

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Kosara Smiljanić

**UTICAJ STARENJA I DUGOTRAJNE  
DIJETALNE RESTRIKCIJE NA  
METABOLIZAM HOLESTEROLA U  
PREDNJEM MOZGU PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Kosara Smiljanić

**EFFECT OF AGING AND LONG-TERM  
DIETARY RESTRICTIONS ON  
CHOLESTEROL METABOLISM IN THE  
RAT FOREBRAIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:**

### Mentori:

Dr Selma Kanazir, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Bato Korać, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

### Članovi komisije:

Dr Aleksandra Mladenović Đorđević, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Sabera Ruždijić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Akad prof Ljubisav Rakić, Srpska akademija nauka i umetnosti

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta “Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije” (broj projekta 173056) koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije pod neposrednim rukovodstvom dr Selme Kanazir.*

*Najveću zahvalnost dugujem upravo dr Selmi Kanazir, mom mentoru, koja mi je omogućila da uplovim u svet neurobiologije i otkrila sve čari istraživačkog rada. Veliko hvala za ukazano poverenje, podršku i znanje koje je nesebično delila sa mnom.*

*dr Saberi Ruždijić hvala na interesovanju sa kojim je pratila moj istraživački rad, kao i korisnim savetima i sugestijama koji su bili od neprocenjive vrednosti.*

*dr Batu Koraću se zahvaljujem na ukazanom poverenju da kao član komisije učestvuje u odbrani ovog rada, a samim tim i u mom istraživačkom razvoju.*

*Akademiku Ljubiši Rakiću se zahvaljujem na originalnim idejama, ohrabrenju i podsticaju koji daje mlađim istraživačima.*

*dr Aleksandri Mladenović Đorđević veliko hvala jer je uvek bila tu da me ohrabri i podstakne, pomogne i podeli svoje znanje i iskustvo sa mnom, ali pre svega, hvala joj na tome kakva je osoba.*

*Veliko hvala i koleginicima, Milki, Vesni, Desi, Nataši, Kiki, maloj Vesni i Smilji na korisnim savetima i razmeni iskustava, podršci, a naročito na prijatnoj atmosferi. Nisam očekivala da ću na poslu pronaći i prijatelje.*

*Kolegama iz “laboratorije 25“ hvala na divnom druženju i podršci.*

*“Mirinim devojkama“ veliko hvala na uspešnoj saradnji, ali prvenstveno na uspostavljanju divne tradicije koja prevazilazi poslovne okvire.*

*Hvala Željku na ljubavi i strpljenju.*

*Ovaj rad je posvećen mojim sestrama, mami i tati, koji su mi dali ljubav i podršku, i Milici, koja me je naučila šta je hrabrost.*

## **REZIME:**

### **Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u prednjem mozgu pacova**

Starenje centralnog nervnog sistema (CNS) praćeno je brojnim promenama koje dovode do narušavanja nervnih funkcija, pre svega kontrole motorike i kognitivnih sposobnosti. Smatra se da su kognitivni poremećaji tokom starenja posledica smanjene sinaptičke plastičnosti, naročito u korteksu i hipokampusu, regionima mozga izuzetno važnim za procese učenja i pamćenja. Najvažniji faktor sredine kojim se može uticati na starenje uopšte, a samim tim i na starenje mozga je režim redukovane ishrane, bez pothranjenosti. Pored toga što se već nekoliko decenija zna da redukovana ishrana produžava životni vek mnogih vrsta, uključujući i sisare, pokazano je da ona odlaže i ublažava starosno zavisne promene u nervnom sistemu.

Holesterol je najzastupljeniji lipid u ćelijama sisara. Učestvujući u izgradnji fosfolipidnog dvosloja bioloških membrana, on reguliše njihovu fluidnost, propustljivost i rigidnost, a samim tim i funkcionalna svojstva membranskih proteina, poput jonskih kanala i transmitterskih receptora. Metabolizam holesterola predstavlja važan aspekt sinaptičke plastičnosti, jer je pokazano da je holesterol neophodan za biogenezu i transport sinaptičkih vezikula, kao i za pravilnu funkcionalnu organizaciju lipidnih osovaca. Od svih organa u telu, mozak sadrži najviše holesterola. Održavanje homeostaze holesterola neophodno je za normalno i neometano funkcionisanje CNS.

Cilj ovog istraživanja bio je da se vidi kako starenje i dugotrajna dijetalna restrikcija (DR) utiču na metabolizam holesterola u mozgu. Mužjaci pacova soja *Wistar* stari 3 meseca (m) bili su podeljeni u dve grupe. Prva grupa, označena kao *ad libitum* (AL), dobijala je svakog dana 100% dnevnog unosa hrane, dok je druga grupa (označena kao DR) stavljena na režim redukovane ishrane koji je podrazumevao dobijanje 100% dnevnog unosa hrane svakog drugog dana. Životinje su žrtvovane nakon dostizanja starosti od 12 i 24m. Životinje stare 3m su predstavljale kontrolnu starosnu grupu. Metabolizam holesterola određivan je na nivou proteina koji su uključeni u sintezu holesterola (HMGCR), njegov transport (ApoE), katabolizam (CYP46) i regulaciju (LXR $\alpha$ ) metodom Western blota i imunohistohemijski. Zastupljenost samog holesterola, njegovih prekursora (lanosterol, latosterol,

dezmosterol) i metabolita (24S-hidroksiholesterol, 27-hidroksiholesterol, holestanol) određena je gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). U primenjenim eksperimentalnim uslovima istom metodom analizirana je i zastupljenost biljnih sterola u svetlu sve veće upotrebe hrane obogaćene biljnim analogima holesterola u ljudskoj ishrani. Pored toga, praćena je i veza između sadržaja holesterola i neurotrofinske signalizacije.

Praćenje promena u metabolizam holesterola pokazalo je da u serumu tokom starenja dolazi do povećanja količine holesterola, bez uticaja režima ishrane. Dugotrajna DR delovala je suprotno starosno-zavisnom povećanju količine holesterolskih prekursora i holestanola, održavajući njihov nivo na nivou 3m starih životinja. Zastupljenost 24S-hidroksiholesterola nije bila promenjena u analiziranim uslovima, dok dijeta nije imala uticaja na povećanje količine 27-hidroksiholesterola tokom starenja. Tokom starenja je takođe došlo do povećanja količine ispitivanih biljnih sterola (sa izuzetkom brasikasterola), dok je DR režim održavao njihov nivo na nivou 3m starih životinja.

Rezultati su pokazali da je tokom starenja došlo do smanjivanja količine proteina HMGCR u korteksu pacova, bez obzira na režim ishrane, kao i do smanjenja nivoa proteina LXR $\alpha$ , koje je bilo pojaćano dijetalnom restrikcijom. Kolićina proteina ApoE bila je povećana tokom starenja. Dijeta u grupi životinja starih 12m delovala je suprotno starenju, smanjujući kolićinu ovog proteina u odnosu na starosnu kontrolu. Nivo proteina CYP46 bio je povećan u grupi životinja starih 24m koje su bile podvrgnute dijeti. U hipokampusu pacova tokom starenja došlo je do smanjenja kolićine proteina HMGCR, CYP46 i LXR $\alpha$ , bez obzira na primenjeni režim ishrane. Ni starenje ni DR nisu uticali na ćelijsku lokalizaciju ekspresije CYP46. Kolićina proteina ApoE u grupi najstarijih pacova koji su bili na režmu DR bila je povećana i u odnosu na starosnu kontrolu, i u odnosu na 3m stare životinje.

Tokom starenja u korteksu je došlo do povećanja kolićine holesterola, dok u hipokampusu nisu detektovane promene. Sa izuzetkom lanosterola u grupi 12mAL holesterolski prekursori su bili manje zastupljeni tokom starenja u obe ispitivane strukture. Dijetalna restrikcija u grupi 12mAL održavala je nivo lanosterola na nivou kontrolnih 3m starih životinja. U grupi 24m starih životinja, pod uticajem dijete došlo je do povećanja kolićine dezmosterola u hipokampusu u odnosu na starosnu kontrolu,

mada je ta količina i dalje bila manja od one izmerene kod 3m starih životinja. Količina holestanola bila povećana tokom starenja bez obzira na režim ishrane. Količina 24S-hidroksisterola nije se menjala ni tokom starenja, ni pod delovanjem dijeta, ukazujući da ispitivani eksperimentalni uslovi nisu uticali na katabolizam holesterola u mozgu pacova.

Zastupljenost biljnih sterola u obe moždane strukture bila je povećana tokom starenja, dok je redukovana ishrana delovala suprotno starenju, smanjujući njihovu količinu u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole. Jedino se količina brasikasterola u korteksu nije menjala u analiziranim eksperimentalnim uslovima.

U korteksu pacova tokom starenja došlo je do povećanja količine proteina BDNF, a do smanjenja nivoa njegovog aktiviranog receptora pTrkB. Dijetalna restrikcija je u grupi životinja starih 12m dodatno povećala količinu BDNF, a u najstarijoj grupi delovala suprotno starenju, održavajući količinu ovog trofina na kontrolnom nivou. U 12m starim životinjama dijeta je održavala nivo aktiviranog receptora na nivou izmerenom kod životinja starih 3m. Ukupan receptor u korteksu nije se menjao u analiziranim uslovima. Promene u trofinskoj signalizaciji u hipokampusu tokom starenja i pod uticajem dugotrajne dijeta detektovane su samo kroz povećanje samog proteina BDNF u grupi 12m starih životinja na režimu redukovane ishrane u odnosu na 3 meseca stare životinje.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da se metabolizam holesterola u korteksu i hipokampusu pacova menja tokom starenja i pod delovanjem dugotrajne dijetalne restrikcije. Najveće promene uočene su na nivou prekursora holesterola, ukazujući na smanjenu stopu sinteze holesterola, dok eliminacija holesterola iz mozga određena njegovim katabolitom, 24S-OHC, nije bila promenjena pod datim eksperimentalnim uslovima. Uticaj dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola bio je izraženiji u hipokampusu, nego u korteksu, i bio je sličan uticaju dijeta ispoljenom u serumu pacova. Veza između holesterola i neurotrofinske signalizacije bila je izraženija u korteksu nego u hipokampusu. Rezultati ove studije pokazali su kapacitet dugotrajne dijetalne restrikcije da utiče na metabolizam holesterola u mozgu smanjujući njegovu sintezu, pri čemu količina holesterola ostaje nepromenjena, ukazujući na mogućnost korišćenja redukovane ishrane u regulaciji metabolizma holesterola kako u periferiji, tako i u mozgu.

**Ključne reči:** starenje, dijetalna restrikcija, korteks, hipokampus, pacov, holesterol

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Molekularna neurobiologija

**UDK BROJ:** 599.323-148.11:577.125 ]:591.13



**RESUME:**

**Effect of aging and long-term dietary restrictions on cholesterol metabolism in the rat forebrain**

Ageing of the central nervous system is associated with a number of changes that disturb nerve function, especially motor control and cognitive abilities. It is believed that cognitive disorders in aging are consequence of reduced synaptic plasticity, especially in the cortex and hippocampus, brain regions extremely important for learning and memory processes. Dominant factor that can influence aging in general, and therefore the aging of the brain is reduced diet regime, without malnutrition. In addition to being known for decades that reduced caloric intake prolongs life span of many species, including mammals, it is shown that it delays and alleviates age-dependent changes.

Cholesterol is the most abundant lipid in mammalian cells. By participating in the construction of phospholipid bilayer of biological membranes, it regulates their fluidity, permeability and rigidity, and consequently the functional properties of membrane proteins, such as ion channels and transmitters receptors. Cholesterol metabolism represents one aspect of synaptic plasticity, as has been shown that cholesterol is essential for biogenesis of synaptic vesicles, and vesicle transport, as well as for proper functional organization of lipid rafts. The brain contains the most cholesterol of all the organs in the body. Maintenance of cholesterol homeostasis is essential for proper functioning of the central nervous system.

The aim of this study was to analyze the influence of aging and long-term dietary restriction on cholesterol metabolism in the rat serum, cortex and hippocampus. The experiments were performed on 3-, 12-, and 24-month-old male *Wistar* rats fed *ad libitum* (AL), or exposed to long term DR (100% every other day-EOD) starting from the age of 3. At the indicated time points, the rats were killed by decapitation. The expression of proteins involved in cholesterol synthesis (HMGCR), transport (ApoE), catabolism (CYP46) and regulation (LXR $\alpha$ ) was determined using Western blot and immunohistochemistry. The levels of cholesterol, its precursors (lanosterol, lathosterol, desmosterol) and metabolites (24S-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, cholestanol) were determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The

same method was used to analyze the amount of phytosterols, given the increasing use of foods enriched with plant analogues of cholesterol in human nutrition. Additionally, the link between cholesterol content and neurotrophin signaling in the rat cortex and hippocampus was analyzed at protein level.

In rat serum cholesterol levels were increased during ageing, regardless of diet regime. Long-term dietary restriction counteracted age-dependent increase in the amount of cholesterol precursors, maintaining their level at the one measured in 3 month old animals. The same influence of dietary restrictions was detected on the age-dependent increase in the cholestanol levels. The amount of 24S-hydroxycholesterol remained stable under experimental conditions, while dietary restriction had no effect on elevated 27-hydroxycholesterol levels during ageing. Ageing has led to increased phytosterols levels, while reduced dietary intake maintained their content on control levels measured in 3-month-old animals.

