

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara B. Dakić

**EFEKAT KRATKOTRAJNOG GLADOVANJA NA
EKSPRESIJU INSULINA I INSULINSKU
SIGNALIZACIJU U HIPOTALAMUSU PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tamara B. Dakić

**EFFECT OF SHORT-TERM FASTING ON INSULIN
EXPRESSION AND INSULIN SIGNALING IN THE
RAT HYPOTHALAMUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

dr Predrag Vujović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Članovi komisije:

dr Tanja Jevđović, docent , Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija

dr Ivana Bjelobaba, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji Katedre za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju Biološkog fakulteta u okviru projekta "Efekat metaboličkih i nemetaboličkih stresora na ekspresiju i delovanje neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze" koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod rukovodstvom prof. dr Jelene Đorđević.

Želela bih da izrazim zahvalnost svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru, dr Predragu Vujoviću, koji je bio tu da utaba moj put ka svetlu nauke. U najtežim trenucima, bio je jedan od retkih ljudi koji je verovao u mene. Ništa ne zvuči dovoljno dobro da mu iskažem svoju zahvalnost povodom toga, pa ću samo reći da se nadam da ću jednog dana uspeti da usmerim makar jednu osobu koja se nađe izgubljena na tom putu. Mislim da je to najbolji način da se odužim za sve što je učinio za mene. Takođe, želim da mu se zahvalim za svo preneto znanje, posvećeno vreme, ogromno strpljenje, nesebične savete, uloženi trud, istrajnu veru i sve ostalo čime je proširio moje naučne vidike. Hvala!

Veliku zahvalnost dugujem i Tanji Jevđović za sve što me je naučila u eksperimentalnom radu, zahvalna sam joj na svim prijateljskim savetima i nesebičnoj pomoći, kao i na svim konstruktivnim kritikama i sugestijama kojima je pomogla u izradi i pisanju ove doktorske disertacije. Hvala što si me naučila da razmišljam kao naučnik.

Zahvalila bih se Ivani Bjelobabi za izdvojeno vreme i strpljenje koje je kao član komisije za ocenu teme i disertacije posvetila ovom radu. Hvala i na praktičnim komentarima i korisnim sugestijama koje sam rado uvažila.

Zahvalila bih se dr Jeleni Đorđević, dr Nebojši Jasniću, dr Ivi Lakić, Oliveri Marin i svim ostalim kolegama sa Katedre za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju što su mi pružili ruku podrške i svojim konkretnim savetima učinili da napredujem u svakodnevnom radu.

Veliku zahvalnost upućujem kolegici Mini Perić za podršku, pomoć i prijateljstvo.

Posebnu zahvalnost dugujem Vedrani Marković, dugogodišnjem prijatelju i saborcu u nauci, koja je kilometrima daleko, ali ipak uvek tu da me podigne i pogura napred kad god u životu ili nauci zastanem.

Mojoj porodici, majci Emimi, bratu Bojanu i pokojnom ocu Borivoju se zahvaljujem za bezrezervnu podršku i razumevanje.

Na kraju, želim da se zahvalim Simu što mi je bio i ostao bezuslovni oslonac i vetar u leđa svih ovih godina tokom kojih smo zajedno rasli, evoluirali i postali ono što jesmo danas.

Ovaj rad posvećujem mojoj baba Jovanki.

Efekat kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju insulina i insulinsku signalizaciju u hipotalamusu pacova

Sažetak

Gladovanje predstavlja stanje tokom kojeg nema unosa hrane, pa se stoga potrebe za energijom zadovoljavaju razgradnjom endogenih energetske depoa. U zavisnosti od dužine trajanja gladovanje može narušiti energetske homeostazu. Hipotalamus kao mesto integracije signala o energetske statusu organizma ima veoma važnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze. Prethodne studije su pokazale da tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do smanjenja koncentracije insulina u krvi, dok je u hipotalamusu detektovana povećana količina insulina. Ovo neočekivano saznanje otvorilo je mnogobrojna pitanja, stoga je predmet ove doktorske disertacije bio ispitivanje uticaja šestočasovnog gladovanja na ekspresiju insulina u hipotalamusu i ispitivanje adaptivnog značaja ovog fenomena.

U ekperimentima su korišćeni mužjaci pacova *Wistar* soja. Jedna grupa životinja imala je neometan pristup hrani (*ad libitum*), a drugoj je hrana uklonjena u trajanju od šest sati. Analizirana je genska i proteinska ekspresija insulina u hipotalamusu. Pokazano je da nakon šest sati gladovanja dolazi do povećanja količine insulina, kao i povećanja ekspresije iRNK za insulin. Proinsulin i insulin su detektovani u neuronima periventrikularnog jedra hipotalamusa i u ependimskim ćelijama koje okružuju treću moždanu komoru. Koncentracija glukoze i insulina u krvi bila je smanjena nakon kratkotrajnog gladovanja dok je u cerebrospinalnoj tečnosti ostala nepromenjena. Nakon kratkotrajnog gladovanja zabeležena je povećana količina aktivnog insulinskog receptora u periventrikularnom jedru. Pored toga, u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa zabeleženo je povećano prisustvo GLUT1 (55kDa), izoforme karakteristične za endotelne ćelije, povećanje neuronskih GLUT2 i GLUT3, dok je količina astrocitne GLUT1 (45 kDa) izoforme i GLUT4 ostala nepromenjena. Nakon šestočasovnog gladovanja nije zabeležena koekspresija aktivnog insulinskog receptora i glukoznih transportera. Količina glikogena u hipotalamusu ostala je nepromenjena. Ukupna i fosforilisana forma proteina uključenih u PI3K-AKT/PKB signalni put (IRS1, pIRS1-Tyr612, IRS2, pIRS2-Ser731, mTOR i

pmTOR-Ser2448) ostala je nepromenjena nakon šestočasovnog gladovanja. Nasuprot tome, iako je ukupna količina ERK1/2 bila smanjena, detektovano je povećano prisustvo aktivne forme ovih enzima.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do *de novo* sinteze insulina u periventrikularnom jedru hipotalamusa. Takođe, rezultati ukazuju da se u početnoj fazi gladovanja procesi preuzimanja glukoze od strane nervnih ćelija kao i sinteza glikogena u hipotalamusu odvijaju nezavisno od dejstva insulina. Na osnovu promena detektovanih u količini glukoznih transportera rezultati sugerišu da se u kratkotrajnom gladovanju neuronima daje prioritet u snabdevanju glukozom odnosu na astrocite. Nakon kratkotrajnog gladovanja iako je detektovana aktivacija insulinskog receptora, ne dolazi do aktivacije PI3K-AKT/PKB signalnog puta, ali je zabeležena aktivacija ERK1/2. Dodatnom analizom signalnih puteva nishodno od ERK1/2 ostaje da se otkrije koja je uloga aktivacije ERK1/2 i da li *de novo* sintetisani insulin tokom kratkotrajnog gladovanja doprinosi njihovoj aktivaciji.

Ključne reči: gladovanje, hipotalamus, periventrikularno jedro, insulin, insulinska signalizacija, glukoza, glukozni transporteri, pacov

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija životinja i čoveka - Neuroendokrinologija

Effect of short-term fasting on insulin expression and insulin signaling in the rat hypothalamus

Abstract

Fasting, a condition characterized by the absence of food intake, requires that the endogenous fuel depots be depleted. Depending on its duration, fasting can disturb energy homeostasis. The hypothalamus is the major integrating center of central and peripheral signals regarding energy status, and thus plays an important role in the energy homeostasis maintenance. Having discovered that short-term fasting decreases insulin circulating levels while simultaneously increasing its hypothalamic content the main goal of this doctoral dissertation was set to examine effects of six-hour fasting on the insulin expression in the hypothalamus and elucidate their adaptive significance.

One group of male *Wistar* rats had unrestricted access to food (*ad libitum*), while the other was subjected to six-hour fasting. The gene and protein hypothalamic insulin expression was analyzed. It was shown that, after six hours fasting, both insulin content and insulin mRNA expression were increased. The proinsulin positivity was detected in the neurons of the hypothalamic periventricular nucleus and in the ependymal cells surrounding the third ventricle. Furthermore, following the short-term fasting, increased amount of the activated insulin receptor in the same hypothalamic region was also observed. Additionally, the 55kDa endothelial GLUT1 expression was increased in the membrane fraction of proteins isolated from the hypothalamus. The same pattern was also detected in the case of the neuronal GLUT2 and GLUT3 isoforms, while the amount of the 45 kDa astrocytic GLUT1 and GLUT4 remained unchanged. After six-hour fasting, no co-expression of the activated insulin receptor and glucose transporters was observed. The glycogen amount and distribution in the hypothalamus remained unchanged. The amount of total and phosphorylated forms of IRS1, IRS2, PI3K and mTOR remained unaffected by fasting. However, there was a significant increase in the activated form of ERK1/2, although the total amount of these enzymes was reduced.

In conclusion, *de novo* synthesis of insulin occurs during short-term fasting in the periventricular nucleus of the hypothalamus. Results indicate that in the initial stage metabolic response to fasting, glucose uptake and glycogen synthesis in the hypothalamus appear to be independent of the insulin action. Based on the changes in the amount of GLUTs, the results suggest that during short-term fasting neuronal glucose supply represents a priority over the one of astrocytes. Although there was an increase in the activation of the insulin receptor, the PI3K-AKT/PKB signaling pathway was not activated, but significant increase in the activation of ERK1/2 was detected. Further analysis of signaling pathways downstream of ERK1/2 are needed to explain the role of ERK1/2 activation and give answer to whether *de novo* synthesized insulin contributes to their activation during short-term starvation.

Key words: fasting, hypothalamus, periventricular nucleus, insulin, insulin signaling, glucose, glucose transporter, rat

Scientific area: Biology

Narrow scientific field: Animal and human physiology - Neuroendocrinology

SPISAK SKRAĆENICA

2DG - 2-deoksi-D-glukoza

4E-BP1 - eIF4E-vezujući protein (eng. *eIF4E-binding proteins*)

AgRP - aguti proteinu sličan peptid (eng. *agouti-related peptide*)

AMPK - AMP-aktivirana proteinska kinaza

ANOVA - analiza varijanse (eng. *analysis of variance*)

ARC - lučno jedro (eng. *arcuate nucleus*)

ATP - adenzin-3-fosfata (eng. *adenosine triphosphate*)

BSA - goveđi serum albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*)

C-peptid - (eng. *connecting peptide*)

CART - kokainom i amfetaminom regulisani transkript (eng. *cocain- and amphetamine-regulated transcript*)

cDNK - komplementarna DNK (eng. *complementary DNA*).

CNS - centralni nervni sistem

CRH - kortikotropni-oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormone*)

CST - cerebrospinalna tečnost

DAB - 3,3-diaminobenzidin

DEPC – dietilpirokarbonat

DMN - dorzomedijalno jedro (eng. *dorsomedial nucleus*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina

eEF - (eng. *eukaryotic elongation factors*)

EGTA - etilenglikoltetrasirćetna kiselina

eIF - (eng. *eukaryotic initiation factors*)

ELISA - imunoenzimski esej (eng. *enzyme-linked immunoadsorbent assay*)

ERK - ekstracelijskim signalima regulisana kinaza (eng. *extracellular signal-regulated kinase*)

FOXO1 - (eng. *forkhead box-containing protein, O subfamily*)

G-6-P - glukozo-6-fosfat (eng. *glucose-6-phosphate*)

Gab-1 - (eng. *Grb2-associated binder-1*)

Gapdh - (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GIP - glukozno-zavistan insulinotropni polipeptid (eng. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*)

GLP-1 - glukagonu sličan peptid-1 (eng. *glucagon-like peptide-1*)

GP - glikogen fosforilaza (eng. *glycogen phosphorylase*)

GLUT - glukozni transporteri (eng. *facilitated diffusion glucose transporters*)

Grb2 (eng. *growth factor receptor-bound protein-2*)

GS - glikogen sintaza

GSK3 - kinaza glikogen sintaze 3

HRP - peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase*)

Ins2 – Insulin 2

IRS - supstrat insulinskog receptora (eng. *Insulin Receptor Substrate*)

Kir6.2 - (eng. *inward-rectifier potassium ion channel*)

KMB - krvno-moždana barijera

LHA - lateralna oblast hipotalamusa (eng. *lateral hypothalamic area*)

MAPK - mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

MCH - melanin-koncentrišući hormon (eng. *melanin-concentrating hormone*)

MCT - monokarboksilatni transporter (eng. *monocarboxylate transporter*)

MEK - kinaza MAP kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

mTOR - (eng. *mammalian target of rapamycin - mTOR*)

NPY - neuropeptid Y

PAS - bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom (eng. *Periodic Acid Schiff*)

PB - fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer*)

PBS - (eng. *phosphate buffered saline*)

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PKD1 - kinaza tipa-1 zavisna od PIP₃ (eng. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*)

PH - domen plektinske homologije (eng. *plectrin homology*)

PI3K - fosfatidilinozitol-3 kinaza (eng. *Phosphatidylinositol 3- Kinase*)

PIP₂ - fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*)

PIP₃ - fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (eng. *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*)

PKB - protein kinaza B (eng. *Protein Kinase B*)

POMC - proopiomelanokortin (eng. *proopiomelanocortin*)

PTB - fosfotirozin-vezujući domen (eng. *phosphotyrosine-binding*)

PTP1B – protein-tirozin fosfataza 1B - (eng. *protein-tyrosine phosphatase 1B*)

PVN - paraventrikularno jedro (eng. *paraventricular nucleus*)

RAF-1 - (eng. *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*),

RAS - (eng. *rat sarcoma*)

RIA - radioimunoesej (eng. *Radioimmunoassay*)

RIPA pufer - (eng. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*)

RNK – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

SDS – natrijum-dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)

SEM - standardna greška srednje vrednosti (eng. *Standard Error of the Mean*)

SGLT - natrijum zavisni glukozni kotransporteri (eng. *Na-dependent glucose co-transporters*)

SH2 - (eng. *Src homology-2*)

SMK - slobodne masne kiseline

SOS - (eng. *son of sevenless*)

SREBP1c - (eng. *sterol regulatory element-binding protein 1c*)

TBST (eng. *Tris buffered saline-Tween*)

TRH - tirotropni-oslobađajući hormon (eng. *thyrotropin-releasing hormone*)

TSC1 - hamartin (eng. *tuberous sclerosis complex 1*)

TSC2 - tuberin (eng. *tuberous sclerosis complex 2*)

VMN - ventromedijalno jedro (eng. *ventromedial nucleus*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Uticaj gladovanja na metabolizam	1
1.2. Regulacija energetske homeostaze	4
1.3. Insulin.....	5
1.3.1. Regulacija sinteze i sekrecije insulina.....	5
1.3.2. Poreklo insulina u centralnom nervnom sistemu	7
1.3.3. Funkcije insulina u centralnom nervnom sistemu	9
1.3.4. Signalni putevi aktivirani dejstvom insulina	10
1.4. Glukozni metabolizam u mozgu.....	15
1.4.1. Glukozni transporteri u mozgu.....	16
1.4.2. Glikogen u mozgu.....	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta	22
3.2. Izolovanje seruma, cerebrospinalne tečnosti i tkiva.....	23
3.3. Biohemisjke analize	23
3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti	23
3.3.2. Određivanje koncentracije laktata u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti.....	24
3.3.3. Određivanje koncentracije insulina u serumu, cerebrospinalnoj tečnosti i homogenatima hipotalamusa	24
3.3.4. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu	25
3.3.5. Određivanje količine glikogena u jetri i hipotalamusu	25
3.4. Molekularno-biološke analize	26
3.4.1. Izolovanje ukupne RNK	26
3.4.2. Sinteza komplementarne DNK - reakcija reverzne transkripcije	26
3.4.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (quantitative Real-Time PCR)	27
3.4.4. Izolovanje ukupnih proteina i priprema ćelijskih frakcija	28
3.4.5. Određivanje koncentracije proteina.....	29
3.4.6. Western blot.....	29
3.5. Histološka i histochemijska bojenja.....	33

3.5.1. Priprema tkiva.....	33
3.5.2. Immunohistohemijske metode	33
3.5.3. Bojenje perijodnom kiselinom i Šifovim reagensom.....	36
3.6. Statistička analiza podataka	36
4. REZULTATI	38
4.1. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na telesnu masu.....	38
4.2. Kratkotrajno gladovanje smanjuje koncentraciju glukoze i insulina u serumu, ali ne i u cerebrosposinalnoj tečnosti.....	39
4.3. Kratkotrajno gladovanje povećava količinu insulina u hipotalamusu.....	41
4.4. Regionalna distribucija insulina u hipotalamusu.....	42
4.5. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju, aktivaciju i distribuciju insulinskog receptora u hipotalamusu	45
4.6. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju glukoznih transportera u hipotalamusu	47
4.7. Distribucija glukoznih transportera u hipotalamusu	49
4.8. Kratkotrajno gladovanje dovodi do smanjenja količine glikogena u jetri, ali ni i u hipotalamusu	52
4.9. Kratkotrajno gladovanje ne utiče na distribuciju glikogena u hipotalamusu	53
4.10. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na insulinske signalne puteve u hipotalamusu.....	54
4.10.1. Kratkotrajno gladovanje nije uticalo na aktivaciju PI3K/AKT signalnog puta u hipotalamusu	54
4.10.2. Kratkotrajno gladovanje dovodi do aktivacije MAPK signalnog puta u hipotalamusu 57	
5. DISKUSIJA.....	58
6. ZAKLJUČCI	76
LITERATURA	77
BIOGRAFIJA.....	93

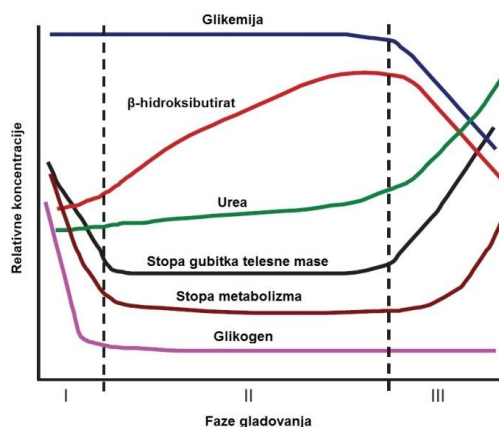
1. UVOD

1.1. Uticaj gladovanja na metabolizam

Hranom se u organizam unose tri glavne kategorije makronutrijenta, ugljenihidrati, masti i proteini, čijom razgradnjom se dobija energija neophodna za odvijanje brojnih ćelijskih procesa. Međutim, sve životinje se tokom života susreću sa promenjivom dostupnošću hrane (Castellini and Rea, 1992; Secor and Carey, 2016). Najopštije govoreći, stanje tokom kojeg ne dolazi do unosa hrane, naziva se gladovanje. U anglosaksonskoj literaturi razlikuju se dva pojma *fasting* i *starvation*. Razlika između ovih pojmova se može napraviti na osnovu nekoliko kriterijuma, a najbolje se može razumeti u ekološkom kontekstu, gde ishrana zavisi od spoljašnjih faktora. Pod pojmom *fasting* podrazumeva se post-apsorbirano stanje u kome životinja ima dostupnu hranu, ali svojevolejno odlučuje da vreme i energiju iskoristi za druge procese, kao što su reprodukcija, migracije, izbegavanje predatora ili termoregulacija (McCue, 2010). Tokom ovog procesa organizam uspeva da održi energetske homeostazu. Međutim ukoliko se period bez unošenja hrane produži, jedinka prelazi u stanje koje nazivamo *starvation* (Secor and Carey, 2016). Pojam *starvation* podrazumeva stanje u kome životinja, iako voljna da jede, zbog spoljašnjih ograničenja, nije u mogućnosti da to i učini (McCue, 2010). Posmatrano kroz metaboličke promene koje se odvijaju u organizmu, teško je napraviti jasnu granicu između ova dva stanja. Smatra se da do tranzicije dolazi kada se sa razgradnje masti prelazi na katabolizam proteina, odnosno kada dođe do značajnog povećanja lokomotorne aktivnosti u cilju potrage za hranom (eng. *food seeking behaviour*), ali i do značajnog gubitka telesne mase (Secor and Carey, 2016; Wang et al., 2006). U literaturi se često ovi termini koriste kao sinonimi. McCue (2007) pravi razliku na osnovu toga da li je razlog gladovanja endogenog (*fasting*) ili egzogenog karaktera (*starvation*). Međutim, u srpskom jeziku ne postoji terminološka razlika između ovih pojmova, te će u daljem tekstu biti korišćen samo termin gladovanje.

Tokom gladovanja organizam svoje potrebe za energijom zadovoljava razgradnjom različitih endogenih depoa. Na osnovu supstrata koji se koristi kao izvor energije (McCue, 2010; Secor and Carey, 2016), ali i na osnovu stope smanjenja telesne mase (Y. Cherel and

Le Maho, 1991), metabolički odgovor na gladovanje može biti podeljen u tri uzastopne faze (slika 1). Prva faza je relativno kratka, i tokom nje razgradnjom glikogena nastaje glukoza koja služi kao supstrat za dobijanje energije (Reikeras et al., 1988; Secor and Carey, 2016). Tokom ove faze dolazi do brzog gubitka telesne mase (Yves Cherel and Le Maho, 1991; Vujovic, 2011). Nakon iscrpljivanja rezervi glikogena organizam prelazi u drugu fazu u kojoj se energija dominantno dobija razgradnjom masti. U masnom tkivu dolazi do razgradnje triglicerida na masne kiseline i glicerol. Povećava se koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) u krvi, koje potom podležu β -oksidaciji i služe kao alternativni izvor energije u skeletnim mišićima, jetri, bubrezima i srcu (Finn and Dice, 2006). S obzirom da je glukoza glavni energetski supstart za neurone, organizam nastoji da što duže održi koncentraciju glukoze u plazmi u fiziološki prihvatljivom opsegu. To se u prvoj fazi postiže prvenstveno glikogenolizom, a kasnije i glukoneogenezom. Prekursor za sintezu glukoze tokom gladovanja mogu biti neke aminokiseline nastale proteolizom, lakatat i piruvat nastali radom mišića, ali najznačajni je glicerol koji nastaje razgradnjom triglicerida (Kerndt et al., 1982; Wang et al., 2006). Oksidacijom slobodnih masnih kiselina u jetri dolazi do produkcije ketonskih tela, koje skeletni mišići, ali i mozak, mogu iskoristiti kao alternativni izvor energije tokom dugotrajnog gladovanja (Finn and Dice, 2006; McCue, 2010). Koncentracija ketonskih tela, β -hidroksibutirata i acetoacetata u krvi, može da poraste i do 70 puta tokom produženog gladovanja (Kerndt et al., 1982). Tokom ove faze brzina gubitka telesne mase je relativno konstantna jer se zbog visokog energetskog sadžaja lipida telesna masa sporije smanjuje (Secor and Carey, 2016). Ukoliko se gladovanje nastavi, dolazi do kritičnog smanjenja lipidnih rezervi, a organizam ulazi u krajnju fazu metaboličkog odgovora na gladovanje u kojoj osnovni izvor energije postaju strukturni proteini skeletnih mišića (Wang et al., 2006). Proteolitička faza karakteriše se povećanom koncentracijom uree u krvi, brzim smanjenjem telesne mase, ali i povećanom lokomotornom aktivnošću u cilju pronalaženja novih izvora hrane (Koubi et al., 1991). Ukoliko se period bez unosa hrane nastavi, dolazi do disfunkcije organa i na kraju do smrti.



Slika 1. Metaboličke promene tokom različitih faza gladovanja. Predstavljena je promena koncentracije glukoze, β -hidroksibutirata i uree u plazmi, promena koncentracije glikogena u jetri, brzina promene telesne mase i stope metabolizma tokom različitih faza gladovanja. Rezultati su predstavljeni samo ilustrativno, ne kvantitativno. Slika je preuzeta i modifikovana iz Secor and Carey, 2016

Svaka faza metaboličkog odgovora na gladovanje praćena je određenim hormonskim promenama. Tokom inicijalne faze smanjuje se koncentracija insulina u krvi, dok koncentracija glukagona raste. Glukagon potom stimuliše razgradnju glikogena. Smanjena koncentracija leptina u krvi, zajedno sa hipoinsulinemijom, je veoma značajna za održavanje glikemije tokom kratkotrajnog gladovanja, ali i za stimulaciju lipolize u masnom tkivu pacova, odnosno za prelazak iz glikogenolitičke u lipolitičku fazu (Perry et al., 2018). Smanjenje koncentracije leptina aktivira hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem, dolazi do povećanja nivoa kortikosterona, koji u uslovima hipoinsulinemije stimuliše razgradnju masti (Perry et al., 2018). Intenzivnije povećanje koncentracije kortikosterona uočava se na prelazu između druge u treću fazu metaboličkog odgovora na gladovanje (Campbell, 2013; Finn and Dice, 2006; Vujovic, 2011) i utiče na katabolizam proteina (Challet et al., 1995). Tokom gladovanja dolazi i do smanjenja koncentracije tiroksina i trijodtironona, a samim tim smanjuje se i stopa bazalnog metabolizma, što ima značajnu ulogu u očuvanju proteina (Secor and Carey, 2016).

Tokom gladovanja pored metaboličkih, dolazi i do promena u ponašanju. Strategije koje životinje koriste tokom gladovanja u cilju pronalaska hrane se razlikuju od vrste do vrste, pa tako životinje za koje je karakteristično da sede i čekaju plen smanjuju svoju aktivnost kada hrana nije dostupna, dok aktivni lovci povećaju svoju aktivnost (Wang et al.,

2006). Kod pacova, tokom inicijalne faze dolazi do smanjivanja fizičke aktivnosti, u cilju smanjivanja telesne temperature, usporavanja metabolizma i konzervacije energije. Ukoliko se gladovanje nastavi i lipidne rezerve se drastično smanje, životinje aktivno kreću u potragu za hranom. Porast lokomotorne aktivnosti kod pacova se uočava na početku treće faze i ogleda se u ubrzanom kružnom kretanju unutar kaveza (Koubi et al., 1991; Vujovic, 2011).

1.2. Regulacija energetske homeostaze

Energetska ravnoteža se održava pomoću složenih regulatornih sistema. Postoje mnogobrojni kratkoročni i dugoročni regulatorni sistemi koji regulišu unos hrane, potrošnju i skladištenje energije. Hipotalamus predstavlja glavno mesto integracije centralnih i perifernih signala vezanih za energetske status jedinke (Blouet and Schwartz, 2010). Nekoliko međusobno povezanih regiona hipotalamusa učestvuju u regulaciji apetita i energetske homeostaze: lučno jedro (ARC), paraventrikularno jedro (PVN), lateralna oblast hipotalamusa (LHA), ventomedijalno (VMN) i dorzomedijalno jedro (DMN) (Yu and Kim, 2012).

U lučnom jedru razlikuju se dve grupacije neurona, jedna koja eksprimira oreksigeni neuropeptid Y (NPY) i aguti proteinu sličan peptid (AgRP), i druga koja eksprimira anoreksigene proopiomelanokortin (POMC) i kokainom i amfetaminom regulisani trenaskript (CART). Oreksigeni neuropeptidi stimulišu unos hrane i povećanje telesne mase, dok anoreksigeni suprimiraju apetit i povećavaju potrošnju energije. S obzirom da se ARC nalazi na dnu treće moždane komore u blizini eminecije medijane, dela mozga u kome su kapilari propustljivi za supstance iz sistemske cirkulacije, ovi neuroni prvi detektuju promene u koncentraciji hormona i metabolita na periferiji (Yu and Kim, 2012). Aksoni NPY/AgRP i POMC/CART neurona se projektuju do neurona PVN, ali i do lateralne oblasti hipotalamusa. PVN neuroni sintetišu anoreksigene supstance, tirotropni-oslobađajući hormon (TRH) i kortikotropni-oslobađajući hormon (CRH) (Valassi et al., 2008), a lezije ovog jedra dovode do prekomernog unosa hrane i gojaznosti (Leibowitz et al., 1981). VMN predstavlja centar za sitost, čijom stimulacijom se smanjuje apetit, a lezije u ovom regionu dovode do hiperfagije, gojaznosti i hiperglikemije (Shimizu et al., 1987).

Takođe, lezije u DMN dovode do hiperfagije i gojaznosti. Nasuprot tome, LHA predstavlja centar za glad i njegova stimulacija dovodi do povećanja unosa hrane, dok njegova lezija uzrokuje hipofagiju i gubitak telesne mase (Yu and Kim, 2012). U LHA se nalaze dve populacije neurona koji sintetišu oreksigene molekule melanin-koncentrišući hormon (MCH) i oreksin (Valassi et al., 2008).

Hipotalamus detektuje promene koncentracije insulina, leptina i hormona gastrointestinalnog trakta, ali i promene koncentracije nutrijenata (glukoza, amino-kiseline i SMK) u krvi (Blouet and Schwartz, 2010). Pored toga, integriše i informacije iz drugih centara, pre svega moždanog stabla i dela limbičkog sistema koji ima ulogu u motivaciji i nagrađivanju (Yu and Kim, 2012), kako bi koordinisao neuroendokrini, ponašajni i metabolički aspekt regulacije energetske homeostaze.

1.3. Insulin

Insulin je polipeptidni hormon koji sintetišu β -ćelije pankreasa. Osnovna funkcija insulina je regulacija perifernog glukoznog metabolizma, a ćelije jetre, mišića i masnog tkiva koje eksprimiraju veliki broj receptora za insulin predstavljaju glavna ciljna tkiva ovog hormona. Generalno, insulin je anabolički hormon, koji stimuliše preuzimanje glukoze, sintezu glikogena, proteina i masti, odnosno, povećava ukupne energetske rezerve u organizmu. Pored toga, insulin u hipotalamusu vrši važnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze.

1.3.1. Regulacija sinteze i sekrecije insulina

Glavno mesto sinteze insulina jesu β -ćelije Langerhansovih ostrvaca u pankreasu. Ovaj polipeptidni hormon sastavljen je od 51 amino-kiseline, i ima molekulsku težinu od 5,8 kDa (Sanger and Tuppy, 1951). Kao i većina peptidnih hormona, i insulin se sintetiše u formi neaktivnog preprohormona, koji se naziva preproinsulin i izgrađen je od 110 amino-kiselina (Dodson and Steiner, 1998). U lumenu endoplazmatičnog retikuluma iseca se signalna sekvenca sa molekula preproinsulin i nastaje proinsulin (Orci et al., 1985). Pored toga, formiraju se tri disulfidne veze, pa molekul proinsulina zadobija karakterističnu konformaciju, nakon čega se transportuje u Goldžijev aparat i pakuje u vezikule. Unutar

sekretornih vezikula, delovanjem enzima prohormon konvertaze 2 i 3 iseca se središnji deo molekula, tzv. C-peptid i formira se insulin (Hutton, 1994). Insulin se skladišti u formi heksamera koji je stabilizovan jonima cinka (Zn^{2+}) (Dodson and Steiner, 1998), zajedno sa C-peptidom u vezikulama koje se nakon stimulacije sekretuju egzocitozom (Chan et al., 1976; Fu et al., 2013; Permutt and Kipnis, 1972; Steiner et al., 1967; Tokarz et al., 2018).

Glavni stimulus za sintezu i sekreciju insulina je povišena koncentracija glukoze u krvi (Permutt and Kipnis, 1972). Kroz glukozni transporter tip 2 (GLUT2), glukoza iz krvi difunduje u citosol β -ćelija, gde biva fosforilisana do glukozo-6-fosfata (G-6-P) delovanjem glukokinaze. G-6-P ulazi u proces glikolize i Krebsov ciklus, nakon čega dolazi do povećanja koncentracije adenzin-3-fosfata (ATP), a potom i zatvaranja ATP-osetljivih kanala za kalijum (K_{ATP}) i depolarizacije membrane. Nakon depolarizacije membrane otvaraju se voltažno-zavisni kanali za kalcijum. To rezultuje influksom Ca^{2+} , porastom njegove unutarćelijske koncentracije i na kraju egzocitozom kojom se insulin iz sekretornih granula oslobađa u krv (Ghasemi et al., 2013; Komatsu et al., 2013). Glukokinaza i GLUT2 u β -ćelijama imaju veoma važnu ulogu u regulaciji glikemije, jer predstavljaju glavni senzor koji detektuje promene koncentracije glukoze u krvi (German, 1993; Tiedge and Lenzen, 1991; Tokarz et al., 2018).

Pored povećanja koncentracije glukoze u krvi i drugi faktori utiču na sekreciju insulina (Malaisse and Malaisse-Lagae, 1968). Povećana koncentracija amino-kiselina u krvi nakon obroka takođe stimuliše oslobađanje ovog hormona (Wilcox, 2005a). Akutno povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina intenzivira sekreciju insulina (Gravena et al., 2002), međutim dugotrajno izlaganje visokoj koncentraciji SMK ima suprotan efekat (Zhou and Grill, 1994). Gastrointestinalni hormoni, glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) i glukozno-zavistan insulinotropni polipeptid (GIP) značajno povećavaju sekreciju insulina tokom obroka te se nazivaju inkretini (Fu et al., 2013). Važan aspekt regulacije sekrecije insulina čine i inhibitorni signali. Tokom stresa ili vežbanja, povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema inhibira sekreciju insulina aktivacijom α -adrenalinskih receptora. Takođe, δ -ćelije pankreasa sekretuju hormon somatostatin koji deluje parakrino i suprimira sekreciju insulina (Komatsu et al., 2013).

