley NN, Travkina T, Cowen DS. Cumulative activation of akt and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316(3):1062-9.

Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr*. 2015;67(1):25-32

Jones KT, Woods C, Zhen J, Antonio T, Carr KD, Reith ME. Effects of diet and insulin on dopamine transporter activity and expression in rat caudate-putamen nucleus accumbens and midbrain *J Neurochem*. 2017; 140(5): 728–740.

Jucker M, Oettinger R, Bättig K. Age-related changes in working and reference memory performance and locomotor activity in the Wistar rat. *Behav Neural Biol*. 1988; 50(1):24-36.

Kahn BB. Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes*. 1996; 45(11):1644–54.

Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*. 2000; 49(9):1525-33.

Kanapuru B, Ershler WB. Inflammation, coagulation, and the pathway to frailty. *Am J Med* 2009; 122(7):605–613

Kane AE, Hilmer SN, Boyer D, Gavin K, Nines D, Howlett SE, de Cabo R, Mitchell SJ. Impact of Longevity Interventions on a Validated Mouse Clinical Frailty Index. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71:333-339.

Kaptan Z, Akgün-Dar K, Kapucu A, Dedeakayoğulları H, Batu Ş, Üzüm G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res.* 2015; 1618:194-204.

Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015;282(21):4067-79.

Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell.* 2005; 120(4):449-60.

Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature.* 2010; 467(7315):622.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011; 91(2):461-553.

Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus.* 2010;20(5):637–645.

Kim KW, Donato J Jr, Berglund ED, et al. FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J Clin Invest* 2012; 122:2578–2589

Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes.* 2014; 63(7):2232-43.

Knopman DS, Edland SD, Cha RH, Petersen RC, Rocca WA. Incident dementia in women is preceded by weight loss by at least a decade. *Neurology.* 2007; 69(8):739-46.

Kobayashi M, Nikami H, Morimatsu M, Saito M. Expression and localization of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci Lett.* 1996;213(2):103-6.

KobiloT, Yuan C, van Praag H. Endurance factors improve hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. *Learn Mem.* 2011; 18;18(2):103-

Könner AC, Klöckener T, Brüning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav.* 2009; 97(5):632-8.

Koranyi L, Bourey RE, James D, Mueckler M, Fiedorek FT Jr, Permutt MA. Glucose transporter gene expression in rat brain: Pretranslational changes associated with chronic

insulin-induced hypoglycemia, fasting, and diabetes. *Mol Cell Neurosci* 1991; 2(3):244-252.

Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 2003; 17:313–321.

Kowalski C, Micheau J, Corder R, Gaillard R, Conte-Devolx B. Age-related changes in cortico-releasing factor, somatostatin, neuropeptide Y, methionine enkephalin and beta-endorphin in specific rat brain areas. *Brain Res.* 1992;582(1):38-46.

Kuhla A, Lange S, Holzmann C, Maass F, Petersen J, Vollmar B, Wree A. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PLoS One.* 2013; 8(7):e68778.

Kullmann S, Heni M, Hallschmid M, et al. Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. *Physiol Rev* 2016; 96: 1169-1209.

Kuruba R, Hattiangady B, Parihar VK, Shuai B, Shetty AK. Differential susceptibility of interneurons expressing neuropeptide Y or parvalbumin in the aged hippocampus to acute seizure activity. *PLoS One.* 2011;6(9):e24493.

Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, Smith SR, Alfonso A, Ravussin E. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity beta-cell function fat cell size and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(6):1337-44.

Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2005; 36(3):197-209. Review.

Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci.* 2000; 15(2):99-108.

Lee KY, Yoo DY, Jung HY, Baek L, Lee H, Kwon HJ, Chung JY, Kang SH, Kim DW, Hwang IK, Choi JH. Decrease in glucose transporter 1 levels and translocation of glucosetransporter 3 in the dentate gyrus of C57BL/6 mice and gerbils with aging. *Lab Anim Res.* 2018; 34(2):58-64.

- Lefevre M, Redman LM, Heilbronn LK, Smith JV, Martin CK, Rood JC, Greenway FL, Williamson DA, Smith SR, Ravussin E; Pennington CALERIE team. Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis*. 2009; 203(1):206-13.
- Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res*. 1997; 49(5):617–626.
- LeRoith D, Lowe WL Jr, Shemer J, Raizada MK, Ota A. Development of brain insulin receptors. *Int J Biochem*. 1988; 20 (3):225–230.
- Leung K, Thuret S. Gut microbiota: a modulator of brain plasticity and cognitive function in ageing. *Healthcare (Basel)*. 2015; 3(4):898-916.
- Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior neurobiology and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006; 30:1045–1064.
- Lhotellier L, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C. Locomotor and Exploratory activity in three inbred strains of mice from young adulthood to senescence. *Exp Aging Res*. 1993; 19(2):177-87.
- Li M, Quan C, Toth R, Campbell DG, MacKintosh C, Wang HY, Chen S. Fasting and Systemic Insulin Signaling Regulate Phosphorylation of Brain Proteins That Modulate Cell Morphology and Link to Neurological Disorders. *J Biol Chem*. 2015; 290(50):30030-41.
- Li M, Verdijk LB, Sakamoto K, Ely B, van Loon LJ, Musi N. Reduced AMPK-ACC and mTOR signaling in muscle from older men, and effect of resistance exercise. *Mech Ageing Dev*. 2012; 133(11-12):655-64.
- Li H, Matheny M, Tümer N, Scarpace PJ. Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol*. 1998; 275(3 Pt 1):E405-11.
- Liao Y, Hung MC. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*. 2010;2(1):19-42.