During aging, there was a reduction in HMGCR protein in the rat cortex, regardless of the diet, and reduction in the levels of LXR $\alpha$  protein, which has been reinforced by dietary restriction. The amount of ApoE protein was increased during ageing. Dietary restriction in the group of 12-month-old animals acted contrary to aging, reducing the amount of this protein in relation to age control. CYP46 protein levels were increased in the group of 24-month-old animals exposed to diet. In the rat hippocampus aging has caused decreased levels of HMGCR, CYP46 and LXR $\alpha$  proteins, regardless of the diet. The amount of ApoE protein in the oldest group of rats that were exposed to dietary restriction was increased in comparison to age-control, and compared to 3 month old animals.

Aging induced slight but significant increase of cholesterol content in the rat cortex, while there were no changes in the amount of cholesterol in the hippocampus. With the exception of lanosterol at 12-month-old AL-fed animals, cholesterol precursors were less common in aging in both brain regions examined. Dietary restriction in the group 12mAL animals prevented the increase of lanosterol amount, keeping it at the level detected in 3-month-old animals. In the hippocampus of 24-month old animals, reduced diet intake increased desmosterol amount in relation to age control, although the amount was still less than that measured in 3-month-old controls. Cholestanol content was increased during ageing, regardless of diet regime. The levels

of 24S-hydroxycholesterol remained stable under experimental conditions, indicating that experimental conditions had no influence on brain cholesterol catabolism.

Amount of plant sterols in both brain structures was increased during aging, while the reduced diet intake acted contrary to the aging, decreasing their levels in relation to age-appropriate controls. Only the amount of brassicasterol in the cortex did not change in the analyzed experimental conditions.

In the rat cortex ageing influenced increased BDNF protein levels, and decreased levels of activated receptor pTrkB. Dietary restriction in the group of 12-month-old animals further increased the amount of BDNF, while in the oldest group acted contrary to aging, keeping the amount of this trephine on the control level. At 12-month-old animals dietary restriction maintained levels of activated receptors at the one measured in animals aged 3 months. The total receptor in the cortex did not change in the analyzed conditions. Changes in trephine signaling in the hippocampus during aging and under the influence of long-term dietary restriction were detected only through the increase in BDNF protein in the group 12 months old animals exposed to reduced feeding compared to 3 month old animals.

The results obtained in this thesis showed that the cholesterol metabolism in the rat cortex and hippocampus have changed during ageing and under the influence of long-term dietary restriction. The greatest changes were observed at the level of cholesterol precursors, indicating a reduced rate of cholesterol synthesis, while the elimination of cholesterol from the brain determined by its derivate, 24S-hydroxycholesterol, was not altered under the experimental conditions. Effect of long-term dietary restriction on cholesterol metabolism was more pronounced in the hippocampus than in the cortex, and was similar to the impact of reduced dietary intake manifested in the rat serum. The link between cholesterol and neurotrophine signaling was more evident in the cortex than in hippocampus. The results of this study showed the capacity of long-term dietary restriction to influence cholesterol metabolism in the brain by reducing its synthesis, whereas the amount of cholesterol remained unchanged, and point to long-term DR as a possible alternative to statin use for its ability to preserve cholesterol homeostasis in the brain.

**Key words:** ageing, dietary restriction, cortex, hippocampus, rat, cholesterol

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Molecular Neurobiology

**UDC NUMBER:** 599.323-148.11:577.125 ]:591.13

## SKRAĆENICE

**24S-OHC** (engl. *24S-hydroxycholesterol*) -24S-hidroksiholesterol

**27-OHC** (engl. *27-hydroxycholesterol*) -27-hidroksiholesterol

**AB** – Alchajmerova bolest

**AL** - *ad libitum*

**APP** (engl. *amyloid precursor protein*) - amiloid prekursorskog proteina

**ApoE** (engl. *Apolipoprotein E*)- apolipoprotein E

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

**bFGF** (engl. *basic fibroblast growth factor*)- bazni fibroblastni faktora rasta

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

**CYP46A1** (engl. *cholesterol 24-hydroxylase*)- holesterol 24-hidroksilaza

**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina

**DR** - dijetalna restrikcija

**ERK** (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinases*)- kinaze čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima

**HB** – Hantingtonova bolest

**HDL** (engl. *high density lipoproteins*)-lipoprotein visoke gustine

**HFD** (engl. *high fat diet*)- hrana bogate mastima

**HMGCR** (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*)- 3-Hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza

**HSP** (engl. *heat shock proteins*) -proteini toplotnog stresa

**IF** - (engl. *intermittent fasting*)- intermitentnoj ishrani

**LDL** (engl. *low density lipoproteins*)- lipoprotein niske gustine

**LDLR** (engl. *low-density lipoprotein receptor*)- receptor lipoproteina niske gustine

**LRP1** (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*)- protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine

**LTP** (engl. *long-term potentiation*)- dugotrajnu potencijaciju

**LXR** (engl. *liver X receptors*)- X receptori jetre

**MCI** (engl. *mild cognitive impairment*)- blago kognitivno oštećenje

**NGF** (engl. *Nerve Growth Factor*)- nervni faktor rasta

**NT-3** (engl. *Neurotrophin-3*)- neurotrofin-3

**NT-4/5** (*engl. Neurotrophin-4/5*)- neurotrofin-4/5

**NT-6** (*engl. Neurotrophin-6*)- neurotrofin-6

**NT-7** (*engl. Neurotrophin-7*)- neurotrofin-7

**p75NTR** (*engl. p75 Neurotrophin Receptor*)- p75 neurotrofinski receptor

**PB** – Parkinsonova boleť

**PNS** - periferni nervni sistem

**RCT** (*engl. reverse cholesterol transport*) -reverzni holesterolski transport

**RNK** - ribonukleinska kislina

**ROS** (*engl. reactive oxygen species*)- reaktivne vrste kiseonika

**SSD** (*engl. sterol sensing domen*)- domen osetljiv na sterole

**SZO** Svetska zdravstvena organizacija

**TrkB** (*engl. Tropomyosin receptor kinase B*)- tropomiozin kinazni receptor B

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Starenje</b> .....	1
<b>1.2. Teorije starenja</b> .....	2
<b>1.3. Starenje centralnog nervnog sistema</b> .....	4
<b>1.4. Mehanizmi starenja i kognitivnog propadanja</b> .....	5
1.4.1. Makroskopske promene.....	5
1.4.2. Mikroskopske promene.....	6
1.4.3. Čelijske i molekulske promene.....	7
<b>1.5. Sredinski faktori i starenje mozga</b> .....	8
<b>1.6. Dijetalna restrikcija</b> .....	9
1.6.1. Efekti dijetalne restrikcije.....	11
1.6.2. Mehanizmi delovanja.....	12
<b>1.7. Metabolizam holesterola u mozgu</b> .....	15
1.7.1. Metabolizam holesterola u bolestima i patološkim stanjima.....	22
<b>1.8. Biljni steroli</b> .....	23
<b>1.9. Proteini koji su uključeni u metabolizam holesterola u mozgu</b> .....	25
1.9.1. HMGCR.....	25
1.9.2. CYP46.....	26
1.9.3. ApoE.....	28
1.9.4. LXR.....	30
<b>1.10. Neurotrofini</b> .....	32
<b>2. CILJ RADA</b> .....	36
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	38
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b> .....	38
<b>3.2. Eksperimentalni dizajn</b> .....	38
<b>3.3. Određivanje biohemijskih parametara u serumu pacova</b> .....	39
<b>3.4. Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova</b> .....	40
3.4.1. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva.....	40
3.4.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	40
3.4.3. Elektroforeza proteina.....	41
3.4.4. Elektrotransfer proteina.....	41
3.4.5. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - Western blot metoda.....	42
3.4.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova.....	43
<b>3.5. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje</b> .....	44
<b>3.6. Ablacija senzomotornog korteksa pacova soja Wistar i dvojno imunohistohemijsko obeležavanje</b> .....	45
<b>3.7. Određivanje sterola u mozgu i serumu pacova</b> .....	46
<b>3.8. Statistička obrada podataka</b> .....	47
<b>4. REZLTATI</b> .....	48
<b>4.1. Eksperimentalni dizajn</b> .....	48
4.1.1. Težina životinja.....	48
4.1.2. Kortikosteron u serumu.....	49
4.1.3. Biohemijski parametri u serumu pacova.....	50

<b>4.2. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcija na sterole u serumu pacova.....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u serumu pacova.....	52
4.2.2. Analiza biljnih sterola u serumu pacova.....	53
<b>4.3. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcija na proteine koji su uključeni u metabolizam holesterola u mozgu.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Promene u korteksu.....	55
4.3.2. Promene u hipokampusu.....	56
<b>4.4. Čelijska lokalizacija ekspresije proteina CYP46.....</b>	<b>58</b>
4.4.1. Ekspresija proteina CYP46 tokom starenja i pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije.....	59
4.4.2. Ekspresija proteina CYP46 nakon povrede mozga.....	61
<b>4.5. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcija na sterole u mozgu pacova.....</b>	<b>65</b>
4.5.1. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u korteksu pacova.....	66
4.5.2. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u hipokampusu pacova.....	68
4.5.3. Analiza biljnih sterola u korteksu pacova.....	70
4.5.4. Analiza biljnih sterola u hipokampusu pacova.....	72
<b>4.6. Uticaj starenja i dijetalne restrikcije ekspresiju zrelog proteina BDNF, njegovog ukupnog (TrkB) i aktiviranog receptora (pTrkB) u korteksu i hipokampusu pacova.....</b>	<b>74</b>
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>76</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>98</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>101</b>



# 1. UVOD

## 1. 1. Starenje

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) populacija starih ljudi u svetu se u poslednjih 50 godina utrostručila, a takav trend će se nastaviti i narednih 50 godina. Stara populacija raste brže od ukupne populacije u skoro svim regionima sveta. Ipak, stopa rasta starije populacije je brža u slabije razvijenim zemljama. Takođe, populacija starih ljudi stari i sama po sebi. U većini zemalja sveta, bez obzira na geografski položaj i stopu razvoja, populacija ljudi koji imaju 80 i više godina raste brže od bilo kog "mlađeg" segmenta stare populacije. Više od polovine populacije starijih od osamdeset godina nalazi se u 6 zemalja: Kini, SAD, Indiji, Japanu, Nemačkoj i Ruskoj Federaciji. Poslednjih godina starenje sve više postaje socijalni problem. Međutim, sve navedeno dovelo je do procvata istraživanja vezanih za proces starenja, kao i do razvoja strategija koje bi mogle da uspore starenje i obezbede normalan život starim ljudima. Jedna od zbunjujućih stvari u vezi sa procesom starenja je to da je, uprkos svojoj univerzalnosti među višim organizmima, starenje u suštini artefakt, s obzirom da su stari organizmi u prirodi ekstremno retki. Činjenica da većina životinja u prirodi retko doživi starost (usled predatora, bolesti, gladi ili suše) (Holliday, 2006), ukazuje na to da je starenje fenomen koji je ekskluzivno prisutan kod ljudi (Hayflick, 2000). Iako je starenje nepredvidivo na individualnom nivou, postoji značajna nasledna komponenta dugovečnosti (Cournil i Kirkwood, 2001; Muiras i saradnici, 1998; Perls i saradnici, 2002).

Starenje se uglavnom definiše kao nagomilavanje štetnih promena u ćelijama i tkivima tokom vremena, koje povećavaju rizik za različite bolesti i, na kraju, dovode do smrti jedinke (Harman, 2003).

## 1. 2. Teorije starenja

Tokom istorije, ljudi su se neprestano trudili da otkriju lek za starenje i bolesti koje su povezane sa starenjem, neprekidno tragajući za "fontanom mladosti". Ovaj san nikada nije postao stvarnost, upravo zbog toga što proces starenja još nije u potpunosti razjašnjen. Ipak, na osnovu raspoloživog znanja predloženo je nekoliko teorija starenja.

- **Evoluciona teorija starenja**

Ova teorija smatra da je starenje rezultat smanjenog intenziteta prirodne selekcije. Prvi put je formulisana četrdesetih godina prošlog veka posmatranjem pacijenata obolelih od Hantingtonove bolesti (HB) (Case i Haldane, 1941). Nedostatak prirodne selekcije, usled koga bolest opstaje u populaciji, objašnjava se relativno kasnim početkom bolesti (30-40 godina), koji omogućava nosiocima dominantne letalne mutacije da se reprodukuju pre smrti. Takođe, još je Darwin objasnio da prirodna selekcija deluje na organizme koji prvenstveno umiru usled predatora i prirodnog okruženja i da je njihova dužina života optimizovana na njihovo životno okruženje (Weinert i Timiras, 2003). U prilog ovome ide i činjenica da životinje koje žive u zaštićenoj sredini žive duže i verovatno dostižu maksimalnu dužinu života (Holliday, 2006).

- **Slobodnoradikalska teorija starenja**

Ova teorija je prvi put formulisana pedesetih godina prošlog veka kada je pretpostavljeno da jedan zajednički proces, modifikovan genetičkim i sredinskim faktorima, tokom koga dolazi do akumulacije endogenih kiseoničnih radikala, može biti odgovoran za starenje i smrt svih živih bića (Harman, 1957). Ova teorija je revidirana 1972. godine kada su mitohondrije identifikovane kao odgovorne za inicijaciju većine slobodnoradikalskih reakcija povezanih sa procesom starenja (Harman, 1972). Tada je takođe postulirano da je dužina života određena stopom oštećenja mitohondrija od strane slobodnih radikala.