1.3.2. Poreklo insulina u centralnom nervnom sistemu

Dugo je smatrano da je centralni nervni sistem neosetljiv na dejstva insulina. Danas je poznato da insulin obavlja brojne funkcije u CNS, ali pitanje njegovog porekla i danas je tema oko koje se često diskutuje.

Prvobitno je smatrano da insulin, kao hormon koji se sinteše na periferiji, nije u mogućnosti da prođe kroz krvno-moždanu barijeru (KMB). Međutim, Margolis i Altszuler su pokazali 1967. godine da koncentracija insulina u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) raste nakon intravenoznog apliciranja insulina (Margolis and Altszuler, 1967). Na taj način demonstrirano je da insulin prolazi KMB, a kasnije je ustanovljeno da je reč o receptorom-posredovanoj transcitozi (King and Johnson, 1985). Preuzimanje insulina se odvija posredstvom insulinskog receptora koji se nalazi na membranama endotelnih ćelija kapilara koje čine KMB i na ependimskim ćelijama. Nakon vezivanja insulina za receptor dolazi do internalizacije kompleksa u endotelne ćelije, ali i brzog otpuštanja u parenhim sa minimalnom degradacijom insulina (King and Johnson, 1985; Plata-Salamán, 1991). Povećanje koncentracije insulina u cerebrospinalnoj tečnosti nije uvek proporcionalno povećanju koncentracije insulina u krvi. Pri suprafiziološkim koncentracijama insulina u krvi dolazi do saturacije transporta preko KMB (Banks et al., 1997; Baura et al., 1993). Propustljivost KMB za insulin se razlikuje u različitim moždanim regionim. Moždani most i hipotalamus smatraju se visoko propustljivim, dok se talamus i srednji mozak smatraju nepropustljivim za insulin (Banks and Kastin, 1998). Na stopu transporta insulina kroz KMB utiču brojni faktori. Tako npr. gladovanje (Strubbe et al., 1988), unos hrane bogate mastima (Gray et al., 2017), gojaznost i tretman dekametazonom smanjuju transport (Plum et al., 2005), takođe Alchajmerova bolest i starenje su povezani sa smanjenim transportom insulina kroz KMB (Ghasemi et al., 2013).

Insulin nije detektovan samo u cerebrospinalnoj tečnosti, već i u moždanom tkivu. Prvu studiju u kojoj je u mozgu pacova detektovana veća koncentracija insulina od one u krvi, sprovela je Havrankova sa saradnicima 1978 godine (Havrankova et al., 1978). Kasnije je imunohistohemijskim metodama pokazano prisustvo insulina i C-peptida u mozgu pacova, miša, kornjače, žabe, pa i čoveka (Dorn et al., 1983; Dorn et al., 1981).

Nakon otkrića prisustva insulina u različitim moždanim regionima nametnulo se pitanje da li je insulin detektovan u CNS poreklom iz krvi ili je sintetisan u moždanom tkivu?

Neki autori smatraju da je insulin prisutan u CNS isključivo perifernog porekla. Baskin i saradnici su u više navrata pokazali da insulin prolazi kroz KBM (Baskin et al., 1983b, 1983a). U jednoj od svojih studija vršili su injeciranje radioaktivno obeleženog insulina u lateralne moždane komore i zabeležili njegovo preuzimanje u hipotalamus (Baskin et al., 1983b). Prvobitno je zabeleženo njegovo prisustvo u endimskim ćelijama koje okružuju treću moždanu komoru, a nakon 30 minuta insulin je uočen i u periventrikularnom jedru, eminanciji medijani i dorzomedijalnom hipotalamusu (Baskin et al., 1983b). Međutim, pitanje je da li se ovi procesi odvijaju i pri fiziološkim koncentracijama insulina.

Sa druge strane postoje brojne studije koje idu u prilog hipotezi da se insulin može sintetisati u mozgu. Ideja o ekspresiji insulina u CNS prvobitno se pojavila sedamdesetih godina prošlog veka, kada je insulin detektovan u moždanom tkivu (Havrankova et al., 1978) i kada je na gojaznim i dijabetičnim pacovima pokazano da koncentracija insulina i insulinskog receptora u moždanom tkivu ne zavisi od koncentracije insulina na periferiji (Havrankova et al., 1979). U prilog ovoj hipotezi idu istraživanja koja su pokazala prisustvo proinsulina u kulturi moždanih ćelija miša (Birch et al., 1984). Jedna od čestih kritika radova koji govore u prilog sintezi insulina u mozgu vezana je za metodologiju jer je insulina uglavnom detektovan na nivou proteina. Takođe, detektovano prisustvo insulin u endotelnim ćelijama krvnih sudova i endimskim ćelijama koje okružuju moždane komore (Pansky and Hatfield, 1978), uzimano je kao kontrargument jer sugeriše na transport iz krvi ili cerebrospinalne tečnosti. Međutim, Dorn i saradnici su insulin detektovali uglavnom u nervnim ćelijama, i to u ćelijskom telu i dendritima (Dorn et al., 1983), što je kasnije potvrđeno i u drugim studijama (Frölich et al., 1998). Pored toga, ideju o centralnoj produkciji insulina podržavaju istraživanja u kojima je pokazano prisustvo C-peptida u CNS (Dorn et al., 1983; Dorn et al., 1982; Frölich et al., 1998; Jezová et al., 1985). C-peptid, kao sastavni deo proinsulina, skladišti se i sekretuje zajedno sa insulinom, i stoga predstavlja marker njegove biosinteze (Dorn et al., 1983; Tokarz et al., 2018). Pored toga, do sada ne postoje istraživanja koja potvrđuju da se C-peptid transportuje kroz KMB

(Frölich et al., 1998; Ghasemi et al., 2013). C-peptid je detektovan u citoplazmi nervnih ćelija, a njegova distribucija poklapa se sa distribucijom insulina (Dorn et al., 1983; Frölich et al., 1998). Važan dokaz koji ide u prilog hipotezi o *de novo* produkciji insulina u mozgu je prisustvo iRNK za preproinsulin 1 i 2 u mozgu embriona miša i pacova (Schechter et al., 1996), ali i prisustvo iRNK za insulin 2 u neonatalnom i adultnom moždanom tkivu pacova (Devaskar et al., 1993; Young, 1986). Dodatno, u *in vitro* studijama je pokazano da moždane ćelije imaju sposobnost sinteze i sekrecije insulina (Birch et al., 1984; Clarke et al., 1986). Naime, prisustvo proinsulina pokazano je u kulturi moždanih ćelija miša (Birch et al., 1984), dok je u kulturi neurona pokazano da nakon hemijske depolarizacije dolazi do sekrecije insulina (Clarke et al., 1986).

1.3.3. Funkcije insulina u centralnom nervnom sistemu

Otkriće insulinskog receptora u centralnom nervnom sistemu pokrenulo je mnogobrojna istraživanja u cilju razjašnjavanja njegove uloge. Do sada su otkrivena brojna centralna dejstva insulina, i u njih spadaju regulacija apetita, reprodukcije, učenja i formiranje memorije. Pored toga, insulin u CNS ispoljava neuromodulatorne, neurotrofičke i neuroprotektivne efekte (Blázquez et al., 2014; Ghasemi et al., 2013; Kleinridders, 2016).

Prvobitne studije o ulozi insulina u CNS su pokazale da injeciranje ovog hormona u treću moždanu komoru dovodi do smanjenja telesne mase i smanjenja unosa hrane (Brief and Davis, 1984; Chavez et al., 1996). Sa druge strane, inhibicija insulinske signalizacije u mozgu prouzrokuje oreksigeni efekat, odnosno povećava se unos hrane i telesna masa (Obici et al., 2002a). Uloga centralnog insulina u regulaciji energetske homeostaze podržana je i saznanjem da selektivna delecija insulinskog receptora u neuronima miša dovodi do hiperfagije, gojaznosti i insulinske rezistencije (Bruning et al., 2000). U hipotalamusu insulin inhibira NPY/AgRP neurone (Dube et al., 1995; Neary et al., 2004), dok POMC/CART neurone aktivira (Palou et al., 2009) i na taj način ostvaruje svoje anoreksigene efekte. Intracerebroventrikularna administracija insulina dovodi do smanjenja ekspresije iRNK za NPY, kao i količine samog proteina (Schwartz et al., 1992), povećanja ekspresije iRNK za POMC u ARC, ali i iRNK za CRH u PVN. Insulinom indukovano smanjenje unosa hrane može da se spreči primenom antagonista melanokortina, te se

smatra da on svoje anoreksigeno dejstvo ostvaruje upravo preko melonokortinskog sistema (Benoit et al., 2002).

Insulin vezivanjem za svoje receptore u centralnom nervnom sistemu može da reguliše periferni metabolizam, odnosno, igra važnu ulogu u regulaciji glukoznog metabolizma (Plum et al., 2005). Intracerebroventrikularna administracija insulina suprimira glukoneogenezu u jetri, nezavisno od koncentracije insulina i glukoze u krvi (Obici et al., 2002b). Centralnim delovanjem insulin moduliše simpatičku inervaciju masnog tkiva, inhibira lipolizu i promoviše lipogenezu (Scherer et al., 2011; Vogt and Brüning, 2013). Na ovaj način se smanjuje i dostupnost supstrata za glukoneogenezu u jetri, što dodatno suprimira hepatičnu produkciju glukoze (Scherer et al., 2011; Vogt and Brüning, 2013).

Insulin regulacijom energetske ravnoteže indirektno utiče i na reprodukciju koja se smatra energetski izuzetno zahtevnim procesom (Ghasemi et al., 2013). Eliminacija gena za insulinski receptor u neuronima ženki miševa rezultuje u smanjenoj fertlnosti, pojavi gojaznosti, ali i poremećenoj sekreciji luteinizirajućeg hormona (Bunner et al., 2014; Plum et al., 2005)

Brojna istraživanja ukazuju na potencijalnu ulogu insulina u regulaciji kognitivnih funkcija. Pacijenti sa dijabetesom tipa 1 i 2 imaju povećan rizik od nastanka poremećaja u ponašanju, i kod njih se sa starenjem uočava značajan pad kognitivnih sposobnosti u odnosu na ispitanike istog uzrasta kod kojih ne postoji problem sa sekrecijom i/ili dejstvom insulina. Takođe, kod ovih pacijenata uočena je veća stopa nastanka i brža progresija Alchajmerove bolesti (Ghasemi et al., 2013; Kleinridders et al., 2014).

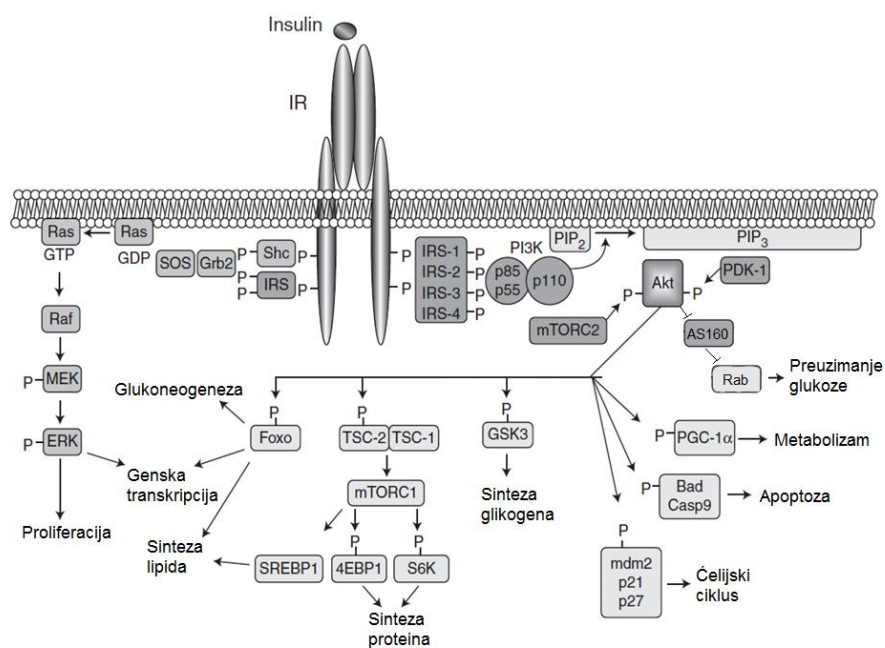
1.3.4. Signalni putevi aktivirani dejstvom insulina

Insulin svoje efekte ostvaruje aktivacijom insulinskog receptora koji poseduje tirozin-kinaznu aktivnost. Insulinski receptor je heterotetramer, koji se sastoji od dve vanćelijske α - i dve transmembranske β -subjedinice međusobno povezane disulfidnim vezama (Jacobs and Cuatrecasas, 1981; Taniguchi et al., 2006). Vezivanjem insulina za α -subjedinicu receptora dolazi do konformacione promene koja omogućava autofosforilaciju tirozinskih ostataka u β -subjedinici i aktivacije receptora (Czech, 1985). Osim tirozinskih

ostataka na β -subjedinici postoji i veći broj treoninskih i serinskih ostataka čija fosforilacija igra važnu ulogu u regulaciji enzimske aktivnosti receptora. Aktivirani insulinski receptor potom fosforiliše proteine koji sadrže SH2 (eng. *Src homology-2*) i fosfotirozin-vezujući domen (PTB), kao što je supstrat insulinskog receptora (IRS) (Sun et al., 1993). Do sada je okarakterisano šest IRS proteina, IRS1-6 (Taniguchi et al., 2006). IRS1 je najviše eksprimiran u skeletnim mišićima, IRS2 u jetri, dok je IRS3 najzastupljeniji u adipoznom tkivu, β -ćelijama pankreasa i jetri. IRS4 je detektovan u timusu, mozgu i bubrezima (Wilcox, 2005a), dok su IRS5 i IRS6 slabo istraženi i izgleda imaju ograničeno dejstvo samo u pojedinim tkivima (Taniguchi et al., 2006). IRS1 i IRS2 su najzastupljenije forme i njihova tkivna distribucija se delimično preklapa, ali su uključeni u različite procese. IRS1 učestvuje u regulaciji glukozne homeostaze, dok je IRS2 uključen u regulaciju lipidnog metabolizma (Siddle, 2011). Fosforilacijom tirozinskih ostataka na IRS proteinima dolazi do njihove aktivacije, nakon čega sledi aktivacija jednog od dva glavna signalna puta regulisana insulinom: PI3K-AKT/PKB (fosfatidilinozitol-3-kinaza - PI3K; protein kinaza B - PKB) ili MAPK (mitogenom aktivirane protein kinaze - MAPK) (slika 2). Pored aktivirajućih fosforilacija, IRS proteini mogu biti fosforilisani i na serinskim i treoninskim ostacima koje negativno regulišu insulinski signalni put (Taniguchi et al., 2006). Drugi proteini koji sadrže PTB domen, kao što su Gab-1 (eng. *Grb2-associated binder-1*), različite izoforme Shc proteina (eng. *Src-homology-2-containing protein*) i p62^{dok}, takodje učestvuju u insulinskoj signalnoj transdukciji (Virkamäki et al., 1999).

Za aktivirani IRS se potom vezuju proteini koji sadrže SH2 domen, kao što su PI3K, Grb2 (eng. *growth factor receptor-bound protein-2*) i drugi. PI3K se sastoji od regulatorne subjedinice p85 i katalitičke subjedinice p110 (Wilcox, 2005a). Vezivanjem regulatorne subjedinice povećava se stabilnost katalitičke i vrši njena inaktivacija. Regulatorna subjedinica se vezuje za aktivirani IRS, nakon čega dolazi do aktivacije katalitičke subjedinice (Boucher et al., 2014). Aktivirana katalitička subjedinica p110 vrši fosforilaciju fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP₂), pri čemu nastaje fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP₃). Novoformirani PIP₃ služi kao mesto interakcije sa drugim proteinima koji sadrže domene plektrinske homologije (PH) kao što je AKT/PKB. Ova interakcija predstavlja preduslov za aktivaciju AKT/PKB, koja podrazumeva koordinisanu

fosforilaciju Thr-308 i Ser-473 amino-kiselinskih ostataka (Alessi et al., 1996). Vezivanje PH domena AKT/PKB za PIP₃ prouzrokuje konformacionu promenu ove kinaze što omogućava fosforilaciju Thr-308 od strane kinaze tipa-1 zavisne od PIP₃ (PDK1). Proteinska kinaza koja fosforiliše AKT/PKB na poziciji Ser-473 je specifična forma mTOR Ser/Thr kinaze (eng. *mammalian target of rapamycin* - mTOR) koja se nalazi u okviru mTORC kompleksa (Cohen, 2006; Taniguchi et al., 2006). Nakon aktivacije AKT/PKB se odvaja od ćelijske membrane i fosforiliše brojne substrate u citoplazmi i nukleusu (Taniguchi et al., 2006).



Slika 2. Signalni putevi aktivirani dejstvom insulina. Detalji sa slike su opisani u tekstu. Slika je preuzeta i modifikovana iz Boucher et al., 2014

Aktivacija AKT/PKB posredstvom PI3K dovodi do fosforilacije i inhibicije Rab-GTPaze-aktivirajućeg proteina AS160 (eng. *AKT substrate of 160 kDa*) što predstavlja neophodan korak u procesu translokacije GLUT4 iz membrane unutarćelijskih vezikula u ćelijsku membranu mišićnih ćelija i adipocita (Wilcox, 2005a). Inhibicija AS160 predstavlja okidač za aktivaciju malih GTP-vezujućih Rab proteina uključenih u citoskeletnu reorganizaciju koja je neophodna za translokaciju vezikula sa GLUT4 (Taniguchi et al., 2006).

Insulin takođe reguliše sintezu glikogena posredstvom PI3K-AKT/PKB signalnog puta. Aktivna AKT/PKB fosforiliše α -subjednicu kinaze glikogen sintaze 3 (GSK3) na Ser-21 i β -subjednicu na Ser-9 i tako smanjuje njenu aktivnost. Glavni supstrat za GSK3 je glikogen sintaza (GS), ključni enzim za glikogenezu. GSK3 negativno reguliše aktivnost GS tako što fosforiliše GS i na taj način inhibira sintezu glikogena. Dakle, u prisustvu insulina inaktivirana GSK3 nije u mogućnosti da fosforiliše GS i na taj način je aktivira. Aktivirana GS, zajedno sa povećanim transportom glukoze stimuliše njeno skladištenje u obliku glikogena (Cohen, 2006; Taniguchi et al., 2006).

Putem PI3K-PKB/AKT signalne kaskade vrši se regulacija transkripcije gena uključenih u glukoneogenezu i lipogenezu (Könner et al., 2009). Pod uticajem insulina dolazi do fosforilacije transkripcionog faktora FOXO1 (eng. *forkhead box-containing protein, O subfamily*) na poziciji Ser-256 i njegove inaktivacije, a samim tim i smanjenja ekspresije enzima uključenih u glukoneogenezu, kao što su fosfoenolpiruvatna karboksilaza, fruktozo-1,6-bifosfataza i glukozo-6-fosfataza (Meyts, 2016; Taniguchi et al., 2006). Takođe, insulin aktivira transkripcioni faktor SREBP1c (eng. *sterol regulatory element-binding protein 1c*), koji stimuliše ekspresiju nekoliko gena uključenih u lipogenezu (Saltiel and Kahn, 2001).

Insulin stimuliše sintezu proteina aktivacijom faktora koji čine translacionu mašineriju. Tu spadaju proteini iz grupe eIF (eng. *eukaryotic initiation factors*) i eEF (eng. *eukaryotic elongation factors*). Poznato je da GSK3 fosforiliše i na taj način inhibira protein eIF2B, koji ima važnu ulogu u inicijaciji translacije. Kao što je već prethodno pomenuto, insulin inaktivira GSK3, sledstveno aktivira eIF2B i stimuliše sintezu proteina (Proud, 2006). Drugi način kojim insulin stimuliše sintezu proteina jeste posredstvom inhibicije kompleksa, sačinjenog od hamartin (eng. *tuberous sclerosis complex 1 – TSC1*) i tuberin (TSC2) proteina, koji negativno reguliše aktivnost mTOR kinaze (Cohen, 2006; Proud, 2006). Insulinom aktivirani mTOR potom fosforiliše i aktivira p70 ribozomalnu protein S6 kinazu. Pored toga, mTOR fosforiliše i na taj način inaktivira eIF4E-vezujući protein (eng. *eIF4E-binding proteins - 4E-BP1*) što dovodi do aktivacije eIF4E faktora koji inicira translaciju proteina (Proud, 2006; Taniguchi et al., 2006).

Osim PI3K-PKB/AKT signalne kaskade, insulin može da aktivira i MAPK signalni put. Adapterski protein Grb2 je još jedan signalni molekul koji sadrži SH domen i može da interaguje sa fosforilisanim IRS. Pored toga, Grb2 može da se veže i direktno za fosforilisane tirozinske ostatke insulinskog receptora, međutim nakon stimulacije insulinom uglavnom se vezuje za IRS i/ili Shc (Virkamäki et al., 1999). Aktivirani Grb2 interaguje sa SOS (eng. *son of sevenless*) proteinom što dovodi do njegove translokacije na ćelijsku membranu, koji potom katalizuje odvajanje GDP i vezivanje GTP za RAS (eng. *rat sarcoma*). Aktivirani RAS regrutuje i aktivira kinazu RAF-1 (eng. *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*), koja potom fosforiliše i aktivira kinazu MAP kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase kinase*), koja zatim fosforiliše i aktivira MAP kinazu (MAPK). MAPK se još naziva i ekstraćelijskim signalima regulisana kinaza (ERK), a za njenu punu aktivaciju potrebna je fosforilacija serinskih i tirozinskih ostataka. Iako postoje dve izoforme, ERK1 i 2, one imaju 84% identičnu sekvencu i većina stimulusa paralelno aktiviraju oba molekula (Roskoski, 2012). Aktivirani ERK potom fosforiliše brojne proteine u citoplazmi, ali ulazi i u nukleus gde fosforiliše brojne transkripcione faktore i na taj način stimuliše ili suprimira transkripciju gena uključenih u ćelijsku deobu, migraciju, inhibiciju apoptoze i ćelijsku diferencijaciju (Meyts, 2016).

Istovremeno sa prenosom signala sa receptora na druge molekule signalnog puta, dolazi do internalizacije kompleksa insulin-insulinski receptor. Ligand se odvaja od receptora u endozomima. Receptor biva defosforilisan dejstvom fosfataze PTP1B (eng. *protein-tyrosine phosphatase 1B*), a insulin razgrađen pomoću insulin degradujućeg enzima. Inaktivirani receptor na kraju ponovo biva integrisan u ćelijsku membranu (Backer et al., 1990; Di Guglielmo et al., 1998; Siddle, 2011).

Budući da je dugo smatrano da insulin ne deluje na mozak, insulinska signalizacija u ovom organu je slabije ispitana. Poznato je da insulinski receptor u mozgu ima istu kinetiku i farmakološka svojstva kao i na periferiji, ali postoji razlika u molekularnoj masi zbog stepena glikozilacije α -subjedinice receptora (Ghasemi et al., 2013). Receptori za insulin eksprimiraju se u brojnim moždanim regionima. a najveći stepen ekspresije zabeležen je u olfaktornom bulbusu, cerebelumu, korteksu velikog mozga, hipokampusu, hipotalamusu i horoidnom pleksusu (Ghasemi et al., 2013; Könnner et al., 2009). U većini

slučajeva insulinski odgovor je posredovan IRS1 (Cheatham and Kahn, 1995; Sun et al., 1991) i IRS2 (Sun et al., 1995) molekulima, za koje je takođe pokazano da se eksprimiraju u mnogim moždanim regionima (Baskin et al., 1994, 1993; Folli et al., 1994). IRS1 je detektovan u korteksu, hipokampusu, malom mozgu, olfaktornim bulbusima, talamusu i hipotalamusu (Baskin et al., 1994; Folli et al., 1994). U hipotalamusu, IRS1 je detektovan u neuronima PVN, SON i ARC (Baskin et al., 1993), dok je ekspresija IRS2 zabeležena u neuronima ARC, VMN i PVN (Pardini et al., 2006).

Slično kao i u perifernim tkivima, i u mozgu se insulinska signalna kaskada odvija preko PI3K-AKT/PKB i/ili MAPK signalnih puteva. Značaj PI3K-AKT/PKB signalnog puta u regulaciji unosa hrane demonstriran je upotrebom specifičnih inhibitora PI3K koji ublažavaju anoreksigene efekte insulina (Vogt and Brüning, 2013). Uloga MAPK/ERK signalnog puta je manje poznata. Pokazano je da *in vitro* insulin inhibira *Npy* i *AgRP* gensku ekspresiju aktivacijom ovog signalnog puta (Vogt and Brüning, 2013). Ekspresija ERK je zabeležena u neuronima, a njena aktivacija je povezana sa ćelijskim preživljavanjem, neurogenezom i učenjem (Van der Heide et al., 2003). Inaktivacija gena koji kodira ERK-2 protein u mozgu miševa dovodi do ćelijske smrti, smanjuje stopu neurogeneze i na kraju ima letalan ishod, što ukazuje da je ovaj put veoma važan za razvoj mozga (Satoh et al., 2011).

Iako je pokazano da insulin u centralnom nervnom sistemu ostvaruje mnogobrojne uloge, smatra se da je glukozni metabolizam u mozgu ne zavisi od dejstva ovog hormona. Međutim, prisustvo insulin-zavisnih glukoznih transportera GLUT4 i GLUT8 u nekim moždanim regionima, kao i anatomske preklapanje lokalizacije GLUT4 sa insulinskim receptorom, ukazuju na moguću ulogu insulina u ovim procesima (Duelli and Kuschinsky, 2001).

1.4. Glukozni metabolizam u mozgu

Moždano tkivo ima visoke energetske zahteve i troši oko 20% ukupne energije u organizmu (McCall, 2004; Mergenthaler et al., 2013). S obzirom da mozak ima ograničenu mogućnost skladištenja energije, njegov metabolizam zavisi od energetskih supstrata koji se putem krvi dopremaju sa periferije. Pri fiziološkim uslovima, energija neophodna za

funkcionisanje centralnog nervnog sistema dobija se iz glukoze procesom glikolize. Međutim, u specifičnim uslovima mozak može da koristi druge substrate, kao što su ketonska tela ili laktat, kao alternativni izvor energije (Camandola and Mattson, 2017; McCall, 2004).

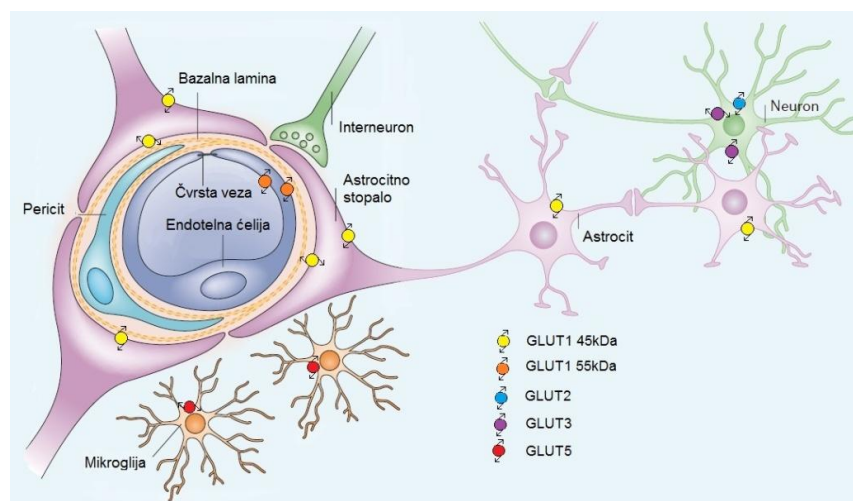
Glukoza je primarni energetska supstrat u većini ćelija. Ćelije preuzimaju glukozu posredstvom transmembranskih proteina koji se strukturno i funkcionalno mogu podeliti u dve velike grupe: glukozni transporteri koji omogućavaju olakšanu difuziju glukoze (GLUT) i natrijum zavisni glukozni kotransporter (SGLT) (Navale and Paranjape, 2016). Do sada je opisano 12 tipova GLUT transportera od kojih su najviše ispitivani GLUT1-4. Glukozni transporteri mogu biti regulisani na transkripcionom, postranskripcionom i posttranslacionom nivou (Duelli and Kuschinsky, 2001). Najpoznatiji primer je regulacija ugradnje GLUT4 u ćelijsku membranu mišićnih ćelija i adipocita pod dejstvom insulina.

1.4.1. Glukozni transporteri u mozgu

Najzastupljenije izoforme glukoznih transportera u centralnom nervnom sistemu jesu GLUT1 i GLUT3 (Benarroch, 2014; Maher et al., 1994), ali se u znatno manjoj meri, eksprimiraju i druge izoforme. U mozgu su detektovane dve izoforme GLUT1, obe su produkt istog gena, ali se, usled različitih postranslacionih modifikacija, razlikuju u molekularnoj masi (Maher et al., 1993; Sivitz et al., 1989). Pored toga, postoji razlika i u tipu ćelija koje ih eksprimiraju. Glikozilovana izoforma od 55 kDa nalazi se na endotelnim ćelijama KMB, dok se druga izoforma od 45 kDa nalazi na ćelijskoj membrani astrocita (Maher et al., 1993), ali i ependimskih ćelija koje okružuju moždane komore i horoidni pleksus (Vannucci et al., 1998). GLUT3 je specifičan isključivo za neurone, što je potvrđeno dvostukim imunohistohemijским obeležavanjem GLUT3 i markera neurona na preseccima moždanog tkiva pacova (Nagamatsu et al., 1993). Ovaj glukozni transporter ispoljava visok afinitet i visok transportni kapacitet za glukozu (Simpson et al., 2007, 2008) čime je omogućeno konstantno dopremanje glukoze u neurone, čak i u uslovima kada je njena koncentracija u vanćelijskoj tečnosti niska. GLUT3 je detektovan u mnogim moždanim regionima, uključujući neokorteks, hipokampus, striatum, mali mozak, talamus i hipotalamus (Choeiri et al., 2002; Gómez et al., 2010; Nagamatsu et al., 1993; Vannucci,

1994). GLUT2 je detektovan u mnogobrojnim moždanim regionima uključujući PVN, LH, ARC i *nucleus tractus solitarius* (Leloup et al., 1994), gde je detektovan u neuronima, astrocitima, endotelnim ćelijama i tanicitima (De los Angeles García et al., 2003; Penicaud et al., 2002). Kao i u β -ćelijama pankreasa, i u hipotalamusu GLUT2 ima ulogu senzora koji detektuje promene u koncentraciji glukoze (Koekkoek et al., 2017). Pored navedenih, u mozgu se eksprimiraju i dva tipa insulin-zavisnih glukoznih transportera GLUT4 i GLUT8 (Sankar et al., 2002). U cerebelumu, ali i u hipotalamusu, talamusu, olfaktornim bulbusima i cerebralnom korteksu najviše se eksprimira GLUT4, pre svega u telima neurona, ali i u nastavcima (Choeiri et al., 2002).

Da bi iz sistemske cirkulacije glukoza ušla u CNS, mora da prođe KMB, strukturnu i hemijsku barijeru između sistemske cirkulacije i CNS. Osim endotelnih ćelija međusobno povezanih čvrstim vezama (eng. *tight junctions*), KMB čine i pericite, bazalna lamina i nastavci astrocita tzv. astrocitna stopala (slika 3). Pericite delimično okružuju endotelne ćelije, a oko njih se nalazi bazalna lamina koja je zaokružena astrocitnim stopalima (Abbott et al., 2006). Smatra se da astrocitna stopala pokrivaju 99% površine bazalne lamine (Barros et al., 2017).



Slika 3. Struktura krvno-moždana barijere i glukozni transporteri. Krvno-moždana barijera je strukturna i hemijska barijera između sistemske cirkulacije i CNS, koju čine endotelne ćelije međusobno povezane čvrstim vezama, pericite, bazalna lamina i astrocitna stopala. Glukoza u CNS ulazi posredstvom GLUT1 55kDa, potom je astrociti preuzimaju posredstvom GLUT1 45kDa, neuroni posredstvom GLUT3 i GLUT2, a mikroglija posredstvom GLUT5. Slika je preuzeta i modifikovana iz Abbott et al, 2006.

Dakle, glukoza ulazi u CNS posredstvom GLUT1 55 kDa izoforme koja se nalazi na luminalnoj i abluminalnoj membrani endotelnih ćelija kapilara. Nakon što difunduje u endotelne ćelije glukoza, prema tradicionalnom shvatanju, iz njih izlazi u moždanu vanćelijsku tečnost (Brown and Ransom, 2007; Patching, 2017; Qutub and Hunt, 2005; Shah et al., 2012), a potom biva transportovana u moždane ćelije posredstvom različitih glukoznih transportera: u neurone posredstvom GLUT3, u astrocite i oligodendrocite posredstvom GLUT1 (45 kDa), a u ćelije mikroglije posredstvom GLUT5 (Maher et al., 1994). Prema alternativnim shvatanjima, glukoza nakon prolaska kroz endotelne ćelije najpre difunduje u astrocite. Potom glukoza koju astrociti nisu iskoristili za svoje metaboličke potrebe difunduje u vanćelijsku tečnost odakle je preuzimaju neuroni (Barros et al., 2017). Za razliku od endotelnih ćelija, u neuronima i glijskim ćelijama glukoza brzo biva fosforilisana do G-6-P. Dakle, nakon ulaska u neurone ili astrocite, heksokinaza fosforiliše glukozu do G-6-P koji dalje ulazi u put pentozna fosfata ili proces glikolize, ali može biti i konvertovan u glikogen. U astrocitima deo G-6-P učestvuje u sintezi glikogena, ali se prvenstveno koristi za glikolizu (Camandola and Mattson, 2017). Uprkos malim kapacitetima za njegovo skladištenje u mozgu, glikogen predstavlja važan izvor energije u uslovima povećane energetske potražnje, odnosno u uslovima poremećene energetske homeostaze (Bélanger et al., 2011; Choi et al., 2003; Matsui et al., 2011; Suh et al., 2007).