Lin AL, Coman D, Jiang L, Rothman DL, Hyder F. Caloric restriction impedes age-related decline of mitochondrial function and neuronal activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014; 34(9):1440-3.

Lipman JM, Turturro A, Hart RW. The influence of dietary restriction on DNA repair in rodents: a preliminary study. *Mech Ageing Dev.* 1989; 48(2):135-43.

Lipman RD, Smith DE, Blumberg JB, Bronson RT. Effects of caloric restriction or augmentation in adult rats: longevity and lesion biomarkers of aging. *Aging (Milano).* 1998;10(6):463-70.

Lipman RD, Smith DE, Bronson RT, Blumberg J. Is late-life caloric restriction beneficial? *Aging (Milano).* 1995; 7(2):136-9.

Liu H, Graber TG, Ferguson-Stegall L, Thompson LV. Clinically relevant frailty index for mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014; 69:1485-1491.

Liu HW, Chan YC, Wei CC, Chen YA, Wang MF, Chang SJ. An alternative model for studying age-associated metabolic complications: Senescence-accelerated mouse prone 8. *Exp Gerontol.* 2017; 99:61-68.

Liu YZ, Chen JK, Zhang Y, Wang X, Qu S, Jiang CL. Chronic stress induces steatohepatitis while decreases visceral fat mass in mice. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14:106.

Liu F, Benashski SE, Persky R, Xu Y, Li J, McCullough LD. Age-related changes in AMP-activated protein kinase after stroke. *Age (Dordr).* 2012; 34(1):157-68.

Loft S, Velthuis-te Wierik EJ, van den Berg H, Poulsen HE. Energy restriction and oxidative DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995; 4(5):515-9.

Longo VD, Panda S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. *Cell Metab.* 2016; 23:1048–1059.

Lu J, E L, Wang W, Frontera J, Zhu H, Wang WT, Lee P, Choi IY, Brooks WM, Burns JM, Aires D, Swerdlow RH. Alternate day fasting impacts the brain insulin-signaling pathway of young adult male C57BL/6 mice. *J Neurochem.* 2011 Apr;117(1):154-63.

Lu J, E L, Wang W, Frontera J, Zhu H, Wang WT, Lee P, Choi IY, Brooks WM, Burns JM, Aires D, Swerdlow RH. Alternate Day Fasting Impacts the Brain Insulin Signaling Pathway of Young Adult Male C57BL/6 Mice. *J Neurochem*. 2011; 117(1): 154–163.

Lu J, E L, Wang W, Frontera J, Zhu H, Wang WT, Lee P, Choi IY, Brooks WM, Burns JM, Aires D, Swerdlow RH. Alternate Day Fasting Impacts the Brain Insulin Signaling Pathway of Young Adult Male C57BL/6 Mice. *J Neurochem*. 2011; 117(1): 154–163.

Lucignani G, Namba H, Nehlig A, Porrino LJ, Kennedy C, Sokoloff L. Effects of insulin on local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987 Jun;7(3):309-14.

Ma L, Zhao Z, Wang R, Zhang X, Zhang J, Dong W, Xu B, Zhang J. Caloric restriction can improve learning ability in C57/BL mice via regulation of the insulin-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurol Sci*. 2014;35(9):1381-6.

Ma L, Wang J, Li Y. Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2015 Apr 15;444:18-23.

Ma T, Chen Y, Vingtdeux V, et al. Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid β . *J Neurosci*. 2014;34(36):12230-8.

Malmstrom T, Morley JE. The frail brain. *J Am Med Dir Assoc*. 2013; 14(7):453-5.

Manal B, Suzana S, Singh DK. Nutrition and Frailty: A Review of Clinical Intervention Studies. *J Frailty Aging*. 2015;4(2):100-6.

Marinangeli C, Didier S, Ahmed T, Caillerez R, Domise M, Laloux C, Bégard S, Carrier S, Colin M1, Marchetti P, Ghesquière B, Balschun D, Buée L, Kluza J, Vingtdeux V. AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Maintenance of Energy Levels during Synaptic Activation. *iScience*. 2018; 30:9:1-13.

Marín-Burgin A, Schinder AF. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res*. 2012; 14;227(2):391-9.

Markowska AL. Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. *Neurobiol Aging*. 1999; 20(2):177-89.

Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 1990; 127(6):3234-6.

Marks JL, King MG, Baskin DG. Localization of insulin and type 1 IGF receptors in rat brain by in vitro autoradiography and in situ hybridization. *Adv Exp Med Biol*. 1991;293:459-70.

Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischemia. *Curr Biol*. 2000; 10(20):1247-55

Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(14):6127-33.

Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev*. 2006; 5(3): 332–353.

Masoro EJ, Compton C, Yu BP, Bertrand H. Temporal and compositional dietary restrictions modulate age-related changes in serum lipids. *J Nutr*. 1983 Apr;113(4):880-92.

Masoro EJ, McCarter RJ, Katz MS, McMahan CA. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J Gerontol*. 1992 Nov;47(6):B202-8.

Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; 126(9):913-22.

Masoro EJ. Caloric Restriction and Aging: Controversial Issues. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(1):14-9.

Masoro EJ. Caloric Restriction and Aging: Controversial Issues. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61(1):14-9.

Masoro EJ. Role of hormesis in life extension by caloric restriction. *Dose Response*. 2006;5(2):163-73.

Masternak MM, Panici JA, Bonkowski MS, Hughes LF, Bartke A. Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009;64(5):516-21.