- **Mitohondrijalna teorija starenja**

Ova teorija se smatra proširenom slobodnoradikalnom teorijom starenja (Miquel i saradnici, 1980). Mutacije mitohondrijske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) se progresivno akumuliraju tokom života i direktno su odgovorne za narušavanje oksidativne

fosforilacije, dovodeći do pojačane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), što dalje rezultuje povećanom stopom oštećenja mitohondrijske DNK i mutageneze, aktivirajući začarani krug, koji se na kraju završava smrću.

- **Teorija genske regulacije**

Ova teorija predlaže starenje kao rezultat promena koje se dešavaju u ekspresiji gena (Kanungo, 1975; Weinert i Timiras, 2003). Iako je poznato da tokom starenja zaista dolazi do promena u ekspresiji mnogih gena, nije verovatno da selekcija može da deluje na gene koji direktno promovišu starenje (Weinert i Timiras, 2003). I dalje postoji niz kontroverzi u ovoj oblasti, pa se smatra da je bolje starenje posmatrati kao stohastički proces, a ne kao programirani mehanizam koji je pod direktnom kontrolom gena.

- **Telomerazna teorija starenja**

Zastupnici ove teorije ističu fundamentalnu ulogu telomera i enzima telomeraze i njihovog značaja za sam proces starenja. Naime, smatra se da je ekspresija ovog enzima neophodna za ćelijsku besmrtnost (Rhyu, 1995) i da njegovo odsustvo može da leži u osnovi procesa ćelijskog starenja (Harley i saradnici, 1990; Ahmed i Tollefsbol, 2001; Artandi, 2006). I pored toga što je poznato da je narušena funkcija telomera uključena u prevremeno starenje koje karakteriše progeriju, ekstremno retko stanje u kome se simptomi koji nalikuju starenju ispoljavaju u ranom uzrastu, naše znanje o ovim mehanizmima je još uvek na samom početku.

- **Imunska teorija starenja**

Ova teorija je predložena 1989. godine (Franceschi 1989; Franceschi i saradnici, 2000a) i u njoj je sugerisano da je starenje indirektno kontrolisano mrežom ćelijskih i molekulskih odbrambenih mehanizama. Glavnu ulogu imaju enzimi reparacije DNK, enzimski i neenzimski antioksidativni sistemi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), produkcija proteina toplotnog stresa (engl. *heat shock proteins*, HSP) (Franceschi 1989; Franceschi i saradnici, 2000b). Ovi mehanizmi funkcionišu tako što ograničavaju negativne efekte različitih fizičkih, hemijskih i bioloških stresora. Efikasnost ove mreže je genetički kontrolisana i različita je među vrstama i individuama. Ova teorija naročito ističe značaj imunskog sistema kao najmoćnijeg mehanizma koji se suočava sa stresorima (Franceschi i saradnici, 2000a). Subjekti koji tokom godina očuvaju

funkcionisanje svog imunskog sistema na visokom nivou će najverovatnije imati dug život (Wayne i saradnici, 1990; Pawelek i saradnici, 1999).

- **Neuroendokrina teorija starenja**

Ova teorija ukazuje na to da je starenje posledica promena u neuralnim i endokrinim funkcijama koje su ključne za koordinaciju i odgovor različitih sistema na spoljašnju sredinu, programiranje fizioloških odgovora na stimulse sredine i održavanje optimalnog funkcionalnog statusa za reprodukciju i preživljavanje. Navedene promene utiču na preživljavanje preko adaptacije na stres (Fabris, 1991; De La Fuente, 2002).

### **1. 3. Starenje centralnog nervnog sistema**

Starenje je fenomen na koji utiče mnoštvo faktora i koji se dešava na molekulskom, ćelijskom i tkivnom nivou i predstavlja kompleksan niz događaja (Cummings, 2007) koji zahvata ceo organizam. Termin “normalno starenje mozga” se koristi za opisivanje starenja CNS-a u odsustvu klinički dijagnostifikovanih neurodegenerativnih ili psihijatrijskih bolesti, ili srodnih patologija. Ipak, treba istaći da se molekulske promene do kojih dolazi tokom normalnog starenja mozga znatno preklapaju sa onima uočenim kod mnogih bolesti.

Starenje različito utiče na različite aspekte neurološke funkcije (Christensen, 2001; Ruffman i saradnici, 2008; Salthouse, 1982; Schaie, 1996). Sposobnosti koje se odnose na brzinu obrade informacija, rešavanje problema, inhibitornu funkciju, radnu memoriju, dugotrajnu memoriju ili prostornu orijentaciju, opadaju sa starenjem (Park i Reuter-Lorenz, 2009; Salthouse, 1982, 1996). Pored toga, različite motorne funkcije, uključujući vreme reakcije, brzinu pokreta i koordinaciju ruke i stopala, konstantno slabe tokom starenja (Era i saradnici, 1986; Fozard i saradnici, 1994; Kauranen i Vanharanta, 1996). Nasuprot tome, sposobnosti koji se odnose na opšte znanje, implicitnu memoriju i profesionalnu stručnost, ne opadaju sa starenjem, već tokom godina čak može doći do njihovog poboljšanja (Christensen, 2001; Park i Reuter-Lorenz, 2009; Salthouse, 1982).

## **1. 4. Mehanizmi starenja i kognitivnog propadanja**

Naše znanje o osnovama molekulskih mehanizma starenja znatno je unapređeno tokom poslednje dve decenije. Identifikovani su signalni putevi koji deluju kao glavni regulatori starenja i same dužine života, a koji su evolutivno očuvani kod kvasaca, nematoda, mušica i sisara. Stopa starenja nije neizbežno fiksirana, već je plastična i podložna modifikacijama. Kognitivno propadanje koje je povezano sa starenjem mozga sisara takođe je varijabilno i potencijalno podložno modifikacijama. Važno pitanje je da li su starosno-zavisne kognitivne promene posredovane bilo kojim od glavnih regulatora starenja i dužine života. Novije studije su povezale ove signalne puteve sa kontrolom starosno-zavisne patologije mozga, dajući mogućnost da narušena regulacija fundamentalnih mehanizama starenja može doprineti patogenezi neurodegenerativnih poremećaja. Bolji uvid u biologiju starenja mozga ostvaren je korišćenjem naprednijih tehnika. Mikroerej tehnologija je omogućila opštu analizu ekspresije gena kod model organizama i ljudi, dovodeći do identifikacije evolutivno očuvanih promena tokom starenja. Istovremeno, napredne tehnike snimanja mozga su nam omogućile uvid u kognitivne mreže ljudskog mozga koji stari.

### **1.4.1. Makroskopske promene mozga tokom starenja**

Mnoge *post mortem* studije humanih mozгова otkrile su gubitak u težini mozga od oko 0,1% godišnje kod ljudi starih između 20 i 60 godina. Taj gubitak je intenzivniji nakon 60. godine života (Miller i Corsellis, 1977; Dekaban, 1978; Ho i saradnici, 1980, Blinkov i Glezer, 1968). Kada je tokom 70-tih godina prošlog veka počelo da se koristi neinvazivno snimanje mozga, otkriveno je da se volumen mozga takođe smanjuje tokom starenja (Coffey i saradnici, 1992; Jernigan i saradnici, 1990; Pfefferbaum i saradnici, 1994). Ovo smanjenje je relativno difuzno i uniformno u beloj masi cerebralnog korteksa, ali pokazuje neke regionalne razlike. Frontalni i parijetalni korteks su pogođeni više nego temporalni i okcipitalni korteks. Strijatum je takođe pogođen (Raz, 2004; Resnick i saradnici, 2003; Scahill i saradnici, 2003; Trollor i Valenzuela, 2001). Redukcija volumena mozga se

povećava sa 0,1-0,2% godišnje između 30. i 50. godine života na 0,3-0,5% godišnje nakon 70. godine života. Ventrikularni sistem se širi i popunjava prostor nastao redukcijom zapremine mozga. Leptomeningealni kompleks tokom starenja blago zadebljava, dok se subarahnoidni prostor uvećava.

#### **1.4.2. Mikroskopske promene mozga tokom starenja**

Shvatanja mikroskopske osnove makroskopskih promena mozga koje su uočene tokom starenja promenila su se tokom godina. Glavna kontroverza se odnosi na gubitak neurona. Prvobitne studije, započete 50-tih godina prošlog veka dovele su do zaključka da tokom starenja dolazi do značajnog gubitka neurona. Gubitak neurona iznosio je od 10% do 60%, u zavisnosti od studije i ispitivane populacije neurona. Ipak, uočene su i populacije neurona, poput jedra kranijalnog nerva, u kojima se broj ćelija nije smanjivao tokom starenja (Esiri, 1994). Tada se smatralo da su neuroni cerebralnog korteksa (Brody, 1955; Henderson i saradnici, 1980) i hipokampus (Ball, 1977), kao i Purkinjeove ćelije malog mozga (Hall i saradnici, 1975) naročito pogođene starenjem. Međutim, novije studije bazirane na stereološkom pristupu i izučavanju neurona u trodimenzionalnom prostoru (Benes i Lange, 2001; Howard i Reed, 1998; West, 1993; West, 1999) dovele su do zaključka da je gubitak neurona tokom starenja ili nedetektabilan, ili relativno umeren (Hof i Morrison, 2004; West i saradnici, 1994). Procenjivanje stepena gubitka neurona tokom starenja dodatno se komplikuje činjenicom da su u istraživanjima uglavnom proučavani mozgovi ljudi starijih od 80 godina, koji su već pokazivali patološke promene poput amiloidnih plaka i neurofibrilarnih klubadi i koji su takođe bili pogođeni neurovaskularnim bolestima (Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS), 2001). Generalno, kod primata je pokazano da tokom starenja ne dolazi do značajnog gubitka neurona u hipokampusu i većem delu neokorteksa. Ipak, redukcija neurona od 30% je uočena u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu primata i to je promena koja korelira sa narušavanjem zadataka radne memorije koja je zavisna od funkcije ovog regiona mozga (Gazzaley i saradnici, 1997; Keuker i saradnici, 2003; Merrill i saradnici, 2000; Peters i saradnici, 1994; Smith i saradnici, 2004).

Sa druge strane, iako se broj neurona ne menja, pokazano je da se veličina neurona smanjuje tokom starenja, naročito u cerebralnom korteksu (Anderson i saradnici, 1983; Haug, 1985; Meier-Ruge i saradnici, 1980; Terry i saradnici, 1987). Smatra se da veličina neurona reflektuje stepen dendritske i aksonske arborizacije ćelije. Stoga ne iznenađuju podaci da tokom starenja dolazi do smanjenja broja sinapsi, koje su lokalizovane uglavnom, ali ne i isključivo na dendritskim trnovima. Kod ljudi starijih od 50 godina zapažena je redukcija u broju i gustini trnova od 46% (Jacobs i saradnici, 1997). Međutim, pokazno je da može doći do kompenzatornog povećanja nekih dendrita, da bi se nadoknadio gubitak drugih (Buell i Coleman, 1981). Za razliku od neurona, tokom starenja mozga detektovano je povećanje broja i veličine astrocita i ćelija mikroglije (Esiri, 2007).

### **1.4.3. Ćelijske i molekulske promene**

Ključni faktor koji ima ulogu u starenju mozga je visok nivo oksidativnog metabolizma neurona kojim obezbeđuju energiju potrebnu za normalno funkcionisanje. Aktivnost mitohondrija neophodna za oksidativni metabolizam neminovno dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji imaju sposobnost da oštete proteine, nukleinske kiseline i lipide. Oštećenje DNK dovodi do smanjene genske ekspresije ili stvaranja izmenjenih proteina koji moraju biti eliminisani procesima kao što je proteazomska degradacija. Jedna novija studija ribonukleinskih kiselina (RNK) dobijenih iz humanih prefrontalnih korteksa je pokazala da je oko 4% od 11000 ispitivanih gena imalo smanjenu ekspresiju nakon 40. godine života (Esiri, 2007). Ovi geni su uključeni u procese sinaptičke funkcije i plastičnosti, vezikularnog transporta, mitohondrijalne funkcije i homeostaze kalcijuma. Nasuprot njima, ekspresija nekih gena je povećana, uključujući gene koji imaju ulogu u pakovanju proteina i odgovoru na stres, antioksidativnoj odbrani, homeostazi jona metala i inflamatornom odgovoru (Lu i saradnici, 2004). Enzimi antioksidativne zaštite i faktori rasta, za koje se očekuje da suzbijaju efekte oksidativnih oštećenja, imaju izmenjenu efektivnost usled promena u njihovim signalnim putevima ili niskoj produkciji tokom starenja (Mattson i saradnici, 2004). Antioksidativna odbrana u mozgu je, u najboljem slučaju, relativno niska. Nasuprot tome, mozak je bogat nezasićenim masnim kiselinama

koje su naročito osjetljive na peroksidaciju (Xiong i saradnici, 2002). Tokom starenja detektovana je i povećana količina gvožđa u mozgu (Zecca i saradnici, 2004). Gvožđe dospeva do mozga mehanizmom selektivnog usvajanja preko krvno-moždane barijere, ali malo je poznato kako se oslobađa i zašto se akumulira tokom starenja. Gvožđe je esencijalna komponenta mnogih enzima u mozgu, ali visoka koncentracija reaktivnog gvožđa može da potpomogne oksidativni stres. Pored gvožđa, i kalcijum ima fundamentalnu ulogu u normalnom funkcionisanju ćelije. Smanjenje efikasnosti mitohondrija do koga dolazi tokom starenja je povezano sa promenama u homeostazi kalcijuma. Povećani nivo unutarćelijskog  $Ca^{2+}$  je odgovoran za aktivaciju kalcijumom-aktiviranih proteaza, kaspaza, što dovodi do ćelijske smrti apoptozom. Međutim, verovatnije je da se u mozgu tokom starenja ispoljavaju lokalizovaniji efekti, poput odumiranja određenih dendrita (Cowan i saradnici, 2001; Gilman i Mattson, 2002).