1.4.2. Glikogen u mozgu

Prisustvo glikogena u mozgu zabeleženo je još sedamdestih godina XX veka (Koizumi and Shiraishi, 1970). Uprkos tome njegova uloga je dugo zanemarivana jer je prisutan u znatno manjoj količini nego u jetri i mišićima (Duran and Guinovart, 2015). U malom mozgu, moždanom mostu, hipokampusu, hipotalamusu, talamusu i korteksu velikog mozga zabeleženo je prisustvo glikogena (Brown and Ransom, 2007; Oe et al., 2016). Sposobnost skladištenja glukoze u formi glikogena imaju isključivo astrociti (Bolli and Fanelli, 1999; Duran and Guinovart, 2015). Dva ključna enzima koji učestvuju u sintezi i razgradnji glikogena su glikogen sintaza (GS) i glikogen fosforilaza. GS je u fosforilisanom obliku neaktivna, a fosforilaciju vrši GSK3. Nakon inaktivacije GSK3, dolazi do defosforilacije i aktivacije GS, a potom i sinteze glikogena (Cohen et al., 1978). Iako i

neuroni ekspiriraju sve potrebne enzime za sintezu glikogena, jedino astrociti imaju mogućnost da ga skladište. Budući da je ustanovljeno da akumulacija glikogena u neuronima indukuje apoptozu (Duran and Guinovart, 2015), enzimi uključeni u sintezu glikogena se u ovim ćelijama održavaju u neaktivnom stanju (Inoue et al., 1988; Vilchez et al., 2007).

U uslovima smanjene dostupnosti glukoze, astrociti razgrađuju glikogen. S obzirom da astrociti ne ekspiriraju enzim glukozo-6-fosfatazu, ne mogu da razgrade glikogen do glukoze, već se on razgrađuje do piruvata koji se delovanjem laktat-dehidogenaze konvertuje u laktat. Laktat iz astrocita se posredstvom monokarboksilatnih transportera (MCT) oslobađa u vanćelijsku tečnost mozga, odakle ga neuroni preuzimaju i koriste kao substrat za dobijanje energije (Bélanger et al., 2011; Choi et al., 2003; Matsui et al., 2011; Suh et al., 2007). Iako se uglavnom smatra da mozak prvenstveno koristi glukozu kao supstrat za dobijanje energije, u *in vitro* uslovima je pokazano da neuroni u većoj meri koriste laktat kao izvor energije u uslovima kada su u medijumu prisutni i laktat i glukoza (McCall, 2004).

U uslovima hipoglikemije, kada se iz krvi doprema nedovoljna količina glukoze do mozga, glikogen u astrocitima biva razgrađen (Brown and Ransom, 2007; Choi et al., 2003). Kod pacova je uočeno da nakon ponovnog uspostavljanja normoglikemije, količina glikogena u astrocitima raste do nivoa koji nekoliko puta nadmašuje onaj detektovan pre narušavanja energetske homeostaze (Brown and Ransom, 2007). Do razgradnje glikogena može doći i u normalnim fiziološkim uslovima, pri normoglikemiji, tokom povećane nervne aktivnosti kada energetske zahtevi prevazilaze lokalnu dostupnost glukoze (DiNuzzo et al., 2012; Matsui et al., 2015).

Na saržaj glikogena u astrocitima mogu uticati brojni faktori, uključujući razne neurotransmitere i neurohumoralne agense, kao i koncentracija glukoze u moždanoj vanćelijskoj tečnosti (Brown and Ransom, 2007). Dobro je poznato da insulin stimuliše sintezu glikogena u jetri, a u *in vitro* studijama je pokazano da na isti način povećava rezerve glikogena u astrocitima (Heni et al., 2011). Pored toga, primenom ¹³C NMR spektroskopije *in vivo* je zabeleženo da u mozgu dolazi do akumulacije glikogena usled intravenozne administracije insulina (Choi et al., 2003).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Gladovanje narušava energetske homeostazu, a važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze ima hipotalamus. Stoga je u prethodnoj studiji (Vujovic, 2011) ispitivan uticaj različite dužine gladovanja na ekspresiju neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze. Ispitivana je ekspresija hormona i neuropeptida u hipotalamusu, hipofizi, kao i njihova koncentracije u krvi. S obzirom na poznato anoreksigeno dejstvo insulina, očekivano je da tokom gladovanja dođe do smanjenja koncentracije insulina i u krvi i u hipotalamusu. Uprkos tome, u hipotalamusu je nakon šest sati gladovanja detektovana povećana količina insulina, iako je koncentracija ovog hormona u sistemskoj cirkulaciji bila smanjena (Vujovic, 2011). Ovo neočekivano saznanje otvorilo je mnogobrojna pitanja, stoga je predmet ove doktorske disertacije bio ispitivanje uticaja šestočasovnog gladovanja na gensku ekspresiju insulina u hipotalamusu i ispitivanje adaptivnog značaja ovog fenomena.

Uzimajući u obzir već poznatu ulogu insulina u regulaciji unosa hrane i glukoznog metabolizma, i na osnovu rezultata prethodnih studija urađenih u našoj laboratoriji, definisani su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati uticaj kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju insulina i insulinsku signalizaciju u hipotalamusu - moždanoj strukturi ključnoj za regulaciju energetske homeostaze.
2. Utvrditi anatomsku lokalizaciju insulinske ekspresije u hipotalamusu, kao i tip ćelija uključenih u proces sinteze insulina (neuroni i/ili glijske ćelije).
3. Utvrditi koje izoforme glukoznih transportera se ekspimiraju u hipotalamusu, koji tip ćelija ih ekspimiraju (neuroni i/ili glijske ćelije), kao i da li kratkotrajno gladovanje utiče na ekspresiju izoformi ovog membranskog transportera.
4. Ispitati da li glukozni transporteri u hipotalamusu u uslovima kratkotrajnog gladovanja i povećane koncentracije insulina mogu biti njime regulisani, odnosno da li insulin ima ulogu u regulisanju procesa preuzimanja glukoze.

5. Ispitati uticaj kratkotrajnog gladovanja na količinu i distribuciju glikogena u hipotalamusu.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji mogu delimično razjasniti složenost mehanizama koji regulišu ekspresiju insulina u hipotalamusu, kao i adaptivni značaj gladovanjem izazvanih promena u ekspresiji ovog hormona. Takođe, ova teza može omogućiti bolje razumevanje insulinske signalne transdukcije u mozgu u uslovima narušene energetske homeostaze.

3. MATERIJAL I METODE

Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i Pravilnikom o laboratorijskim životinjama Republike Srbije. Odobreni su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (rešenje br. EK-BF-2017/05), kao i od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprave za veterinu (br. rešenja 323-07-05119/2017-05).

3.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* gajeni u vivarijumu Biološkog fakulteta, starosti oko dva meseca i telesne mase 250-300 g. Tri nedelje pre početka eksperimenata životinje su odvojene po dve u kavez. Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima na temperaturu od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i režim osvetljenja od 12 sati svetla i 12 sati mraka, sa početkom dnevnog perioda u 06:00 ujutru.

Životinje su nasumično podeljene u dve grupe:

1. Eksperimentalna grupa - životinje kojima je hrana oduzeta 6h pre žrtvovanja (6h G),
2. Kontrolna grupa - životinje koje su imale slobodan (*ad libitum*) pristup hrani (K).

S obzirom da su pacovi noćne životinje, eksperimentalnoj grupi je na početku aktivne faze (u 18:00) uklonjena hrana u trajanju od šest sati, dok je kontrolna grupa imala neometan pristup hrani. Obe grupe životinje imale su neometan pristup vodi. U ponoć, nakon šest sati gladovanja žrtvovane su eksperimentalne životinje. U isto vreme, žrtvovane su i životinje iz kontrolne grupe. Životinjama je pre i posle gladovanja merena telesna masa i glikemija. Broj ispitivanih životinja po grupu je bio $n=18$. Eksperimenti su urađeni u tri nezavisne replikacije, pri čemu je svaka namenjena različitim metodama: imunoblot i PCR $n=6$, histohemijska bojenja $n=6$, kvantifikacija glikogena $n=6$.

3.2. Izolovanje seruma, cerebrospinalne tečnosti i tkiva

Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom smese ketamina (80 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg). Dubina anestezije proverena je na nekoliko načina: štipanjem repa, štipanjem prstiju na ekstremitetima i praćenjem refleksa treptaja očiju. Nakon ulaska u duboku anesteziju, otvaran je grudni koš i uzorkovana krv iz leve srčane komore. Potom je perfuzija celog organizma vršena ubrizgavanjem fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) kroz levu srčanu komoru. Izlazak krvi je omogućen zasecanjem desne pretkomore. Perfuzija tkiva je obavljena do potpunog obezbojavanja jetre.

Nakon disekcije posteriornih vratnih mišića, staklenom mikropipetom (Drummond Scientific, Broomall, PA) uzorkovana je cerebrospinalna tečnost iz *cisterna magna*. Potom su životinje dekapitovane giljotinom (Harvard-Apparatus, Holliston, MA), i izolovani su hipotalamus i jetra.

Krv prikupljena kardiopunkcijom sakupljena je u epruvete, inkubirana tokom jednog sata na +4°C do koagulacije, centrifugirana 20 minuta na 2400 g (Sorvall, SL-50T, Super T21, Thermo Fisher Scientific) na istoj temperaturi, nakon čega je izdvajan serum. Uzorci tkiva, seruma i cerebrospinalne tečnosti čuvani su do upotrebe na -70°C.

Priprema tkiva korišćenih za imunohistohemijske analize i histološka bojenja opisana je u odgovarajućim poglavljima.

3.3. Biohemisjke analize

3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti

Pre i posle gladovanja, životinjama je merena glikemija uzorkovanjem krvi iz repne vene, a nakon izolovanja cerebrospinalne tečnosti određivana je i glikorahija. Koncentracija glukoze u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti je određivana pomoću glukometra (GlucoSure AutoCode, Prizma DOO, Srbija). Princip rada aparata se zasniva na reakciji glukoze sa kiseonikom iz vazduha pomoću enzima glukozo-oksidge koji se nalazi na kristalnim poljima tračica na koje se nanese kap uzorka. Oksidacijom glukoze nastaje glukonska kiselina i vodonih preoksid, koji reguju sa drugim komponentama kristala gradeći obojeno

jedinjene. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji glukoze u krvi. Opseg glukometra iznosi 1,1 – 33,3 mmol/l.

3.3.2. *Određivanje koncentracije laktata u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti*

Koncentracija laktata u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti merena je pomoću digitalnog aparata Accutrend® Plus (Cobas, Roche, Mannheim, Nemačka). Reakcija se zasniva na oksidaciji laktata pomoću enzima laktat-oksidaze, pri čemu dolazi do redukovanja medijatora koji reaguje sa ostalim komponentama koje se nalaze na kristalnim poljima tračica. Tokom opisane reakcije nastaje obojeno jedinjenje, intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji laktata. Opseg merenja na osnovu informacija obezbeđenih od strane proizvođača je 0,8 - 22 mmol/l.

3.3.3. *Određivanje koncentracije insulina u serumu, cerebrospinalnoj tečnosti i homogenatima hipotalamusa*

Koncentracija insulina u serumu, cerebrospinalnoj tečnosti i homogenatima hipotalmusa određena je upotrebom radioimunoeseja (eng. *Radioimmunoassay* - RIA). Metoda se zasniva na kompetitivnom vezivanju radioaktivno obeleženog antigena i antigena iz uzorka za specifična antitela. Koncentracija antigena u uzorku obrnuto je proporcionalna detektovanom nivou radioaktiviteta. Korišćen je radioimunoesej za insulin, osetljivosti 0,6 mIU/l (INEP, Beograd). Ukratko, pomešano je 100 µl uzorka (serum/CST/tkivni homogenat) ili standarda sa 100 µl insulina obeleženog radioaktivnim izotopom joda (¹²⁵I-insulin) i 100 µl liofiziranog anti-insulin seruma. Nakon prekonoćne inubacije na sobnoj temperaturi, dodato je 500 µl hladnog reagensa za precipitaciju i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani 20 minuta pri brzini od 1900 g. Radioaktivnost u precipitatu merena je automatskim gama brojačem (1470 Wallac Wizard, PerkinElmer, SAD). Konstruisana je standardna kriva na osnovu koje je određivana koncentracija insulina u uzorcima. Tkivni homogenati predstavljaju ukupne proteine izolovane mehaničkom homogenizacijom u RIPA puferu (eng. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*), razblažene do koncentracije 2µg/µl (način pripreme homogenata opisan je u poglavlju 3.4.4).

3.3.4. *Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu*

Koncentracija kortikosterona u serumu određena je komercijalnim imunoenzimskim esejom (ELISA, ab108821, Abcam, UK). Korišćen je kompetitivni ELISA esej u kome su za unutrašnju površinu mikrotitar ploče vezana poliklonska antitela za kortikosteron-21-tiroglobulin konjugovan sa biotinom. Standardi i razblaženi uzorci nepoznate koncentracije kortikosterona nanošeni su na mikrotitar ploče u duplikatu i inkubirani 2h na sobnoj temperaturi sa antitelom. Nakon ispiranja dodat je konjugat streptavidin-peroksidaza i inkubiran 30 min. Ploče su zatim pet puta sukcesivno ispirane i dodat je hromogeni supstrat tetrametilbenzidin koji dovodi do razvijanja boje. Nakon prekidanja enzimske reakcije rastvorom 0,5N HCl izmerene su apsorbance na 450 nm talasne dužine pomoću automatskog ELISA čitača za mikrotitar ploče (LKB 5060-006, LKB Instruments, Beč, Austrija). Na osnovu očitanih vrednosti konstruisana je 4PL kriva (eng. *4-parameter logistic curve*; Prism, GraphPad Software, Inc.) i izračunate su koncentracije kortikosterona. Senzitivnost kita za kortikosteron je ~ 0.3 ng/ml.

3.3.5. *Određivanje količine glikogena u jetri i hipotalamusu*

Koncentracija glikogena u jetri i hipotalamusima određivana je metodom koju su utvrdili Rasouli i saradnici (Rasouli et al., 2015). Glikogen je najpre ekstrahovan iz tkiva, a potom razgrađen do glukoze čija koncentracija je merena. Uzorci jetre i hipotalamusa su izmereni na masenoj vagi i stavljeni u epruvete, u koje je dodat 30% KOH u odnosu 1:5 (m:v), a potom inkubirani 10 minuta u ključaloj vodi uz povremeno mešanje. Nakon hlađenja u uzorke je dodat etanol do finalne koncentracije 55%, nakon čega je smesa centrifugirana 10 minuta na 1700 g, na sobnoj temperaturi. Dobijeni pelet je resuspendovan u 1 ml (jetra) ili 100 µl (hipotalamus) destilovane vode, nakon čega je određivana koncentracija glukoze. Koncentracija glukoze merena je na mikrotitar ploči upotrebom fenola i sumporne kiseline (Rasouli et al., 2014). Ukratko, u svaki bunarić je nalivano 10 µl uzorka ili standardnog rastvora glukoze (5,44 mmol/l), potom 30 µl vode, 40 µl 6,8% fenola i 200 µl 85% sumporne kiseline. Uzorci su promešani i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su očitavane apsorbance na automatskom mikrotitar čitaču na 495 nm. Na osnovu apsorbanci uzoraka i standardnog rastvora poznate koncentracije

određivane su koncentracije glukoze prema formuli: $[GLU] = (A_{uz}/A_{st}) * C_{st}$, a koncentracija glikogena je izražena kao mg glukoznih jedinica po gramu tkiva. S obzirom da 97% izmerene glukoze predstavlja glukozu nastalu hidrolizom glikogena, dobijene vrednosti su množene faktorom 0,97 (Rasouli et al., 2015).

3.4. Molekularno-biološke analize

3.4.1. Izolovanje ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK iz hipotalamusa urađena je metodom fenolske ekstrakcije. Tkivo je homogenizovano u hladnom Trizol® reagensu (Sigma, Nemačka) na ledu pomoću ručnog homogenizera (Ultra-turrax, Sigma-Aldrich, SAD) u odnosu 1:10 (m:v). Nakon petominutne inkubacije na sobnoj temperaturi dodat je hloroform (1/5 početnog volumena), uzorci su promešani i centrifugirani 20 minuta pri brzini 12000 g na 4°C. Nakon centrifugiranja gornja faza (vodena) je izdvajana u čiste ependorfice i dodavan je izopropil alkohol (1/2 početnog volumena). Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 10 minuta pri brzini 12000 g na 4°C. Supernatant je odlivan, a istaložena RNK isprana u 500 µl hladnog 75% etanola i centrifugirana 5 minuta na 7500 g. Postupak ispiranja je ponovljen, i potom je dobijeni talog 5 minuta sušen na vazduhu i rastvoran u 0,1% DEPC H₂O (voda tretirana dietilpirokarbonatom). Koncentracija i stepen čistoće izolovane RNK određivan je na spektrofotometru (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech), merenjem apsorbance na 260 i 280 nm talasne dužine. Aparat je na osnovu izmerenih apsorbanci automatski izračunavao koncentraciju RNK. Za određivanje čistoće uzorka i procenu eventualne kontaminacije korišćen je odnos apsorbancije na 260 i 280 nm. Odnos $A_{260}/A_{280} > 1,8$ smatran je zadovoljavajućim. Radi provere kvaliteta dobijene RNK urađena je elektroforeza na 1,5% agaroznom gelu koji sadrži etidijum-bromid u trajanju od 30 minuta, pri konstantnom naponu od 100 V, a vizuelizacija je urađena na UV transiluminatoru (ChemiDoc-It Imager, UVP, Nemačka).

3.4.2. Sinteza komplementarne DNK - reakcija reverzne transkripcije

Reakcija reverzne transkripcije je proces tokom koga se na osnovu molekula iRNK kao matrice sintetiše komplementarni lanac i nastaje tzv. komplementarna DNK (eng.

complementary DNA, cDNK). U cilju sprečavanja potencijalne DNK kontaminacije, pre sinteze cDNK RNK uzorci su prečišćeni pomoću komercijalnog kita (DNA-free™ kit, AM1906, Ambion, SAD). U uzorak ukupne RNK (2ug) dodati su reakcioni pufer i rastvor dezoksiribonukeaza I (1U/μl), smeša je inkubirana 30 minuta na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem inaktivacionog regensa, nakon čega su uzorci inkubirani 2 minuta na sobnoj temperaturi, pa centrifugirani 1,5 minuta na 10000 g. Dobijeni supernatant je prebačen u druge ependorfice i korišćen za reakciju reverzne transkripcije. Reverzna transkripcija je urađena pomoću komercijalnog kita (High-Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, SAD). Reakcionu smešu za sintezu cDNK sačinjavali su: reakcioni pufer, 2 μg prečišćene ukupne RNK, smeša četiri dezoksiribonukleotidtrifosfata, smeša nasumičnih prajmera, reverzna transkriptaza, i ribonukleazni inhibitor. Reakcija se odvijala po sledećem temperaturnom profilu: 10 minuta na 25°C, 120 minuta na 37°C, potom 5 minuta na 85°C. Dobijena cDNK čuvana je na -70°C.

3.4.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*quantitative Real-Time PCR*)

Za kvantitativno određivanje genske ekspresije insulina u hipotalamusu primenjena je lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* - qPCR) upotrebom Power SYBR® Green reagensa (Applied Biosystems, SAD) i sistema QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific, SAD). PCR metoda se zasniva na seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija specifičnih prajmera sa matricom i njihova elongacija, te se na taj način umnožava deo molekula DNK od interesa. Tokom svakog ciklusa praćena je zastupljenost sintetisanog produkta, čime je osigurana pouzdana kvantifikacija nivoa ekspresije. Za praćenje zastupljenosti količine sintetisanog produkta korišćena je SYBR® Green fluorescentna boja koja se vezuje za dvolančanu DNK, pa tako detektovani signal reflektuje količinu dvolančane DNK nastale tokom reakcije lančanog umnožavanja. Reakcija je urađena sa 20 ng cDNK, a sekvence korišćenih prajmera (Invitrogen, SAD) date su u tabeli 1. PCR reakcija se odvijala u standardnim uslovima: 2 min na 50°C, 10 min na 95°C, i 40

ciklusa od po 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Nivo ekspresije insulina u hipotalamusu izračunat je metodom $2^{-\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001), a kao endogen kontrola korišćen je *Gapdh* (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Endogena ili interna kontrola predstavlja gen koji pokazuje konstitutivnu ekspresiju nezavisno od sredinskih faktora ili eksperimentalne procedure i koristi se radi neutralizacije tehničkih grešaka prilikom procene ekspresije gena od interesa. Validnost upotrebe *Gapdh* kao endogene kontrole potvrđena je regresionom analizom.

Tabela 1. Sekvence prajmera korišćenih za reakciju lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Ime gena	Sekvence prajmera	
<i>Ins2</i> (NM_019130.2)	F: TGACCAGCTACAGTCGGAAAC	R: TCCACCAAGTGAGAACCACAAA
<i>Gapdh</i> (NM_017008.4)	F:CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	R: GGCATGGACTGTGGTCATGA

3.4.4. Izolovanje ukupnih proteina i priprema ćelijskih frakcija

U cilju analiziranja ekspresije specifičnih protein, iz hipotalamusa su izolovani ukupni proteini, ali i citosolna i membranska frakcija proteina. U svaki pufer korišćen za izolaciju proteina dodat je koktel inhibitora proteaza (SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, S8830, Sigma-Aldrich) i fosfataza (1mM Na-ortovanadat). Rastvori korišteni pri izolaciji proteina su ohlađeni na 4°C. Takođe, svi ostali koraci ovog postupka, uključujući inkubiranja i centrifugiranja, urađeni su na istoj temperaturi, osim ako nije drugačije naglašeno.

Ukupni proteini izolovani su iz hipotalamusa upotrebom RIPA pufera (50 mM Tris-HCl pH 7,2-7,5, 150mM NaCl, 1% NP 40, 0.1% SDS, 10 mM EDTA, 10mM EGTA, 0.5% Triton X). Uzorci su homogenizovani ručnim homogenizerom (Ultra-turrax, Sigma-Aldrich, SAD) u 10 volumena RIPA pufera, nakon čega su sonifikovani tri puta po 10 s i inkubirani 10 minuta. Supernatant dobijen nakon 20 minuta centrifugiranja na 17200 g predstavljao je ukupne proteine.

Subćelijske frakcije proteina izolovane su pomoću komercijalnog kita (Thermo Scientific, cat.87790, SAD), prema uputstvu proizvođača. Ukratko, hipotalamusi su izmereni, isprani u 0,1M fosfatnom puferu pH 7,2 (eng. *Phosphate buffer* - PB), homogenizovani u puferu za izolovanje citoplazmatskih proteina (eng. *Cytoplasmic*

Extraction Buffer - CEB), te su homogenati centrifugirani 5 minuta na 500 g. Dobijeni supernatant predstavljao je citosolnu proteinsku frakciju, a pelet je resuspendovan u puferu za izolovanje membranskih proteina (eng. *Membrane Extraction Buffer* - MEB), inkubiran 10 minuta, potom centrifugiran 5 minuta na 3000 g. Supernatant je predstavljao membranska frakciju proteina.

3.4.5. *Određivanje koncentracije proteina*

Koncentracija proteina određena je metodom po Loriju (LOWRY et al., 1951). Ukratko, u 100 μ l razblaženog uzorka dodato je 100 μ l 2% SDS (eng. *sodium dodecyl sulfate*) i 1ml radnog reagensa (0,02% Na-K tartarat; 0,01% CuSO_4 , u 2% Na_2CO_3 ; 0,4% NaOH), i inkubirano 10 min. Zatim je doliveno 100 μ l Folinovog reagensa (*Milipore*, Nemačka), nakon čega je usledila inkubacija u trajanju od 20 minuta. Nakon inkubacije merena je apsorbanca na 750 nm na spektrofotometru (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Švedska).

Kao standard za konstruisanje standardne krive korišćena je serija rastvora govedeg serum albumina (eng. *Bovine Serum Albumin* - BSA) poznatih koncentracija.

3.4.6. *Western blot*

Western blot je korišćena za utvrđivanje količine insulina, određenih proteina uključenih u insulinsku signalnu transdukciju, kao i glukoznih transportera. Imunoblot metoda se koristi za detekciju određenih proteina u uzorku, a zasniva se na razdvajanju proteina na osnovu molekulske mase i specifičnoj reakciji između antigena i antitela. Ova metoda se koristi za analizu ekspresije odnosno količine ispitivanog proteina, kao i njegove ćelijske lokalizacije, interakcije sa drugim proteinima i postranslacionih modifikacija datog proteina.

3.4.6.1. *Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu*

Pojedinačni uzorci iz iste eksperimentalne grupe sjedinjeni su tako da je svaki bio zastupljen sa istom količinom proteina, a zatim i dva puta razblaženi u puferu za nalivanje (Laemmli sample buffer, Bio-Rad, SAD) koji je sadžao redukujući agens β -merkaptotanol

(Sigma-Aldrich, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 5%. Svi uzorci, osim onih korišćenih za analizu ekspresije glukoznih transportera, su denaturisani kuvanjem u trajanju od 5 minuta na temperature od 100°C. U zavisnosti od analiziranog proteina, na gel je nalivano po 30-100 µg uzorka. Proteini su elektroforetski razdvojeni na SDS-poliakrilamidnom gelu, a koncentracija gela za razdvajanje birana je u odnosu na molekulsku masu analiziranog proteina (8-12,5%).

3.4.6.2. Transfer proteina sa gela na membranu

Nakon elektroforeze, proteini su prenošeni sa gela na membranu. Primenjen je mokri transfer, a korišćena je polivinildifluorid (PVDF) membrana (0,2 µm, Bio-Rad, SAD). Transfer se odvijao preko noći na 4°C, pri konstantnoj jačini struje (20 mA po gelu). Reverznim bojenjem membrane *Ponceau S* bojom (1% *Ponceau S* u 5% sirćetne kiseline) proverena je uspešnost transfera.

3.4.6.3. Imunodetekcija

U cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela, membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi u 5% BSA (Sigma, Nemačka) ili 5% nemasnom mleku u prahu (Santa Cruz Biotechnology, SAD) rastvorenom u TBST (eng. *Tris buffered saline-Tween*: 20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) u trajanju od 1-2 sata .

Inkubacija sa primarnim antitelima vršena je preko noći pri temperaturi od 4°C. Antitela su rastvorana u TBST ili rastvoru korišćenom za blokiranje. Spisak svih korišćenih antitela, kao i njihova razblaženja data su u tabeli 2. Membrane su ispirane od viška nevezanog antitela u TBST tri puta po 10 minuta i potom inkubirane sa sekundarnim antitelima. Korišćena su sekundarna antitela konjugovana sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase* - HRP), razblažena u TBST u odnosu 1:10000, a inkubacija je trajala 90 minuta. Nakon ispiranja viška nevezanog sekundarnog antitela vršena je detekcija signala na aparatu ChemiDoc-It gel/blot Imager (UVP, Nemačka). Reakcija je vizuelizovana dodavanjem rastvora luminola i vodonik peroksida (Clarity™ Western ECL Blotting Substate, Bio-Rad, SAD) u odnosu 1:1. Luminol je hemiluminiscentni agens koji u

reakciji sa peroksidazom rena dovodi do oslobađanje fotona, pri čemu je količina oslobođenih fotona proporcionalna količini proteina.

Membrane su nakon detekcije stripovane tj. podvrgnute uklanjanju vezanih primarnih i sekundarnih antitela. Ukratko, membrane su ispirane inkubacijama u sledećim rastvorima i vremenskim intervalima: dva puta u trajanju od po 10 minuta u puferu za blago stripovanje (70 mM SDS, 1,3 M glicin, 10% Tween; pH=2,2), potom dva puta po 10 minuta u PBS (eng. *phosphate buffered saline*), i na kraju dva puta po 5 minuta u TBST, potom reaktivirane u metanolu i blokirane 1h u 5% mleku. Nakon toga membrane su inkubirane preko noći sa novim primarnim antitelom specifičnim za β -aktin na 4°C. Detekcija je urađena po prethodno opisanom postupku. Dobijeni signal za β -aktin služio je kao kontrola nalivanja uzoraka na gel, odnosno služio je kao parametar prilikom normalizacije jačine specifičnog signala različitih uzoraka.

Tabela 2. Spisak primarnih i sekundarnih antitela korišćenih za *Western blot* analizu

Primarna antitela korišćena za <i>Western blot</i>						
Antigen	Molekulska težina	Klonalnost Poreklo	Blokiranje	Razblaženje	Kataloški broj	Proizvođač
Insulin (H-86)	12 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 3h	1:200 5% mleko	SC-9168	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Insulin R β (C-19)	95 kDa	poliklonsko zec	5% BSA 1,5h	1:500	sc-711	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Insulin receptor (phospho Y1361)	90 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 2h	1:1000	ab60946	Abcam, UK
GLUT1	55 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 2h	1:10000 TBST	ab652	Abcam, UK
GLUT2	57 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 2h	1:1000 TBST	ab95256	Abcam, UK
GLUT3	45-47 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 2h	1:4000 TBST	ab41525	Abcam, UK
GLUT4 (IF8)	50-63 kDa	poliklonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000 TBST	SC-53566	Santa Cruz Biotechnology, SAD
IRS1 (E-12)	170-185 kDa	monoklonsko miš	3% BSA 1,5h	1:500 3% BSA	SC-8038	Santa Cruz Biotechnology, SAD
IRS2 (B-5)	165-185 kDa	monoklonsko miš	3% BSA 1,5h	1:500 3% BSA	SC-390761	Santa Cruz Biotechnology, SAD

pIRS1 (phospho Y612)	175-185 kDa	polikonsko zec	3% BSA 1,5h	1:250 3% BSA	ab66153	Abcam, UK
Phospho-IRS2 (Ser731)	200 kDa	polikonsko zec	3% BSA 1,5h	1:400 3% BSA	ab3690	Abcam, UK
PI3K- p85 alpha	85 kDa	polikonsko zec	3% BSA 1,5h	1:300 3% BSA	ab40755	Abcam, UK
AKT 1/2/3 (H-136)	62,56,62 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000	SC-8312	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Phospho-AKT1/2/3 (Ser473)	62,56,62 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000	SC-7985-R	Santa Cruz Biotechnology, SAD
mTOR (7C10)	289 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000 TBST	#2983	Cell Signaling
Phospho-mTOR (Ser2448)	289 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000 TBST	#2971	Cell Signaling
p44/42 MAPK (ERK1/2)	42, 44 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000 TBST	#9102	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Try204)	42, 44 kDa	polikonsko zec	5% mleko 1,5h	1:1000 TBST	#9101	Cell Signaling
PI 3 Kinase p85 α	85 kDa	monoklonsko zec	5% BSA 2h	1:300 3% BSA	ab40755	Abcam, UK
Glycogen synthase 1 (Gs-7H5)	86 kDa	monoklonsko miš	5% mleko 2h	1:1000 5% mleko	SC-81173	Santa Cruz Biotechnology, SAD
β -actin (C4)	43 kDa	monoklonsko miš	5% mleko 1h	1:1000 5% mleko	SC-47778	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Sekundarna antitela korišćena za Western blot						
Tip antitela	Poreklo		Razblaženje	Kataloški broj	Proizvođač	
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	magarac		1:10000 TBST	SC-2077	Santa Cruz Biotechnology, SAD	
Donkey anti-mouse IgG-HRP	magarac		1:10000 TBST	SC- 2096	Santa Cruz Biotechnology, SAD	

3.4.6.4. Kvantifikacija

Kvantifikacija dobijenih signala urađena je pomoću programa ImageJ (verzija 1.47m, National Institute for Health, SAD). Merena je optička gustina dobijenog signala za

protein od interesa, a potom normalizovana u odnosu na izmerenu optičku gustinu signala za β -aktin. Za svaki analizirani protein tri puta je ponovljen *Western blot*.

3.5. Histološka i histochemijska bojenja

3.5.1. Priprema tkiva

Imunohistochemijskim analizama prethodila je transkardijalna perfuzija tkiva, tokom koje je kao fiksativ korišćen hladan 4% rastvor paraformaldehida (PFA; Sigma, SAD). Kao što je već navedeno, životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom smese ketamina i ksilazina i perfundovane 0,9% rastvorom NaCl do potpunog obezbojavanja jetre. Tkiva su fiksirana ubrizgavanjem 4% rastvora PFA u sistemsku cirkulaciju kroz levu komoru srca. Za potpunu fiksaciju u proseku je korišćeno oko 250 ml 4% rastvora PFA po eksperimentalnoj životinji. Nakon perfuzije, pacovi su dekapitovani giljotinom, a izolovani mozgovi su preko noći inkubirani u 4% rastvoru PFA na temperaturi od 4°C. U cilju krioprotekcije, mozgovi su dehidratirani stavljanjem u seriju rastvora rastuće koncentracije saharoze (10%, 20% i 30%) u 0,2 M rastvor PB. Mozgovi su inkubirani u svakom od rastvora do spuštanja na dno suda, a zatim zamrzavani na -70°C i sečeni na kriokatu (Leica CM1850) na -20°C. Koronalni preseki mozgovca debljine 10 μ m (za histochemijska bojenja) ili 20 μ m (za imunofluorescenciju) montirani su na SuperFrost® mikroskopske pločice (Menzel-Glasser, Nemačka) i čuvani na 4°C.