Matsumae M, Sato O, Hirayama A, Hayashi N, Takizawa K, Atsumi H, Sorimachi T. Research into the Physiology of Cerebrospinal Fluid Reaches a New Horizon: Intimate Exchange between Cerebrospinal Fluid and Interstitial Fluid May Contribute to Maintenance of Homeostasis in the Central Nervous System. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016; 56(7):416-41.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012;489(7415):318-21.

Mattson M, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2004; 27(10):589-94.

Mattson MP, Duan W, Guo Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem*. 2003; 84(3):417-31.

Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev*. 2001; 122(7):757-78.

Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev*. 2016;31(16):30251–30253.

Mattson MP. Lifelong brain health is a lifelong challenge: from evolutionary principles to empirical evidence. *Ageing Res Rev*. 2015; 20:37-45.

Mattson, MP. The Impact of Dietary Energy Intake on Cognitive Aging. *Front Aging Neurosci*. 2010. 10.3389/neuro.24.005.2010.

Mattson MP, Duan W, Guo Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem*. 2003; 84(3):417-31. Review.

Mayer CM, Belsham DD. Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 307(1-2):99-108.

Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci.* 2014; 34(46):15490-6.

McCall AL, Van Bueren AM, Nipper V, Moholt-Siebert M, Downes H, Lessov N. Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(1):69-76.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition.* 1989; 5(3):155-71.

McNay C and Gold, PE. Age-Related Differences in Hippocampal Extracellular Fluid Glucose Concentration During Behavioral Testing and Following Systemic Glucose Administration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001; 56(2):B66-71.

McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 93(4):546-53.

McQuail JA, Nicolle MM. Spatial reference memory in normal aging Fischer 344 × Brown Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging.* 2015; 36:323-333.

Mercken EM, Carboneau BA, Krzysik-Walker SM, de Cabo R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction exercise and mimetics. *Ageing Res Rev.* 2011;11(3):390-8.

Michel JP, Lang PO, Zekry D. The frailty process: update of the phenotype and preventive strategies. *Ann Gerontol* 2008; 1:e1-e7.

Miller DW, Keller BT, Borchardt RT. Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier. *J Cell Physiol.* 1994; 161(2):333-41.

Miller MG, Thangthaeng N, Shukitt-Hale B. A Clinically Relevant Frailty Index for Aging Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72:892-896.

Minor RK, Chang JW, de Cabo R. Hungry for life: how the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;299(1):79-88.

Minor RK, Chang JW, de Cabo R. Hungry for life: how the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 299(1):79-88.

Minor RK, López M, Younts CM, Jones B, Pearson KJ, Anson RM, Diéguez C, de Cabo R. The arcuate nucleus and NPY contribute to the antitumorigenic effect of calorie restriction. *Aging Cell.* 2011; 10(3):483-92.

Mitchell AC, Leak RK, Zigmond MJ, Cameron JL, Mirnics K. Gene transcripts associated with BMI in the motor cortex and caudate nucleus of calorie restricted rhesus monkeys. *Genomics.* 2012;99(3):144-51.

Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, de Cabo R. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annu Rev Anim Biosci.* 2015; 3:283–303.

Mitnitski AB, Mogilner AJ, Rockwood K: Accumulation of deficits as a proxy measure of aging. *Scientific World Journal* 2001; 1: 323–336.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(3):1101-11.

Mladenovic Djordjevic A, Perovic M, Tesic V, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S. Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem Int.* 2010; 56(2):250-5.

Mladenovic Djordjevic AN, Perovic M, Smiljanic K, Todorovic S, Tesic V, Ruzdijic S, Kanazir S. The effects of dietary restriction and aging on amyloid precursor protein and presenilin-1 mRNA and protein expression in rat brain. *Neuroreport.* 2014; 25(6):398-403.

Mooradian AD, Morin AM, Cipp LJ, Haspel HC. Glucose transport is reduced in the blood-brain barrier of aged rats. *Brain Res.* 1991; 551:145–149.

- Morakinyo AO, Ajiboye KI, Oludare GO, Samuel TA. Restraint Stress Impairs Glucose Homeostasis Through Altered Insulin Signalling in Sprague-Dawley Rat. *Niger J Physiol Sci.* 2016; 31(1):23-9.
- Morgan TE, Wong AM, Finch CE. Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. *Interdiscip Top Gerontol.* 2007;35:83-97.
- Morgan W, Richardson A, Nelson J. Dietary Restriction Does Not Protect the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway of Older Animals From Low-Dose MPTP-Induced Neurotoxicity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003; 58: B394-B399.
- Morley JE. Anorexia, sarcopenia, and aging. *Nutrition.* 2001; 17(7-8):660-3.
- Mosconi L, De Santi S, Li J, Tsui WH, Li Y, Boppana M, Laska E, Rusinek H, de Leon MJ. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiol Aging.* 2008; 29(5):676-92.
- Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res Rev.* 2017; 39:36–45.
- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(2-3):121-38.
- Mukherjee J, Christian BT, Dunigan KA, Shi B, Narayanan TK, Satter M, Mantil J. Brain imaging of 18F-fallypride in normal volunteers: blood analysis distribution test-retest studies and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D-2/D-3 receptors. *Synapse.* 2002; 46(3):170-88.
- Müller U, Cristina N, Li ZW, Wolfer DP, Lipp HP, Rüllicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell.* 1994; 79(5):755-65.
- Mulligan JD, Gonzalez AA, Kumar R, Davis AJ, Saupe KW. Aging Elevates Basal Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) Activity and Eliminates Hypoxic Activation of AMPK in Mouse Liver, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005; 60(1):21-7.

Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol.* 2011;31(17):3531-45.

Murphy T, Dias GP, Thuret S. Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies: Mind the Gap. *Neural Plast.* 2014; 2014:563160.

Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Fröberg S, Ljungqvist O, Thorell A, Goodyear LJ. AMPactivated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes.* 2001; 50(5):921-7.

Navarro-Martínez R, Fernández-Garrido J, Buigues C, Torralba-Martínez E, Martínez-Martinez M, Verdejo Y, Mascarós MC, Cauli O. Brain-derived neurotrophic factor correlates with functional and cognitive impairment in non-disabled older individuals. *Exp Gerontol.* 2015; 72:129-37.

Nyberg L, Bäckman L. Cognitive ageing: a view from brain imaging. *New Frontiers in Cognitive Ageing.* 2004; 135–160

Oka Y, Asano T, Lin JL, Tsukuda K, Katagiri H, Ishihara H, Inukai K, Yazaki Y. Expression of glucose transporter isoforms with aging. *Gerontology.* 1992;38 Suppl 1:3-9.

Olson Pillai VB, Sundaesan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circ Res.* 2014;114(2):368-78.EN8.

Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 2011 Jun 6;585(11):1537-42.

Onaolapo OJ, Onaolapo AY. Subchronic Oral Bromocriptine Methanesulfonate Enhances Open Field Novelty-Induced Behavior and Spatial Memory in Male Swiss Albino Mice. *Neurosci J.* 2013;2013:94824.

Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One.* 2010;5(1):e8758.

Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats. *Science.* 1917; 45(1160):294-5.

- Paganini-Hill A, Clark LJ, Henderson VW, Birge SJ. Clock drawing: Analysis in a retirement community. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49(7):941-7.
- Panza F, Solfrizzi V, Barulli MR, Santamato A, Seripa D, Pilotto A, Logroscino G. Cognitive frailty epidemiological and neurobiological evidence of an age-related clinical condition: A systematic review. *Rejuvenation Res.* 2015; 18(5):389-412.
- Panza F, Solfrizzi V, Frisardi V, Maggi S, Sancarlo D, Adante F, D'Onofrio G, Seripa D, Pilotto A. Different models of frailty in predementia and dementia syndromes. *J Nutr Health Aging.* 2011; 15(8):711-9.
- Panza F, Solfrizzi V, Logroscino G, Maggi S, Santamato A, Seripa D, Pilotto A. Current epidemiological approaches to the metabolic-cognitive syndrome. *J Alzheimers Dis.* 2012;30 Suppl 2:S31-75
- Panza F, Solfrizzi V, Barulli MR, Santamato A, Seripa D, Pilotto A, Logroscino G. Cognitive Frailty: A Systematic Review of Epidemiological and Neurobiological Evidence of an Age-Related Clinical Condition. *Rejuvenation Res.* 2015; 18(5):389-412.
- Park CW, Yoo KY, Hwang IK, Choi JH, Lee CH, Park OK, Cho JH, Lee YL, Shin HC, Won MH. Age-related Changes in the Insulin Receptor β in the Gerbil Hippocampus. *Neurochem Res.* 2009; 34(12):2154-62.
- Park S, Komatsu T, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Higami Y, Kuramoto K, Shimokawa I. Calorie restriction initiated at middle age improved glucose tolerance without affecting age-related impairments of insulin signaling in rat skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2006; 41(9):837-45.
- Park SK, Prolla TA. Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res Rev.* 2005; 4(1):55-65.
- Parks RJ, Fares E, Macdonald JK, Ernst MC, Sinal CJ, Rockwood K, Howlett SE. A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2012; 67:217-227.
- Pearson-Leary J, McNay EC. Novel Roles for the Insulin-Regulated Glucose Transporter-4 in Hippocampally Dependent Memory. *J Neurosci.* 2016; 36(47):11851-11864.

Pellerin L, Bonvento G, Chatton JY, Pierre K, Magistretti PJ. Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr Metab.* 2002; 15(5):268–273.

Perovic M, Tesic V, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Loncarevic-Vasiljkovic N, Ruzdijic S, Kanazir S. BDNF transcripts proBDNF and proNGF in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age (Dordr).* 2013;35(6):2057-70.

Peters R. Ageing and the brain. *Postgrad Med J.* 2006; 82(964):84-8.

Picca A, Pesce V, Lezza AMS. Does eating less make you live longer and better? An update on calorie restriction. *Clin Interv Aging.* 2017; 12:1887-1902.

Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, Martin FP, Cominetti O, Welsh C, Rieder A, Traynor J, Gregory C, De Palma G, Pigrau M, Ford AC, Macri J, Berger B, Bergonzelli G, Surette MG, Collins SM, Moayyedi P, Bercik P. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2017; 153(2):448-459.e8

Pires RC, Souza EE, Vanzela EC, Ribeiro RA, Silva-Santos JC, Carneiro EM, Boschero AC, Amaral ME. Short-term calorie restriction improves glucose homeostasis in old rats: involvement of AMPK. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014; 39(8):895-901

Pitsikas N, Carli M, Fidecka S, Algeri S. Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiol Aging.* 1990; 11(4):417-23.

Plitzko D, Rumpel S, Gottmann K. Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. *Eur J Neurosci.* 2001; 14(8):1412-5.

Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16(2):59-65.

Pons V, Riera J, Capó X, Martorell M, Sureda A, Tur JA, Drobic F, Pons A. Calorie restriction regime enhances physical performance of trained athletes. *J Int Soc Sports Nutr.* 2018; 15:12.