Moždani neurotrofinski faktor (engl. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) je dobro okarakterisan modulator normalnog starenja mozga (Tapia-Arancibia i saradnici, 2008). Njegov nivo se u mozgu smanjuje sa godinama. Ovaj faktor je neophodan za procese učenja i pamćenja koji su narušeni tokom starenja (Tapia-Arancibia i saradnici, 2008). Njegova ekspresija može biti indukovana fizičkom aktivnošću i dijetalnom restrikcijom, koje takođe predstavljaju modulatore normalnog starenja mozga (Tapia-Arancibia i saradnici, 2008).

### **1.5. Sredinski faktori i starenje mozga**

Najvažniji sredinski faktor koji utiče na starenje uopšte, a posebno na starenje mozga je redukovana ishrana. Već decenijama se zna da redukovani dnevni unos hrane značajno produžava život glodara i nekih drugih životinja (Merry, 2002; Martin i saradnici, 2006). Pored toga, smanjeno unošenje hrane povećava otpornost na oksidativne i metaboličke povrede, kancer, stres i dijabetes. Ostali korisni uticaji na moždanu funkciju u starijem životnom dobu su fizička aktivnost (Cotman i Berchtold, 2002), obrazovanje (Shenkin i saradnici, 2003; Staff i saradnici, 2004), kognitivna stimulacija (Lazarov i



saradnici, 2005) i visok unos polinezasićenih masnih kiselina (Kyle, 2002) i vitamina B, naročito B6, B12 i folata (Elias i saradnici, 2006).

## 1.6. Dijetalna restrikcija

Dijetalna restrikcija (DR) označava smanjeni unos hranljivih materija, bez pothranjenosti. Termin "dijetalna restrikcija" oslikava činjenicu da su sve dijetalne komponente redukovane, a ne samo broj kalorija (Masoro, 2009). Takođe, pored ukupnog unosa hrane, treba obratiti pažnju i na vreme između obroka. Miševi koji su bili na intermitentnoj ishrani (engl. *intermittent fasting*, IF) koja podrazumeva gladovanje svakog drugog dana pokazali su slične metaboličke promene kao i miševi koji su bili na svakodnevnoj DR (Anson i saradnici, 2003; Mattson i saradnici, 2003).

Smatra se da prekretnicu u izučavanju efekata restriktivnog režima ishrane na dužinu i kvalitet života predstavlja pionirski rad Mekkeja i saradnika iz 1935. godine (McCay i saradnici, 1935). Ipak, ideja da smanjeni unos hrane ima pozitivan uticaj na zdravlje, a samim tim i na dužinu života je znatno starija. Antikonvulzivna svojstva gladovanja prepoznata su još u antičko vreme, što sugerise da gladovanje i, generalno, DR verovatno predstavljaju prvi efikasan tretman za epileptičke napade u medicinskoj istoriji. Srednji vek je doneo prve pisane zapise o blagotvornom dejstvu kalorijske restrikcije zahvaljujući italijanskom plemiću Luiđiju Kornaru (Luigi Cornaro) iz 15. veka. On je živeo život u izobilju sve do svoje 35. godine, kada je po savetu lekara prešao na umerenu ishranu. Takav režim ishrane je propagirao u 4 kratke knjige koje je napisao između 83. i 95. godine života nazvane "*La vita sobria*", ili "Umetnost dugog življenja". Kornarov recept da se "jede što je manje moguće" njemu je bio izuzetno koristan, jer je živeo 102 godine u vreme kada je prosečna dužina života u Evropi iznosila manje od 30 godina (Leon, 2011). Frensis Bejkon (Francis Bacon, 1561–1626) je rekao " izgleda da je potvrđeno da onaj ko malo jede, dočeka dug život", navodeći za primer monahe u manastirima. Ser Vilijam Templ (William Temple, 1628–1699) je napisao da je "dobro zdravlje i dugovečnost nagrada za siromašne, a ne za bogate, jer prvi zavise od umerenosti, a ne od viška". Slično tome, Džordž Vašington (George Washington, 1732–1799) je

izjavio da "ukoliko želite dugo da živite, prvo nastojte da svoje apetite stavite u razumne okvire".

Eksperimentalne studije efekata restrikcije hrane na životinjama počele su početkom 20. veka. Godine 1917. Osborn i saradnici (Osborne i saradnici, 1917) su pokazali da restrikcija unosa hrane kod pacova ima pozitivan uticaj na njihov životni vek, kao i na reprodukciju u kasnijem životu. Mekkež je u svom često citiranom radu pokazao da restrikcija unosa hrane od 40% započeta kada se životinja odvoji od majke dramatično produžava njen život. Nakon ovog rada, pokazano je da dijetalna restrikcija ima slične korisne efekte kod različitih vrsta, i za sada je to jedina eksperimentalna intervencija koja može da produži život kod mnogih vrsta, uključujući kvasce, voćne mušice, nematode, ribe, pacove, miševе i pse (Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2005). Beskičmenjački model organizmi su naročito pogodni za analizu molekularnih mehanizama DR usled svoje jednostavnosti i kratkog životnog ciklusa (Fontana i saradnici, 2010; Kenyon, 2005). Ipak, metabolički, anatomski i fiziološki, beskičmenjaci se veoma razlikuju od sisara, tako da se pokazalo da glodari predstavljaju izuzetno vredan i pouzdan model za određivanje uticaja DR na dužinu i kvalitet života sisara. Kod glodara redukcija prosečnog dnevnog kalorijskog unosa od 30% do 60% započeta rano u životu dovodi do proporcionalnog povećanja maksimalne dužine života od 30% do 60% (Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2005). DR započeta u adultnom dobu (12 meseci) produžava maksimalnu dužinu života, ali samo 10-20% (Weindruch i Walford, 1982). Do danas, miševi i pacovi su jedini sisarski organizmi kod kojih je jasno pokazano da DR povećava i prosečnu i maksimalnu dužinu života i usporava mnoge strukturne i fiziološke promene do kojih dolazi tokom starenja u mnogim organima i tkivima.

U toku su dve studije o efektima DR (30% restrikcije) na prevenciju bolesti i dugovečnost na rezus majmunima. Jedna se odvija na Univerzitetu Viskonsin u Medisonu, a druga na Nacionalnom institutu za starenje (Ingram i saradnici, 1990; Kemnitz i saradnici, 1993). Slično glodarima, DR kod majmuna dovodi do smanjenja ukupnih i visceralnih masnih naslaga, poboljšava insulinsku senzitivnost i lipidni profil, snižava telesnu temperaturu i smanjuje inflamaciju (Kemnitz i saradnici, 1994; Lane i saradnici, 1996; Roth i saradnici, 2002; Kim i saradnici, 1997). S obzirom da rezus majmuni žive oko 40 godina,

biće potrebno još desetak godina da se dobiju podaci o efektima dugotrajne DR na maksimalnu dužinu života ovih primata.

Utvrđivanje efekata DR na starenje i dužinu života kod ljudi je teško, s obzirom da ne postoje validni biomarkeri starenja i zato što je teško sprovesti randomizovanu i kontrolisanu dugotrajnu studiju preživljavanja kod ljudi normalne težine. Drugi potencijalni problem je neadekvatna upotreba termina "kalorijska, tj. dijetalna restrikcija" u kliničkim studijama. U studijama na životinjama, DR se odnosi na uslove u kojima je energetska unos 30-50% redukovan u odnosu na nivo unosa kontrolne grupe životinja kojoj je standardna briketirana hrana dostupna *ad libitum* (AL). U nekim studijama unos hrane kontrolne grupe životinja je ograničen (85-95% kalorija koje životinje unose AL) da bi se izbeglo poređenje ispitivane DR grupe sa kontrolnim životinjama koje dobijaju na težini tokom starenja (Pugh i saradnici, 1999). Nasuprot tome, kod ljudi se termin DR koristi da se opiše redukcija energetskog unosa u uslovima kada je bazalni unos energije već povišen (gojazni ljudi).

### **1.6.1. Efekti dijetalne restrikcije**

Iako su korisni efekti dijetne na kardiovaskularni, imuni i endokrini sistem dobro poznati (Roth i saradnici, 2004; Lane i saradnici, 1999; Masoro, 2000; Berrigan i saradnici, 2002; Hursting i saradnici, 2003), njen uticaj na nervni sistem nije sistematski proučavan sve do nedavno. Ipak, kliničke studije o efektima DR na starenje mozga i neurološke bolesti još nisu sprovedene i sve raspoložive informacije potiču iz animalnih studija.

Ćelije CNS-a se tokom starenja suočavaju sa povećanim oksidativnim stresom (Serrano i Klann, 2004; Zecca i saradnici, 2004), narušenom energetskom homeostazom (Ames, 2004), akumulacijom oštećenih proteina (Gray i saradnici, 2003; Trojanowski i Mattson, 2003) i lezijama na nukleinskim kiselinama (Kyng i Bohr, 2005; Lu i saradnici, 2004). DR je jedna od eksperimentalnih manipulacija koje uspešno čuvaju stepen plastičnosti i/ili kognitivnih sposobnosti kod starih životinja (Idrobo i saradnici, 1987; Ingram i saradnici, 1987; Stewart i saradnici, 1989; Pitsikas i Algeri, 1992; Pitsikas i saradnici, 1992; Eckles i saradnici, 1997; Eckles-Smith i saradnici, 2000). Ipak, molekularna osnova ovih procesa nije sasvim razjašnjena.

Kod odraslih pacova DR uzrokuje smanjenje oštećenja hipokampusa i strijatuma i poboljšava rezultat na testovima ponašanja nakon ekscitotoksičnih i metaboličkih povreda (Bruce-Keller i saradnici, 1999). Neuroprotektivni efekat DR pokazan je i u animalnim modelima HB, Parkinsonove bolesti (PB), moždanog udara i AB (Duan, 2003; Maswood, 2004, Yu i saradnici, 1999).

Ranije je pomenuto da tokom starenja dolazi do kumulativnih oštećenja uzrokovanih mitohondrijalnim reaktivnim kiseoničnim vrstama (Harman, 1956). Poznato je da postoji obrnuta korelacija između produkcije ROS i dugovečnosti kod sisarskih vrsta (Ku i saradnici, 1993). Mozak je posebno osetljiv na oksidativni stres usled visoke stope aktivnosti mitohondrija i prisustva jona teških metala koji mogu delovati kao katalizatori oksidativnih reakcija. Pored toga, velika zastupljenost lipida u nervnom sistemu čini ga veoma osetljivim na oksidativna oštećenja. Lipidna peroksidacija ima veoma važnu ulogu u mnogim neurodegenerativnim i psihijatrijskim poremećajima (Barnham i saradnici, 2004). Pored toga oštećeni molekuli se nagomilavaju u dugoživećim postmitotskim neuronima (Sohal i saradnici, 1994). Pokazano je da DR i IF mogu da spreče oksidativni stres preko tri glavna mehanizma: smanjuju produkciju mitohondrijalnih ROS, povećavaju antioksidativnu odbranu i poboljšavaju mehanizme reparacije molekula koji su oštećeni oksidacijom (Gredilla i Barja, 2005). Izgleda da je smanjenje produkcije ROS u mitohondrijama najvažniji nosilac efekata DR. Nekoliko studija je pokazalo nizak nivo produkcije mitohondrijalnih ROS u različitim tkivima pacova koji su bili podvrgnuti DR, uključujući i mozak (Bevilacqua i saradnici, 2005; Sanz i saradnici, 2005).

### **1.6.2. Mehanizmi delovanja**

Od 1935. godine predloženo je niz različitih hipoteza o mehanizmu delovanja DR. Sam Mekkej je u svom radu predložio da DR produžava životni vek pacova tako što usporava njihov rast. Mnogi gerontolozi su podržavali ovu teoriju do osamdesetih godina prošlog veka, kada je pokazano da DR produžava život i adultnih miševa i pacova (Weindruch i Walford, 1982; Yu i saradnici, 1985). Berg i Sims su 1960. godine predložili mehanizam delovanja DR prema kome dijeta produžava život smanjujući masne naslage u

telu (Berg i Simms, 1960). Ova hipoteza je bila široko prihvaćena od strane nutricionista, ali je kasnije odbačena. Sacher je 1977. godine predložio da DR produžava život smanjujući stopu metabolizma jedinke (Sacher, 1977). Ovu teoriju su odmah prihvatili gerontolozi, a danas je dosta onih koji je podržavaju, ali i osporavaju.