3.5.2. Imunohistochemijske metode

Imunohistochemija je metoda kojom se vrši otkrivanje prisustva i lokalizacije određenog proteina na presecima tkiva. Metoda se zasniva na specifičnoj reakciji između antigena i specifično obeleženih antitela. Antitela mogu biti obeležena enzimom ili fluoroforom. Takođe, obeleživač može biti konjugovan direktno za primarno antitelo ili konjugovan sa specifičnim sekundarnim antitelom koje prepoznaje primarno.

3.5.2.1. Immunoperoksidazno bojenje

Pre bojenja na presecima mozga je sprovedena procedura za povratak tkivne antigenosti, inkubacijom u 10 mM citratnom puferu (pH 6,0) u mikrotalasnoj pećnici.

Potom su blokirane endogene peroksidaze desetminutnom inkubacijom preseka u 0,3% H₂O₂ rastvora u metanolu. Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela urađeno je inkubacijom tkiva u 3% rastvoru normalnog magarećeg seruma u rastvoru PBS finalne koncentracije 0,01M. Preseci su preko noći inkubirani u rastvoru primarnog antitela specifičnog za insulin, nakon čega su ispirani u PBS i inkubirani u rastvoru razblaženog sekundarnog antitela obeleženog sa HRP. Vizuelizacija je urađena pomoću hromogenog supstrata 3,3-diaminobenzidina (DAB; DAKO, SAD). Reakcija je zaustavljena ispiranjem preseka u destilovanoj vodi. Preseci su potom dehidratirani u etanolu i prečišćeni u ksilenu. Pokrovno staklo je fiksirano pomoću DPX medijuma (Sigma, SAD). Preseci su analizirani i snimani pomoću svetlosnog mikroskopa (DMRX 301-371.010 Leica microsystems, Nemačka).

3.5.2.2. Imunofluorescentno bojenje

Za imunofluorescentnu detekciju preseci su ispirani tri puta po 10 minuta u 0,01M rastvoru PBS u cilju rehidratacije i uklanjanja nečistoća sa preseka. Zatim je usledila inkubacija u 10 mM citratnom puferu (pH 6,0) do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja, a u cilju permeabilizacije, preseci su inkubirani 15 minuta u 0,1% Triton-X 100. Preseci su na kraju inkubirani 45 minuta na sobnoj temperaturi u 2% rastvoru BSA da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela. Na preseke je nanošen rastvor primarnog antitela i inkubiran preko noći na temperaturi od 4°C u vlažnoj atmosferi. Primarna i sekundarna antitela rastvarana su u 2% rastvoru BSA. Spisak korišćenih antitela i razblaženja data su u tabeli 3. Nevezano primarno antitelo je uklanjano ispiranjem (3 puta po 10 minuta) u 0,01M rastvoru PBS. Inkubiracija u rastvoru sekundarnog antitela konjugovanih sa odgovarajućom fluoroforom odvijala se tokom 2 h na sobnoj temperaturi u mraku. Preseci su zatim ponovo ispirani, pa inkubirani 10 minuta sa fluorescentom bojom koja obeležava jedra ćelija vezujući se za dvolančanu DNK (DAPI 1:4000). U završnom koraku nanošen je Mowiol (Sigma-Aldrich, SAD) i pokrovno staklo. U cilju utvrđivanja specifičnosti imunoreakcije detektovane na presecima mozga korišćeno je nekoliko kontrola. Prilikom svakog bojenja jedan presek je korišćen kao negativna kontrola - obrađivan je po opisanom protokolu ali bez dodavanja primarnih antitela. Za pojedina antitela urađene su i pozitivne

kontrole, na tkivima za koja se zna da konstitutivno eksprimiraju veliku količinu analiziranog proteina.

Preseci hipotalmusa analizirani su i slikani pomoću konfokalnog mikroskopa (LSM 510, Carl Zeiss GmbH). Argonski laser (488 nm) je korišćen za ekscitaciju Alexa Fluor 488, a helijum-neonski laser (543 nm) za ekscitaciju Alexa Fluor 555. Korišćeni su objektivni 40x i 63x. Slike su obrađene pomoću Zeiss LSM 510 Basic software paketa (verzija 3.2).

Tabela 3. Spisak primarnih i sekundarnih antitela korišćenih za imunohistohemijska bojenja

Primarna antitela korišćena za imunohistohemijska bojenja					
Antigen	Klonalnost	Poreklo	Korišćeno razblaženje	Kataloški broj	Proizvođač
p-Insulin R β (Tyr1162/1163)	Polikonsko	koza	1:70 (IF)	sc-25103	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Insulin (H-86)	Poliklonsko	zec	1:100 (IF)	SC-9168	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Insulin A (C-12)	Poliklonsko	koza	1:100	Sc-7839	Santa Cruz Biotechnology, SAD
GLUT1	Polikonsko	zec	1:350 (IF)	ab652	Abcam, UK
GLUT2	Polikonsko	zec	1:300 (IF)	ab95256	Abcam, UK
GLUT3	Polikonsko	zec	1:150 (IF)	PA1-21043	Thermo Fisher Scientific, SAD
GLUT4	Polikonsko	zec	1:100 (IF)	SC-53566	Santa Cruz Biotechnology, SAD
GFAP, clone N206A/8	Monoklonsko	miš	1:400 (IF)	75-240	NeuroMab
NeuN, clone A60	Monoklonsko	miš	1:200 (IF)	MAB377	Millipore, SAD
Vimentin	Monoklonsko	miš	1:200 (IF)	M7020	Dako, SAD
Sekundarna antitela korišćena za imunohistohemijska bojenja					
Tip antitela		Poreklo	Razblaženje	Kataloški broj	Proizvođač
Donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488		magarac	1:200	A-21202	Molecular Probes, SAD

Donkey anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	magarac	1:200	A-11055	Molecular Probes, SAD
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 555	magarac	1:200	A-31572	Molecular Probes, SAD
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	magarac	1:200	SC-2077	Santa Cruz Biotechnology, SAD

3.5.3. Bojenje perjordnom kiselinom i Šifovim reagensom

U cilju utvrđivanja regionalne distribucije glikogena u hipotalamusu, rađeno je histochemijsko bojenje perjordnom kiselinom i Šifovim reagensom (eng. *Periodic Acid Schiff* - PAS). PAS boji glikogen, ali i druge polisaharide, stoga je kao potvrda specifičnosti bojenja rađena digestija glikogena enzimom diastazom. Nakon hidratacije, preseći mozga su inkubirani sa perjordnom kiselinom 10 minuta, ispirani vodom, pa inkubirani sa Šifovim reagensom tokom dva minuta na sobnoj temperaturi. Kontrastno bojenje urađeno je hematoksilinom, nakon čega su preparati ispirani pod mlazom vode, dehidrirani kroz seriju rastvora etanola rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%). Preparati su na kraju prečišćavani u ksilolu i prekriveni sa DPX medijumom i pokrovnim staklom. Preseci su snimani svetlosnim mikroskopom (Leica LEITZ DMRB).

3.6. Statistička analiza podataka

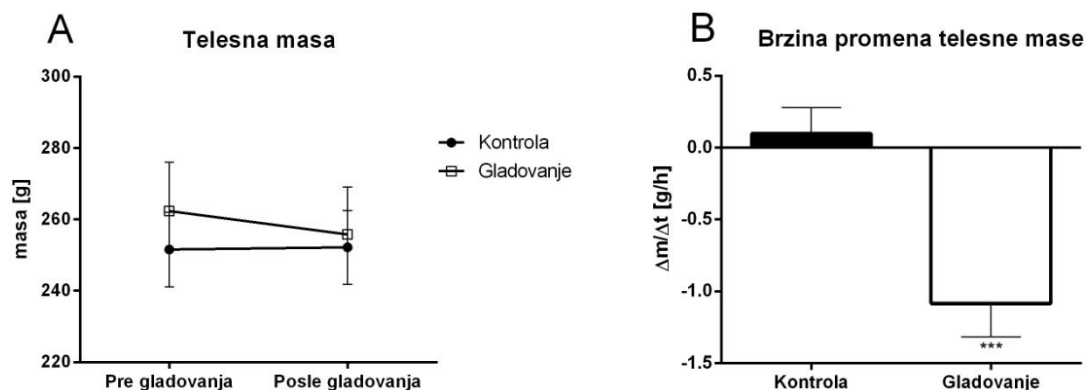
Rezultati eksperimenta analizirani su pomoću programa za statističku obradu GraphPad Prism (verzija 6.01), i predstavljeni kao srednja vrednost grupe \pm standardna greška (eng. *Standard Error of the Mean* - SEM). Primenom *Shapiro-Wilk* ili *Kolmogorov-Smirnov* testa proveravano je da li podaci podležu normalnoj raspodeli, potom je primenjivan dvostrani nezavisni *Studentov* t-test kako bi se utvrdilo da li je razlika dobijenih rezultata između dve grupe životinja slučajna ili posledica tretmana. U slučajevima kada je analiza F-testom pokazala da se standardne devijacije dve grupe značajno razlikuju primenjivan je dvostrani nezavisni *Studentov* t-test sa *Welch*-ovom korekcijom. Dvosmerna analiza varijanse (ANOVA) praćena *Bonferroni* testom za višestruka poređenja primenjena je za analizu telesne mase i koncentracije glukoze u krvi merene kod kontrolnih i izgladnjivanih životinja na početku i kraju ispitivanog perioda. ROUT metoda je primenjena radi utvrđivanja vrednosti koje značajno odstupaju od ostalih

(eng. *outlier*). Za sve biohemijske metode i PCR svaka pojedinačna životinja predstavljala je jedinicu analize podataka, dok su za *Western blot* pojedinačni uzorci iz iste eksperimentalne grupe pomešani (čitava grupa predstavljala jedan uzorak), te je tehnička replika predstavljala jedinicu analize. U svim primenjenim analizama prag statističke značajnosti postavljen je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na telesnu masu

Nakon šestočasovnog gladovanja telesna masa je smanjena u proseku za $6,5 \pm 1,41$ g, odnosno 2,42% telesne mase. Međutim, telesna masa zabeležena posle gladovanja nije statistički značajno različita u odnosu na masu izmerenu pre gladovanja (slika 1A; $F(1, 44)=0,0606$; $P=0,8066$). Pored toga, ne postoji značajna razlika ni između kontrolnih i izgladnjivanih životinja (slika 1A; $F(1, 44)=0,36$; $P=0,5516$) nakon ispitivanog perioda. Međutim, stopa promene telesne mase (g/h) statistički značajno se razlikuje između kontrolnih i izgladnjivanih životinja (slika 1B; $***P=0,0006$).



Slika 1. Telesna masa i stopa promene telesne mase kontrolnih i izgladnjivanih životinja tokom ispitivanog šestočasovnog perioda. Nakon kratkotrajnog gladovanja nije se promenila telesna masa (A), međutim brzina promene telesne mase se statistički značajno razlikuje između kontrolnih i izgladnjivanih životinja ($***P=0,0006$; B). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. Broj životinja po eksperimentalnoj grupi $n=12$.

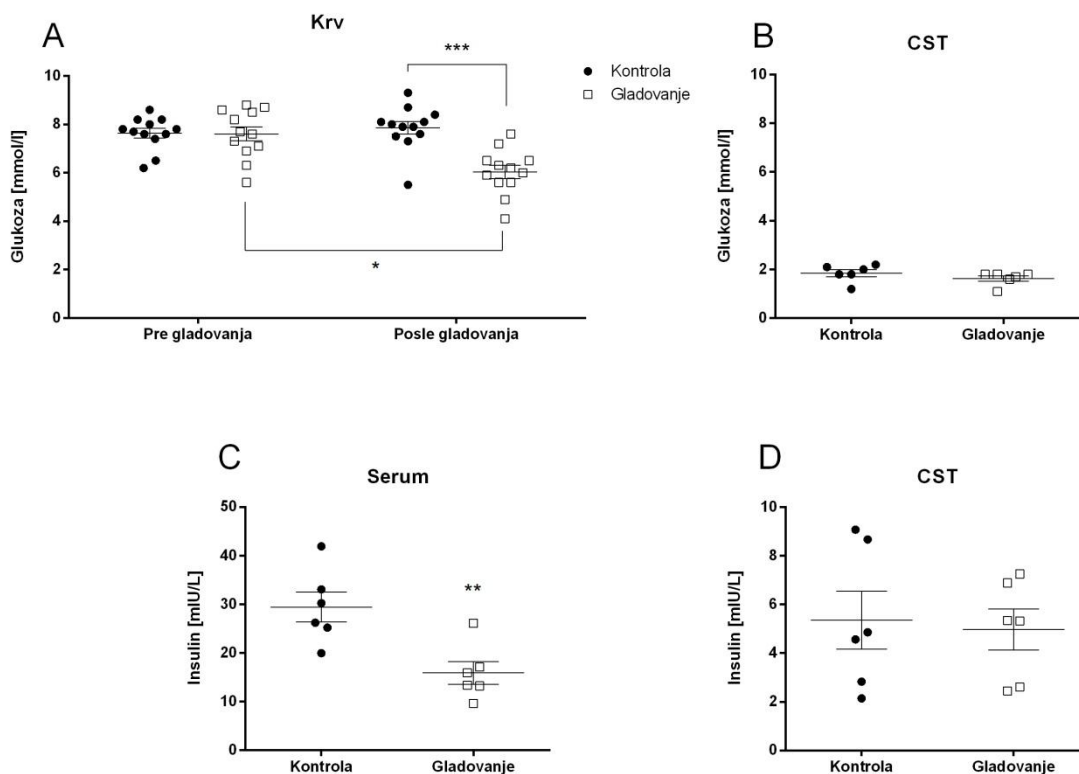
4.2. Kratkotrajno gladovanje smanjuje koncentraciju glukoze i insulina u serumu, ali ne i u cerebrospinalnoj tečnosti

Pre početka eksperimenta određivana je glikemija i pokazano je da nema statistički značajne razlike između dve grupe životinja (slika 2A; K=7,63±0,20 mmol/l; 6hG =7,61±0,29 mmol/l; P=0,9443). Nakon šest sati gladovanja koncentracije glukoze u krvi bila je značajno smanjena u odnosu na merenje pre gladovanja kod tih životinja (slika 2A; F(1, 44)=6,763; 6hG pre gladovanja=7,61±0,29 mmol/l; 6hG posle gladovanja=6,03±0,27 mmol/l; *P=0.0126), kao i u odnosu na vrednost izmerenu kod kontrolnih jedinki koje su imale neograničen pristup hrani tokom ispitivanog perioda (slika 2A; F(1, 44)=12,70; K=7,86±0,26 mmol/l; 6hG =6,03±0,27 mmol/l; ***P=0,0009).

Koncentracija glukoze u cerebrospinalnoj tečnosti nakon šestočasovnog gladovanja nije bila promenjena u odnosu na vrednost detektovanu kod kontrolnih jedinki (slika 2B; K=1,85±0,14 mmol/L; 6hG=1,63±0,11 mmol/l; P=0,2646).

Nakon kratkotrajnog gladovanja koncentracija insulina u serumu bila je smanjena (slika 2C; K=29,45±3,09 mIU/l; 6hG=15,91±2,30 mIU/l; **P=0,0056), dok je u cerebrospinalnoj tečnosti ostala nepromenjena (slika 2D; K=5,36±1,19 mIU/l; 6hG=4,98±0,84 mIU/l; P=0,7995).

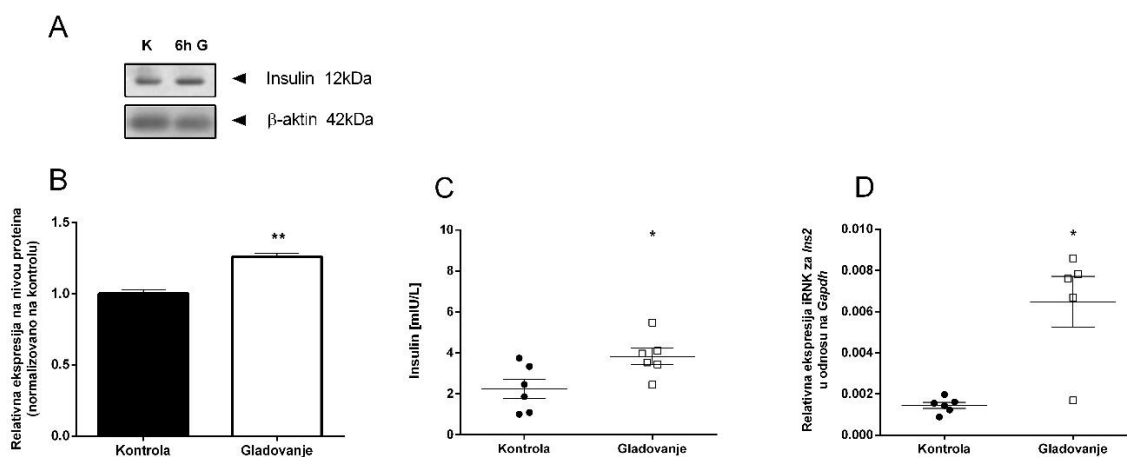
Radi procene faze gladovanja u kojoj se životinje nalaze, merena je koncentracija kortikosterona u krvi. Rezultati su pokazali da nakon šestočasovnog gladovanja koncentracija kortikosterona nije bila promenjena u odnosu na kontrolnu vrednost (K=269±39,0 ng/ml; 6hG=295±27,8 ng/ml; P=0,2576).



Slika 2. Koncentracija glukoze i insulina u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti kontrolnih i izgladnjivanih pacova. (A) Koncentracija glukoze u serumu bila je smanjena nakon šest sati gladovanja u odnosu na vrednosti izmerene pre gladovanja (* $P=0.0126$), ali i u odnosu na vrednosti izmerene u serumu kontrolnih životinja nakon perioda gladovanja (** $P=0,0009$). (C) Koncentracija insulina u serumu je snižena nakon šestočasovnog gladovanja (** $P=0,0056$). Međutim, koncentracija glukoze (B) i insulina (D) u cerebrospinalnoj tečnosti je ostala nepromenjena. (E) Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. Broj životinja po eksperimentalnoj grupi $n=6$, osim u slučaju glikemije gde je broj životinja po grupi $n=12$. CST - cerebrospinalna tečnost.

4.3. Kratkotrajno gladovanje povećava količinu insulina u hipotalamusu

Količina insulina, kao i ekspresija iRNK za Insulin 2 (*Ins2*; pacovski homolog humanom insulinu) u hipotalamusu, bili su značajno povećani nakon šestočasovnog gladovanja (slike 3A i 3B; $**P=0,0019$; slika 3D; $*P=0,0147$). Takođe, količina insulina izmerena RIA metodom u homogenatima hipotalmusa bila je značajno povećana nakon kratkotrajnog gladovanja (slika 3C; $*P=0,0288$) u odnosu na vrednosti dobijenih kod životinja koje su imale neometan pristup hrani.

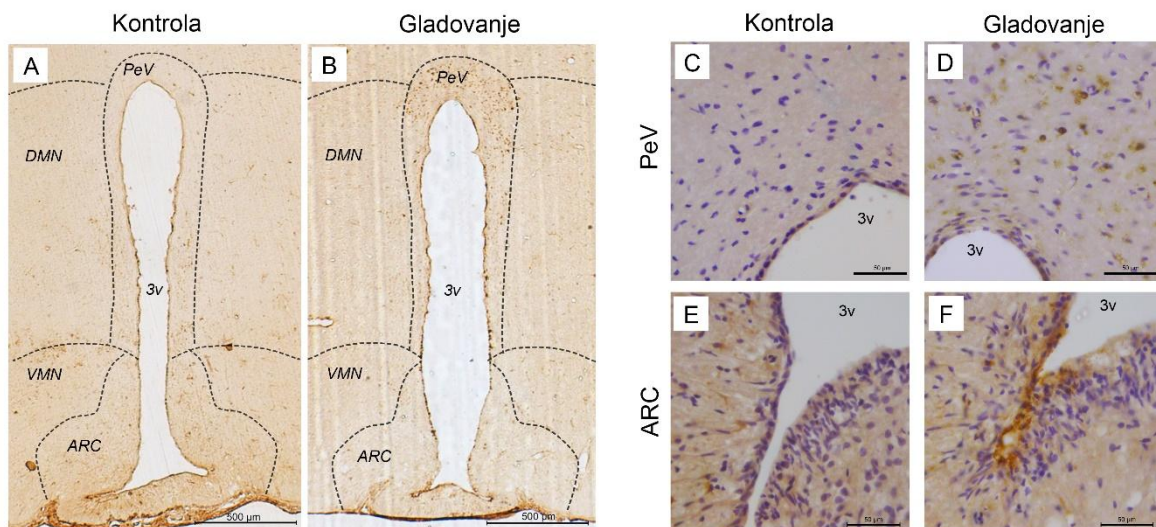


Slika 3. Ekspresija insulina u hipotalamusu na nivou proteina i iRNK nakon kratkotrajnog gladovanja. (A) Reprezentativni imunoblot za detekciju proteina insulina i β -aktina u hipotalamusu pacova. (B) Kvantitativna analiza imunoblotova za određivanje količine insulina u hipotalamusu pacova je pokazala da nakon šest sati gladovanja dolazi do povećanja količine insulina ($**P=0,0019$). (C) Količina insulina izmerena RIA metodom u parenhimu hipotalmusa je takođe povećana nakon kratkotrajno gladovanja ($*P=0,0288$). (D) Ekspresija iRNK za *Ins2* u hipotalamusu pacova bila je povećana nakon šestočasovnog gladovanja ($*P=0,0147$). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. Broj životinja po eksperimentalnoj grupi $n=6$. K - kontrola; 6h G - šestočasovno gladovanje.

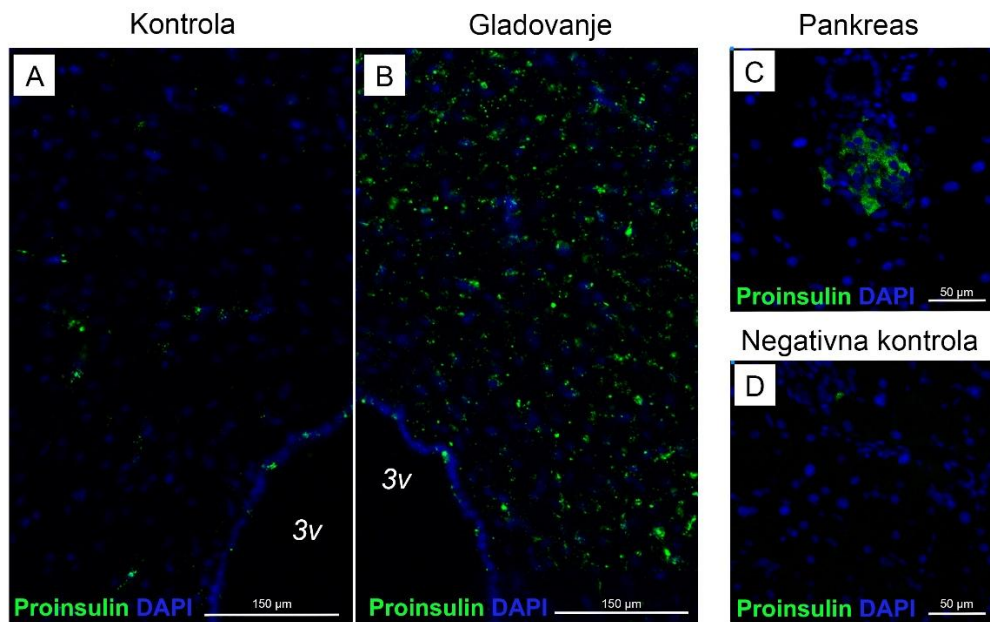
4.4. Regionalna distribucija insulina u hipotalamusu

U cilju utvrđivanja neuroanatomske i ćelijske lokalizacije insulina u hipotalamusu urađeno je imunohistohemijsko bojenje. Insulin je detektovan u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja imunoperoksidaznim bojenjem (slika 4). Prisustvo insulina zabeleženo je u regionima za koje je poznato da su uključeni u regulaciju energetske homeostaze (slike 4A i 4B), kao što su ARC (slike 4E i 4F), VMN i DMN. Pored toga, insulin je detektovan i u regionu periventrikularnog jedra (PeV; slike 4A-D). Međutim, u ovom regionu izraženija imunopozitivnost za insulin je detektovana nakon kratkotrajnog gladovanja (slika 4D). Primenom imunofluorescentno obeleženog antitela detektovan je isti obrazac distribucije insulina u hipotalamusu (slike 5A i 5B), kao i prilikom primene prethodno pomenute metode. Važno je naglasiti da je u ovom slučaju korišćeno antitelo sintetisano naspram sekvence koja odgovara prekursoru insulina, proinsulinu (25-110 amino-kiseline), formi prisutnoj u sekretornim vezikulama. Specifičnost korišćenih antitela testirana je na presecima pankreasa, gde je u okviru Langerhansovih ostrvaca zabeleženo prisustvo proinsulina (slika 5D).

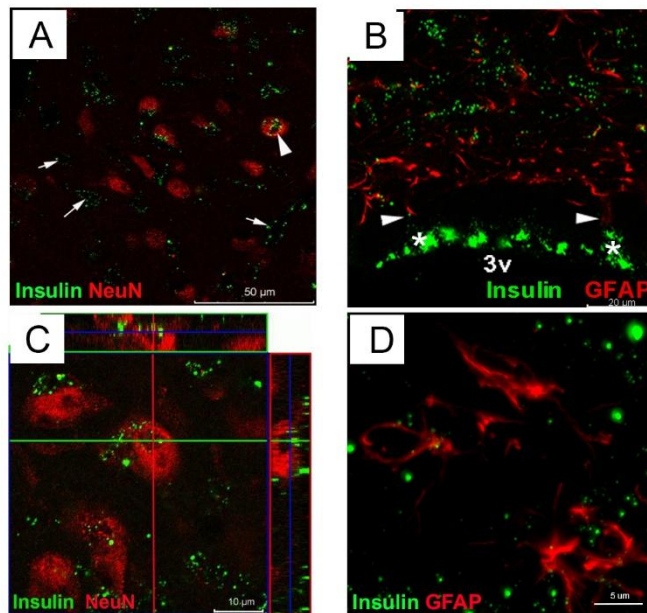
Radi utvrđivanja tipa ćelija koje sintetišu proinsulin, urađeno je dvostuko imunofluorescentno bojenje sa markerom neurona NeuN (eng. *Neuronal Nuclei antigen*) ili glijskih ćelija GFAP (eng. *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Pokazano je da se insulin sintetiše u citoplazmi neurona, i to unutar perikariona (slika 6A i 6C), dok prisustvo ovog prohormona nije detektovano u GFAP pozitivnim ćelijama. (slika 6B i 6D). Pored toga, proinsulin i insulin su detektovani u apikalnom delu endimskih ćelija koje okružuju treću moždanu komoru (slika 7B i 7C).



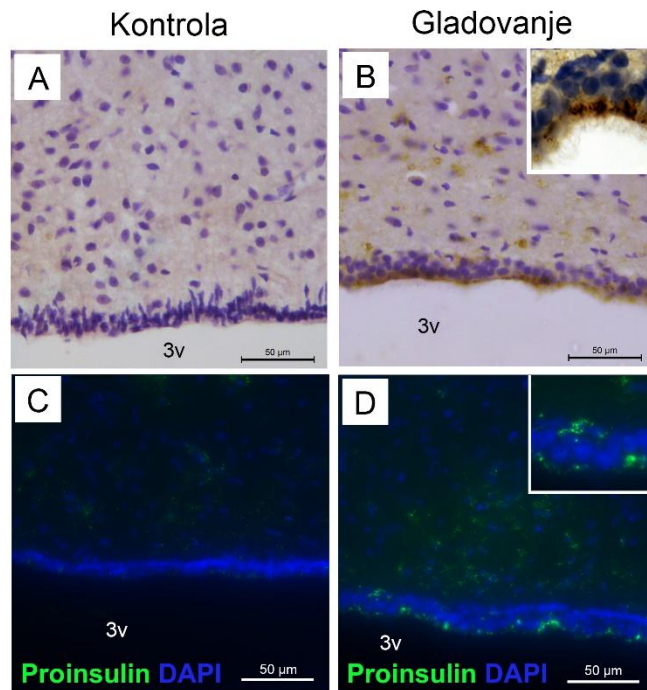
Slika 4. Neuroanatomska lokalizacija insulina u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih pacova. Insulin je detektovan u periventrikularnom jedru (PeV), lučnom jedru (ARC), ventromedijalnom (VMN) i dorzomedijalnom jedru (DMN) kontrolnih (A) i izgladnjivanih životinja (B). Izraženija insulinika imunopozitivnost nakon kratkotrajnog gladovanja uočena je u regionima koji okružuju treću moždanu komoru (3v): PeV (D) i ARC (F) u odnosu na kontrolu (E, C).



Slika 5. Proinsulin u periventrikularnom jedru hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Proinsulin (zeleni signal) je detektovan u periventrikularnom jedru (PeV) hipotalamusa kontrolnih (A) i izgladnjivanih životinja (B); izraženija imunopozitivnost za proinsulin zabeležena je nakon šestočasovnog gladovanja. Preseci pankreasa korišćeni su kao pozitivna kontrola (C), a negativna kontrola je urađena izostavljanjem primarnog antitela (D). DAPI - marker jedara (plavi signal). 3v - treća moždana komora.



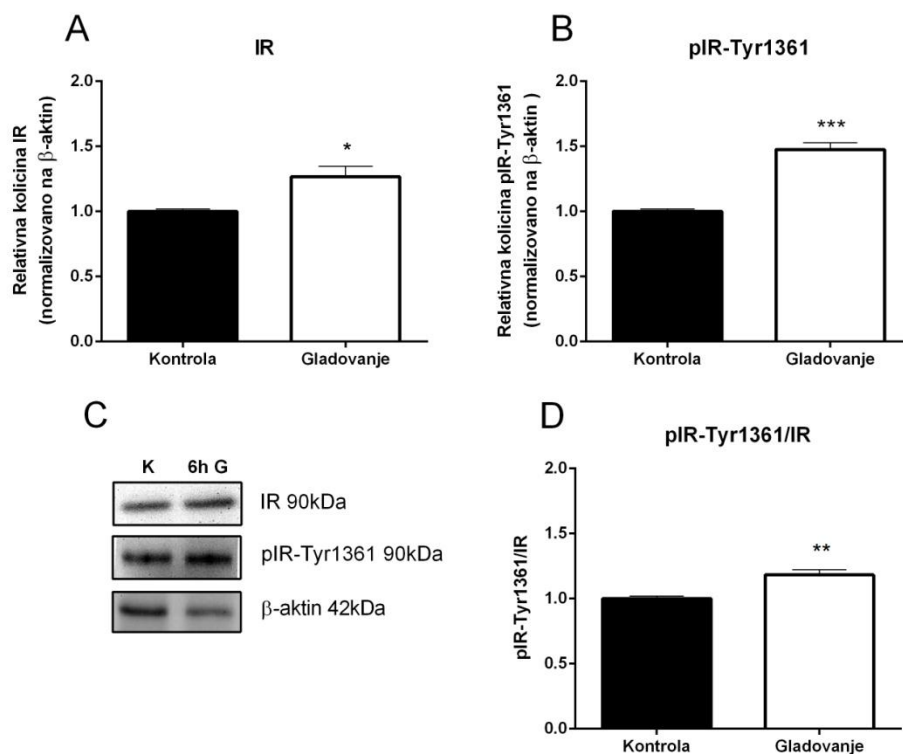
Slika 6. Insulin je detektovan u neuronima, ali ne i u astrocitima nakon kratkotrajnog gladovanja. (A,C) Insulin (zeleni signal) je kod izgladnjivanih životinja detektovan u ćelijama koje ekspiriraju NeuN (marker neurona), (B,D) Insulin nije uočen u GFAP pozitivnim astrocitima



Slika 7. Insulin i proinsulin u endimskim ćelijama hipotalamusa nakon kratkotrajnog gladovanja. Insulin (A, B) i proinsulin (C, D) su detektovani kod izgladnjivanih životinja i u endimskim ćelijama koje okružuju treću moždanu komoru (3v), i to u regionu bližem apikalnoj membrani. DAPI - marker jedara (plavi signal).