Potter WB, O'Riordan KJ, Barnett D, et al. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoS One*. 2010;5(2):e8996.

Potts MB, Lim DA. An old drug for new ideas: metformin promotes adult neurogenesis and spatial memory formation. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):5-6.

Prasannarong M, Vichaiwong K, Saengsirisuwan V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822 (6):1051-1061.

Przedborski S, Donaldson D, Jakowec M, Kish SJ, Guttman M, Rosoklija G, Hays AP. Brain superoxide dismutase catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1996; 39(2):158–165.

Pugh TD, Oberley TD, Weindruch R. Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice. *Cancer Res*. 1999; 59(7):1642-8.

Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z, Yi L. Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPK α . *Exp Mol Med*. 2007; 39(4):535-43.

Quintas A, de Solís AJ, Díez-Guerra FJ, Carrascosa JM, Bogónez E. Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. *Exp Gerontol*. 2012 Feb;47(2):198-201.

Racette SB, Weiss EP, Villareal DT, Arif H, Steger-May K, Schechtman KB, Fontana L, Klein S, Holloszy JO; Washington University School of Medicine CALERIE Group. One year of caloric restriction in humans: feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61:943–950

Rafalski VA, Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Prog Neurobiol*. 2011;93(2):182-203.

Raman A, Colman RJ, Cheng Y, Kemnitz JW, Baum ST, Weindruch R, Schoeller DA. Reference body composition in adult rhesus monkeys: glucoregulatory and anthropometric indices. *J Gerontol. J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005 Dec;60(12):1518-24.

Ramsey JJ, Laatsch JL, Kemnitz JW. Age and gender differences in body composition, energy expenditure, and glucoregulation of adult rhesus monkeys. *J Med Primatol.* 2000; 29(1):11-9.

Ravussin E, Redman LM, Rochon J, Das SK, Fontana L, Kraus WE, Romashkan S, Williamson DA, Meydani SN, Villareal DT, Smith SR, Stein RI, Scott TM, Stewart TM, Saltzman E, Klein S, Bhapkar M, Martin CK, Gilhooly CH, Holloszy JO, Hadley EC, Roberts SB; CALERIE Study Group. A 2-year randomized controlled trial of human caloric restriction: feasibility and effects on predictors of health span and longevity. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2015; 70:1097–1104

Raz N, Gunning FM, Head D, Dupuis JH, McQuain J, Briggs SD, Loken WJ, Thornton AE, Acker JD. Selective aging of the human cerebral cortex observed in vivo: differential vulnerability of the prefrontal gray matter. *Cereb Cortex.* 1997; 7(3):268–82.

Raz N, Lindenberger U, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, Williamson A, Dahle C, Gerstorf D, Acker JD. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends individual differences and modifiers. *Cereb Cortex.* 2005; 15(11):1676–89.

Raz N, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, Gunning-Dixon F, Acker JD. Differential aging of the human striatum: longitudinal evidence. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003; 24(9):1849-56.

Raz N, Rodrigue KM. Differential aging of the brain: patterns cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30(6): 730-48.

Rebrin I, Forster M, Sohal RS. Effects of age and caloric intake on glutathione redox state in different brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res.* 2007; 1127:10–1.

Ren H, Lu TY, McGraw TE, Accili D. Anorexia and impaired glucose metabolism in mice with hypothalamic ablation of Glut4 neurons. *Diabetes.* 2015;64(2):405-17.

Ren H, Yan S, Zhang B, Lu TY, Arancio O, Accili D. Glut4 expression defines an insulin-sensitive hypothalamic neuronal population. *Mol Metab.* 2014;3(4):452-9.

Reno CM, Puente EC, Sheng Z, Daphna-Iken D, Bree AJ, Routh VH, Kahn BB, Fisher SJ. Brain GLUT4 Knockout Mice Have Impaired Glucose Tolerance, Decreased Insulin

Sensitivity, and Impaired Hypoglycemic Counterregulation. *Diabetes*. 2017;66(3):587-597.

Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci*. 2003; 23(8):3295–301.

Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, Befroy D, Pypaert M, Hardie DG, Young LH, Shulman GI. Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis *Cell Metab*. 2007; 5(2): 151–156.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 6(5):306-14.

Ribeiro LC, Rodrigues L, Quincozes-Santos A, Tramontina AC, Bambini-Junior V, Zanotto C, Diehl LA, Biasibetti R, Kleinkauf-Rocha J, Dalmaz C, Goncalves CA, Gottfried C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. *Brain Res*. 2012; 1472:11-9.

Rizza W, Veronese N, Fontana L. What are the roles of caloric restriction and diet quality in promoting healthy longevity? *Ageing Res Rev*. 2014; 13:38–45.

Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. 2013;3(1):1-58.

Rockwood K, Fox RA, Stolee P, Robertson D, Beattie B. Frailty in elderly people: an evolving concept. *CMAJ*. 1994; 150:489–495.

Rossi S, Zanier ER, Mauri I, Columbo A, Stocchetti N. Brain temperature, body core temperature, and intracranial pressure in acute cerebral damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71(4):448-54.

Sahu A, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Hypothalamic Neuropeptide Y Secretion Decreases in Aged Male Rats: Implications for Reproductive Aging. *Endocrinology*. 1988; 122(5):2199-203.

Salat DH, Buckner RL, Snyder AZ, Greve DN, Desikan RS, Busa E, et al. Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cereb Cortex*. 2004; 14(7):721–30.

Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C. GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis* 2011; 2011:189728

Sandyk R. The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 1993; 69:125–130

Santos MS, Pereira EM, Carvahó AP. Stimulation of immunoreactive insulin release by glucose in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 1999; 24(1):33-6.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol.* 1983;18(1):55-64.