Još jedan mogući mehanizam delovanja DR je putem hormeze (lat. *hormezis*). Hormeza se odnosi na fenomen prilikom koga obično štetan agens spoljašnje sredine (zračenje, hemijske supstance) kada je primenjen u niskom intenzitetu ili koncentraciji, menja svoju ulogu i postaje koristan faktor. Za DR se smatra da predstavlja stresor niskog intenziteta koji izaziva odgovor preživljavanja u organizmu, pomažući mu da toleriše štetne uticaje aktivirajući puteve dugovečnosti (Masoro, 2007). I zaista, DR dovodi do umerenog povećanja nivoa slobodnog kortikosterona u plazmi miševa i pacova. Ovo hronično povećanje bi trebalo da ima značajni anti-inflamatorni i anti-tumorski efekat (Klebanov i saradnici, 1995). Na ćelijskom i molekularnom nivou DR može da indukuje povećanu aktivnost gena koji štite ćeliju od delovanja štetnih agenasa (Heydari i saradnici, 1993). Takođe, DR povećava autofagiju i popravku oštećenja DNK i pojačava mehanizme endogene enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite (Cuervo i saradnici, 2005; Weraarchakul i saradnici, 1989; Cho i saradnici, 2003). Autofagija je ćelijski proces kojim se dugoživeći proteini, kao i cele organele odvajaju i degraduju od strane lizozoma (Alirezai i saradnici, 2011). Ovaj proces je esencijalan za održanje dugoživećih ćelija, kakvi su neuroni, te je stoga fundamentalan za funkcionisanje CNS-a. Narušavanje autofagije je povezano sa neurodegenerativnim bolestima, poput AB, Parkinsonove bolesti (PB) i HB (Martinez-Vicente i Cuervo, 2007). Pokazano je da čak i kratkotrajna DR pojačava autofagiju u neuronima (Alirezai i saradnici, 2010), primarno preko inhibicije mTOR-a (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*), serin/treonin proteinske kinaze koja reguliše ćelijski rast i proliferaciju, kao i proteinsku sintezu i transkripciju. Naime, DR suprimira mTOR i ova inhibicija ima fundamentalnu ulogu u pozitivnim efektima DR, uključujući odlaganje starenja i neurodegeneracije.

Pored toga, blag metabolički stres povezan sa dijetalnom restrikcijom indukuje ekspresiju neurotrofnih faktora u mozgu (Mattson i Furukawa, 1996). Neki od ovih faktora, poput nervnog faktora rasta (engl. *nerve growth factor*, NGF), BDNF i baznog

fibroblastnog faktora rasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), mogu da zaštite neurone od smrti u eksperimentalnim životinjama, kao i u modelima akutnih (moždani udar, trauma, napadi) i hroničnih (AB, PB) neurodegenerativnih stanja u kulturi ćelija (Cheng i Mattson, 1994; Ren i Finklestein, 1997).

Ni za jedan od predloženih mehanizama ne postoje nesumljivi dokazi, ali je sasvim moguće da delovanje DR uključuje kombinaciju metaboličkih, fizioloških i ćelijskih adaptacija na samu DR (McCay i saradnici, 1935; Brown-Borg, 2007). Poznato je da su signalni putevi osetljivi na nutrijente glavni modulatori procesa starenja: različite hranljive materije mogu, direktno ili indirektno, aktivirati različite puteve.

Ostali predloženi mehanizmi su:

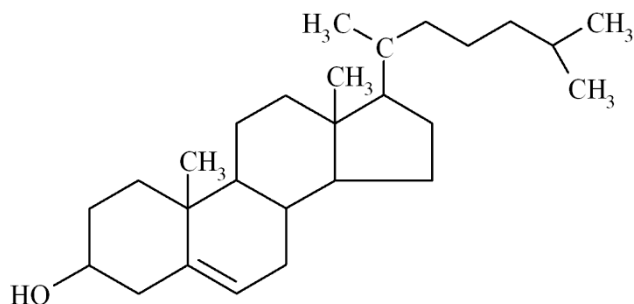
- redukovani nivoi hormona koji regulišu termogenezu i ćelijski metabolizam (tiroidni hormon, kateholamini)
- redukovani nivoi anaboličkih hormona (testosteron, estradiol, insulin, leptin)
- povećani nivoi hormona koji suprimiraju inflamaciju (glukokortikoidi, leptin, grelin) (Fontana i Klein, 2007).

Shematski prikaz delovanja dijetalne restrikcije predstavljen je na Slici 1.



**Slika 1. Efekti dijetalne restrikcije tokom starenja.** Modifikovano iz Manzanero i saradnici, 2011, Exp Transl Stroke Med 3:8

### 1.7. Metabolizam holesterola u mozgu



**Slika 2. Molekul holesterola**

Dvadeseti vek je obeležio veliki napredak u razumevanju bioloških procesa na molekulskom nivou. Jedno od najvećih dostignuća je svakako razumevanje kompleksnog metabolizma holesterola. Početkom prošlog veka, holesterol je bio samo delimično

okarakterisan, dok se o njegovoj strukturi veoma malo znalo. Sada je, međutim, struktura jasno definisana, dok su put biosinteze, kao i elegantni mehanizmi kojima je regulisan metabolizam holesterola potpuno razjašnjeni.

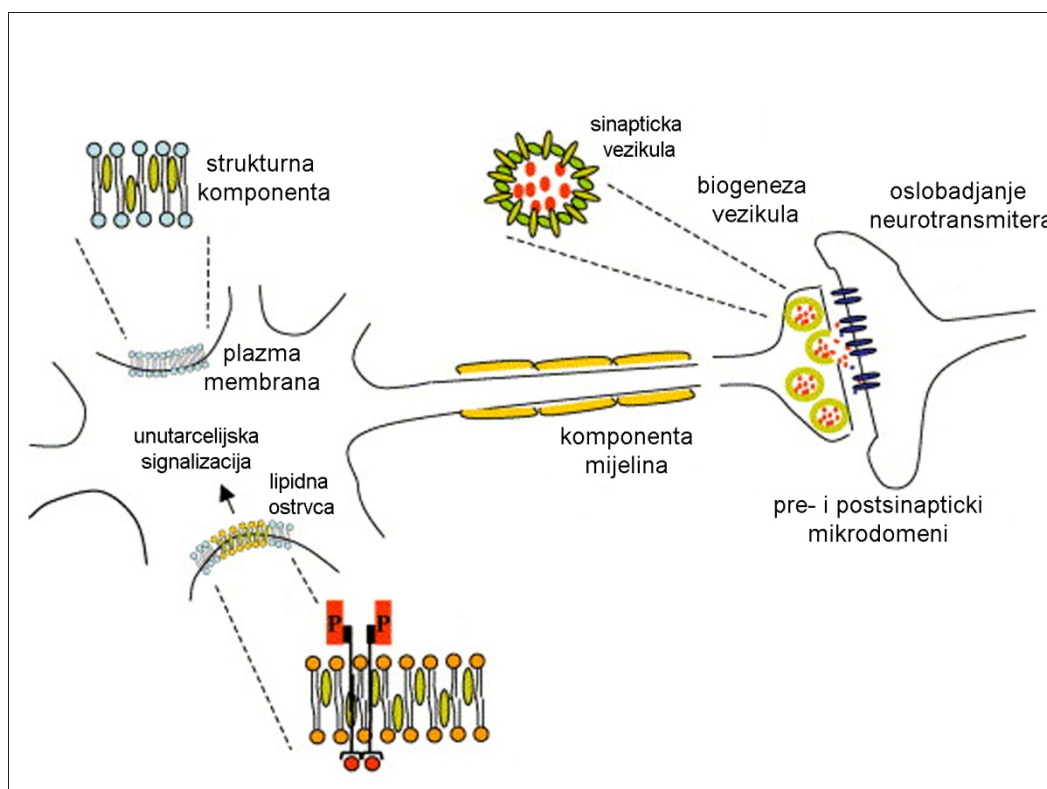
Puletie de la Sall (Poullietier de la Salle) je otkrio holesterol u žuči i kamenu u žuči (Fieser i Fieser, 1959) u drugoj polovini 18. veka. Francuski hemičar Mišel Eugen Ševro (Michael Eugene Chevreul) je 1815. godine je ovu supstancu nazvao holesterin (grčki: khole - žuč i stereos - čvrsto). Empirijska formula za holesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ) je ustanovljena 1888. godine (Slika 2).

Početak prošlog veka bilo je poznato da holesterol ima alkoholnu funkcionalnu grupu i dvostruku vezu. Za rad na razjašnjavanju strukture holesterola i holnih kiselina Henrik Viland (Heinrich Wieland) je dobio Nobelovu nagradu za hemiju 1927. godine. Interesantno je da prva struktura četiri prstena holesterola nije bila sasvim tačna. Veliki trud je uložan dok 1932. godine Viland i Dejn (E. Dane) nisu objavili tačnu strukturu holesterola. Nakon toga je počelo istraživanje puta biosinteze ovog kompleksnog molekula. Konrad Bloč (Konrad Bloch) je 1964. godine dobio Nobelovu nagradu za doprinos razjašnjavanju biosinteze holesterola. Majkl Braun (Michael Brown) i Džozef Goldštajn (Joseph Goldstein), koji su 1985. godine dobili Nobelovu nagradu za istraživanja regulacije holesterola, nazvali su holesterol *Janusom*, molekulom sa dva lica. Iako se ovaj komentar tada odnosio na holesterol van mozga, on se danas lako može primeniti i na holesterol prisutan u CNS-u.

Holesterol je najzastupljeniji lipid u ćelijama sisara. Više od 2 milijarde godina evolucije učinilo je da se ovaj molekul savršeno uklopi u fosfolipidni dvosloj gde reguliše fluidnost, permeabilnost i rigidnost bioloških membrana. Takođe, holesterol određuje i funkcionalna svojstva membranskih proteina, poput jonskih kanala i transmitterskih receptora (Yeagle, 1985; Spector i Yorek, 1985; Bastiaanse i saradnici, 1997; Burger i saradnici, 2000). Holesterol nije uniformno distribuiran u biološkim membranama, već je, zajedno sa ostalim lipidima, poput sfingomijelina, koncentrisan u mikrodomenima, označenim kao lipidna ostrvca. Ona su dijametra nekoliko desetina nanometara i služe kao platforme za organizaciju različitih signalnih komponenti u dinamičke module i kontrolu njihovog subćelijskog sortiranja i efikasne funkcije (Paratcha i Ibanez, 2002; Brown i



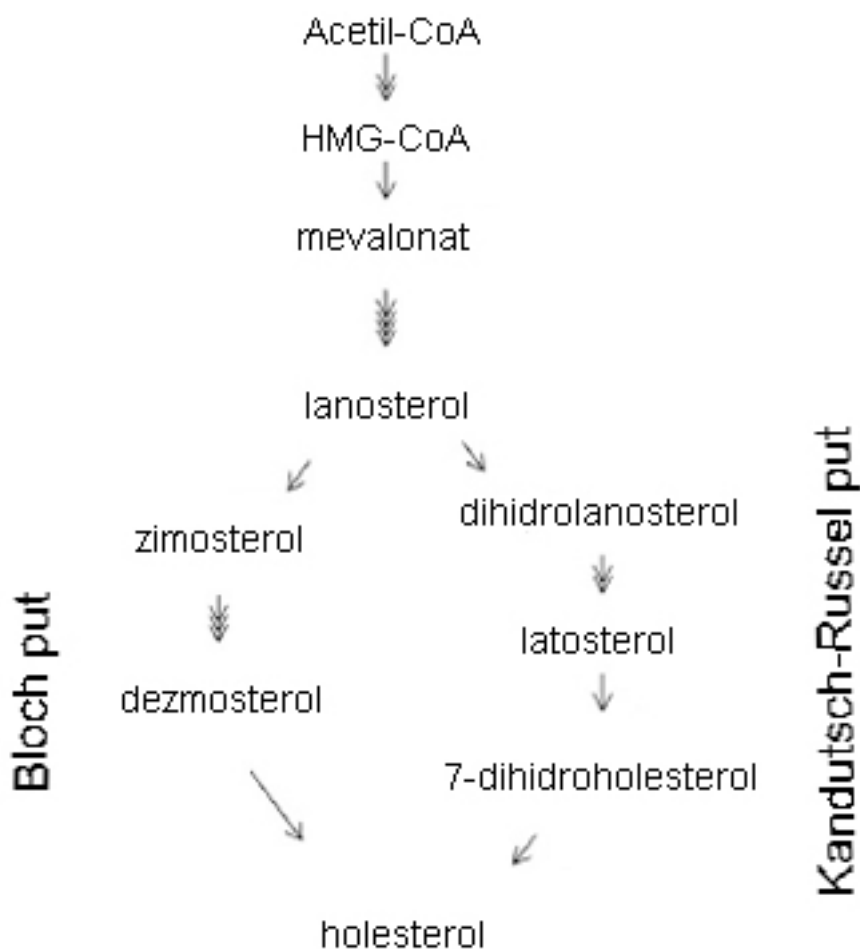
London, 1998; Kurzchalia i Parton,1999; Simons i Toomre, 2000; Ikonen, 2001; Simons i Eehalt, 2002). Holesterol je takođe prekursor steroidnih hormona, žučnih kiselina, vitamina D i oksisterola. U mozgu, holesterol je izuzetno važan za funkcionisanje sinapsi. Naime, on služi kao gradivni materijal za različite sinaptičke komponente i prekursor je steroida koji dalje promovišu sinaptogenezu (Sakamoto i saradnici, 2001). Takođe, nivo holesterola u ćeliji reguliše stvaranje kompleksa dva proteina sinaptičkih vezikula, sinaptofizina i sinaptobrevina, koji dalje određuje sinaptičku efikasnost (Mitter i saradnici, 2003), a pokazano je i da je za transport vezikula duž mikrotubula neophodan holesterol (Klopfenstein i saradnici, 2002). Veza između holesterola i biogeneze vezikula dovela je do hipoteze da je broj sinapsi koje neuron može da formira određen njegovim kapacitetom da generiše sinaptičke vezikule (Slika 3).