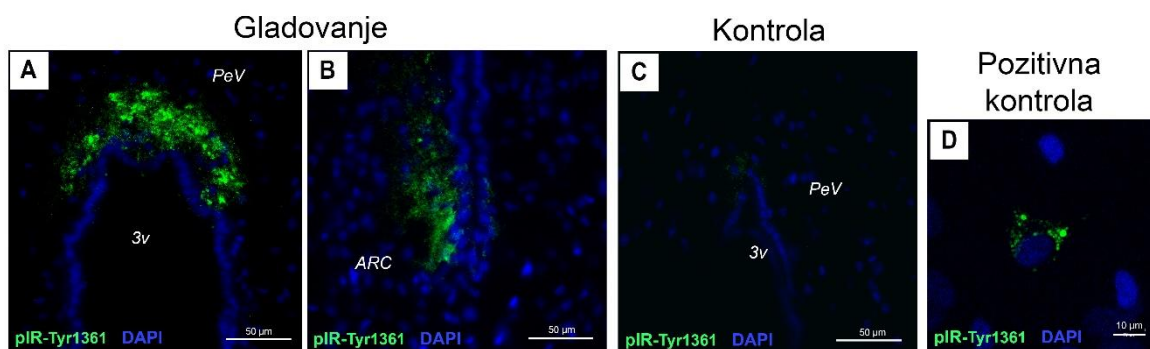
4.5. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju, aktivaciju i distribuciju insulinskog receptora u hipotalamusu

Kratkotrajno gladovanje dovelo je do povećanja količine insulinskog receptora u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa (slika 8A; *P=0,0105). Takođe, povećana je i količina fosforilisane forme insulinskog receptora na tirozinskom ostatku 1361 (pIR-Tyr1361, slika 8B; ***P<0,0001). Odnos ukupne količine insulinskog receptora i količine njegove aktivne forme, takođe je bio povećan nakon šestočasovnog gladovanja (slika 8D; **P=0,0013).



Slika 8. Ekspresija ukupne (IR) i aktivne forme (pIR-Tyr1361) insulinskog receptora u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja. (A) Nakon šest sati gladovanja dolazi do povećanja količine insulinskog receptora u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa pacova (*P=0,0105). **(B)** Povećana je i količina pIR-Tyr1361 nakon kratkotrajnog gladovanja (***P<0,0001). **(C)** Reprezentativni imunoblot za IR, pIR-Tyr1361, i β -aktin koji je korišćen kao kontrola nalivanja. **(D)** Takođe, povećan je i odnos pIR-Tyr-1361/IR u hipotalamusu izgladnjivanih životinja; **P=0,0013. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - šestočasovno gladovanje.

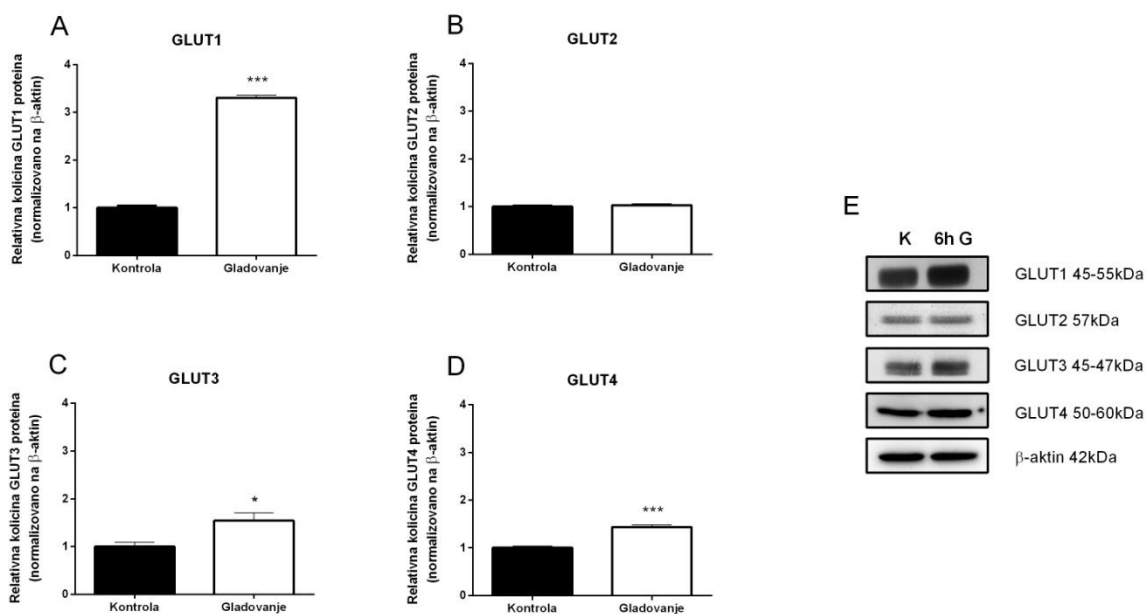
Distribucija aktivne forme insulinskog receptora (pIR-Tyr1361) u hipotalamusu analizirana je imunofluorescencijom. Na presecima hipotalamusa izgladnjivanih životinja pIR-Tyr1361 je detektovan u okviru PeV, na vrhu treće moždane komore (slika 9A), ali i na dnu u blizini ARC (slika 9B). Kod kontrolnih životinja, pIR-Tyr1361 je detektovan na vrhu treće moždane komore, ali u znatno manjoj meri u poređenju sa izgladnjivanim životinjama (slika 9C). Kao pozitivna kontrola, poslužila je kultura astrocita koji su inkubirani u medijumu koji sadrži insulin. Na membrani tih astrocita zabeležen je signal za pIR-Tyr1361 (slika 9D).



Slika 9. Distribucija aktivnog insulinskog receptora (pIR-Tyr1361) u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. (A) Nakon šest sati gladovanja pIR-Tyr1361 je detektovan na vrhu treće moždane komore (3v) u okviru periventikularnog jedra (PeV), (B) kao i na dnu treće moždane komore u blizini lučnog jedra (ARC). (C) Kod kontrolnih životinja pIR-Tyr1361 je detektovan u PeV, ali u manjoj meri u poređenju sa izgladnjivanim životinjama. (D) Na membrani astrocita inkubiranih u medijumu koji sadrži insulin detektovan je pIR-Tyr1361. DAPI - marker jedara (plavi signal).

4.6. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju glukoznih transportera u hipotalamusu

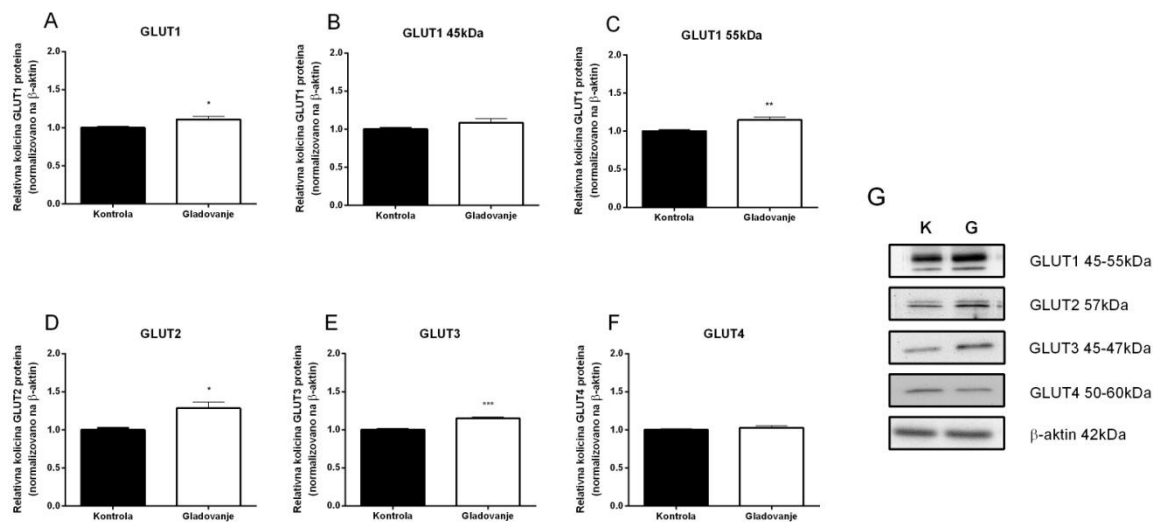
U okviru ove studije analizirana je i ekspresija glukoznih transportera 1-4 u ukupnim proteinima izolovanim iz hipotalamusa. Pokazano je da kratkotrajno gladovanje dovodi do značajnog povećanja ekspresije GLUT1 (slika 10A; *** $P < 0,0001$), GLUT3 i GLUT4 (slike 10C i 10D; * $P = 0,0442$ i *** $P < 0,0001$) dok je ekspresija GLUT2 ostala nepromenjena (slika 10B; $P = 0,4898$).



Slika 10. Ekspresija GLUT1-4 u ukupnim proteina izolovanim iz hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Nakon šest sati gladovanja povećana je ekspresija GLUT1 (A; *** $P < 0,0001$), GLUT3 (C; * $P = 0,0442$) i GLUT4 (D; *** $P < 0,0001$), dok je ekspresija GLUT2 (B) ostala nepromenjena. (E) Reprezentativni blot za GLUT1-4 i β -aktin koji je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - šestočasovno gladovanje.

Uzimajući u obzir da su samo glukozni transporteri prisutni u ćelijskoj membrani zapravo angažovani u transportu glukoze u ćeliju, analizirana je količina GLUT1-4 u membranskoj frakciji proteina. Nakon kratkotrajnog gladovanja količina dva najzastupljenija glukozna transportera u mozgu, GLUT1 i GLUT3, bila je povećana (slika 11A; GLUT1, * $P = 0,0146$ i slika 11E; GLUT3, *** $P < 0,0001$);). Detaljnija analiza GLUT1 izoformi ukazala je da je bila povećana samo izoforma od 55 kDa prisutna u endotelnim

ćelijama kapilara (slika 11C; $**P=0,0030$), ali ne i izoforma od 45 kDa koja se eksprimira na astrocitima (slika 11B; $P=0,1838$). Količina GLUT2 u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa bila je povećana nakon šest sati gladovanja (slika 11D; $*P=0,0149$), dok je količina membranskih GLUT4 proteina bila nepromenjena (slika 11F; $P=0,3215$).



Slika 11. Količina GLUT1-4 u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih pacova. Kratkotrajno gladovanje dovodi do povećanja količine GLUT1 (A; $*P=0,0146$) i GLUT3 (E; $***P=0,0001$). Analizom različitih izoformi GLUT1 ustanovljeno je povećanje količine mikrovaskularne (55 kDa) izoforme (C; $*P=0,0030$), ali ne i povećanje izoforme od 45 kDa (B). Pored toga, povećana je i količina GLUT2 (D; $*P=0,0149$), dok je količina GLUT4 ostala nepromenjena (F). Reprezentativni blot za GLUT1-4 i β-aktin koji je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - šestočasovno gladovanje.

4.7. Distribucija glukoznih transportera u hipotalamusu

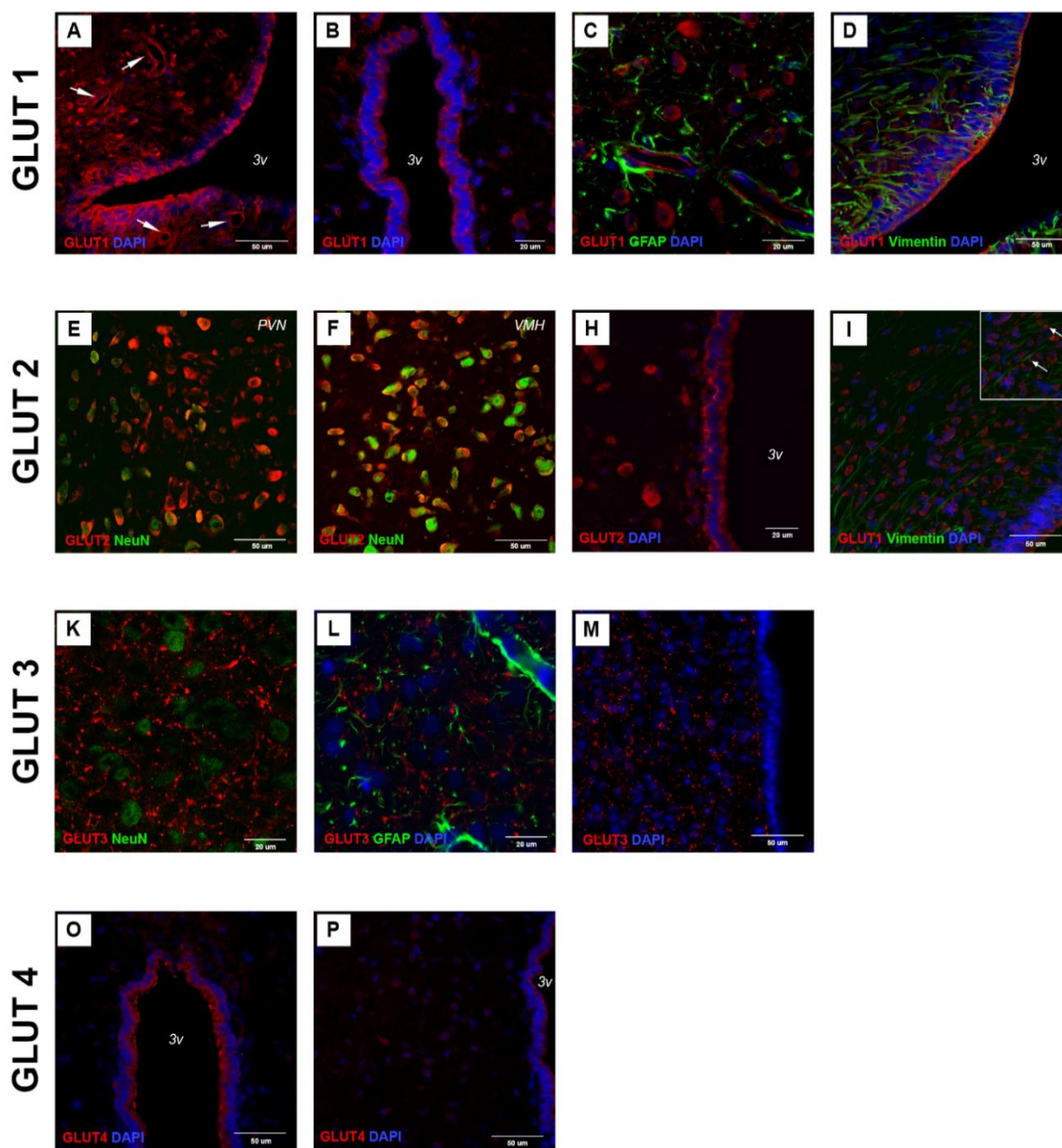
Primenom dvostrukog imunofluorescentnog obeležavanja analizirana je anatomska i ćelijska distribucija glukoznih transportera u hipotalamusu, dok je u cilju ispitivanja njihove osetljivosti na dejstvo insulina analizirana koekspresija svakog od ovih transportera sa aktivnom formom insulinskog receptora.

GLUT1 je detektovan široko rasprostranjen u parenhimu hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja (slike 12A-D). Osim toga, GLUT1 imunopozitivost detektovana je i na bazolateralnoj i apikalnoj membrani endodimskih ćelija (slika 12B), kao i na apikalnoj membrani tancita (slika 12D) koje okružuju treću moždanu komoru. Ovaj glukozni transporter detektovan je i u endotelnim ćelijama krvnih sudova (slika 12A, bele strelice) koje su okružene astrocitnim stopalom (slika 12C). Međutim, ni u jednom regionu nije uočena koekspresija GLUT1 i pIR-Tyr1361 u istim ćelijama (slike 13A i B).

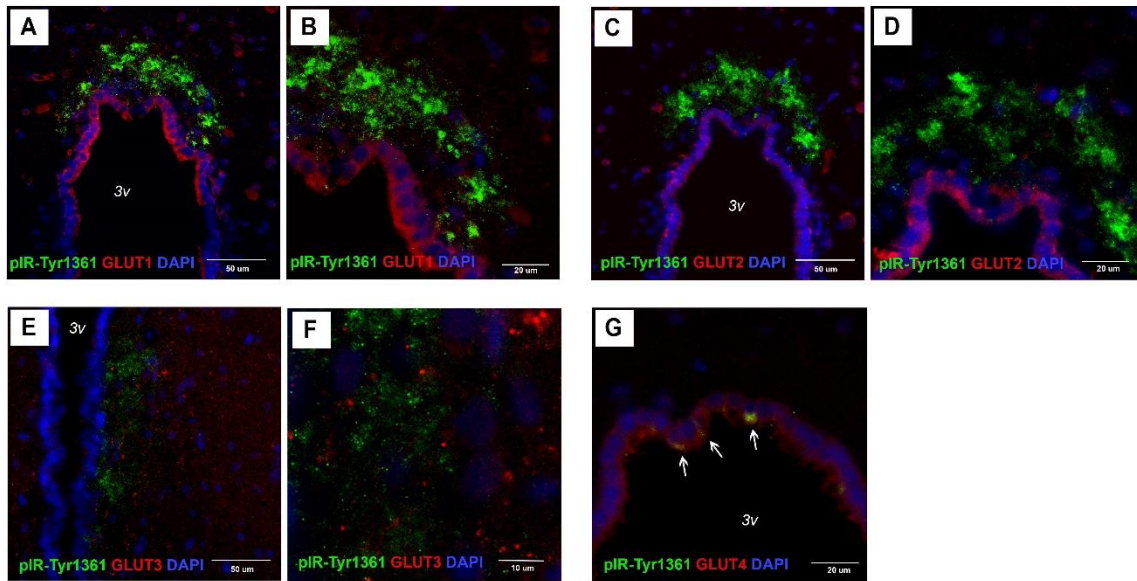
GLUT2 je detektovan u neuronima u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Izraženija imunopozitivnost zabeležena je u neuronima paraventricularnog (PVN; slika 12E) i ventromedijalnog jedra (VMN; slika 12F) u odnosu na druge regione hipotalamusa. Endodimske ćelije (slika 12H) i tanciti (slika 12I), takođe eksprimiraju GLUT2. Nastavci tancita koji se pružaju do lučnog jedra (ARC) su u kontaktu sa telima neurona ovog jedra, koji takođe eksprimiraju GLUT2 (slika 12I, bele strelice). Dvostruko imunofluorescentno obeležavanje GLUT2 i pIR-Tyr1361 pokazalo je da ne postoji preklapanje signala u ispitivanim moždanim regionima (slika 13C i D).

U subventrikularnoj oblasti hipotalamusa, u okviru PeV i PVN detektovan je GLUT3 (slike 12K-M). Ovaj glukozni transporter detektovan je u neuronima, kao i u neuronskim nastavcima, koji su u kontaktu sa GFAP pozitivnim ćelijama (slika 12L). U istom regionu detektovan je i pIR-Tyr1361, međutim preklapanje ova dva signala nije uočeno (slike 13E i F).

U poređenju sa ostalim glukoznim transporterima, imunopozitivnost za GLUT4 je bila manje izražena. GLUT4 je detektovan na apikalnoj membrani endodimskih ćelija koje okružuju treću moždanu komoru (slika 12O) i u parenhimu hipotalamusa (slika 12P). U pojedinim endodimskim ćelijama uočeno je preklapanje signala za GLUT4 i pIR-Tyr1361 (slika 13G, bele strelice).



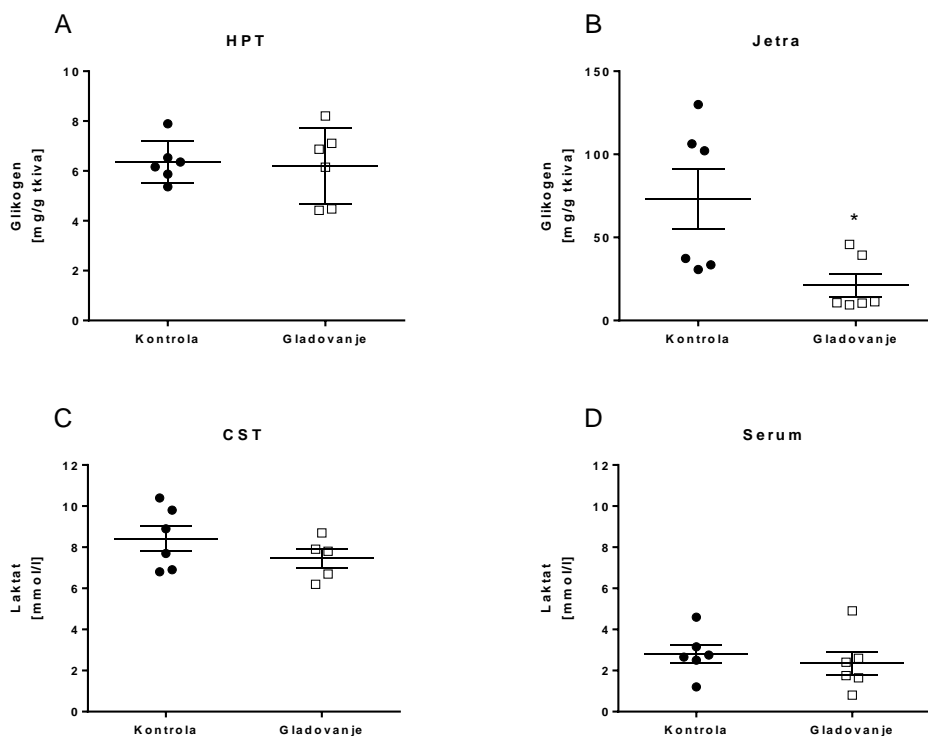
Slika 12. Anatomsko i ćelijska lokalizacija glukoernih transportera u hipotalamusu izgladnjivanih pacova. GLUT1 je detektovan u svim regionima hipotalamusa. Intenzivan signal detektovan je u endodmskim ćelijama (B), tancitama (A,D), ali i u endotelnim ćelijama krvnih sudova (A, bele strelice), okruženim astrocitnim stopalom (C). GLUT2 je detektovan u neuronima hipotalamusa, u okviru paraventrikularnog (E) i ventromedijalnog jedra (F). Ependimske ćelije (H) i tanciti (I) ekspimiraju GLUT2, a nastavci tancita su u kontaktu sa neuronima lučnog jedra koji takođe ekspimiraju GLUT2 (I, bele strelice). GLUT3 je detektovan u periventrikularnom (M) i paraventrikularnom jedru (K,L). GLUT4 je detektovan u endodmskim ćelijama (O) i sporadično u parenhimu hipotalamusa (P). 3v - treća moždana komora; PVN - paraventrikularno jedno; VMN - ventromedijalno jedno.



Slika 13. Analiza koekspresije aktivne forme insulinskog receptora (pIR-Tyr1361) sa različitim glukoznim transporterima u hipotalamusu izgladnjivanih životinja. Detektovano je odsustvo koekspresije pIR-Tyr1361 i GLUT1 (A,B), GLUT2 (C,D) ili GLUT3 (E,F). Međutim, na pojedinim mestima na apikalnoj membrani endimskih ćelija koje okružuju treću moždanu komoru (3v) zabeleženo je preklapanje signala za GLUT4 i pIR-Tyr1361 (G, bele strelice). DAPI - marker jedara (plavi signal).

4.8. Kratkotrajno gladovanje dovodi do smanjenja količine glikogena u jetri, ali ni i u hipotalamusu

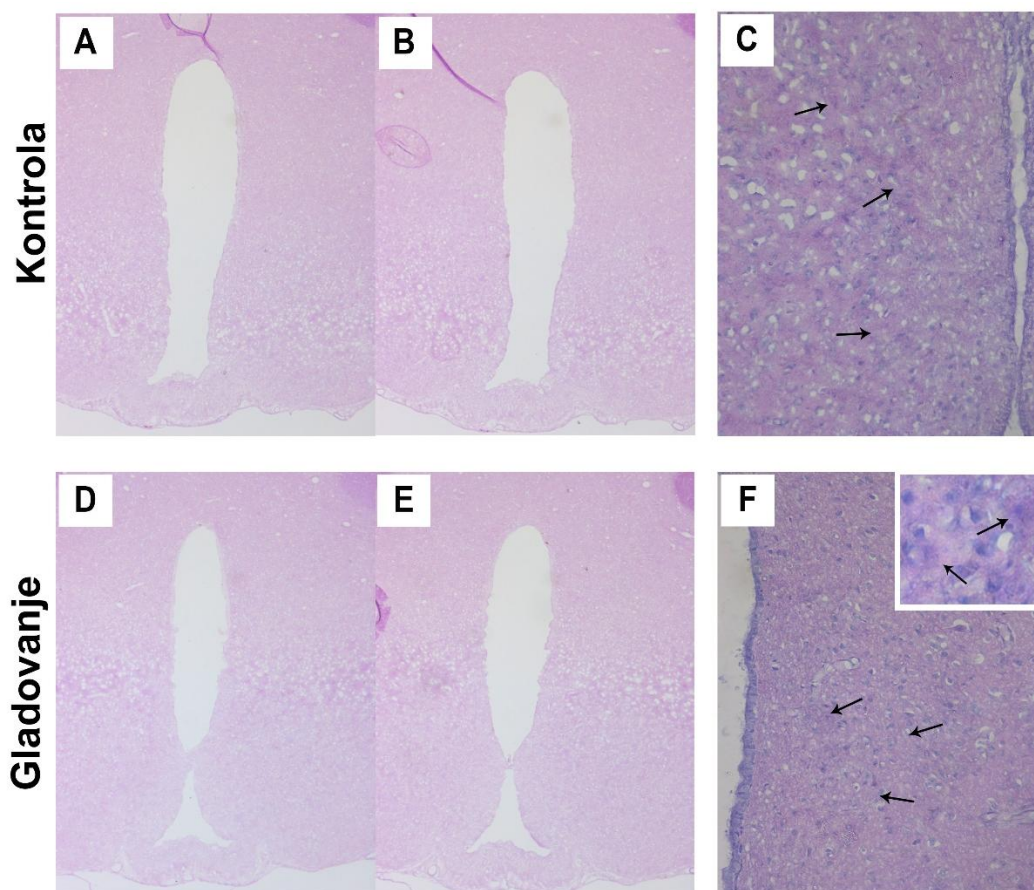
Kratkotrajno gladovanje nije uticalo na količinu glikogena u hipotalamusu (slika 14A; K=6,36±0,35 mg/g; 6hG=6,21±0,62 mg/g; P=0,8276), dok je glikogen u jetri bio smanjen za 57% u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 14B; K=73,3±18,10 mg/g; 6hG=21,2±6,82 mg/g; *P=0,0224). Koncentracija laktata u cerebrospinalnoj tečnosti korišćena je kao mera stope degradacije glikogena u moždanom tkivu. Pokazano je da nakon šest sati gladovanja nije došlo do promene koncentracije ovog metabolita u cerebrospinalnoj tečnosti (slika 14C; K=8,42±0,62 mmol/l; 6hG=7,46±0,45 mmol/l; P=0,2596). Osim toga, koncentracija laktata nakon šestočasovnog gladovanja nije bila značajno promenjena ni u serumu (slika 14D; K=2,81±0,45 mmol/l; 6hG=2,35±0,57 mmol/l; P=0,5426).



Slika 14. Količina glikogena u hipotalamusu i jetri, i koncentracija laktata u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Nakon kratkotrajnog gladovanja količina glikogena u hipotalamusu ostala je nepromenjena (A), dok je u jetri bila smanjena (B; *P=0,0224). Koncentracija laktata u cerebrospinalnoj tečnosti (C) i serumu (D) ostala je nepromenjena. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM. Broj životinja po grupi n=6. HPT - hipotalamus; CST - cerebrospinalna tečnost.

4.9. Kratkotrajno gladovanje ne utiče na distribuciju glikogena u hipotalamusu

Primenom histološkog PAS bojenja ispitana je distribucija glikogena u hipotalamusu. Na presecima kontrolnih (slika 15A) i izgladnjivanih (slika 15D) životinja uočava se homogena distribucija glikogena, ali razlika u distribuciji glikogena između dve ispitivane grupe nije uočena (slike 15C i 15F). Kako bi se potvrdila specifičnost, urađeno je kontrolno bojenje pri čemu su presece prethodno tretirani diastazom, enzimom koji razgrađuje glikogen. Uočeno je da je tretman diastazom smanjio intenzitet PAS bojenja u odnosu na netretirane preseke (slike 15B i 15E). Oko jedara pojedinih ćelija uočava se intenzivnije bojenje glikogena (slike 15C-F, označeno crnim strelicama).

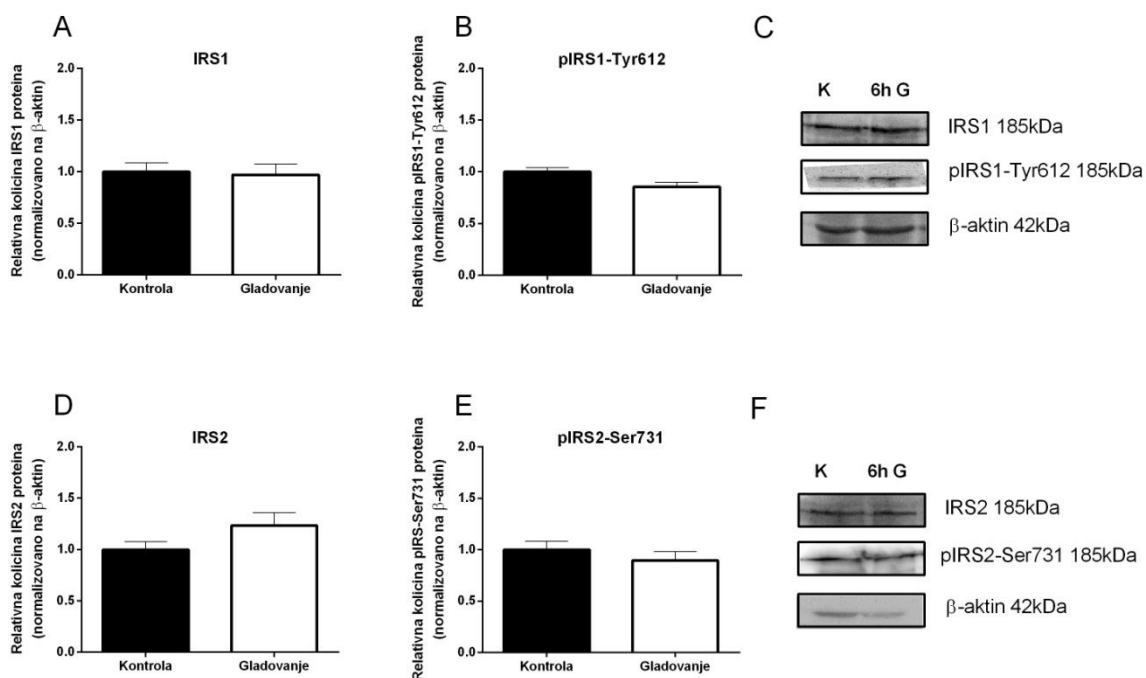


Slika 15. Distribucija glikogena u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Kratkotrajno gladovanje ne utiče na distribuciju glikogena u hipotalamusu (A, D). Kao kontrola bojenja, presece su tretirani diastazom, enzimom koji razgrađuje glikogen (B, E). Na većem uveličanju uočljivo je intenzivnije bojenje glikogena oko ćelijskih jedara (C, F, crne strelice).

4.10. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na insulinske signalne puteve u hipotalamusu

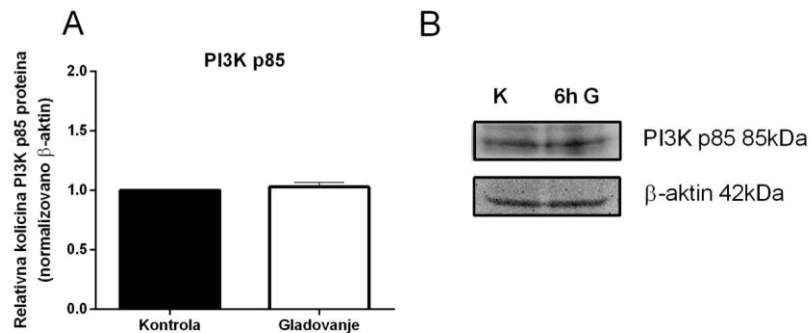
4.10.1. Kratkotrajno gladovanje nije uticalo na aktivaciju PI3K/AKT signalnog puta u hipotalamusu

Količina IRS1 i IRS2 nije bila promenjena u hipotalamusu nakon kratkotrajnog gladovanja (slika 16A; $P=0,8289$; i slika 16D; $P=0,2239$). Pored toga, količina fosforilisanih formi pIRS1-Tyr612, i pIRS2-Ser731 nije bila promenjena nakon šest sati gladovanja (slika 16B; $P=0,2154$; slika 16E; $P=0,3916$).



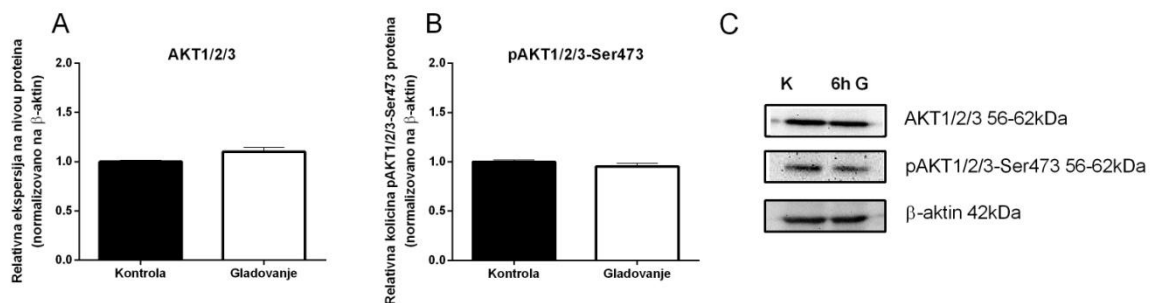
Slika 16. Količina ukupne i aktivne forme IRS1 i IRS2 u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Nakon kratkotrajnog gladovanja ukupna količina IRS1 (A) i IRS2 (D) nije bila promenjena. Takođe, nepromenjena je ostala i količina fosforilisane forme IRS1-Tyr612 (B) i IRS2-Ser731 (E). Reprezentativni imunoblot za IRS1 i pIRS1-Tyr612 (C), IRS2 i pIRS2-Ser731 (F). β -aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje.