Scahill R, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC. A longitudinal study of brain volume changes in normal ageing using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol.* 2003; 60(7):989-94.

Schafer MJ, Dolgalev I, Alldred MJ, Heguy A, Ginsberg SD. Calorie restriction suppresses age-dependent hippocampal transcriptional signatures. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0133923.

Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res.* 1996; 736(1-2):16-27.

Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004; 28(5):364-71.

Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 1991; 40(3):599-636.

Schober SE, Carroll MD, Lacher DA, Hirsch R; Division of Health and Nutrition Examination Surveys. High serum total cholesterol--an indicator for monitoring cholesterol lowering efforts: U.S. adults, 2005-2006. *NCHS Data Brief.* 2007; (2):1-8.

Scrofano MM, Jahngen-Hodge J, Nowell TR Jr, Gong X, Smith DE, Perrone G, Asmundsson G, Dallal G, Gindlesky B, Mura CV, Taylor A. The effects of aging and

calorie restriction on plasma nutrient levels in male and female Emory mice. *Mech Ageing Dev.* 1998; 105(1-2):31-44.

Seidler RD, Alberts JL, Stelmach GE. Changes in multi-joint performance with age. *Motor Control.* 2002; 6(1):19–31.

Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* 2008;22(3):807-18.

Semprini R, Ragonese M, Poggi M, Franze A, Martorana A. Ageing as a Trait de Union between diabetes and dementia for frailty. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013; 12(4):520-4.

Sengupta B, Stemmler M, Laughlin SB, Niven JE. Action potential energy efficiency varies among neuron types in vertebrates and invertebrates. *PLoS Comput Biol.* 2010; 1;6:e1000840.

Sharma S, Kaur G. Dietary restriction enhances kainite-induced increase in NCAM while blocking the glial activation in adult rat brain. *Neurochem Res.* 2008; 33(7):1178-88.

Shukitt-Hale B, McEwen JJ, Szprengiel A, Joseph JA. Effect of age on the radial arm water maze—a test of spatial learning and memory. *Neurobiol Aging.* 2004; 25:223-229.

Sibille E, Su J, Leman S, Le Guisquet AM, Ibarguen-Vargas Y, Joeyen-Waldorf J, et al. Lack of serotonin1B receptor expression leads to age-related motor dysfunction early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Mol Psychiatry.* 2007;12(11):1042–56. 975.

Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(11):1766–1791.

Simpson IA, Vannucci SJ, DeJoseph MR, Hawkins RA. (2001) Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J Biol Chem* 276(16):12725-12729.

Singh R, Lakhanpal D, Kumar S, Sharma S, Kataria H, Kaur M, Kaur G. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *Age (Dordr)*. 2012; 34(4):917-33.

Singh R, Manchanda S, Kaur T, Kumar S, Lakhanpal D, Lakhman SS, Kaur G. Middle age onset short-term intermittent fasting dietary restriction prevents brain function impairments in male Wistar rats. *Biogerontology*. 2015; 16(6):775-88.

Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(11):6037-42.

Smiljanic K, Pesic V, Mladenovic Djordjevic A, Pavkovic Z, Brkic M, Ruzdijic S, Kanazir S. Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. *Biogerontology*. 2015; 16(1):71-83.

Smiljanić K. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u prednjem mozgu pacova (disertacija). Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd 2012; 1-101.

Soffié M, Buhot MC, Poucet B. Cognitive and noncognitive processes involved in selective object exploration: comparison between young adult and old rats. *Physiol Behav*. 1992; 52(5):1029-35.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996; 273(5271):59-63

Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med*. 2011; 32(3):159-221.

Sprott RL. Animal models of aging: Something old, something new. *ILAR J*. 2011;52(1):1-3.

Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Tomasevic T, Radosavljevic T. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys*. 2013;32(2):277-83.

Stark R, Ashley SE, Andrews ZB. AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol*. 2013; 366(2):215-23

Steculorum SM, Solas M, Brüning JC. The paradox of neuronal insulin action and resistance in the development of aging-associated diseases. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1 Suppl): S3-11.

Stein LJ, Dorsa DM, Baskin DG, Figlewicz DP, Porte D Jr, Woods SC. Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology*. 1987; 121(5):1611-5.

Stewart J, Mitchell J, Kalant N. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging*. 1989;10(6):669–675.

Stranahan AM, Mattson MP. Bidirectional metabolic regulation of neurocognitive function. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; 96(4):507-16.

Strubbe JH, Mein CG. Increased feeding in response to bilateral injection of insulin antibodies in the VMH. *Physiol Behav*. 1977; 19(2):309-13.

Su F, Shu H, Ye Q, Wang Z, Xie C, Yuan B, Zhang Z, Bai F. Brain insulin resistance deteriorates cognition by altering the topological features of brain networks. *Neuroimage Clin*. 2016;13:280-287.

Suchiang K, Sharma R. Dietary restriction regulates brain acetylcholinesterase in female mice as a function of age. *Biogerontology*. 2011; 12(6):581-9.

Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(12):7418-28.

Sun XJ, Miralpeix M, Myers M, Glasheen E, Backer J, Kahn C, White M. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J Biol Chem* 1992; 267(31):22662–22672

Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. Dissecting the role of 5'AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMPactivated protein kinase. *J Biol Chem*. 2006; 281(43):32207-16.

Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B. Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol.* 1997; 94(4):345-52.

Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* 2001; 76(1):1-10. Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 2007; 317:369–372

Taha C, Klip A. The insulin signaling pathway. *J Membr Biol.* 1999; 169(1):1–12

Takadera T, Sakura N, Mohri T, Hashimoto T. Toxic effect of a beta-amyloid peptide (beta 22–35) on the hippocampal neuron and its prevention. *Neurosci Lett.* 1993; 161(1):41-4.

Tanaka M, Sawada M, Yoshida S, Hanaoka F, Marunouchi T. Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. *Neurosci Lett.* 1995; 199(1):37-40.

Tanegashima K, Sato-Miyata Y, Funakoshi M, Nishito Y, Aigaki T, Hara T. Epigenetic regulation of the glucose transporter gene *Slc2a1* by β -hydroxybutyrate underlies preferential glucose supply to the brain of fasted mice. *Genes Cells.* 2017;22(1):71-83.

Tang PF.; Woollacott MH. 57. Balance control during walking in the older adult: research and its implications. *Phys Ther.* 1997;77(6):646-60.

Tanne D, Koren-Morag N, Graff E, Goldbourt U. Blood lipids and first-ever ischemic stroke/transient ischemic attack in the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Registry: high triglycerides constitute an independent risk factor. *Circulation.* 2001; 104(24):2892-7.

Tarrach, C.H.A., Dodson, A.A.R., Foster, C.S., Harold, J.A., Wilding, J.P.H. Rat Third Ventricle Ependymal Cells Possess the Ability To Produce Insulin. 2005. 65th Scientific Sessions Congress, Abstract Number: 1528-P.

Alquier T, Leloup C, Lorsignol A, Pénicaud L. Translocable Glucose Transporters in the Brain. *Diabetes.* 2006; 55 (Supplement 2) S131-S138;

- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(2):E141–5.
- Thorsell A, Heilig M. Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides.* 2002; 36(2-3) 182-193.
- Trollor J, Valenzuela M. Brain ageing in the new millennium. *Aust N Z J Psychiatry.* 2001; 35(6):788-805.
- Turdi S, Fan X, Li J, Zhao J, Huff AF, Du M, Ren J. AMP-activated protein kinase deficiency exacerbates aging-induced myocardial contractile dysfunction. *Aging Cell.* 2010; 9(4):592-606.
- Unger J, McNeill TH, Moxley RT 3rd, White M, Moss A, Livingston JN. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience.* 1989;31(1):143-57.
- Uno H. Age-related pathology and biosenescent markers in captive rhesus macaques. *Age (Omaha).* 1997; 20(1):1-13.
- Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal.* 2011; 4:re2
- van der Heide LP, Ramakers GMJ, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* 2006; 79(4):205–221
- Van Liew JB, Davis PJ, Davis FB, Bernardis LL, Deziel MR, Marinucci LN, Kumar D. Effects of aging, diet, and sex on plasma glucose, fructosamine, and lipid concentrations in barrier-raised Fischer 344 rats. *J Gerontol.* 1993; 48(5):B184-90.
- Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev.* 2013;12:8–21.
- Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.* 1998;797(1):1-11.

Vaughan KL, Kaiser T, Peadar R, Anson RM, de Cabo R, Mattison JA. Caloric Restriction Study Design Limitations in Rodent and Nonhuman Primate Studies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 73(1):48-53.

Veyrat-Durebex C, Quirion R, Ferland G, Dumont Y, Gaudreau P. Aging and long-term caloric restriction regulate neuropeptide Y receptor subtype densities in the rat brain. *Neuropeptides*. 2013; 47(3):163-9.

Villareal DT, Fontana L, Das SK, Redman L, Smith SR, Saltzman E, Bales C, Rochon J, Pieper C, Huang M, Lewis M, Schwartz AV; CALERIE Study Group. Effect of two-year caloric restriction on bone metabolism and bone mineral density in non-obese younger adults: a randomized clinical trial. *J Bone Miner Res*. 2016; 31:40–51

Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S, Andreelli F. AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010; 45(4):276-95.

Voloboueva LA, Sun X, Xu L, Ouyang YB, Giffard RG. Distinct Effects of miR-210 Reduction on Neurogenesis: Increased Neuronal Survival of Inflammation But Reduced Proliferation Associated with Mitochondrial Enhancement. *J Neurosci*. 2017; 15;37(11):3072-3084.

Wahl D, Coogan SC, Solon-Biet SM, de Cabo R, Haran JB, Raubenheimer D, Cogger VC, Mattson MP, Simpson SJ, Le Couteur DG. Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin Interv Aging*. 2017; 12:1419-1428.

Wallum BJ, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 ;64(1):190-4.

Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med*. 2014; 66:88-99.

Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*. 1997;14;388(6643):686-90.

Wang X, Pal R, Chen XW, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis EK. High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005; 140(1-2):120-6.

Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Sonntag W, Cefalu WT. Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. *Exp Gerontol*. 1997; 32(6):671-84.

Weindl A, Sofroniew MV. Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;28:303-20.

Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life span and spontaneous cancer incidence. *Science*. 1982; 215(4538):1415-8.

Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr*. 1986;116(4):641-54.

Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, Klein S, Holloszy JO. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(5):1033-42.

Werner H, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24(12):1947-53.

Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Mendelsohn FA. Localization and Characterization of Insulin-Like Growth Factor-I Receptors in Rat Brain and Pituitary Gland Using in vitro Autoradiography and Computerized Densitometry A Distinct Distribution from Insulin Receptors. *J Neuroendocrinol*. 1989;1(5):369-77.

Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FA. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology*. 1987 Oct;121(4):1562-70.