**Slika 3. Uloga holesterola u mozgu.** Modifikovano iz Valenza i Cattaneo, 2006, Prog Neurobiol 80:165-76

Mozak sadrži 5-10 puta više holesterola od bilo kog drugog organa u telu. Naime, ćelije CNS-a, neuroni i astrociti, imaju veliku potrebu za holesterolom. Neuroni moraju da sintetišu ogromnu površinu membrana za aksone, dendrite i sinapse (Goritz i saradnici, 2005; Pfenninger, 2009). Najveći deo holesterola se nalazi u mijelinskom omotaču i u membranama nervnih ćelija. Procenjeno je da je oko 70% holesterola prisutnog u mozgu povezano sa mijelinom. U CNS-u holesterol je u najvećoj meri (>99.5%) neesterifikovan. Visok sadržaj holesterola u mozgu nije povezan sa odgovarajućom visokom stopom sinteze, jer je sinteza holesterola u mozgu 20-80 puta manja nego u jetri (Spady i Dietschy, 1983). Iako sadrži oko 650 km krvnih sudova (Begley i Brightman, 2003), mozak ne može da preuzme holesterol iz cirkulacije, zahvaljujući prisustvu krvno-moždane barijere i potpuno zavisi od *in situ* sinteze holesterola. Ipak, pokazano je da oko 1% holesterola ipak prođe krvno-moždanu barijeru (Lutjohann i saradnici, 2004).

Biosinteza holesterola je kompleksan i energetski veoma skup proces. Naime, za sintezu jednog molekula holesterola neophodno je 18 molekula acetil-CoA, 18 molekula ATP, 29 molekula NADPH i više od 20 enzima. Biosinteza holesterola počinje od acetil koenzima A (CoA) koji se nakon više enzimskih reakcija prevodi u holesterolski prekursor lanosterol, prvi steroidni intermedijer u biosintezi holesterola. Postoje dva glavna puta konverzije lanosterola u holesterol. Glavni put uključuje lanosterol kao intermedijer (put Kandutsch–Russell), dok alternativni put koristi dezmosterol kao intermedijer (put Bloch) (Slika 4). U Švanovim ćelijama u perifernom nervnom sistemu (PNS) sinteza holesterola se odvija preko lanosterola, dok oligodendrociti u CNS-u verovatno koriste dezmosterol (Bourre i saradnici, 1990). Stopa konverzije dezmosterola u holesterol korelira sa stopom mijelinizacije u CNS-u i smatra se ograničavajućom za sintezu holesterola u CNS-u. Pokazano je i da put biosinteze holesterola zavisi od starosti organizma. Tako se kod mladih miševa holesterol uglavnom sintetiše preko dezmosterola, dok je kod starih glavni prekursor lanosterol (Lutjohann i saradnici, 2002).



**Slika 4. Šematski prikaz sinteze holesterola.** Modifikovano iz Kölsch i saradnici, 2010, *Biochim Biophys Acta* 1801:945-50

Prvi dokazi da ćelije u mozgu sintetišu holesterol objavljeni su sredinom prošlog veka od strane grupe Henrika Velča (Heinrich Waelsch). Njihovo pionirsko korišćenje teške vode za izučavanje sinteze lipida u pacovima ukazalo je da se holesterol sintetiše u mozgu i da je stopa sinteze viša tokom ranog postnatalnog razvića nego kod adultnih životinja (Dietschy i Turley, 2004). Sinteza holesterola u CNS-u tokom razvića je relativno visoka, ali kod adultnih jedinki pada na nizak nivo. Ovo se može objasniti efikasnim recikliranjem holesterola u mozgu. To za posledicu ima veoma dug poluživot holesterola, koji je procenjen na oko 5 godina u mozgu odraslog čoveka (Bjorkhem i saradnici, 1998). Treba istaći da su procene o metaboličkoj stabilnosti holesterola u celom mozgu uglavnom

zasnovane na činjenici da se najveća količina holesterola u mozgu nalazi u mijelinu (Dietschy i Turley, 2004). Obrt holesterola u pojedinačnim neuronima i astrocitima mogao bi da bude veoma visok i da dostigne procenjenih 20% dnevno, u zavisnosti od regiona mozga i neuronalnog ćelijskog tipa (Dietschy i Turley, 2004). U korist ovakvog zaključka ide i činjenica da je obrt holesterola proporcionalan metaboličkoj stopi različitih tkiva i životinjskih vrsta (Dietschy i Turley, 2004). S obzirom da neuroni imaju intenzivnu metaboličku aktivnost, obrt holesterola u njima trebalo bi da bude isto tako visok.

Eksperimenti na tzv. kompartmentalizovanoj kulturi su pokazali da, iako i aksoni i dendriti, kao i telo neurona poseduju endoplazmatski retikulum (ER) gde su locirani enzimi koji učestvuju u biosintezi holesterola, izgleda da se sinteza obavlja isključivo u telu neurona (Vance i saradnici, 1994), odakle se transportuje u akson (de Chaves i saradnici, 1997). Subćelijski transport novosintetisanog holesterola od ER do plazma membrane je posredovan nevaskularnim mehanizmima koji mogu uključivati direktni kontakt membrana ili specijalizovane citosolne nosače (Soccio i Breslow, 2004; Prinz, 2007; Ikonen, 2008; Storch i Xu, 2009). Za sada ostaje da se utvrdi da li i kako neuroni i astrociti koriste ovaj transportni sistem.

Prema *in vitro* studijama astrociti sintetišu 2 do 3 puta više holesterola nego neuroni i fibroblasti. Oligodendrociti, ćelije odgovorne za mijelinizaciju, imaju još veći kapacitet za sintezu holesterola. Neuroni smanjuju ili potpuno obustavljaju sintezu holesterola nakon rođenja i potpuno zavise od holesterola sintetisanog od strane astrocita (Ignatius i saradnici, 1986; Poirier i saradnici, 1993). Naime, sinteza jednog molekula sterola zahteva širok spektar enzima koji su distribuirani u različitim subćelijskim organelama i zahtevaju veliku količinu energije (Pfriege, 2003a). Predstavljeni su eksperimentalni dokazi o transferu holesterola od astrocita do neurona u *in vitro* sistemu (Mauch i saradnici, 2001). U kulturi neurona iz CNS-a sisara je pokazano da je ovim neuronima neophodan holesterol poreklom iz glijskih ćelija da bi formirali brojne i efikasne sinapse (Pfriege, 2003a). Transport holesterola od astrocita do neurona odvija se u okviru apolipoproteina E (ApoE).

Lipoproteini izlučeni u kulturi astrocita sadrže holesterol i fosfolipide, ali relativno malo esterifikovanog holesterola ili triglicerida. Prisustvo prekursora holesterola,

latosterola i dezmosterola, u ovim lipoproteinima (Mutka i saradnici, 2004; Wang i saradnici, 2008) sugeriše da astrociti sintetišu prekursore koji zatim bivaju preuzeti od strane neurona i konvertovani u holesterol. Ovakvo parcijalno snabdevanje može biti veoma efikasno jer se na taj način zaobilazi konverzija lanosterola u neuronima. Ćelijsko preuzimanje lipoproteina je posredovano specifičnim receptorima, koji čine familiju transmembranskih proteina za koje se vezuju ApoE (Herz, 2009). Od svih članova familije, dva receptora su najverovatnije uključena u transport holesterola u mozgu. To su receptor lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein receptor*, LDLR) i protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*, LRP1). LDLR eksprimiran i u neuronima i u glijskim ćelijama (Pitas i saradnici, 1987; Swanson i saradnici, 1988), dok je LRP1 predominantno eksprimiran u neuronima (Moestrup i saradnici, 1992; Wolf i saradnici, 1992; Rebeck i saradnici, 1992). Patološka stanja menjaju količinu i ćelijsko-specifičan obrazac ekspresije lipoproteinskih receptora (Boyles i saradnici, 1987; Rebeck i saradnici, 1992; Tooyama i saradnici, 1993).

Tokom godina se mislilo da je nakon završene mijelinizacije dalji metabolizam holesterola u CNS-u u stagnaciji. Ovakva slika je promenjena tokom poslednje decenije. Sada se zna da mala populacija neurona aktivno metaboliše holesterol i da promene u ovom metabolizmu imaju efekte na funkcije višeg reda u mozgu.

Održavanje homeostaze holesterola u mozgu je ključno za normalno funkcionisanje CNS-a. To se postiže visoko koordinisanom i sofisticiranom regulacijom sinteze, transporta i eliminacije viška holesterola iz mozga. Narušena homeostaza holesterola u CNS-u nalazi se u osnovi brojnih neurodegenerativnih bolesti (Valenza i Cattaneo, 2006).

Uprkos efikasnom iskorišćenju holesterola, ipak postoji potreba za njegovom ekskrecijom iz mozga da bi se održalo ravnotežno stanje, jer kao polarni lipid holesterol može biti toksičan za ćeliju. Njegova akumulacija uzrokuje ćelijsku smrt (Liu i saradnici, 2010). Do sada su poznata 2 mehanizma ekskrecije viška holesterola iz mozga. Procenjeno je da se dnevno u cerebrospinalnu tečnost eliminiše 1-2 mg holesterola u vidu holesterola vezanog za ApoE (Pitas i saradnici, 1987). Tačna mesta ovakve eliminacije, kao i sam mehanizam još uvek nisu precizno ustanovljeni. Drugi, kvantitativno mnogo značajniji mehanizam uključuje konverziju holesterola u 24S-hidroksiholesterol (24S-OHC)

(Lutjohan i saradnici, 1996; Bjorkhem i saradnici, 1997; Bjorkhem i saradnici, 1998). Za razliku od holesterola, 24S-OHC prolazi krvno-moždanu barijeru. Dnevno se na ovaj način, kod ljudi, eliminiše 6-7 mg holesterola (Bjorkhem i saradnici, 1998; Lutjohann i saradnici, 1996). Iz cirkulacije 24S-OHC biva preuzet od strane jetre i eliminisan iz organizma. S obzirom da je skoro celokupan 24S-OHC prisutan u cirkulaciji čoveka poreklom iz mozga, može se koristiti kao surogat marker homeostaze holesterola u mozgu. Treba imati u vidu da se 24S-OHC u cirkulaciji prenosi istim lipoproteinima kao i holesterol (Babiker i Diczfalusy, 1998), pa promene u sadržaju lipoproteina mogu da utiču na nivo 24S-OHC (Bretillon i saradnici, 2000). Ova veza se uvek mora uzeti u obzir kada se 24S-OHC u plazmi koristi kao marker homeostaze holesterola u mozgu. Pokazano je da nivo 24S-OHC u cirkulaciji odražava balans između moždane produkcije ovog sterola i njegovog metabolizma u jetri (Bretillon i saradnici, 2000). Produkcija u mozgu je relativno konstantna, dok njegov metabolizam u jetri varira sa godinama. Nivo 24S-OHC je relativno konstantan nakon druge decenije života, mada postoji izvestan trend povećanja količine ovog sterola nakon šeste decenije života. Takođe je pokazano da različita neuropatološka stanja i bolesti utiču na nivo 24S-OHC u cirkulaciji (Leoni i saradnici, 2002; Bretillon i saradnici, 2000; Lutjohann i saradnici, 2000).

### **1.7.1. Metabolizam holesterola u bolestima i patološkim stanjima**

Brojne studije su ukazale da postoji jasna veza između metabolizma holesterola i neurodegenerativnih bolesti. Hiperholesterolemija *per se* je važan faktor rizika za nastanak AB i PB, dok je prisustvo alela ApoE ε4 najbolje opisani genski faktor rizika za AB sa kasnim početkom. Eksperimenti u kulturi ćelija su pokazali da će u membranama sa nižim sadržajem holesterola biti favorizovan neamiloidogeni put obrade amiloid prekursorškog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP) (Puglielli i saradnici, 2003), dok je povećan sadržaj holesterola povezan sa amiloidogenim putem obrade APP-a i akumulacijom beta-amiloida.

Značaj sinteze holesterola za funkcionisanje mozga naglašen je činjenicom da genetički deficiti u enzimima koji posreduju u postskvalenskoj sintezi holesterola uzrokuju

neurološke simptome (Waterham, 2006). Najučestalija i najbolje izučena bolest je *Smith-Lemli-Opitz* sindrom, autozomno-recesivni poremećaj koji se karakteriše malformacijama nekoliko organa, neurološkim simptomima i poremećajima ponašanja. Genetički poremećaj se tiče 7-dehidroholesterol reduktaze, koja katalizuje poslednji korak u biosintezi holesterola (Kelley i Hennekam, 2000). Ostale bolesti koje su uzrokovane genetičkim deficitima predstavljena je u Tabeli 1.