Količina regulatorne p85 subjedinice PI3K u ukupnoj proteinskoj frakciji izolovanoj iz hipotalamusa ostala je nepromenjena nakon šestočasovnog gladovanja (slike 17A i B; $P=0,5121$).



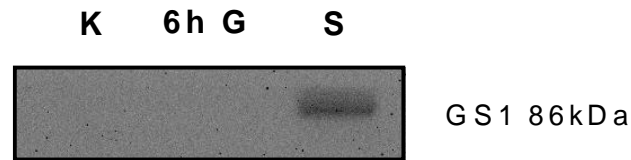
Slika 17. Količina p85 subjedinice PI3K u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Nakon kratkotrajnog gladovanja količina PI3K nije bila promenjena (**A**). Reprezentativni imunoblot za PI3K. β -aktin je korišćen kao kontrola nalivanja (**B**). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje.

Nakon šestočasovnog gladovanja nije zabeležena promena količine AKT1/2/3 (slika 18A; $P=0,2430$) i njegove aktivne forme, fosforilisane na serinskom ostatku 473 (pAKT1/2/3-Ser473, slika 18B; $P=0,0536$).



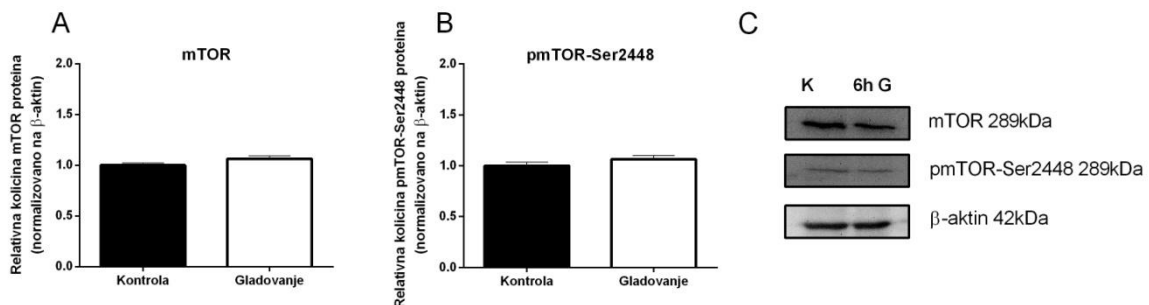
Slika 18. Količina ukupne i fosforilisane forme AKT1/2/3 u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Nakon kratkotrajnog gladovanja ukupna količina AKT1/2/3 nije bila promenjena (**A**). Takođe, nepromenjena je ostala i količina fosforilisane forme AKT1/2/3-Ser473 (**B**). Reprezentativni blot za AKT1/2/3 i pAKT1/2/3-Ser473 (**C**). β -aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje.

Western blot metodom nije detektovan signal za glikogen sintazu tip 1 u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Kao pozitivna kontrola u ovoj analizi korišćen je homogenat proteina izolovanih iz srca, u kojem je detektovana GS1 (slika 19).



Slika 19. Glikogen sintaze 1 nije prisutna u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Primenjenom metodom nije detektovana glikogen sintaza 1 u hipotalamusu kontrolnih, ni izgladnjivanih životinja. U uzorku proteina izolovanih iz srca (pozitivna kontrola) detektovano je prisustvo ovog enzima. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje; S - proteini izolovani iz srca.

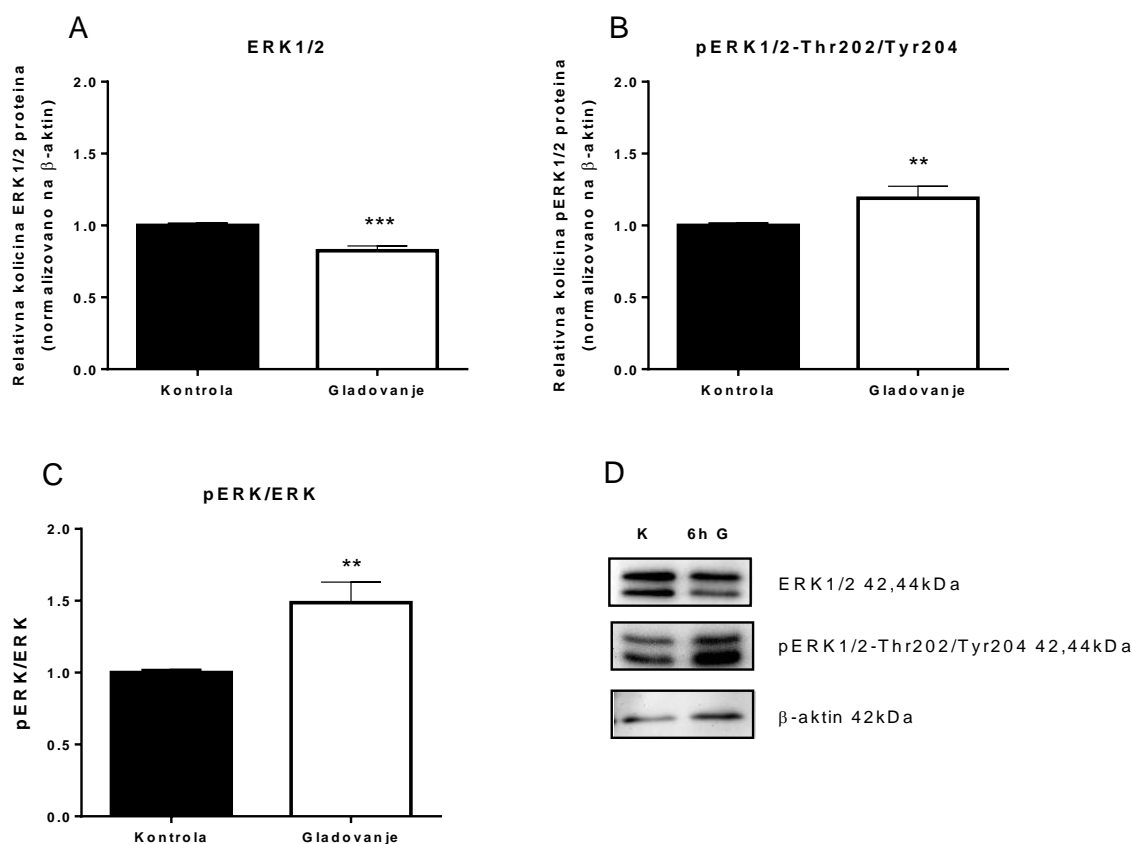
Šestočasovno gladovanje nije dovelo do promene ekspresije mTOR (slika 20A; $P=0,1071$) i njegove aktivne forme, fosforilisane na serinskom ostatku 2448 (pmTOR-Ser2449, slika 20B; $P=0,2186$).



Slika 20. Količina proteina mTOR i njegove fosforilisane forme mTOR-Ser2449. Nakon šest sati gladovanja ukupna količina mTOR, (A) kao i količina pmTOR-Ser2449 (B) u hipotalamusu nije bila promenjena u odnosu na kontrolu. (C) Reprezentativni blot za mTOR, pmTOR Ser2449 i β -aktin koji je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje.

4.10.2. Kratkotrajno gladovanje dovodi do aktivacije MAPK signalnog puta u hipotalamusu

Nakon šest sati gladovanja, količina ERK1/2 u hipotalamusu izgladnjivanih životinja bila je smanjena (slika 21A; $***P=0,0007$), dok je količina aktivne forme pERK1/2 fosforilisane na treoninskom ostatku 202 i tirozinskom ostatku 204 bila povećana (pERK1/2-Thr202/Tyr204, slika 21B; $*P=0,0384$). Analiza odnosa količine fosforilisane i ukupne količine ERK1/2 kod izgladnjivanih i kontrolnih jedinki pokazala je da kratkotrajno gladovanje značajno povećava udeo aktivne forme ovog enzima (slika 21C; $**P=0,0094$).



Slika 21. Količina ERK1/2 i ERK1/2Thr202/Tyr204 u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Kratkotrajno gladovanje dovelo je do smanjenja ekspresije ERK1/2 (A; $***P=0,0007$), ali i do povećanja ekspresije aktivirane forme ERK1/2-Thr202/Tyr204 (B; $*P=0,0384$). Odnos količine fosforilisane i ukupne količine ERK1/2 ukazuje na povećanje stope aktivacije ovog enzima (C; $**P=0,0094$) (D) Reprezentativni blot za ERK1/2, pERK1/2-Thr202/Tyr204 i β -aktin koji je korišćen kao kontrola nalivanja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. K - kontrola; 6h G - kratkotrajno gladovanje.

5. DISKUSIJA

Na osnovu supstrata koji se koristi za dobijanje energije, gladovanje se može podeliti u tri faze: glikogenolitičku, lipolitičku i proteolitičku (McCue, 2010). Prelaz iz jedne u drugu fazu može se pratiti na osnovu promene koncentracije glukoze, slobodnih masnih kiselina, uree i kortikosterona u krvi, ali i na osnovu stope smanjenja telesne mase (Yves Cherel and Le Maho, 1991).

U našoj studiji, telesna masa životinja nakon šest sati gladovanja smanjena je za 2,42% od početne telesne mase. Uprkos tome, telesna masa izgladnjivanih pacova ne menja se značajno u odnosu na masu kontrolnih jedinki. Na osnovu brzine promene telesne mase, kao i koncentracije slobodnih masnih kiselina, uree i kortikosterona u krvi (Vujovic, 2011), procenjeno je da se životinje nakon šest sati gladovanja nalaze u početnoj (glikogenolitičkoj) fazi gladovanja.

Inicijalna faza metaboličkog odgovora na gladovanje traje relativno kratko i tokom nje se glikemija održava razgradnjom glikogena u jetri (Nutter, 1941; Secor and Carey, 2016). Koncentracija glukoze u krvi nakon kratkotrajnog gladovanja bila je značajno smanjena, ali izmerene vrednosti ($6,03 \pm 0,27$ mmol/l) su i dalje bile u okvirima normoglikemije (Bráslašū et al., 2007). Takođe, nakon šestočasovnog gladovanja bila je smanjena i količina glikogena u jetri. Zajedno, ovi rezultati ukazuju na to da se glikemija tokom šest sati gladovanja održava razgradnjom glikogena iz jetre, što dodatno potvrđuje zaključak da su se izgladnjivane životinje na kraju ispitivanog perioda nalazile u inicijalnoj, tzv. glikogenolitičkoj fazi odgovora na izostanak unosa hrane. Nakon kratkotrajnog gladovanja, zabeležena je i smanjena koncentracija insulina u krvi, što je u skladu sa već poznatom činjenicom da se tokom gladovanja smanjuje sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa (Maruyama et al., 1984).

Gladovanje narušava energetske homeostazu organizma koja je pod kontrolom hipotalamusa koji predstavlja mesto integracije centralnih i perifernih signala koji regulišu energetske status organizma (Schwartz et al., 2000). U okviru studije o uticaju različite dužine trajanja gladovanja na ekspresiju neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze, detektovano je povećanje količine insulina u tkivu hipotalamusa nakon

šestočasovnog gladovanja. S obzirom da je poznato da insulin ima anoreksigeno dejstvo (Chavez et al., 1996), ovo saznanje je otvorilo mnogobrojna pitanja. Stoga je glavni cilj ove disertacije bio detaljno analiziranje povećane količine insulina u hipotalamusu nakon šestočasovnog gladovanja, kao i razjašnjavanje njegove potencijalne uloge.

Prisustvo insulina u CNS odavno je potvrđeno (Devaskar et al., 1993; Havrankova et al., 1978; Singh et al., 1997; Young, 1986), ali pitanje njegovog porekla je i dalje predmet brojnih diskusija. Sa jedne strane poznato je da insulin receptor-posredovanom transcitozom prolazi kroz KMB. S tim u vezi neki autori tvrde da je insulin prisutan u centralnom nervnom sistemu isključivo perifernog porekla (Banks, 2004; Baskin et al., 1985). Sa druge strane postoje brojne *in vivo* i *in vitro* studije koje ukazuju na mogućnost sinteze insulina u centralnom nervnom sistemu (Clarke et al., 1986; Devaskar et al., 1993; Dorn et al., 1983; Dorn et al., 1982; Havrankova et al., 1978; Schechter et al., 1996; Young, 1986).

U našoj studiji prvobitno je pokazano da šestočasovno gladovanje povećava količinu insulina detektovanog u hipotalamusu pacova. Povećano prisustvo insulina u ovom moždanom regionu nakon kratkotrajnog gladovanja se iz nekoliko razloga ne može pripisati isključivo transportu ovog hormona kroz KMB. Kao prvo, tokom gladovanja dolazi do smanjenja koncentracije insulina u sistemske cirkulaciji, ali i do smanjenja stope njegovog transporta kroz KMB (Strubbe et al., 1988). Stoga je sledeći korak bio ispitivanje efekta kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju iRNK za *Ins2*. Naši rezultati pokazali su da je povećanje količine insulina u parenhimu hipotalamusa, bilo praćeno i povećanjem iRNK za ovaj hormon. Ekspresija iRNK za *Ins2* potvrđena je i u CNS miša (Mehran et al., 2012), kao i u GABA-ergičkim neuronima u korteksu cerebruma pacova (Molnar et al., 2014). Dodatno, u DNK izolovanoj iz mozga miša pokazana je aktivnost promotora gena karakterističnih za β -ćelije pankreasa (Song et al., 2010; Wicksteed et al., 2010). Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da se povećanje količine insulina u hipotalamusu nakon kratkotrajnog gladovanja bar delimično može pripisati *de novo* sintezi ovog hormona.

Treba naglasiti da je povećana ekspresija insulina u našoj studiji bila detektovana u uslovima gde je koncentracija glukoze u krvi, iako značajno smanjena u odnosu na

kontrolne vrednosti, i dalje bila u normoglikemičnom opsegu. U većini sličnih studija koje su ispitivale uticaj gladovanja, životinje su bile u stanju produženog gladovanja što je proizrokovalo hipoglikemiju i hipoinsulinemiju (Cardoso et al., 2010; Cranston et al., 1998; Moreira et al., 2005). Razlog zašto u drugim studijama do sada nije zabeležen fenomen povećanja ekspresije insulina u hipotalamusu tokom gladovanja možda leži u ovoj činjenici.

Nakon što je potvrđeno da kratkotrajno gladovanje indukuje povećanje ekspresije insulina u hipotalamusu, cilj je bio utvrditi u kom regionu hipotalamusa dolazi do njegove sinteze, kao i koji tip ćelija eksprimira insulin. Stoga su primenom imunohistohemijskih metoda analizirani preseki mozga izglednijanih i kontrolnih životinja. Insulin je detektovan u jedrima hipotalamusa koja su uključena u regulaciju energetske homeostaze, kao što su ARC, VMN, DMN. Međutim, u ovim jedrima nije uočena razlika između kontrolnih i izglednijanih životinja. Pored toga, insulin je detektovan i u PeV, s tim da je veća imunopozitivnost za insulin zabeležena na presecima hipotalamusa izglednijanih životinja. Ovo jedro primarno nije uključeno u regulaciju energetske homeostaze, ali je prisustvo iRNK za *Ins2* u njemu davno zabeleženo primenom *in situ* hibridizacije (Young, 1986).

U našem istraživanju je insulinska imunopozitivnost detektovana u neuronima, što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima (Mehran et al., 2012; Molnar et al., 2014; Schechter et al., 1996, 1988). Tokom ranijih istraživanja insulinska imunoreaktivnost je detektovana u endoplazmatičnom retikulumu, Glodžijevom aparatu, citolazmi, aksonima, i dendritima neurona (Schechter et al., 1996, 1988). Sinteza insulina u neuronima zabeležena je i u *in vitro* uslovima. Naime, pokazano je da neuroni pacova u kulturi sekretuju insulin nakon hemijski indukovane depolarizacije membrane (Clarke et al., 1986).

Prisustvo proinsulina u našoj studiji utvrđeno je i u endimskim ćelijama koje okružuju treću moždanu komoru. Prisustvo insulina je ranije već detektovano u citoplazmi i nastavcima endimskih ćelija i tancita (Pansky and Hatfield, 1978). S obzirom da je u našem eksperimentu prisustvo insulina bilo uočljivije u blizini apikalne membrane, može se pretpostaviti da su endimske ćelije verovatno uključene u sekreciju insulina u cerebrospinalnu tečnost (CST). U prilog ovoj tvrdnji ide i rezultat da koncentracija insulina u cerebrospinalnoj tečnosti nije bila smanjena, za razliku od koncentracije ovog hormone u

sistemske cirkulaciji, kao i činjenica da se transport insulina kroz KMB smanjuje tokom gladovanja (Strubbe et al., 1988). Ideja o poreklu insulina u CST delimično iz krvi, a delimično iz parenih mozga razmatrana je i u drugim studijama (Plata-Salamán, 1991). Uzimajući u obzir sve navedeno može se zaključiti da insulin sekretovan iz ependimskih ćelija bar delimično doprinosi održanju koncentracije insulina u cerebrospinalnoj tečnosti tokom gladovanja.

Dakle, povećanje ekspresije insulina na nivou iRNK i na nivou proteina u uslovima hipoinsulinemije i normoglikemije zabeležene u našoj studiji, ukazuje da tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do *de novo* produkcije insulina u hipotalamusu pacova. Dalje se nametnulo pitanje u čemu je adaptivni značaj ovog gladovanjem indukovano prolaznog povećanja ekspresije insulina u hipotalamusu. Stoga je sledeći korak u okviru naših istraživanja bio ispitivanje uloge *de novo* sintetisanog insulina. Osnovna funkcija insulina je stimulacija preuzimanja glukoze od strane skeletnih mišića i masnog tkiva (Cushman and Wardzala, 1980; Suzuki and Kono, 1980), kao i sinteza glikogena u jetri i skeletnim mišićima (Fleig et al., 1987; Roden et al., 1996). Glukoza predstavlja glavni supstrat za dobijanje energije u neuronima i stoga je neophodno da ove ćelije uvek imaju na raspolaganju dovoljnu količinu glukoze. S tim u vezi postoje brojni regulatorni mehanizmi koji štite moždano tkivo od naglih promena koncentracije glukoze u krvi (Mitrakou et al., 1991). Generalno, smatra se da je glukozni metabolizam u mozgu nezavistan od dejstva insulina (Camandola and Mattson, 2017). Međutim, činjenice da se u mozgu ekspimiraju dve insulin-zavisne izoforme glukoznih transportera, GLUT4 i 8 (Sankar et al., 2002), kao i da u pojedinim moždanim regionima potvrđena njihova kolokalizacija sa insulinskim receptorom, (Alquier et al., 2006) ukazuju da insulin može uticati na glukozni metabolizam u CNS. Pored toga, postoje studije koje ukazuju da transport glukoze i/ili njen metabolizam u nekim tipovima moždanih ćelija može menjati pod uticajem insulina. Naime, pokazano je da insulin stimuliše preuzimanje 2-deoksi-D-glukoze (2DG) u kulturi glijskih ćelija pacova (Clarke et al., 1984). Uzimajući u obzir prethodno navedene literaturne podatke, jedan od ciljeva ove disertacije je bio i ispitivanje da li glukozni transporteri u hipotalamusu u uslovima kratkotrajnog gladovanja i povećane koncentracije insulina mogu biti njime

regulisani, odnosno da li kratkotrajnim gladovanjem indukovano povećanje ekspresije insulina ima ulogu u regulisanju preuzimanja glukoze od strane nervnih ćelija.

Najpre je analizirana ekspresija (IR) i njegove fosforilisane forme u hipotalamusu. Analizirana je fosforilacija IR na Tyr-1361 za koju je poznato da dovodi do aktivacije insulinskog receptora i ispoljavanja plejotropnih efekata insulina (Giudice et al., 2013). Nakon šestočasovnog gladovanja ekspresija IR i pIR-Tyr1361 u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa bila je povećana. Odnos pIR-Tyr1361/IR bio je povećan, što ukazuje da povećana ekspresija pIR-Tyr1361 nije posledica samo povećanja ukupne količine receptora, već da dolazi do povećane fosforilacije, odnosno aktivacije receptora. Imunohistohemijskim metodama analizirana je anatomska distribucija. Signal za pIR-Tyr1361 detektovan je na vrhu treće moždane komore u PeV, ali i na dnu treće moždane komore u blizini ARC. Dobijeni rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima u kojima je pokazano da se IR eksprimira u hipotalamusu, hipokampusu, olfaktornim bulbusima i cerebelumu (Marks et al., 1990; Obici et al., 2002a; Werther et al., 1987). U hipotalamusu, IR je detektovan u DMN i ventromedijalnom delu ARC, ali i u PeV (Obici et al., 2002a). Činjenica da su nakon šest sati gladovanja u našem eksperimentu, i insulin i pIR-Tyr1361 detektovani u PeV ukazuje da *de novo* sintetisani insulin najverovatnije deluje kao parakrini signal.

Kako bismo dalje ispitali da li *de novo* sintetisani insulin ima ulogu u regulaciji glukoze homeostaze, analizirali smo ekspresiju četiri izoforme glukoznih transportera koje su najzastupljenije u mozgu GLUT1-4, kao i njihovu koekspresiju sa aktivnom formom insulinskog receptora. Ekspresija glukoznih transportera u hipotalamusu analizirana je u ukupnoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa, kao i u membranskoj frakciji, budući da samo transporteri ugrađeni u ćelijsku membranu učestvuju u transportu glukoze.

GLUT1 i GLUT3 su dve najzastupljenije izoforme glukoznih transportera u mozgu. Povećanje ekspresije GLUT1 i GLUT 3 zabeleženo je u svakoj od frakcija. Ovi rezultati ukazuju da je nakon kratkotrajnog gladovanja došlo, ne samo do povećanja količine GLUT1 i GLUT3 proteina u hipotalamusu, već i do povećanja stope njihove ugradnje u ćelijsku membranu. Uprkos povećanju ekspresije GLUT1 i GLUT3, kratkotrajno gladovanje nije dovelo do promene u regionalnoj distribuciji u okviru hipotalamusa.

Imunofluorescentnim bojenjem pokazano je da je GLUT1 homogeno distribuiran u parenhimu hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Pored toga, signal za GLUT1 zabeležen je i u endotelnim ćelijama krvnih sudova. Takođe, u skladu sa rezultatima drugih istraživanja, GLUT1 je detektovan u ependimskim ćelijama koje okružuju moždane komore, kao i u horoidnom pleksusu (Nualart et al., 1999; Silva-Alvarez et al., 2005; Vannucci et al., 1998). U skladu sa nalazima ranijih studija (Leino et al., 1997; Maher et al., 1991; Mantych et al., 1992; Vannucci et al., 1997), na presecima hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja, GLUT3 je detektovan u nastavcima i telu neurona u okviru subventrikularne zone, u regionu PeV i PVN.

U moždanom tkivu eksprimira se i GLUT2, ali u znatno manjoj meri u poređenju sa GLUT1 i 3 (Brant et al., 1993). Njegovo prisustvo zabeleženo je u neuronima i astrocitima u okviru PVN, LH, ARC i *nucleus tractus solitarius*, ali i u ependimskim ćelijama i tancitima koje okružuju treću moždanu komoru (De los Angeles García et al., 2003; Leloup et al., 1994; Penicaud et al., 2002). U našoj studiji prisustvo GLUT2 detektovano je u neuronima hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja, ali i u ependimskim ćelijama i tancitima koje okružuju treću moždanu komoru. U skladu sa drugim istraživanjima (Leloup et al., 1994; Roncero et al., 2004) i u našem istraživanju je najveći broj neurona koji eksprimira GLUT2 zabeležen u PVN i VMN. Kratkotrajno gladovanje nije uticalo na regionalnu distribuciju GLUT2, kao ni na njegovu ekspresiju, ali je zabeleženo povećanje količine ovog transportera u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa.

Pored navedenih glukoznih transportera u različitim moždanim regionima detektovano je prisustvo insulin-zavisnog glukoznog transportera, GLUT4 (Duelli and Kuschinsky, 2001). GLUT4 je detektovan u hipotalamusu, ali i u drugim moždanim regionima uključujući cerebelum, talamus i cerebralni korteks (Brant et al., 1993; Choeiri et al., 2002; Kobayashi et al., 1996; Vannucci et al., 1998). U hipokampusu je zabeleženo da insulin stimuliše ugradnju GLUT4 u ćelijsku membranu (Grillo et al., 2009). Naši rezultati su pokazali da je ekspresija insulin-zavisnog GLUT4 transportera u ukupnoj frakciji proteina bila povećana nakon kratkotrajnog gladovanja. Međutim, količina ovog receptora u membranskoj frakciji ostala je nepromenjena. Njegovo prisustvo je zabeleženo u

ependimskim ćelijama oko treće moždane komore i sporadično u pojedinim neuronima u hipotalamusu.

Postavlja se pitanje koji faktori su doveli do povećanje ekspresije glukoznih transportera nakon kratkotrajnog gladovanja i da li *de novo* sintetisani insulin potencijalno ima ulogu u ovim procesima? GLUT1 i GLUT3 su dve najzastupljenije izoforme glukoznih transportera u mozgu. Konstitutivno su prisutni u ćelijskoj membrani i ne reaguju na stimulaciju insulinom, stoga se smatra da je preuzimanje glukoze u mozgu insulin-nezavisan proces (Camandola and Mattson, 2017). Međutim, poznato je da pod određenim uslovima translokacija nekih glukoznih transportera može da promeni svoju osetljivost prema insulinu. Na primer, u mišićnim ćelijama insulin stimuliše ugradnju GLUT4 u ćelijsku membranu (Furtado et al., 2002). Međutim, tokom vežbanja do translokacije GLUT4 u ćelijsku membranu može doći nezavisno od dejstva insulina. Naime, mišićne kontrakcije omogućavaju ugradnju GLUT4 posredstvom procesa koji uključuju AMP-aktiviranu proteinsku kinazu (AMPK) i Ca^{2+} (Richter and Hargreaves, 2013).

Insulin može da stimuliše ugradnju GLUT1 u ćelijsku membranu miocita, ali u znatno manjoj meri u poređenju sa GLUT4 (Calderhead et al., 1990). Međutim, insulin ne reguliše ekspresiju iRNK i proteina GLUT1 u svim ćelijama koje sintetišu ovaj membranski transporter (McGowan et al., 1995). Na primer, smatra se da je olakšana difuzija glukoze posredstvom GLUT1 u nervne ćelije proces nezavisan od dejstva insulina (Camandola and Mattson, 2017). Nasuprot tome, pokazano je da insulinom aktivirani PI3K signalni put povećava translokaciju GLUT1 u ćelijsku membranu kardiomiocita (Cura, 2010). Takođe, u ćelijskim linijama L6 (ćelije mioblasta) i 3T3-L1 (adipociti) zabeleženo je da insulin stimuliše sintezu GLUT1 posredstvom mTOR/p70 S6 signalnog puta (Taha et al., 1995; Taha and Klip, 1999). U našoj studiji nije uočena koekspresija GLUT1 i aktivne forme insulinskog receptora nakon kratkotrajnog gladovanja. Odsustvo koekspresije GLUT1 i pIR-Tyr1361 ukazuje da je preuzimanje glukoze u hipotalamusu posredstvom ovog transportera proces nezavistan od dejstva insulina. U drugim studijama pokazano je da različiti faktori mogu uticati na ekspresiju i translokaciju GLUT1 u ćelijsku membranu. Tako na primer faktori rasta prisutni u serumu povećavaju ekspresiju GLUT1 i stimulišu preuzimanje glukoze od strane fibroblasta gajenih u kulturi (McGowan et al., 1995).

Povećana ekspresija GLUT1 zabeležena je i u kulturi neurona i glijskih ćelija usled hipoksije i/ili nedostatka glukoze (Bruckner et al., 1999). Pretpostavlja se da je *in vivo* glavni regulator ekspresije GLUT1, koncentracija glukoze u krvi koja utiče na njegovu ekspresiju i na nivou proteina i iRNK (Koranyi et al., 1991; Kumagai et al., 1995; Nagamatsu et al., 1994; Shah et al., 2012; Simpson et al., 1999). Sa jedne strane, hipoglikemija povećava ekspresiju GLUT1 na nivou proteina i iRNK, dok hiperglikemija smanjuje količinu iRNK za GLUT1, ali ne utiče na količinu proteina (Koranyi et al., 1991). Nakon kratkotrajnog gladovanja koncentracija glukoze u krvi je bila smanjena, te je naša pretpostavka da je upravo ovo smanjenje glukoze u krvi dovelo do povećane ekspresije GLUT1 u hipotalamusu.

Povećanje ekspresije GLUT3 transportera može biti uslovljeno različitim faktorima. Hipoglikemija nastala nakon 72h gladovanja, dovodi do povećanja iRNK za GLUT3 u hipokampusu, kao i cerebralnom i piriformnom korteksu miševa (Nagamatsu et al., 1994). Hronična insulinom-indukovana hipoglikemija takođe povećava ekspresije GLUT3 u moždanom tkivu miša (Uehara et al., 1997). Slično zapaženja zabeleženo je u kulturi neurona gde je u uslovima hipoglikemije i/ili hipoksije povećana ekspresija iRNK za GLUT3 (Espinoza-Rojo et al., 2010; Nagamatsu et al., 1994). Iako neuroni poseduju receptore za insulin (Schulingkamp et al., 2000), preuzimanje glukoze od strane neurona uglavnom nije stimulisano dejstvom ovog hormona (Heidenreich et al., 1989). *In vitro* insulin u neuronima stimuliše translokaciju vezikula koje sadrže GLUT3 do ćelijske membrane, međutim ne dovodi do njihove fuzije sa membranom i samim tim ne utiče na preuzimanje glukoze (Uemura and Greenlee, 2006). Nakon depolarizacije ćelije visokom vanćelijskom koncentracijom K^+ , vezikule koje sadrže GLUT3 fuzionišu se sa membranom (Uemura and Greenlee, 2006) što dalje rezultuje povećanjem stope preuzimanja glukoze (Uemura and Greenlee, 2001). U kulturi skeletno-mišićnih ćelija je pokazano da insulin aktivacijom MAPK signalnog puta stimuliše biosintezu GLUT3 (Taha and Klip, 1999). U našoj studiji, nakon kratkotrajnog gladovanja je zabeleženo povećanje količine, kako insulina, tako i GLUT3 u hipotalamusu. Osim toga, zabeleženo je i povećanje količine pERK1/2-Thr202/Tyr204, odnosno aktivacija MAPK signalnog puta. Međutim, naši rezultati su pokazali da ne postoji koekspresija GLUT3 sa pIR-Tyr1361, što ukazuje da se

preuzimanje glukoze od strane neurona posredstvom GLUT3 najverovatnije odvija procesom nezavisnim od dejstva insulina. Ekspresija GLUT3 je zabeležena u različitim regionima mozga, naročito onim sa visokom stopom metaboličke aktivnosti (Espinoza-Rojo et al., 2010), a *in vivo* je pokazano da zajedno sa povećanjem cerebralne potrošnje glukoze dolazi do povećanja ekspresije GLUT3 (Espinoza-Rojo et al., 2010). Na osnovu rezultata drugih studija, može se samo spekulirati da je stimulus za povećanje ekspresije GLUT3 tokom šestočasovnog gladovanja bilo smanjenje koncentracije glukoze u krvi.

Nakon kratkotrajnog gladovanja ekspresija GLUT2 je ostala nepromenjena, ali je povećana količina ovog transportera u ćelijskoj membrani. S obzirom da ne postoji preklapanje u anatomskoj lokalizaciji pIR-Tyr1361 i GLUT2, zaključeno je da insulin sintetisan u hipotalamusu nakon kratkotrajnog gladovanja verovatno nije uticao na ugradnju ovog glukoznog transportera u ćelijsku membranu. Stoga se nametnulo pitanje koji faktori su mogli dovesti do povećane ugradnje GLUT2 u ćelijsku membranu. Pretpostavka je da, kao i u slučaju GLUT1 i GLUT3, stimulus predstavlja smanjenje koncentracije glukoze u krvi (Koranyi et al., 1991; Kumagai et al., 1995; Nagamatsu et al., 1994; Shah et al., 2012; Simpson et al., 1999).