Wetzel W, Matthies H. Differences in Y-Maze Retention of Rats: Selection According to Open Field Activity. *Physiol Behav.* 1982; 28:619-622.

Whitehead JC, Hildebrand BA, Sun M, Rockwood MR, Rose RA, Rockwood K, Howlett S. A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2014; 69:621–632.

Willette AA, Bendlin BB, Colman RJ, Kastman EK, Field AS, Alexander AL, Sridharan A, Allison DB, Anderson R, Voytko ML, Kemnitz JW, Weindruch RH, Johnson SC. Calorie restriction reduces the influence of glucoregulatory dysfunction on regional brain volume in aged rhesus monkeys. *Diabetes.* 2012;61(5):1036-42.

Willig F, Palacios A, Monmaur P, M'Harzi M, Laurent J, Delacour J. Short-term memory exploration and locomotor activity in aged rats. *Neurobiol Aging.* 1987; 5: 393-402.

Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3737-55.

Wolden-Hanson T. Mechanisms of the anorexia of aging in the Brown Norway rat. *Physiol Behav.* 2006; 30;88(3):267-76.

Wong WT. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:22.

Woods SC, Porte D Jr. Relationship between plasma and cerebro-spinal fluid insulin levels of dogs. *Am J Physiol.* 1977; 233(4):E331-4.

Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int.* 1993; 22(1):1-10.

Wu A, Wan F, Sun X, Liu Y. Effects of dietary restriction on growth neurobehavior and reproduction in developing Kunmin mice. *Toxicol Sci.* 2002; 70:238-244.

Wu SB, Wei YH. AMPK mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(2):233-47

Wyss JM, Chambless BD, Kadish I, van Groen T. Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol Aging*. 2000; 21(5):671-81.

Xia X, Chen W, McDermott J, Han JJ. Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Res*. 2017; 6: 860.

Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2007;449(7161):496-500.

Yamada Y, Kemnitz JW, Weindruch R, Anderson RM, Schoeller DA, Colman RJ. Caloric Restriction and Healthy Life Span: Frail Phenotype of Nonhuman Primates in the Wisconsin National Primate Research Center Caloric Restriction Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018; 73(3):273-278.

Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol Aging*. 2004; 25:325–332.

Yeh WL, Lin CJ, Fu WM. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Mol Pharmacol*. 2008; 73(1):170–7.

Yilmaz N, Vural H, Yilmaz M, Sutcu R, Sirmali R, Hicyilmaz H, Delibas N. Calorie restriction modulates hippocampal NMDA receptors in diet-induced obese rats. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011; 31(3):214-9.

Yorke A, Kane AE, Hancock Friesen CL, Howlett SE, O'Blenes S. Development of a Rat Clinical Frailty Index. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 72:897-903.

Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Life span study of SPF Fischer 344 male rats: I. Physical metabolic and longevity characteristics. *J. Gerontol*. 1985; 40(6):657-70.

Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vynych JV. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *J Neurochem* 1984; 42(5):1354–1362

Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vynych JV. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *J Neurochem*. 1984; 42(5):1354-62.

Zaia A, Piantanelli L. Insulin receptors in the brain cortex of aging mice. *Mech Ageing Dev.* 2000; 113(3):227-32.

Zhang B, Sannajust F. Diurnal rhythms of blood pressure heart rate and locomotor activity in adult and old male Wistar rats. *Physiol Behav.* 2000; 70(3-4):375-80

Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, Zhao G, Zhang M, Pang X, Yan Z, Liu Y, Zhao L. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nat Commun.* 2013; 4:2163.

Zhang Y, Mi SL, Hu N, Doser TA, Sun A, Ge J, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 accentuates aging-induced cardiac remodeling and contractile dysfunction: role of AMPK, Sirt1, and mitochondrial function. *Free Radic Biol Med.* 2014; 71:208-20.

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem.* 1999; 274(49):34893-902.

Biografija

Smilja Todorović je rođena 19.10.1981. godine u Mostaru, Bosna i Hercegovina. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2000. godine, a završila 2009. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smer Genetičko inženjerstvo i biotehnologija sa opštim uspehom 9.03 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad pod naslovom „Efekat restriktivnog režima ishrane na neuronalnu smrt u modelu kortikalne lezije“ uradila je na Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Nakon uspešne odbrane diplomskog rada sa ocenom 10, 2009. godine se zapošljava u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, gde je angažovana na projektu „Molekularna i bihejvioralna ispitivanja plastičnosti mozga” (broj 143004). Sledeće, 2010. godine upisuje doktorske studije u okviru studijskog programa Biologija (modul: Eksperimentalna neurobiologija, od gena do ponašanja) na Biološkom fakultetu. Od 2010. godine je zaposlena kao istraživač-pripravnik u Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Od 2011. godine učestvuje u realizaciji projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (broj 173056), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač-saradnik stiče 2012. godine, u koje je reizabrana 2015. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je pod mentorstvom dr Aleksandre Mladenović Đorđević, višeg naučnog saradnika i dr Selme Kanazir, naučnog savetnika Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, u okviru Projekta 173056, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Društva za neuronauke Srbije (DNS), Federacije evropskih društava za neuronauke (FENS), Srpskog društva za molekularnu biologiju (MolBios) i Međunarodne unije biohemije i molekularne biologije (IUBMB). Učestvovala je u nekoliko COST akcija, u istraživačkom projektu SCOPES i u istraživačkom DAAD bilateralnom projektu sa Nemačkom.

Smilja T. Todorović je do sada objavila 5 radova u međunarodnim časopisima od kojih je na jednom prvi autor i ima preko 20 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.