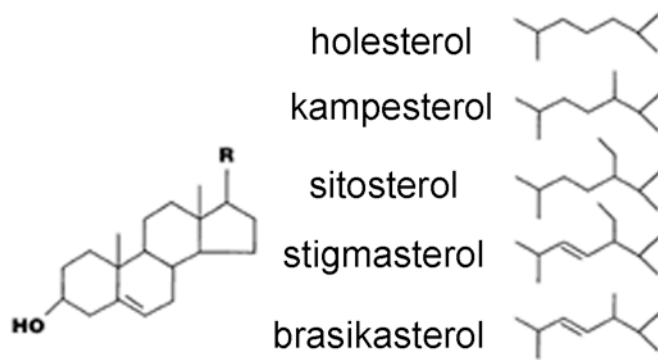
**Tabela 1. Poremećaji usled urođenih poremećaja u sintezi ili homeostazi holesterola.** Modifikovano iz Valenza i Cattaneo, 2006, Prog Neurobiol 80:165-76

Bolest	Nasleđivanje	Genetički deficit	Neurološke osobine	Uključeni put	Reference
Child sindrom	XLD	3 $\beta$ -hidroksisterol 4-dekarboksilaza	Ocipitalne malformacije	Biosinteza holesterola	Kelley and Herman (2001)
Hondrodizplazija punktata tip 2 (CDPX2)	XLD	3 $\beta$ -hidroksisteroid- $\Delta^4$ - $\Delta^1$ -izomeraaza	Povremene malformacije	Biosinteza holesterola	Kelley et al. (1999)
Anti-Bikslerov sindrom	AR	Lanosterol 14 alfa-demetilaza (Cyp51)	Brahicefalija, kraniofacijalni dismorfizam	Biosinteza holesterola	Bottero et al. (1997)
Latosteroloza	AR	Sterol C-5-desaturaza	Mikrocefalija, psihomotorna retardacija	Biosinteza holesterola	Brunetti-Pierri et al. (1997)
Desmosteroloza	AR	Desmosterol reduktaza	Mikrocefalija, retardacija	Biosinteza holesterola	Abderson et al. (2002)
Smith-Lemli-Opitz sindrom (SLOS)	AR	7-dehidroksiholesterol reduktaza (7-DHCRed)	Mentalna retardacija, autizam, mikrocefalija, kašnjenje u razvoju i holoprosencefalija	Biosinteza holesterola	Tint et al. (1994) i Porter (2002)
NPC bolest	AR	NPC 1 ili 2	Progresivna neurodegeneracija koja pogađa talamus i Purkinjeove ćelije, demencija	Transport i homeostaza holesterola	Crocker (1961) i Reid et al. (2004)
AD	-		Senilna demencija sa višestrukim nedostacima u kratkoročnoj memoriji i izvršnim kortikalnim funkcijama	Homeostaza holesterola	Sennvik et al. (2000) i Shobab et al. (2005)
HD	AD	Huntingtin	rogresivna motorna, psihijatrijska, kognitivna disfunkcija, neurodegeneracija primamo u strijatalnim neuronima	Biosinteza holesterola	Vonsattel aand DiFiglia (1998) i Valenza et al. (2005)

## 1.8. Biljni steroli

Biljni steroli (fitosteroli) su prirodni konstituenti ćelijskih membrana biljaka. Njihova uloga u biljkama je slična ulozi holesterola kod životinja (Law, 2000). Naime, oni određuju membransku fluidnost biljnih ćelija, kao i ostale fiziološke funkcije karakteristične za biljnu biologiju. Strukturno su slični holesterolu, sa malim razlikama u pozicijama etil- ili metil-grupa. Strukture biljnih stareola prikazane su na Slici 5. Do sada je poznato više od 250 različitih fitosterola (Piironen i saradnici, 2000). Najzastupljeniji

biljni steroli u hrani su  $\beta$ -sitosterol (65%), kampesterol (30%) i stigmasterol (3%) (Weihrauch i Gardner, 1978).  $\beta$ -sitosterol i kampesterol imaju etil-, odnosno metil-grupu na poziciji C-24, dok stigmasterol na toj poziciji ima etil-grupu, ali i dvostruku vezu na poziciji C-22. Stanoli su saturisane forme sterola. Najzastupljeniji su  $\beta$ -sitostanol i kampesteanol.



**Slika 5. Hemijska struktura holesterola i različitih biljnih sterola.**

Modifikovano iz von Bergmann i saradnici, 2005, Am J Cardiol 96:10D-14D

Iako holesterol i biljni steroli pokazuju veliku strukturnu sličnost, njihovi metabolizmi se razlikuju u nekim aspektima. Na primer, sisari ne sintetišu biljne sterole, za razliku od holesterola (Salen i saradnici, 1970). Apsorpcija ovih jedinjenja se takođe razlikuje od apsorpcije holesterola. Ljudi apsorbuju i zadržavaju 55-60% holesterola unetog hranom, dok je ukupna apsorpcija neholesterolskih komponenti znatno niža i iznosi 0.04-16% (Salen i saradnici, 1970; Gould i saradnici, 1969; Sudhop i saradnici, 2002; Heinemann i saradnici, 1993; Ostlund i saradnici, 2002). Razlika u stopi apsorpcije između biljnih sterola i holesterola se može objasniti hemijskom strukturom ovih jedinjenja. Dodavanje etil-, odnosno metil-grupe na poziciji C-24 i, u slučaju stanola saturacijom  $\Delta^5$  dvogube veze, povećava hidrofobnost molekula i tako smanjuje njegovu apsorpciju (Heinemann i saradnici, 1993). Biljni steroli se, verovatno, ne metabolišu do žučnih kiselina i mnogo brže od holesterola se eliminišu iz jetre (von Bergmann i saradnici, 2005).

Pedesetih godina prošlog veka otkriveno je da fitosteroli iz soje snižavaju nivo holesterola u serumu (Peterson, 1958). Biljni steroli su se nakon toga upotrebljavali kao



kapsule, sirupi ili suspenzije, tako da su se koristile visoke doze da bi se postigao hipoholesterolemički efekat (Lees i saradnici, 1977). Zbog loše rastvorljivosti u vodi nije bilo moguće koristiti ih kao farmaceutske agense i na kraju se od njih odustalo. Ipak, ponovo su postali interesantni kada je otkriveno da esterifikacija olakšava njihovo unošenje u različite vrste hrane (Weststrate i Meijer, 1998; Hendriks i saradnici, 1999).

U skorije vreme, mnoge studije su pokazale da i biljni steroli i stanoli snižavaju koncentracije lipoproteina niske gustine (engl. *low density lipoproteins*, LDL) u serumu, bez efekata na koncentracije lipoproteina visoke gustine (engl. *high density lipoproteins*, HDL) i triglicerida (Plat i saradnici, 2000; Mensink i saradnici, 2002), mada postoje i studije u kojima nije otkriven takav efekat (AbuMweis i saradnici, 2006).

Različiti mehanizmi su predloženi da bi se objasnilo efekat biljnih sterola i stanola na snižavanje holesterola u serumu. Fitosteroli mogu da istisnu holesterol iz micela (Child i Kuksis, 1986) zato što su hidrofobniji od holesterola. Ova zamena dovodi do smanjenja koncentracije holesterola u micelama i posledično smanjenje apsorpcije holesterola. Biljni steroli mogu i da redukuju stopu esterifikacije holesterola u enterocitima (Child i Kuksis, 1983)

## **1.9. Proteinu koji su uključeni u metabolizam holesterola u mozgu**

### **1.9.1. 3-Hidroksi-3 metilglutaril koenzim A - reduktaza (HMGCR)**

3-Hidroksi-3 metilglutaril koenzim A - reduktaza (HMGCR) je ograničavajući enzim u biosintezi holesterola. Ovaj enzim katalizuje konverziju 3-hidroksi-3 metilglutaril koenzima A (HMG-CoA) u mevalonat (Espenshade i Hughes, 2007). Humani protein HMGCR se sastoji od jednog polipeptidnog lanca od 888 aminokiselina. N-terminalni hidrofobni deo od 339 aminokiselina se nalazi u membrani ER, dok je katalitičko mesto enzima locirano u hidrosolubilnom C-terminalnom citoplazmatskom domenu. Ova dva regiona enzima su povezana regionom spojnicom (engl. *linker-region*), koji obuhvata aminokiselinske ostatke 340-459 (Istvan i Deinsehofer, 2000). Membranski domen sadrži tzv. domen osetljiv na sterole (engl. *sterol sensing domen*, SSD), odgovoran za vezivanje

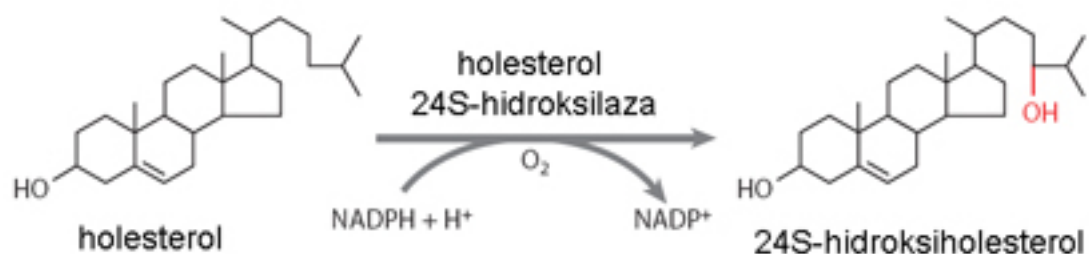
sterola ili drugih mevalonatskih derivata, što ubrzava degradaciju enzima (Ravid i saradnici, 2000).

HMGCR je visoko regulisani enzim, u pogledu količine enzima i aktivacionog stanja. Kontrola se ostvaruje preko stope sinteze i degradacije enzima, ili posttranslacionim modifikacijama fosforilacijom ili defosforilacijom. Hormonska regulacija HMGCR je ostvarena delovanjem nekoliko hormona na različitim nivoima: tiroidni hormoni regulišu ekspresiju gena, glukokortikoidi deluju na posttranslacionom nivou (Geelen i saradnici, 1986), dok insulin utiče i na transkripcione (Feramisco i saradnici, 2004) i na posttranslacione procese (Leoni i saradnici, 1985). Produkti mevalonatskog puta sinteze omogućavaju regulaciju negativnom povratnom spregom modulišući i ekspresiju i degradaciju enzima. Degradacija ovog enzima se dešava u ER preko ubikvitin-proteazomskog sistema.

HMGCR je fiziološki prisutna u ćeliji u nefosforilisanj aktivnoj formi (30%) i fosforilisanj neaktivnoj formi (70%). To je posledica fosforilacionog stanja serina na poziciji 871 (Ser871) koji je u katalitičkom domenu. Odnos nefosforilisane forme i ukupnog protein ukazuje na aktivaciono stanje enzima. Specifične kinaze (uglavnom AMP-zavisne kinaze, AMPK) (Ching i saradnici, 1996) i fosfataze (uglavnom protein fosfataza 2A, PP2A) (Gaussin i saradnici, 1997) su odgovorni za ove interkonverzije. Oni predstavljaju enzime uključene u brzu regulaciju aktivnosti HMGCR.

### **1.9.2. Holesterol 24S-hidroksilaza (CYP46)**

Holesterol 24-hidroksilaza (CYP46) je enzim odgovoran za konverziju holesterola u 24S-OHC (Slika 6). To je protein od oko 500 aminokiselina koji pripada familiji citohroma P450. Uočena je velika homologija humanog i mišjeg proteina (~95%), dok je homologija sa ostalim članovima superfamilije P450 manja od 35% (Lund i saradnici, 1999). Gen za CYP46 nalazi se na humanom hromozomu 14q32.1 (~ 42 kb).



**Slika 6. Enzimski konverzija holesterola u 24S-hidroksiholesterol.**  
 Modifikovano iz Russell i saradnici, 2009, Annu Rev Biochem 78:1017-40

Promotorski region ima visok sadržaj GC parova, što je odlika gena za koje se smatra da su konstitutivno eksprimirani i neophodni za osnovne ćelijske funkcije, odnosno imaju tzv. “housekeeping” ulogu. Dosadašnje studije su pokazale da na ekspresiju ovog gena utiču oksidativni stres i tretman kombinacijom deksametazona i interleukina-6 (Ohyama i saradnici, 2006), kao i samo starenje (Perović i saradnici, 2009).

CYP46 je neuron-specifični enzim, eksprimiran u endoplazmatskom retikulumu. Imunohistohemijskim bojenjem je utvrđeno njegovo prisustvo u piramidalnim ćelijama hipokampusa, Purkinjeovim ćelijama cerebeluma, kao i u ćelijskim telima neurona II/III, V i VI sloja korteksa. Takođe, ekspresija ovog proteina je potvrđena i u interneuronima hipokampusa i cerebeluma, u ganglijskim ćelijama retine i u populaciji retinalnih ćelija lokalizovanim u unutrašnjem zrnastom sloju. Dvojnim bojenjem sa postsinaptičkim markerima utvrđena je postsinaptička distribucija ovog enzima. Za sada nema dokaza da se CYP46 eksprimira u PNS-u (Ramirez i saradnici, 2008).

U određenim patološkim uslovima CYP46 može biti detektovan i u glijskim ćelijama, astrocitima i mikroglijji. Tako je otkriveno da astrociti pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti eksprimiraju ovaj enzim (Bogdanović i saradnici, 2003). CYP46-pozitivni astrociti i mikroglijske ćelije su detektovane i u blizini mesta povrede, nakon različitih vidova traume mozga (He i saradnici, 2006, Cartagena i saradnici, 2008).

Male količine mišje iRNK za CYP46 su detektovane i u testisima i jetri. Izgleda da se ova iRNK u testisima ne prevodi u protein, dok je količina iRNK i proteina u jetri oko 100 puta manja nego u mozgu, što dalje potvrđuje da se CYP46 preferencijalno eksprimira u mozgu (Nishimura, 2003).