Izvan CNS, glavni regulator ekspresije GLUT4 i njegove ugradnje u ćelijsku membranu je insulin (Birnbaum, 1989; James et al., 1989). U mišićnim ćelijama i adipocitima, insulin preko PI3K-AKT/PKB aktivacije stimuliše translokaciju GLUT4 u ćelijsku membranu (Wilcox, 2005a). Na isti način, insulin u neuronima hipokampusa stimuliše translokaciju GLUT4 i preuzimanje glukoze (Grillo et al., 2009). Činjenica da količina GLUT4 u membranskoj frakciji nije bila promenjena, ukazuje da lokalno sintetisan insulin tokom kratkotrajnog gladovanja ne utiče na njegovu translokaciju. Odsustvo značajnije koekspresije GLUT4 i pIR-Tyr1361 dodatno potvrđuje da insulin nije uključen u procese translokacije GLUT4, ali pored toga ukazuje i da nije uticao na povećanje ekspresije ovog transportera detektovanog u ukupnoj proteinskoj frakciji. Postavlja se pitanje koji faktori su mogli dovesti do povećanja količine GLUT4. Smatra se da ekspresija GLUT4 u mozgu može biti stimulirana promenama koncentracije insulina i/ili glukoze u krvi (McCall, 2004). U drugoj studiji, nakon četiri dana gladovanja ekspresija iRNK za GLUT4 u hipotalamusu i cerebelumu se ne menja (Alquier et al., 2006). Rezultati dobijeni nakon

šest sati gladovanja, u uslovima hipoinsulinemije, ukazuju na povećanje ekspresije GLUT4, što nije u skladu sa rezultatima drugih studija, gde je takođe u uslovima hipoinsulinemije zabeleženo smanjenje GLUT4 u ukupnoj proteinskoj frakciji (Vannucci et al., 1998), ili nije zabeležena promena ekspresije iRNK za GLUT4 (Alquier et al., 2006). Objašnjenje različitih rezultata dobijenim u drugim i našoj studiji možda leži u razlikama u koncentraciji glukoze u krvi. Važno je naglasiti da se nakon kratkotrajnog gladovanja iako je koncentracija glukoze u krvi smanjena ona i dalje nalazi u okvirima normoglikemije, dok je nakon četiri dana gladovanja zabeležena hipoglikemija (Alquier et al., 2006).

Dakle, kako bi glukoza iz krvi dospela u vanćelijsku tečnost mozga, mora prvo da prođe KMB. Ovaj proces odvija se posredstvom GLUT1 transportera koji omogućava kontinuiran influks glukoze u mozak nezavisno od njene koncentracije u krvi (McAllister et al., 2001; Ngarmukos et al., 2001). U mozgu se eksprimiraju dve izoforme GLUT1 koje se razlikuju po molekulskoj masi, ali i tipu ćelija koje ih eksprimiraju (Maher et al., 1993; Sivitz et al., 1989). Nakon šest sati gladovanja, u membranskoj frakciji proteina izolovanih iz hipotalamusa detektovane su obe izoforme GLUT1 (45kDa i 55kDa), te su odvojeno analizirane. Pokazano je da kratkotrajno gladovanje dovodi do značajnog povećanja količine mikrovaskularne izoforme GLUT1 od 55kDa, ali ne i astrocitne izoforme od 45kDa. U drugim studijama, u uslovima akutne i hronične hipoglikemije je uočeno povećanje GLUT1 od 55kDa, ali ne i promena ekspresije GLUT1 od 45kDa (Simpson et al., 1999; Uehara et al., 1997). Takođe, tokom hronične hipoglikemije zabeleženo je i povećanje stope olakšane difuzije glukoze kroz KMB (McCall et al., 1986). Neke studije ukazuju da u endotelnim ćelijama postoji asimetrična distribucija GLUT1, tj. da se četiri puta više ovih transportera nalazi na abluminalnoj u odnosu na luminalnu strane membrane (Farrell and Pardridge, 1991). Promena odnosa broja GLUT1 transportera na luminalnoj i abluminalnoj strani endotelnih ćelija je verovatno mehanizam kojim se postiže promena stope preuzimanja glukoze iz krvi u mozak (Patching, 2017; Simpson et al., 2007). Naime, oko 40% endotelnih GLUT1 transportera zabeleženo je u unutar ćelije. U uslovima povećanje energetske potražnje zahvaljujući prisustvu dovoljne količine unutarćelijskog GLUT1 omogućeno je brzo ugrađivanje ovog transportera u membranu (Farrell and Pardridge, 1991). Nakon kratkotrajnog gladovanja, u našoj studiji potvrđeno je prisustvo

GLUT1 u endotelnim ćelijama, ali zbog nedovoljne osetljivosti imunofluorescentne metode, nije bilo moguće proceniti raspodelu transportera u luminalnoj i abluminalnoj strani membrane endotelnih ćelija. U svakom slučaju, šestočasovno gladovanje dovelo je do povećanja ekspresije sveukupnog GLUT1 i njegove povećane ugradnje u ćelijsku membranu, čime je omogućen pojačan transport glukoze iz krvi u mozak. Važno je naglasiti činjenicu da je koncentracija glukoze u CST ostala nepromenjena nakon šestočasovnog gladovanja, iako je koncentracija glukoze u krvi značajno opala. Održavanje koncentracije glukoze u CST je od velike važnosti za neometano funkcionisanje centralnog nervnog sistema u uslovima narušene energetske homeostaze, a naši rezultati ukazuju da povećan transport glukoze kroz KMB omogućen povećanom ekspresijom GLUT1 55kDa doprinosi njenom održavanju tokom kratkotrajnog gladovanja.

Nakon ulaska u vanćelijsku tečnost mozga, molekul glukoze može da bude preuzet od strane neurona ili glijskih ćelija. Neuroni preuzimaju glukozu GLUT3 transporterom i primarno je koriste kao izvor piruvata koji se zatim koristi u procesima oksidativne fosforilacije za produkciju ATP. Sa druge strane, astrociti glukozu preuzimaju posredstvom izoforme GLUT1 od 45 kDa i koriste je za glikolizu ili sintezu glikogena (Benarroch, 2014). Nakon kratkotrajnog gladovanja količina astrocitne GLUT1 izoforme u membranskoj frakciji nije bila promenjena, dok je količina GLUT3 bila povećana i u ukupnoj, i u membranskoj frakciji. Slični rezultati dobijeni su u studiji u kojoj je insulinom indukovana hipoglikemija i gde je zabeleženo povećanje ekspresije GLUT1 55kDa i GLUT3, ali ne i GLUT1 45kDa (Uehara et al., 1997). Na osnovu matematičkih modelovanja, neke studije ukazuju da neuroni imaju veći kapacitet za transport glukoze u odnosu na astrocite (Bélangier et al., 2011). Dodatno, *in vitro* je pokazano da se u uslovima nedostatka glukoze u neuronima povećava stopa preuzimanje 2DG, dok se kod astrocita ne menja (Hara et al., 1989). Rezultati naše studije i već postojeći literaturni podaci, navode na zaključak da se tokom inicijalne faze gladovanja, neuronima daje prioritet u odnosu na astrocite u kontekstu snabdevanja glukozom.

Rezultati dobijeni u našim eksperimentima idu u prilog tradicionalnom shvatanju glukoznog metabolizma u mozgu, prema kome, neuroni, usled visokih energetske zahteva, imaju prednost u korišćenju glukoze u odnosu na astrocite. Devedesetih godina prošlog

veka predložena je alternativna hipoteza prema kojoj neuroni prvenstveno koriste laktat nastao razgradnjom glikogena u astrocitima (Pellerin and Magistretti, 1994). Prema ovoj hipotezi astrociti preuzimaju više glukoze nego što im je potrebno za zadovoljenje svojih energetske potrebe i koriste je za sintezu i skladištenje glikogena (Pellerin and Magistretti, 1994). U uslovima povećane metaboličke aktivnosti neurona, glikogen se u astrocitima razgrađuje do laktata, koji se posredstvom MCT1 i MCT4 transportuje iz ovih ćelija u vanćelijsku tečnost, odakle ga neuroni preuzimaju preko MCT2 i koriste kao substrat za dobijanje energije (Bélanger et al., 2011; McCall, 2004; Pellerin and Magistretti, 1994). Međutim, pokazano je da transporter za glukozu (GLUT3) i laktat (MCT2) na neuronima imaju veći afinitet prema svojim supstratima nego odgovarajući transporter astrocita (GLUT1, MCT1 i MCT4) (Barros and Deitmer, 2010; Simpson et al., 2007). Novije studije ukazuju da tokom povećane nervne aktivnosti prvenstveno neuroni preuzimaju glukozu (Díaz-García et al., 2017; Lundgaard et al., 2015). Pored toga, zabeležena je veća ekspresija heksokinaze u neuronima nego u astrocitima na presecima hipokampusa miševa, a slični rezultati su dobijeni i analizom humanih moždanih preseka (Lundgaard et al., 2015). Navedene studije, uključujući i našu idu u prilog tradicionalnom shvatanju glukoznog metabolizma prema kome se neuronima daje prioritet u odnosu na astrocite u kontekstu snabdevanja glukozom.

GLUT2 ima važnu ulogu u regulaciji glukozne homeostaze i na periferiji, i u CNS. Pojedini neuroni u hipotalamusu eksprimiraju GLUT2, glukokinazu i Kir6.2 (eng. *inward-rectifier potassium ion channel*), pa se smatra da slično β -ćelijama pankreasa, imaju ulogu u detektovanju promena koncentracije glukoze u moždanoj vanćelijskoj tečnosti (Burdakov et al., 2005). Neuroni u okviru VMN i *nucleus tractus solitarius* koji eksprimiraju GLUT2 (Marty et al., 2005) mogu biti aktivirani usled hipoglikemije i stimulisati sekreciju glukagona iz pankreasa (Thorens, 2014). Pored toga, GLUT2 u mozgu je neophodan za regulaciju ishrane i termogeneze. Kod miševa kojima je inaktiviran gen za GLUT2 u neuronima zabeležen je povećan unos hrane i netolerancija na niske temperature (Lamy et al., 2014). U okviru CNS, ulogu u detekciji promena u koncentraciji glukoze u vanćelijskoj tečnosti nemaju samo neuroni koji eksprimiraju GLUT2 i glukokinazu. Prethodno je pomenuto da endotelne ćelije regulišu transport glukoze iz krvi u mozak. Pored toga,

specijalizovane endodimske ćelije, tzv. taniciti, imaju važnu ulogu u održavanju koncentracije glukoze u cerebrospinalnoj tečnosti (CST). Ove ćelije su apikalnom membranom u kontaktu sa CST, dok se na bazalateralnoj strani njihovi nastavci projektuju do oreksigenih i anoreksigenih neurona u ARC i VMN (Barahona et al., 2018). Takođe, u okviru ARC nastavci tanicita su u kontaktu sa kapilarima KMB i omogućavaju transport makromolekula procesom transcitoze između krvi i CST (Langlet, 2014). Poznato je da taniciti eksprimiraju i GLUT1 (Silva-Alvarez et al., 2005), i GLUT2 (De los Angeles García et al., 2003) i da imaju važnu ulogu u prenosu hemijskih signala iz CST do neurona u hipotalamusu (Bolborea and Dale, 2013; Goodman and Hajhosseini, 2015). Ciljana inaktivacija GLUT2 u tanicitima dovodi do povećanja unosa hrane i sledstveno do povećanja telesne mase (Barahona et al., 2018).

U našem istraživanju zabeleženo je povećanje količine GLUT2 u ćelijskoj membrani, a njegovo prisustvo je detektovano u neuronima hipotalamusa kontrolnih i izgladnjivanih životinja, ali i u endodimskim ćelijama i tanicitima koje okružuju treću moždanu komoru. S obzirom da je u našoj studiji prisustvo GLUT2 detektovano u endodimskim ćelijama i tanicitima koje okružuju treću moždanu komoru, pretpostavlja se da bi ove ćelije koje čine vezu između krvi i CST, mogle učestvovati u regulaciji koncentracije glukoze u cerebrospinalnoj tečnosti tokom gladovanja. Sa druge strane, poznato je da neuroni imaju veće energetske zahteve u poređenju sa astrocitima i da su osetljiviji na lokalno smanjenje dostupnosti glukoze (Bélanger et al., 2011; Hara et al., 1989), pa bi ova činjenica mogla da objasni fiziološki značaj povećane ugradnje GLUT2 u membrane neurona. Međutim, kako bi se tačno utvrdio fiziološki značaj povećane ugradnje GLUT2, ostaje da se razjasni da li je do povećane ugradnje došlo u membranama neurona i/ili endodimskih ćelija i tanicita.

Dakle, analizom ekspresije različitih glukoznih transportera i njihove koekspresije sa aktivnom formom receptora za insulin, zaključeno je da *de novo* sintetisani insulin nije uticao na ekspresiju i translokaciju glukoznih transportera u hipotalamusu nakon šestočasovnog gladovanja. Na osnovu pregleda literaturnih podataka moguće je izvesti zaključak da ulogu stimulusa u regulaciji ekspresije i translokacije glukoznih transportera imaju koncentracija glukoze i/ili insulina u sistemskoj cirkulaciji. Mehanizmi ovih procesa

tek treba da budu ispitani. Pored toga, može se zaključiti da tokom inicijane faze gladovanja, neuronima daje prioritet u odnosu na astrocite u kontekstu snabdevanja glukozom.

Opšte je poznato da insulin u jetri i mišićima pored uloge u preuzimanju glukoze, stimuliše i sintezu glikogena (Cohen et al., 1978; Rui, 2014). Glikogen sintaza (GS), enzim uključen u sintezu glikogena, katalizuje ugradnju glukoze u glikogen (Stalmans et al., 1987). Kinaza glikogen sintaze 3 je najvažniji enzim koji učestvuje u regulaciji aktivnosti GS (Taha and Klip, 1999). Insulin preko PI3K-AKT/PKB signalnog puta fosforiliše GSK3 i na taj način je inaktivira. Nakon inaktivacije GSK3 dolazi ne dolazi do fosforilacije i sledstvene aktivacije GS (Taniguchi et al., 2006). U mozgu glikogen predstavlja važan izvor energije, a sintetiše se i skladišti isključivo u astrocitima. U uslovima kada zahtevi za energijom prevazilaze dostupnost glukoze, astrociti razlažu glikogen do laktata, koji se oslobađa u CST i postaje dostupan neuronima (Brown and Ransom, 2007). Neuronu preuzimaju laktat iz vanćelijske tečnosti posredstvom monokarboksilnih transportera i koriste kao supstrat za dobijanje ATP (Brown et al., 2004). U više navrata je pokazano da se nakon tretmana insulinom u astrocitima gajenim u kulturi povećavaju rezerve glikogena (Dringen and Hamprecht, 1992; Heni et al., 2011; Muhič et al., 2015). Na osnovu toga je, u okviru naše studije, postavljena hipoteza da bi insulin sintetisan tokom kratkotrajnog gladovanja mogao uticati na povećanje depoa glikogena u hipotalamusu. Međutim, nakon šest sati gladovanja količina glikogena u hipotalamusu ostala je nepromenjena. Iako insulin u moždanom tkivu stimuliše sintezu glikogena i *in vitro* (Dringen and Hamprecht, 1992) i *in vivo* (Choi et al., 2003), izgleda da insulin sintetisan tokom kratkotrajnog gladovanja ne utiče na rezerve glikogena. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom koju su radili Garriga i Cusso, gde su pokazali da nakon 5h gladovanja ne dolazi do promene u koncentraciji glikogena u hipotalamusu, ali ni u cerebelumu, korteksu, striatumu i hipokampusu. Smanjenje količine glikogena u ovim moždanim strukturama zabeleženo je tek nakon 24h gladovanja (Garriga and Cussó, 1992). Znajući da je koncentracija glukoze u krvi nakon šest sati gladovanja i dalje bila u okvirima normoglikemije, za razliku od hipoglikemičnih uslova koji su bili detektovani nakon 24h gladovanja, moguće je zaključiti da glikemija ima značajan uticaj na rezerve glikogena u mozgu. U prilog ovom zaključku ide i činjenica da

insulinom indukovana hipoglikemija dovodi do smanjenja količine glikogena u mozgu (Choi et al., 2003). Slično tome, smanjenje rezervi glikogena zabeleženo je u kulturi astrocita koji su gajeni u medijumu bez glukoze (Dringen and Hamprecht, 1992).

S obzirom da do sinteze i razgradnje glikogena u mozgu može doći istovremeno (Brown and Ransom, 2007), merena je koncentracija laktata u CST kao mera degradacije glikogena. Laktat u mozgu može nastati razgradnjom glikogena u astocitima, ali može biti i perifernog porekla (van Hall et al., 2009). Iako neke studije ukazuju na minimalnu stopu transporta laktata kroz KMB (Pardridge and Oldendorf, 1977), zabeleženo je da npr. tokom intenzivnog vežbanja njegova koncentracija u krvi povećava, kao i stopa transporta ovog metabolita u mozak (Brown and Ransom, 2007). S tim u vezi, u okviru naše studije, izmerena je i koncentracija laktata u serumu nakon gladovanja. Koncentracija laktata u CST i krvi je ostala nepromenjena nakon šest sati gladovanja. Nepromenjena koncentracija laktata u CST ukazuje da kratkotrajno gladovanje nije uticalo na promet glikogena u hipotalamusu. U drugoj studiji je nakon prekonoćnog gladovanja zabeleženo povećanje koncentracije laktata u hipotalamusu (Violante et al., 2009), stoga se može pretpostaviti da je šest sati nedovoljno dug period gladovanja koji bi izazvao povećanje koncentracije laktata. U našem ogledu je koncentracija laktata u serumu ostala nepromenjena nakon kratkotrajnog gladovanja, a izmerene vrednosti su u skladu sa rezultatima drugih studija (Mohebbi et al., 2015; Rezaei et al., 2017; Sari et al., 2013), što ukazuje da verovatno nije došlo do njegovog transporta iz krvi u CST. Ovaj rezultat dodatno potvrđuje činjenicu da je nepromenjena koncentracija laktata u CST odraz nepromenjenog prometa glikogena u hipotalamusu.

Iako gladovanje nije uticalo na ukupan sadržaj i promet glikogena u mozgu, brza stopa sinteze i razgradnje glikogena potencijalno može dovesti do njegove regionalne redistribucije. Stoga je na presecima hipotalmusa analizirana i anatomska distribucija glikogena. Rezultati PAS bojenja su potvrdili da je glikogen homogeno distribuiran u celom hipotalamusu i da ne postoje razlike u regionalnoj distribuciji između kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Pored toga, kao mera sinteze glikogena analizirana je i ekspresija enzima glikogen sintaze. Glikogen sintaza postoji u dve izoforme koje su kodirane različitim genima: GS1 karakteristična za mišićne ćelije i GS2 karakteristična za hepatocite

(Jensen and Lai, 2009). GS2 se ekspimirira samo u hepatocitama, dok se GS1 osim u skeletnim mišićima (Jensen and Lai, 2009), ekspimirira i u mozgu (Baranowska-Bosiacka et al., 2017; Browner et al., 1989). Glikogen sintaza je detektovana u mnogim moždanim regionima, uključujući hipokampus, korteks i cerebelum (Inoue et al., 1988). Prisustvo iRNK za glikogen sintazu je detektovana u astrocitima i neuronima, ali intenzivnija ekspresija zabeležena je u astrocitima (Pellegri et al., 1996). Međutim, u našoj studiji, u hipotalmusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja nije detektovano prisustvo GS1. S obzirom da je ekspresija ovog proteina zabeležena u srcu, može se zaključiti da je GS1 u hipotalmusu prisutan u znatno manjoj količini, te da je za njegovu detekciju neophodno primeniti osetljiviju metodu.

Uzimajući u obzir sve prethodno navedene rezultate može se zaključiti da gladovanjem indukovano povećanje ekspresije insulina u hipotalmusu, nije u funkciji regulacije glukoznog metabolizma. Stoga je istraživanje dalje bilo fokusirano na analizu ekspresije različitih učesnika signalnih puteva insulina. Insulin u centralnom nervnom sistemu može aktivirati PI3K-AKT/PKB i MAPK signalni put. Aktivacija PI3K-AKT/PKB signalnog puta indukuje ekspresiju glukoznog transportera GLUT4 i promoviše energetski metabolizam i ćelijsko preživljavanje, dok MAPK signalni put moduliše ekspresiju gena uključenih u sinaptičku plastičnost i ćelijsku diferencijaciju (Liu et al., 2015). Imajući to u vidu analizirana je ekspresija i aktivacija IRS1, IRS2, PI3K, AKT1/2/3, mTOR i ERK1/2.

Kao što je već pomenuto, nakon šestočasovnog gladovanja, osim povećanja ukupne količine IR, zabeleženo je i povećanje količine njegove fosforilisane forme. Analizirana fosforilacija IR na tirozinskom ostatku 1361 ukazuje na aktivaciju receptora (Giudice et al., 2013), stoga se može zaključiti da nakon kratkotrajnog gladovanja dolazi do aktivacije receptora. Uprkos aktivaciji receptora, nakon šest sati gladovanja količina IRS1 ostala je nepromenjena, dok je u slučaju IRS2 uočen trend porasta, međutim nije zabeležena statistički značajna promena. U perifernim tkivima, nakon stimulacije insulinom jedan od prvih događaja je fosforilacija IRS na tirozinskim ostacima (Baskin et al., 1994) i to fosforilacija IRS1 na tirozinskim ostacima 612 i 632 je neophodna za aktivaciju PI3K (Esposito et al., 2001). Nakon šestočasovnog gladovanja količina IRS1 fosforilisanog na tirozinu 612 se nije promenila, što ukazuje da ne dolazi do aktivacije PI3K signalnog puta.

Pored toga, nakon šest sati gladovanja nije došlo ni do promene u ekspresiji fosforilisane forme IRS2. Rezultati ukazuju da se signal sa aktiviranog insulinskog receptora prenosi nezavisno od aktivacije IRS1 i IRS2. Međutim, važno je uzeti u obzir i činjenicu da insulin može dovesti do fosforilacije drugih aminokiselinskih ostataka na IRS proteinima, kao i da je vreme tokom kojeg mogu da se detektuju fosforilacije različito. Na primer, fosforilacija tirozinskih ostataka na IRS1 je dugotrajnija, dok je kod IRS2 prolazna (Thirone et al., 2006). Stoga je moguće da u hipotalamusu tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do fosforilacije drugih aminokiselinskih ostataka na IRS proteinima. U hipotalamusu je zabeležena i ekspresija IRS4 (Numan and Russell, 1999), te ostaje da se razjasni da li on potencijalno učestvuje u ovim procesima.

Iako nije tačno ustanovljeno na koji način se tokom kratkotrajnog gladovanja signal sa aktiviranog IR prenosi nishodno, analizirana je ekspresija ostalih učesnike signalnog puta u cilju razjašnjavanja adaptivnog značaja ovog fenomena. Aktivacija AKT/PKB kompleksa podrazumeva vezivanje regulatorne subjedinice PI3K (p85) za fosforilisani IRS protein i aktivaciju p110 (Boucher et al., 2014). Potom aktivirani AKT/PKB disosuje sa membrane i fosforiliše brojne substrate u citoplazmi i nukleusu (Wilcox, 2005b). Nakon kratkotrajnog gladovanja nije uočena promena u količini regulatorne subjedinice PI3K. Pored toga, ekspresija i aktivnost AKT1/2/3 ostale su nepromenjene nakon šest sati gladovanja. Takođe odsustvo translokacije GLUT4 na ćelijsku membranu uprkos detektovanoj povećanoj količini transportera u tkivu hipotalamusa je u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju da nakon kratkotrajnog gladovanja PI3K-AKT/PKB put nije aktivan. Dodatno, nepostojanje značajne koekspresije pIR-Tyr1361 i GLUT4, zabeleženo u našem istraživanju, ukazuje da insulin ne učestvuje u regulaciji GLUT4 proteina nakon šestočasovnog gladovanja. Nakon šest sati gladovanja nije zabeležena promena u količini glikogena u hipotalamusu. Pored toga, analizirana je i ekspresija GS1, enzima ključnog za sintezu glikogena. Iako je u drugim studijama zabeležena ekspresija GS1 u mozgu, ovaj protein nije detektovan u hipotalamusu kontrolnih i izgladnjivanih životinja. Putem PI3K-PKB/AKT signalne kaskade insulin stimuliše i sintezu proteina, međutim nakon kratkotrajnog gladovanja nije zabeležena promena u ekspresiji ukupne i fosforilisane forme mTOR Ser/Thr kinaze.

Drugi signalni put koji može biti aktiviran vezivanjem insulina za svoj receptor je MAPK signalni put. Aktivacija ovog signalnog puta može biti posredstvom IRS1/2, ali i Gab-1, Shc i p62^{dok} (Virkamäki et al., 1999). S obzirom da nisu analizirani svi učesnici MAPK signalnog puta, već samo IRS1/2 i ERK1/2 može se samo spekulirati o događajima koji se dešavaju između ova dva signalna molekula. Literaturni podaci ukazuju da insulin nema značajnog uticaja na fosforilaciju Shc proteina (Virkamäki et al., 1999), i da IRS2, pre nego IRS1, utiče na fosforilaciju ERK (Thirone et al., 2006). Iako je zabeležen trend povećanja ekspresije IRS2, ostaje nerazjašnjeno da li nakon kratkotrajnog gladovanja dolazi i do aktivacije IRS2. Nakon kratkotrajnog gladovanja zabeleženo je smanjenje ukupne količine ERK1/2 u hipotalamusu, ali je ekspresija pERK1/2 (Thr202/Tyr204) bila povećana. Odnos fosforilisane i ukupne forme ERK1/2 bio je povećan što ukazuje da i pored smanjene ekspresije ukupne forme dolazi do aktivacije ovog signalnog molekula. Iako je generalno prihvaćeno da aktivacija MAPK signalnog puta nema ulogu u preuzimanju glukoze, u kulturi mišićnih ćelija zabeleženo je da insulin stimuliše biosintezu GLUT3 tako što aktivira p21^{ras} (Taha et al., 1995; Taha and Klip, 1999). Aktivirani p21^{ras} se potom vezuje za Raf-1 koji dovodi do aktivacije MAPK/ERK. S obzirom da je nakon kratkotrajnog gladovanja došlo do povećanja ekspresije GLUT3 u hipotalamusu i povećane aktivacije ERK1/2, može se pretpostaviti da insulin možda ima ulogu u regulaciji ekspresije GLUT3. Međutim, odsustvo koekspresije pIR-Tyr1361 i GLUT3 ukazuje da se ovaj proces odvija nezavisno od dejstva insulina.

Zajedno, rezultati dobijeni analizom učesnika insulinske signalne trasdukcije ukazuju da tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do aktivacije IR. Nishodno od IR nije detektovana aktivacija PI3K-AKT/PKB signalnog puta, odnosno *de novo* sintetisani insulin, po svemu sudeći ne učestvuje u preuzimanju glukoze, sintezi glikogena i sintezi proteina u hipotalamusu tokom kratkotrajnog gladovanja. Nakon šestočasovnog gladovanja je detektovana aktivacija MAPK signalnog puta, odnosno aktivacija ERK1/2. Koja je uloga aktivacije ERK1/2 i da li *de novo* sintetisani insulin tokom kratkotrajnog gladovanja doprinosi njenoj aktivaciji ostaje da se razjasni analizom signalnih puteva nishodno od ERK1/2.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije su po prvi put ukazali da nakon šestočasovnog gladovanja dolazi do povećanja količine insulina u hipotalamusu pacova. Insulin je detektovan u neuronima periventrikularnog jedra hipotalamusa i u ependimskim ćelijama izgladnjivanih životinja. Činjenica da je koncentracija insulina u CST ostala nepromenjena nakon kratkotrajnog gladovanja, iako je bila smanjena u serumu, ukazuje da se povećanje količine insulina u hipotalamusu bar delimično može pripisati *de novo* sintezi ovog hormona, što je potvrđeno detekcijom iRNK za insulin 2. Prisustvo aktivne forme receptora za insulin zabeležen je u istom region gde je detektovan i insulin što ukazuje da novosintetisani insulin svoje dejstvo najverovatnije ostvaruje parakrino.

Nepromenjena koncentracija glukoze u CST nakon šestočasovnog gladovanja, iako je koncentracija glukoze u krvi značajno opala ukazuje na povećan transport glukoze kroz KMB. U saglasnosti sa ovom pretpostavkom je i detektovana povećana količina GLUT1 izoforme eksprimirane u endotelnim ćelijama koje učestvuju u formiranju KMB.

Povećanje količine glukoznih transportera karakterističnih za neurone (GLUT2 i GLUT3), ali ne i forme karakteristične za astrocite GLUT1 (45 kDa) navodi na zaključak da se, u početnoj fazi gladovanja neuronima daje prioritet u odnosu na astrocite u kontekstu snabdevanja glukozom. Odsustvo koekspresije aktivirane forme insulinskog receptora i glukoznih transportera ukazuje da se ovi procesi dešavaju nezavisno od dejstva insulina.

Pored toga, insulin sintetisan u hipotalamusu tokom glikogenolitičke faze gladovanja ne utiče na lokalne rezerve glikogena.

Tokom kratkotrajnog gladovanja dolazi do aktivacije insulinskog receptora. Međutim, nishodno od insulinskog receptora nije detektovana aktivacija PI3K-AKT/PKB signalnog puta, odnosno *de novo* sintetisani inuslin, po svemu sudeći ne učestvuje u preuzimanju glukoze, sintezi glikogena i sintezi proteina u hipotalamusu.

Nakon šestočasovnog gladovanja, u hipotalamusu pacova je zabeležena aktivacija MAPK signalnog puta, odnosno aktivacija ERK1/2. Koja je uloga aktivacije ERK1/2 i da li *de novo* sintetisani insulin tokom kratkotrajnog gladovanja doprinosi njenoj aktivaciji ostaje da se razjasni.

LITERATURA

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*
- Alquier, T., Leloup, C., Lorsignol, A., Pénicaud, L., 2006. Translocable glucose transporters in the brain: Where are we in 2006? *Diabetes.* <https://doi.org/10.2337/db06-S021>
- Backer, J.M., Kahn, C.R., White, M.F., 1990. The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*
- Banks, W.A., 2004. The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.040>
- Banks, W.A., Jaspán, J.B., Huang, W., Kastin, A.J., 1997. Transport of insulin across the blood-brain barrier: Saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides.* [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00231-3)
- Banks, W.A., Kastin, A.J., 1998. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: Insulin and amylin. *Peptides* 19, 883–889. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00018-7)
- Barahona, M.J., Llanos, P., Recabal, A., Escobar-Acuña, K., Elizondo-Vega, R., Salgado, M., Ordenes, P., Uribe, E., Sepúlveda, F.J., Araneda, R.C., García-Robles, M.A., 2018. Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia.* <https://doi.org/10.1002/glia.23267>
- Baranowska-Bosiacka, I., Falkowska, A., Gutowska, I., Gąssowska, M., Kolasa-Wołoskiuk, A., Tarnowski, M., Chibowska, K., Goschorska, M., Lubkowska, A., Chlubek, D., 2017. Glycogen metabolism in brain and neurons – astrocytes metabolic cooperation can be altered by pre- and neonatal lead (Pb) exposure. *Toxicology.* <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.007>
- Barros, L.F., Deitmer, J.W., 2010. Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.002>
- Barros, L.F., San Martín, A., Ruminot, I., Sandoval, P.Y., Fernández-Moncada, I., Baeza-Lehnert, F., Arce-Molina, R., Contreras-Baeza, Y., Cortés-Molina, F., Galaz, A., Alegría, K., 2017. Near-critical GLUT1 and Neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* <https://doi.org/10.1002/jnr.23998>
- Baskin, D.G., Porte, D., Guest, K., Dorsa, D.M., 1983a. Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology* 112, 898–903. <https://doi.org/10.1210/endo-112-3-898>
- Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Alessio, D.A.D., Goldstein, B.J., White, M.F., 1994. Insulin receptor substrate-1 (irs-1) expression in rat brain. *Endocrinology.* <https://doi.org/10.1210/endo.134.4.7511094>
- Baskin, D.G., Sipols, A.J., Schwartz, M.W., White, M.F., 1993. Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. *Regul. Pept.* [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(93\)90355-C](https://doi.org/10.1016/0167-0115(93)90355-C)

- Baskin, D.G., Stein, L.J., Ikeda, H., Woods, S.C., Figlewicz, D.P., Porte, D., Greenwood, M.R.C., Dorsa, D.M., 1985. Genetically obese Zucker rats have abnormally low brain insulin content. *Life Sci.* 36, 627–633. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90166-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90166-3)
- Baskin, D.G., Woods, S.C., West, D.B., Houten, M. Van, Posner, B.I., Dorsa, D.M., Porte, D., 1983b. Immunocytochemical detection of insulin in rat hypothalamus and its possible uptake from cerebrospinal fluid. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo-113-5-1818>
- Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., Schwartz, M.W., 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI116773>
- Béllanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Benarroch, E.E., 2014. Brain glucose transporters: Implications for neurologic disease. *Neurology* 82, 1374–1379. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000328>
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., Woods, S.C., 2002. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 22, 9048–52. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2200-02.2002> [pii]
- Birch, N.P., Christie, D.L., Renwick, A.G.C., 1984. Proinsulin-like material in mouse foetal brain cell cultures. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80266-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80266-5)
- Birnbaum, M.J., 1989. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90968-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90968-9)
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., Ruiz-Albusac, J.M., 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease 5, 161.
- Blouet, C., Schwartz, G.J., 2010. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.024>
- Bolborea, M., Dale, N., 2013. Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.008>
- Bolli, G.G., Fanelli, C.G., 1999. Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70083-9](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70083-9)
- Boucher, J., Kleinridders, A., Ronald Kahn, C., 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Brant, A.M., Jess, T.J., Milligan, G., Brown, C.M., Gould, G.W., 1993. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 1297–1302. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1557>
- Brășlașu, E.D., Brădălan, C., Cornilă, M., 2007. Normal Blood Glucose in White Wistar Rat and Its Changes Following Anesthesia. *Lucr. Științifice Med. Vet.* XL, 120–123.
- Brief, D.J., Davis, J.D., 1984. Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res. Bull.* 12, 571–575. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90174-6)

- Brown, A.M., Ransom, B.R., 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*.
<https://doi.org/10.1002/glia.20557>
- Brown, A.M., Tekkök, S.B., Ransom, B.R., 2004. Energy transfer from astrocytes to axons: The role of CNS glycogen. *Neurochem. Int.* 45, 529–536.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.005>
- Browner, M.F., Nakano, K., Bang, A.G., Fletterick, R.J., 1989. Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: a negatively charged protein with an asymmetric charge distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.11.011>
- Bruckner, B.A., Ammini, C. V, Otal, M.P., Raizada, M.K., Stacpoole, P.W., 1999. Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation. *Metabolism*. 48, 422–431. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90098-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90098-7)
- Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., Kahn, C.R., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science (80-.)*. 289, 2122–2125.
<https://doi.org/8841> [pii]
- Bunner, A.E., Chandrasekera, P.C., Barnard, N.D., 2014. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J. Diabetes*.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.146>
- Burdakov, D., Luckman, S.M., Verkhatsky, A., 2005. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus, in: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1763>
- Calderhead, D.M., Kitagawa, K., Lienhard, G.E., Gould, G.W., 1990. Translocation of the brain-type glucose transporter largely accounts for insulin stimulation of glucose transport in BC3H-1 myocytes. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/bj2690597>
- Camandola, S., Mattson, M.P., 2017. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J.* 36, 1474–1492.
<https://doi.org/10.15252/emj.201695810>
- Campbell, I., 2013. Starvation, exercise, injury and obesity. *Anaesth. Intensive Care Med.* 14, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2013.04.007>
- Cardoso, S., Santos, M.S., Seiça, R., Moreira, P.I., 2010. Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.001>
- Castellini, M.A., Rea, L.D., 1992. The biochemistry of natural fasting at its limits. *Experientia*. <https://doi.org/10.1007/BF01920242>
- Challet, E., Le Maho, Y., Robin, J.P., Malan, A., cherel, Y., 1995. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)00287-S](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)00287-S)
- Chan, S.J., Keim, P., Steiner, D.F., 1976. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.1964>
- Chavez, M., Riedy, C.A., Van Dijk, G., Woods, S.C., 1996. Central insulin and macronutrient intake in the rat. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*

- <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.3.R727>
- Cheatham, B., Kahn, C.R., 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* <https://doi.org/10.1210/edrv-16-2-117>
- Cherel, Y., Le Maho, Y., 1991. Excretion During Prolonged Fasting in the Rat. *Physiol. Behav.* 50, 345–349.
- Cherel, Y., Le Maho, Y., 1991. Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat. *Physiol. Behav.* 50, 345–349.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90076-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90076-Z)
- Choeiri, C., Staines, W., Messier, C., 2002. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience* 111, 19–34.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00619-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00619-4)
- Choi, I.Y., Seaquist, E.R., Gruetter, R., 2003. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.* 72, 25–32. <https://doi.org/10.1002/jnr.10574>
- Clarke, D.W., Boyd, F.T., Kappy, M.S., Raizada, K., 1984. Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *J. Biol. Chem.* 259, 11672–11675.
- Clarke, D.W., Mudd, L., Boyd, F.T., Fields, M., Raizada, M.K., 1986. Insulin Is Released from Rat Brain Neuronal Cells in Culture. *J. Neurochem.* 47, 831–836.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb00686.x>
- Cohen, P., 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 7, 867–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2043>
- Cohen, P., Nimmo, H.G., Proud, C.G., 1978. How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochem Soc Symp* 69–95.
- Cranston, I., Marsden, P., Matyka, K., Evans, M., Lomas, J., Sonksen, P., Maisey, M., Amiel, S.A., 1998. Regional differences in cerebral blood flow and glucose utilization in diabetic man: The effect of insulin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
<https://doi.org/10.1097/00004647-199802000-00002>
- Cura, A., 2010. Acute Modulation of Endothelial Cell Glucose Transport: A Dissertation.
- Cushman, S.W., Wardzala, L.J., 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*
- Czech, M., 1985. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu Rev Physiol* 47, 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.47.030185.002041>
- De los Angeles García, M., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H.H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., Nualart, F., García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H.H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., Nualart, F., 2003. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* 86, 709–724.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01892.x>
- Devaskar, S.U., Singh, B.S., Carnaghi, L.R., Rajakumar, P. a., Giddings, S.J., 1993. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul. Pept.* 48, 55–63.
[https://doi.org/10.1016/0167-0115\(93\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0167-0115(93)90335-6)
- Di Guglielmo, G.M., Drake, P.G., Baass, P.C., Authier, F., Posner, B.I., Bergeron, J.J.M., 1998. Insulin receptor internalization and signalling. *Mol. Cell. Biochem.*

- <https://doi.org/10.1023/A:1006883311233>
- Díaz-García, C.M., Mongeon, R., Lahmann, C., Koveal, D., Zucker, H., Yellen, G., 2017. Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.021>
- DiNuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., Giove, F., 2012. The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity. *Neurochem. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0802-5>
- Dodson, G., Steiner, D., 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80037-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80037-7)
- Dorn, A., Bernstein, H. G, Rinne, A., Ziegler, M., Hahn, H.J, Ansorge, S., 1983. Insulin and glucagonlike peptides in the brain. *Anat. Rec.* 207, 69–77. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070108>
- Dorn, A., Bernstein, H.G., Hahn, H.J., Ziegler, M., Rummelfanger, H., 1981. Insulin immunohistochemistry of rodent CNS: apparent species differences but good correlation with radioimmunological data. *Histochemistry* 71, 609–616.
- Dorn, A., Rinne, A., Bernstein, H.G., Hahn, H.J., Ziegler, M., 1983. Insulin and C-peptide in human brain neurons. *J. Hirnforsch.* 24, 495–499.
- Dorn, A., Rinne, A., Hahn, H.J., Bernstein, H.G., Ziegler, M., 1982. C-peptide immunoreactive neurons in human brain. *Acta Histochem.* 70, 326–330. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(82\)80080-9](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(82)80080-9)
- Dringen, R., Hamprecht, B., 1992. Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 58, 511–517. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09750.x>
- Dube, M.G., Phelps, C.P., Sninsky, C.A., Kalra, P.S., 1995. Insulin and insulin-like growth factor ii suppress neuropeptide y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: A putative hypothalamic site for energy homeostasis. *Endocrinology* 136, 5718–5724. <https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588328>
- Duelli, R., Kuschinsky, W., 2001. Brain Glucose Transporters : Relationship to Local Energy Demand. *News Physiol Sci* 16, 0–5.
- Duran, J., Guinovart, J.J., 2015. Brain glycogen in health and disease. *Mol. Aspects Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.08.007>
- Espinoza-Rojo, M., Iturralde-Rodriguez, K.I., Chanez-Cardenas, M.E., Ruiz-Tachiquin, M.E., Aguilera, P., 2010. Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* <https://doi.org/ABSTRACT#15> [pii]
- Esposito, D.L., Li, Y., Cama, A., Quon, M.J., 2001. Tyr612and Tyr632in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology.* <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8283>
- Farrell, C.L., Pardridge, W.M., 1991. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5779>
- Finn, P.F., Dice, J.F., 2006. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition.* <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.04.008>

- Fleig, W.E., Enderle, D., Steudter, S., Nöther-Fleig, G., Ditschuneit, H., 1987. Regulation of basal and insulin-stimulated glycogen synthesis in cultured hepatocytes. Inverse relationship to glycogen content. *J. Biol. Chem.* 262, 1155–1160.
- Folli, F., Bonfanti, L., Renard, E., Ronald, C., 1994. Insulin Receptor Substrate-1 Nervous System (IRS-I) Distribution in the Rat Central I-. *J. Neurosci.*
<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2016.03.007>
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., Zöchling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K., Riederer, P., 1998. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 105, 423–438.
<https://doi.org/10.1007/s007020050068>
- Fu, Z., R. Gilbert, E., Liu, D., 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.*
<https://doi.org/10.2174/157339913804143225>
- Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W., Klip, A., 2002. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell Biol.* 80, 569–578.
<https://doi.org/10.1139/o02-156>
- Garriga, J., Cussó, R., 1992. Effect of starvation on glycogen and glucose metabolism in different areas of the rat brain. *Brain Res.* 591, 277–82.
- German, M.S., 1993. Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1781>
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., Ahmadiani, A., 2013. Insulin in the brain: Sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.*
<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8339-9>
- Giudice, J., Barcos, L.S., Guaimas, F.F., Penas-Steinhardt, A., Giordano, L., Jares-Erijman, E. a, Coluccio Leskow, F., 2013. Insulin and insulin like growth factor II endocytosis and signaling via insulin receptor B. *Cell Commun. Signal.* 11, 18.
<https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-18>
- Gómez, O., Ballester-Lurbe, B., Poch, E., Mesonero, J.E., Terrado, J., 2010. Developmental regulation of glucose transporters GLUT3, GLUT4 and GLUT8 in the mouse cerebellar cortex. *J. Anat.* 217, 616–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01291.x>
- Goodman, T., Hajihosseini, M.K., 2015. Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front. Neurosci.*
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00387>
- Gravena, C., Mathias, P.C., Ashcroft, S.J.H., 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J. Endocrinol.*
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1730073>
- Gray, S.M., Aylor, K.W., Barrett, E.J., 2017. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia* 60. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4285-4>
- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Hendry, R.M., Reagan, L.P., 2009. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 1296, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.005>

- Hara, M., Matsuda, Y., Hirai, K., Okumura, N., Nakagawa, H., 1989. Effect of glucose starvation on glucose transport in neuronal cells in primary culture from rat brain. *J. Neurochem.* 52, 909–912.
- Havrankova, J., Roth, J., Brownstein, M.J., 1979. Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J. Clin. Invest.* 64, 636–642.
<https://doi.org/10.1172/JCI109504>
- Havrankova, J., Schmechelt, D., Roth, J., Brownstein, A.M., 1978. Identification of insulin in rat brain. *Neurobiology* 75, 5737–5741. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5737>
- Heidenreich, K.A., Gilmore, P.R., Garvey, W.T., 1989. Glucose transport in primary cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* <https://doi.org/10.1002/jnr.490220405>
- Heni, M., Hennige, A.M., Peter, A., Siegel-Axel, D., Ordeltcheide, A.M., Krebs, N., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.U., Staiger, H., 2011. Insulin promotes Glycogen storage and cell proliferation in primary human Astrocytes. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021594>
- Hutton, J.C., 1994. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia.* <https://doi.org/10.1007/BF00400826>
- Inoue, N., Matsukado, Y., Goto, S., Miyamoto, E., 1988. Localization of Glycogen Synthase in Brain. *J. Neurochem.* 50, 400–405. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02926.x>
- Jacobs, S., Cuatrecasas, P., 1981. Insulin Receptor: Structure and Functio. *Endocr. Rev.* 2, 251–263.
- James, D.E., Strube, M., Muedler, M., 1989. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/338083a0>
- Jensen, J., Lai, Y.-C., 2009. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. *Arch. Physiol. Biochem.* 115, 13–21. <https://doi.org/10.1080/13813450902778171>
- Jezová, D., Vígás, M., Sadlon, J., 1985. C-peptide-like material in rat brain: response to fasting and glucose ingestion. *Endocrinol Exp* 19, 261–266.
- Kerndt, P., Naughton, J., Driscoll, C., Loxterkamp, D., 1982. Fasting: The history, pathophysiology and complications. *West J Med* 137, 379–399.
- King, G.L., Johnson, S.M., 1985. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.3883490>
- Kleinridders, A., 2016. Deciphering brain insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor signalling. *J. Neuroendocrinol.* 28, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jne.12433>
- Kleinridders, A., Ferris, H.A., Cai, W., Kahn, C.R., 2014. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function, in: *Diabetes.* pp. 2232–2243.
<https://doi.org/10.2337/db14-0568>
- Kobayashi, M., Nikami, H., Morimatsu, M., Saito, M., 1996. Expression and localization of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci. Lett.* 213, 103–106. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12845-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12845-7)
- Koekkoek, L.L., Mul, J.D., la Fleur, S.E., 2017. Glucose-sensing in the reward system. *Front. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00716>
- Koizumi, J., Shiraiishi, H., 1970. Ultrastructural appearance of glycogen in the hypothalamus of the rabbit following chlorpromazine administration. *Exp. Brain Res.*

- <https://doi.org/10.1007/BF00235051>
- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., Sato, Y., 2013. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J. Diabetes Investig.* <https://doi.org/10.1111/jdi.12094>
- Könner, A.C.C., Klöckener, T., Brüning, J.C.J.C., 2009. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol. Behav.* 97, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.027>
- Koranyi, L., Bourey, R.E., James, D., Mueckler, M., Fiedorek, F.T., Permutt, M.A., 1991. Glucose transporter gene expression in rat brain: Pretranslational changes associated with chronic insulin-induced hypoglycemia, fasting, and diabetes. *Mol. Cell. Neurosci.* [https://doi.org/10.1016/1044-7431\(91\)90051-O](https://doi.org/10.1016/1044-7431(91)90051-O)
- Koubi, H.E., Robin, J.P., Dewasmes, G., Le Maho, Y., Frutoso, J., Minaire, Y., 1991. Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol. Behav.* [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90075-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90075-Y)
- Kumagai, A.K., Kang, Y.S., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 1995. Upregulation of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes* 44, 1399–1404. <https://doi.org/10.2337/diab.44.12.1399>
- Lamy, C.M., Sanno, H., Labouèbe, G., Picard, A., Magnan, C., Chatton, J.Y., Thorens, B., 2014. Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.003>
- Langlet, F., 2014. Tanycytes: A Gateway to the Metabolic Hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jne.12191>
- Leibowitz, S.F., Hammer, N.J., Chang, K., 1981. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol. Behav.* 27, 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90366-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90366-8)
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., Van Bueren, A.M., McCall, A.L., Drewes, L.R., 1997. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J. Neurosci. Res.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970901\)49:5<617::AID-JNR12>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970901)49:5<617::AID-JNR12>3.0.CO;2-S)
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., Pénicaud, L., 1994. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res.* 638, 221–6. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90653-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90653-X)
- Liu, Z., Patil, I.Y., Jiang, T., Sancheti, H., Walsh, J.P., Stiles, B.L., Yin, F., Cadenas, E., 2015. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128274>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J.D.R., Sun, W., Goldman, S., Blekot, S., Nielsen, M., Takano, T., Deane, R., Nedergaard, M., 2015. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms7807>

- Maher, F., Davies-Hill, T.M., Lysko, P.G., Henneberry, R.C., Simpson, I.A., 1991. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 351–360. [https://doi.org/10.1016/1044-7431\(91\)90066-W](https://doi.org/10.1016/1044-7431(91)90066-W)
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 8, 1003–11.
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 1993. Glucose transporter isoforms in brain: Absence of GLUT3 from the blood- brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 342–345. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.43>
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., 1968. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J. Lab. Clin. Med.* <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214368901662>
- Mantych, G.J., James, D.E., Chung, H.D., Devaskar, S.U., 1992. Cellular localization and characterization of glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology.* <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505464>
- Margolis, R.U., Altszuler, N., 1967. Insulin in the Cerebrospinal Fluid. *Nature* 215, 1375. <https://doi.org/10.1038/2151375a0>
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., Baskin, D.G., 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234–3236. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3234>
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., Thorens, B., 2005. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI26309>
- Maruyama, H., Hisatomi, A., Orci, L., Grodsky, G.M., Unger, R.H., 1984. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI111658>
- Matsui, T., Soya, S., Kawanaka, K., Soya, H., 2015. Brain Glycogen Decreases During Intense Exercise Without Hypoglycemia: The Possible Involvement of Serotonin. *Neurochem. Res.* 40, 1333–1340. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1594-1>
- Matsui, T., Soya, S., Okamoto, M., Ichitani, Y., Kawanaka, K., Soya, H., 2011. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J. Physiol.* 589, 3383–3393. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203570>
- McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., Janigro, D., 2001. Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: An in vitro study. *Brain Res.* 904, 20–30. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02418-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02418-0)
- McCall, a L., Fixman, L.B., Fleming, N., Tornheim, K., Chick, W., Ruderman, N.B., 1986. Chronic hypoglycemia increases brain glucose transport. *Am. J. Physiol.* 251, E442–E447. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1986.251.4.E442>
- McCall, A.L., 2004. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.052>
- McCue, M.D., 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.002>

- McCue, M.D., 2007. Snakes survive starvation by employing supply- and demand-side economic strategies. *Zoology* 110, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.02.004>
- McGowan, K.M., Long, S.D., Pekala, P.H., 1995. Glucose transporter gene expression: Regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacol. Ther.* [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00007-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00007-4)
- Mehran, A.E., Templeman, N.M., Brigidi, G.S., Lim, G.E., Chu, K.Y., Hu, X., Botezelli, J.D., Asadi, A., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., Bamji, S.X., Clee, S.M., Johnson, J.D., 2012. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* 16, 723–737. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.019>
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Meyts, P. De, 2016. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network, in: *Endotext*. pp. 1–32.
- Mitrakou, A., Ryan, C., Veneman, T., Mokan, M., Jenssen, T., Kiss, I., Durrant, J., Cryer, P., Gerich, J., 1991. Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *Am. J. Physiol.* 260, E67–E74. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.260.1.E67>
- Mohebbi, H., Rahmani-Nia, F., yar Arabmomeni, A., Riasi, A., Mohammad, M., 2015. The effects of interval training and age on blood lactate (La) levels and lactate dehydrogenase (LDH) activity in male Wistar rats. *Pars J. Med. Sci.* 12, 37–45.
- Molnar, G., Farago, N., Kocsis, A.K., Rozsa, M., Lovas, S., Boldog, E., Baldi, R., Csajbok, E., Gardi, J., Puskas, L.G., Tamas, G., 2014. GABAergic Neurogliaform Cells Represent Local Sources of Insulin in the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4082-13.2014>
- Moreira, P.I., Santos, M.S., Sena, C., Seica, R., Oliveira, C.R., 2005. Insulin protects against amyloid β -peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. *Neurobiol. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.017>
- Muhič, M., Vardjan, N., Chowdhury, H.H., Zorec, R., Kreft, M., 2015. Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) modulate cytoplasmic glucose and glycogen levels but not glucose transport across the membrane in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.629063>
- Nagamatsu, S., Sawa, H., Inoue, N., Nakamichi, Y., Takeshima, H., Hoshino, T., 1994. Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose in vivo in mouse brain and in vitro in neuronal cell cultures from rat embryos. *Biochem J.* <https://doi.org/10.1042/bj3000125>
- Nagamatsu, S., Sawa, H., Kamada, K., Nakamichi, Y., Yoshimoto, K., Hoshino, T., 1993. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett.* 334, 289–295. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80697-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80697-S)
- Navale, A.M., Paranjape, A.N., 2016. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys. Rev.* <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
- Neary, N.M., Goldstone, A.P., Bloom, S.R., 2004. Appetite regulation: From the gut to the hypothalamus. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2265.2003.01839.x

- Ngarmukos, C., Baur, E.L., Kumagai, A.K., 2001. Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res.* 900, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02184-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02184-9)
- Nualart, F., Godoy, A., Reinicke, K., 1999. Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res.* [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01078-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01078-1)
- Numan, S., Russell, D.S., 1999. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain. *Mol. Brain Res.* [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00160-6)
- Nutter, P., 1941. Depletion of Tissue Glycogen During Fasting and Fatigue and Partial Recovery Without Food. *J. Nutr.* 21, 477–488.
- Obici, S., Feng, Z., Karkanas, G., Baskin, D.G., Rossetti, L., 2002a. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci.* 5, 566–572. <https://doi.org/10.1038/nm861>
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanas, G., Rossetti, L., 2002b. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* 8, 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/nm798>
- Oe, Y., Baba, O., Ashida, H., Nakamura, K.C., Hirase, H., 2016. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia.* <https://doi.org/10.1002/glia.23020>
- Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Vassalli, J.D., Perrelet, A., 1985. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90124-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90124-2)
- Palou, M., Sánchez, J., Rodríguez, A.M., Priego, T., Picó, C., Palou, A., 2009. Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: Relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell. Physiol. Biochem.* 23, 115–124. <https://doi.org/10.1159/000204100>
- Pansky, B., Hatfield, J.S., 1978. Cerebral localization of insulin by immunofluorescence. *Am. J. Anat.* <https://doi.org/10.1002/aja.1001530309>
- Pardini, A.W., Nguyen, H.T., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Williams, D.L., Kim, F., Schwartz, M.W., 2006. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.109>
- Pardridge, W.M., Oldendorf, W.H., 1977. TRANSPORT OF METABOLIC SUBSTRATES THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb07702.x>
- Patching, S.G., 2017. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9672-6>
- Pellegrini, G., Rossier, C., Magistretti, P.J., Martin, J.L., 1996. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Mol. Brain Res.* [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00305-C](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00305-C)
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10625–10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>

- Penicaud, L., Leloup, C., Lorsignol, a, Alquier, T., Guillod, E., 2002. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 539–543.
- Permutt, M.A., Kipnis, D.M., 1972. Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2006.04.077>
- Perry, R.J., Wang, Y., Cline, G.W., Rabin-Court, A., Song, J.D., Dufour, S., Zhang, X.M., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2018. Leptin Mediates a Glucose-Fatty Acid Cycle to Maintain Glucose Homeostasis in Starvation. *Cell* 172, 234–248.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.001>
- Plata-Salamán, C.R., 1991. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 243–258. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80004-1)
- Plum, L., Schubert, M., Brüning, J.C., 2005. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>
- Proud, C.G., 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem. Soc. Trans.* <https://doi.org/10.1042/BST20060213>
- Qutub, A.A., Hunt, C.A., 2005. Glucose transport to the brain: A systems model. *Brain Res. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.03.002>
- Rasouli, M., Ostovar-Ravari, A., Shokri-Afra, H., 2014. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18, 2020–2024.
- Rasouli, M., Shokri-Afra, H., Ostovar-Ravari, A., 2015. A new protocol for separation of acid soluble and insoluble fractions from total glycogen and simultaneous measurements. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1785–1789.
- Reikeras, O., Nordstrand, K., Henden, T., 1988. Effects of fasting and glucose insulin potassium on glycogen contents in heart, skeletal-muscle and liver. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 48, 285–288. <https://doi.org/10.3109/00365518809167496>
- Rezaei, S., Agha-Alinejad, H., Molanouri Shamsi, M., Jafari, M., Azevedo Voltarelli, F., Naderi, A., Earnest, C., 2017. Evaluation of efforts in untrained Wistar rats following exercise on forced running wheel at maximal lactate steady state. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* <https://doi.org/10.20463/jenb.2017.0040>
- Richter, E. a, Hargreaves, M., 2013. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* 93, 993–1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>
- Roden, M., Perseghin, G., Petersen, K.F., Hwang, J.H., Cline, G.W., Gerow, K., Rothman, D.L., Shulman, G.I., 1996. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI118460>
- Roncero, I., Alvarez, E., Chowen, J.A., Sanz, C., Rábano, A., Vázquez, P., Blázquez, E., 2004. Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02269.x>
- Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Rui, L., 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 4, 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>

- Sanger, F., Tuppy, H., 1951. The Amino-acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. *Biochem. J.* [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90071-7)
- Sankar, R., Thamocharan, S., Shin, D., Moley, K.H., Devaskar, S.U., 2002. Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00487-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00487-4)
- Sari, D.N., Endardjo, S., Santoso, D.I.S., 2013. Blood lactate level in Wistar rats after four and twelve week intermittent aerobic training. *Med. J. Indones.* <https://doi.org/10.13181/mji.v22i3.582>
- Satoh, Y., Kobayashi, Y., Takeuchi, A., Pages, G., Pouyssegur, J., Kazama, T., 2011. Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS Causes Cortical Abnormalities and Neonatal Lethality: Erk1 Deficiency Enhances the Impairment of Neurogenesis in Erk2-Deficient Mice. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2243-10.2011>
- Schechter, R., Beju, D., Gaffney, T., Schaefer, F., Whetsell, L., 1996. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res.* 736, 16–27. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00664-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00664-6)
- Schechter, R., Holtzclaw, L., Sadiq, F., Kahn, A., Devaskar, S., 1988. Insulin synthesis by isolated rabbit neurons. *Endocrinology.* <https://doi.org/10.1210/endo-123-1-505>
- Scherer, T., OHare, J., Diggs-Andrews, K., Schweiger, M., Cheng, B., Lindtner, C., Zielinski, E., Vempati, P., Su, K., Dighe, S., Milsom, T., Puchowicz, M., Scheja, L., Zechner, R., Fisher, S.J., Previs, S.F., Buettner, C., 2011. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab.* 13, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.008>
- Schulingkamp, R. J., Pagano, T. C., Hung, D., Raffa, R. B., 2000. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 855–872. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00040-3)
- Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P., 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608–16. <https://doi.org/10.1210/endo.130.6.1597158>
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Secor, S.M., Carey, H. V., 2016. Integrative physiology of fasting. *Compr. Physiol.* 6, 773–825. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150013>
- Shah, K., DeSilva, S., Abbruscato, T., 2012. The role of glucose transporters in brain disease: Diabetes and Alzheimer’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms131012629>
- Shimizu, N., Oomura, Y., Plata-Salamán, C.R., Morimoto, M., 1987. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res.* 416, 153–156. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91508-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91508-3)
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Silva-Alvarez, C., Carrasco, M., Balmaceda-Aguilera, C., Pastor, P., García, M.D.L.A.,

- Reinicke, K., Aguayo, L., Molina, B., Cifuentes, M., Medina, R., Nualart, F., 2005. Ependymal cell differentiation and GLUT1 expression is a synchronous process in the ventricular wall. *Neurochem. Res.* 30, 1227–1236. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-8794-z>
- Simpson, I., Carruthers, A., Vannucci, S.J., 2007. Supply and Demand in Cerebral Energy Metabolism :The Role of Nutrient Transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600521>
- Simpson, I.A., Appel, N.M., Hokari, M., Oki, J., Holman, G.D., Maher, F., Koehler-Stec, E.M., Vannucci, S.J., Smith, Q.R., 1999. Blood-brain barrier glucose transporter: Effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J. Neurochem.* 72, 238–247. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720238.x>
- Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., Vannucci, S.J., 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *AJP Endocrinol. Metab.* 295, E242–E253. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90388.2008>
- Singh, B.S., Rajakumar, P.A., Eves, E.M., Rosner, M.R., Wainer, B.H., Devaskar, S.U., 1997. Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. *Regul. Pept.* 69, 7–14. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(96\)02120-9](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(96)02120-9)
- Sivitz, W., DeSautel, S., Walker, P.S., Pessin, J.E., 1989. Regulation of the glucose transporter in developing rat brain. *Endocrinology* 124, 1875–1880. <https://doi.org/10.1210/endo-124-4-1875>
- Song, J., Xu, Y., Hu, X., Choi, B., Tong, Q., 2010. Brain expression of Cre recombinase driven by pancreas-specific promoters. *Genesis.* <https://doi.org/10.1002/dvg.20672>
- Stalmans, W., Bollen, M., Mvumbi, L., 1987. Control of glycogen synthesis in health and disease. *Diabetes Metab Rev* 3, 127–161. <https://doi.org/doi:10.1002/dmr.5610030107>
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., Aten, B., 1967. Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.157.3789.697>
- Strubbe, J.H., Porte, D., Woods, S.C., 1988. Insulin responses and glucose levels in plasma and cerebrospinal fluid during fasting and refeeding in the rat. *Physiol. Behav.* [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90139-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90139-4)
- Suh, S.W., Bergher, J.P., Anderson, C.M., Treadway, J.L., Fosgerau, K., Swanson, R.A., 2007. Astrocyte Glycogen Sustains Neuronal Activity during Hypoglycemia: Studies with the Glycogen Phosphorylase Inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-Chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 45–50. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.115550>
- Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Miralpeix, M., White, M.F., 1993. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1128/MCB.13.12.7418>. Updated
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., White, M.F., 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/352073a0>
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F., 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling.

- Nature. <https://doi.org/10.1038/377173a0>
- Suzuki, K., Kono, T., 1980. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2542>
- Taha, C., Klip, A., 1999. The insulin signaling pathway. *J. Membr. Biol.* <https://doi.org/10.1007/PL00005896>
- Taha, C., Mitumoto, Y., Liu, Z., Skolnik, E.Y., Klip, A., 1995. The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. Roles of p21(ras) and pp70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24678>
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Thirone, A.C.P., Huang, C., Klip, A., 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.005>
- Thorens, B., 2014. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia.* <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Tiedge, M., Lenzen, S., 1991. Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/bj2790899>
- Tokarz, V.L., MacDonald, P.E., Klip, A., 2018. The cell biology of systemic insulin function. *J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Uehara, Y., Nipper, V., McCall, A.L., 1997. Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.4.E716>
- Uemura, E., Greenlee, H.W., 2006. Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.10.035>
- Uemura, E., Greenlee, H.W., 2001. Amyloid β -peptide inhibits neuronal glucose uptake by preventing exocytosis. *Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7719>
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–68. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Van der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M., Biessels, G.J., Gispen, W.H., 2003. Insulin inhibits extracellular regulated kinase 1/2 phosphorylation in a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3) kinase-dependent manner in neuro2a cells. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01828.x>
- van Hall, G., Strømstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., Quistorff, B., Secher, N.H., Nielsen, H.B., 2009. Blood lactate is an important energy source for the human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1121–9. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.35>
- Vannucci, S.J., 1994. Developmental Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Rat Brain. *J. Neurochem.* 62, 240–246. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62010240.x>
- Vannucci, S.J., Koehler-Stec, E.M., Li, K., Reynolds, T.H., Clark, R., Simpson, I.A., 1998. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res*

- 797, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00103-6)
- Vannucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A., 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2–21.
- Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medrão-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez De Córdoba, S., Guinovart, J.J., 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10, 1407–1413. <https://doi.org/10.1038/nn1998>
- Violante, I.R., Anastasovska, J., Sanchez-Canon, G.J., Rodrigues, T.B., Righi, V., Nieto-Charques, L., Parkinson, J.R.C., Bloom, S.R., Bell, J.D., Cerdán, S., 2009. Cerebral activation by fasting induces lactate accumulation in the hypothalamus. *Magn. Reson. Med.* <https://doi.org/10.1002/mrm.22010>
- Virkamäki, a, Ueki, K., Kahn, C.R., 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI6609>
- Vogt, M.C., Brüning, J.C., 2013. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.004>
- Vujovic, P.Z., 2011. Ekspresija neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze tokom različitih faza metaboličkog odgovora na gladovanje. University of Belgrade.
- Wang, T., Hung, C.C.Y., Randall, D.J., 2006. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 223–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.105739>
- Werther, G.A., Hogg, a, Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., Allen, A.M., Mendelsohn, F.A., 1987. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121, 1562–70. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1562>
- Wicksteed, B., Brissova, M., Yan, W., Opland, D.M., Plank, J.L., Reinert, R.B., Dickson, L.M., Tamarina, N.A., Philipson, L.H., Shostak, A., Bernal-Mizrachi, E., Elghazi, L., Roe, M.W., Labosky, P.A., Myers, M.G., Gannon, M., Powers, A.C., Dempsey, P.J., 2010. Conditional gene targeting in mouse pancreatic β -cells: Analysis of ectopic cre transgene expression in the brain. *Diabetes.* <https://doi.org/10.2337/db10-0624>
- Wilcox, G., 2005a. Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(03\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(03)00128-7)
- Wilcox, G., 2005b. Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(03\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(03)00128-7)
- Young, W.S., 1986. Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides* 8, 93–97. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(86\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0143-4179(86)90035-1)
- Yu, J.H., Kim, M.S., 2012. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab. J.* 36, 391–398. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.6.391>
- Zhou, Y.P., Grill, V.E., 1994. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI117042>

BIOGRAFIJA

Tamara Dakić, rođena 4. decembra 1989. godine u Beloj Crkvi, Republika Srbija, osnovne akademske studije na Biološom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija završila je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,95. Iste godine upisala je master akademske studije, smer Eksperimentalna fiziologija, koje završava 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,83 i ocenom 10 na master radu pod naslovom: "Promet vazopresina u supraoptičkom i paraventricularnom jedru hipotalamusa pacova akutno izloženih niskoj i visokoj ambijentalnoj temperaturi". Nakon završenih master akademskih studija, Tamara Dakić upisuje dokorske akademske studije na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija.

Od 2013. Do 2017. godine, Tamara je bila angažovana na na projektu: "Efekat metaboličkih i nemetaboličkih stresora na ekspresiju i delovanje neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze" (173023) kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije. Od jula 2017. godine, na istom projektu zaposlena je kao istraživač-pripravnik, a u zvanje istraživač-saradnik unapređena je u novembru 2017. godine.

Na Katedri za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju angažovana je i kao saradnik u nastavi u okviru kurseva Fiziologija životinja, Endokrinologija i Eksperimentalna fiziologija životinja i čoveka.

Autor je 5 naučnih radova iz oblasti fiziologije životinja. Glavna oblast njenog istraživačkog rada je neuroendokrinologija, gladovanje i energetska homeostaza.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тамара Дакић

број индекса Б3039/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова"

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Тамара Дакић _____

Број индекса _____ Б3039/2013 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада _____ Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и
инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова _____

Ментор _____ др Предраг Вујовић _____

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.