Genetički modificirani miševi kod kojih je inaktiviran gen za kolesterol 24-hidroksilazu se fenotipski ne razlikuju od divljeg soja. Isto tako, između ovako genetički modificiranih miševa i divljeg soja nema razlike u stopi rasta i težini tela, kao i u težini mozga, jetre i nadbubrežnih žlezda. Iako je količina kolesterola ista kod obe grupe miševa, *de novo* sinteza kolesterola je redukovana kod genetički modificiranih miševa. Sintaza kolesterola u korteksu i hipokampusu, regionima mozga koji ekspimiraju visoke nivoe CYP46 je smanjena čak za 60%, dok je sinteza u regionima CNS-a, poput kičmene moždine koja je bogata mijelinom, koji normalno ekspimiraju niske nivoe ovog enzima, nepromenjena. Heterozigoti za indukovanu mutaciju gena za CYP46 pokazuju 20-30% redukovanu stopu sinteze kolesterola u mozgu. Takođe je pokazano da ovako genetički modificirani miševi imaju narušeno prostorno, asocijativno i motorno učenje, i nepravilnu dugotrajnu potencijaciju (engl. *long-term potentiation*, LTP) u hipokampusu (Russell i saradnici, 2009).

### **1.9.3. Apolipoprotein E (ApoE)**

Apolipoprotein E (ApoE) je otkriven pre četrdesetak godina u humanoj plazmi. Prvobitno je nazvan "protein bogat argininom" (Shore i Shore, 1974). Od otkrića do danas napravljen je značajan napredak u razumevanju uloge ApoE u održavanju homeostaze kolesterola u plazmi. Dve decenije nakon njegovog otkrića u plazmi, ApoE je detektovan i u mozgu, gde predstavlja glavni transportni molekul kolesterola (Posse de Chaves i saradnici, 2008).

Kod ljudi, ekspresija ApoE je najveća u jetri, a potom u mozgu (Weisgraber, 1994). Humani ApoE je glikoprotein od 299 aminokiselina koji je posttranslaciono sijaliniziran (Weisgraber, 1994; Xu, 1999; Yamauch, 1999). ApoE je kodiran polimorfnim genom koji se kod ljudi nalazi na hromozomu 19 (Das i saradnici, 1985; Lin-Lee, 1985). Varijacije u sekvenci gena daju 3 alela čiji su produkti izoforme proteina: ApoE2, ApoE3 i ApoE4. Nasleđivanje alela  $\epsilon 4$  je najjači poznati genetički faktor rizika za dobijanje Alchajmerove bolesti sa kasnim početkom (Corder, 1993; Strittmatter, 1993; Poirier, 1993), a vezan je i sa ubrzanim razvojem i progresijom i drugih neurodegenerativnih stanja, kao što su PB

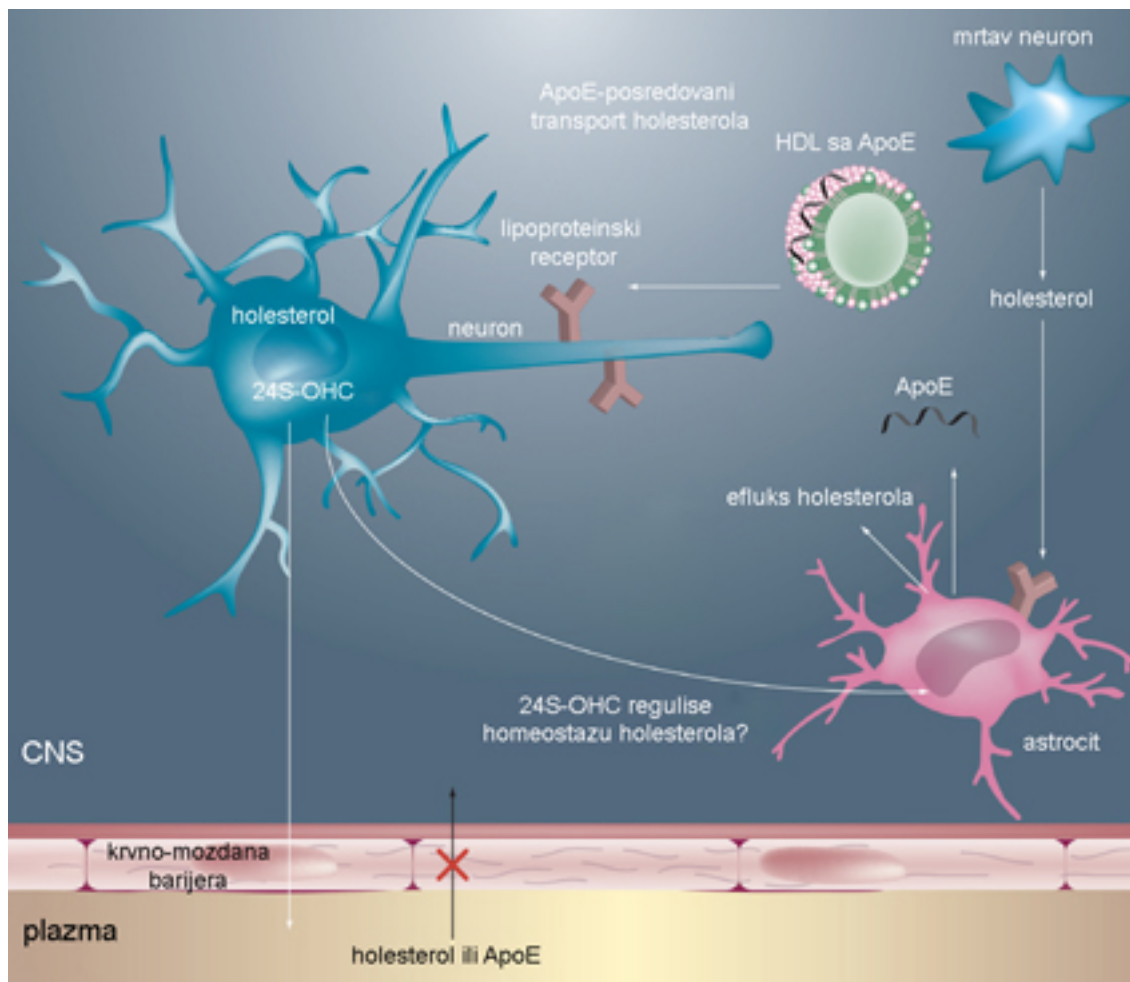
(Martinez i saradnici, 2005), multipla skleroza (Masterman i Hillert, 2004), trauma glave (White i saradnici, 2001), cerebralno krvarenje (Greenberg i saradnici, 1995) i moždani udar (Hofman i saradnici, 1997).

ApoE u plazmi je poreklom uglavnom iz jetre i makrofaga, dok je u CNS-u sintetisan lokalno, u mozgu. Zahvaljujući prisustvu krvno-moždane barijere, ApoE iz plazme i ApoE iz CNS-a se ne razmenjuju. U mozgu, ApoE sintetišu astrociti (Boyles, 1985; Poirier, 1991; Pitas, 1987), dok u određenim patološkim i fiziološkim uslovima (Xu, 1999; Aoki, 2003; Han, 1994; Harris, 2004) i neuroni i mikroglia počinju da sintetišu ApoE. ApoE se, zajedno sa fosfolipidima i holesterolom pakuje u lipoproteinske partikule veličine HDL koje se vezuju za receptore na neuronima. Na taj način ApoE snabdeva neurone holesterolom (Slika 7), koji im je neophodan za rast, oporavak i sinaptogenezu (Mauch i saradnici, 2001; Mahley, 1988; Pitas i saradnici, 1998; Hayashi i saradnici, 2004).

ApoE takođe ima ulogu u čišćenju i recikliranju lipida, naročito nakon povrede (Ladu, 2000; Poirier, 2008). Značaj ApoE u transportu holesterola u mozgu mogao bi da objasni doprinos ovog proteina formiranju sinapsi, plastičnosti i oporavku (Poirier, 2008; Rebeck, 2002). Regulacija snabdevanja neurona holesterolom preko ApoE još uvek nije potpuno razjašnjena. U daljim istraživanjima mora se obratiti posebna pažnja na neuronalnu lokaciju na kojoj se odvija holesterolski transport (sinapse vs. ćelijsko telo), kao i na mogućnost da je prenos holesterola regulisan električnom aktivnošću (Pfrieger, 2003). Takva istraživanja bi takođe mogla povezati, direktno ili indirektno, ApoE u ćelijskoj signalizaciji sa količinom holesterola u neuronalnim membranama i njihovim mikrodomenima.

Genetički modifikovani miševi kod kojih je inaktiviran gen koji kodira ApoE, u poređenju sa divljim sojem, imaju povećan nivo produkata oksidativne peroksidacije i drugih markera oksidativnog stresa u različitim regionima mozga (Matthews i Beal, 1996), uključujući povećane nivoe oksidovanog holesterola (Maor i saradnici, 2000; Keller i saradnici, 2000) i povećanu sklonost ka oksidativnim modifikacijama (Lauderback i saradnici, 2001). Ovi miševi takođe imaju deficite u učenju (Fagan i saradnici, 1998; Masliah i saradnici, 1995), a razvijaju i neurofibrilarnu klubad (Bi i saradnici, 2001). Nedostatak ApoE u neuronima povećava prijemčivost ovih mišava za ishemijsku povredu

(Sheng i saradnici, 1999). Ipak, holinergički parametri i nervna regeneracija ostaju normalni, što ukazuje da neki alternativni proteini, bar delimično, mogu zameniti ApoE.



**Slika 7. ApoE - posredovani transport holesterola u mozgu.** Modifikovano iz de Chavas, 2008, Future Lipidol 3:505–530.

#### 1.9.4. X receptori jetre (LXR)

X receptori jetre (engl. *liver X receptors*, LXRs) su otkriveni 1995. godine. Pripadaju velikoj porodici receptora koji se vezuju za regulatorni region ciljnih gena i tako stimulušu njihovu transkripciju. Ovi receptori su prvobitno izolovani iz cDNK biblioteka humane jetre kao receptori siročići, jer se nisu znali njihovi prirodni ligandi (Willy i

saradnici, 1995). Kasnije su oksidovani derivati holesterola, oksisteroli, identifikovani kao ligandi ovih receptora, pa su označeni i kao oksisterolski receptori. Takođe, *in vitro* je pokazano da se i glukoza i glukozo-6-fosfat vezuju i aktiviraju ove receptore (Mitro i saradnici, 2007), ali se o fiziološkom značaju ovakve aktivacije receptora još uvek raspravlja (Lazar i Willson, 2008; Oosterveer i saradnici, 2008) Izučavanja LXR su pokazala da oni deluju kao "senzori holesterola" koji u slučaju povišenog nivoa holesterola stimulišu njegov transport do jetre i ekskreciju preko žučnih kiselina.

Kod sisara postoje 2 izoforme LXR receptora koje su označene kao LXR $\alpha$  i LXR $\beta$ . LXR $\alpha$  je u velikim količinama prisutan uglavnom u jetri, crevima, bubrezima, slezini i masnom tkivu, dok je LXR $\beta$  ubikvitarno rasprostranjen, ali u manjoj meri (Repa i Mangelsdorf, 2000). Obe izoforme su prisutne u mozgu (Whitney i saradnici, 2002). LXR $\alpha$  i LXR $\beta$  imaju oko 80% identične aminokiselinske sekvence. Regulacija gena posredovana ovim receptorima zahteva njihovu dimerizaciju sa još jednim jedarnim receptorom, retinoid X receptorom (RXR).

Jetrini X receptori detektuju višak holesterola i aktiviraju različite adaptivne mehanizme koje štite ćeliju od preopterećenja holesterolom. Aktivacija ovih receptora dovodi do: 1) stimulacije odstranjivanja holesterola iz ćelije, transporta do jetre i ekskrecije preko žuči procesom koji se naziva reverzni holesterolski transport (engl. *reverse cholesterol transport*, RCT) od perifernih tkiva do jetre, odakle se izlučuje u žuč; 2) inhibicije apsorpcije holesterola u crevima; 3) inhibicije sinteze holesterola i njegovog preuzimanja od strane ćelije. Efekti LXR na RTC i ekskreciju, kao i na intestinalnu apsorpciju su najvažniji mehanizmi koji štite ćeliju od prekomernih količina holesterola, dok efekti na sintezu i preuzimanje holesterola imaju manju ulogu.

Oksisterol 24S-OHC, endogeni ligand ovih receptora, stimuliše efluks holesterola iz epitelnih ćelija horoidnog pleksusa do vanćelijskog ApoE povećavajući ekspresiju proteina ABCA1, ABCG1, ABCG4 i ABCG5 (Fujiyoshi i saradnici, 2007). Pošto je ovaj efekat uočen samo na apikalnim membranama direktno uz cerebrospinalnu tečnost u kojoj nema HDL, ovo može predstavljati jedinstven HDL- i ApoA-I –nezavisan mehanizam odstranjivanja holesterola. 24S-OHC povećava ekspresiju ABCA1, ABCG1 i ApoE u astrocitima, ali ne i u neuronima. Ovi podaci ukazuju da 24S-OHC nauralnog porekla

može da stimuliše ApoE-posredovani efluks holesterola susednih glijskih ćelija (Abildayeva i saradnici, 2006). Iako ApoE-posredovani efluks holesterola nije uključen u odstranjivanje viška holesterola iz mozga, on može biti važan za redistribuciju holesterola između različitih regiona mozga. Ovaj proces je bitan tokom razvića i moždanih povreda, jer je holesterol neophodan za izrastanje neurita i sinaptogenezu.

### **1.10. Neurotrofini**

Neurotrofini su identifikovani kao promoteri neuronalnog preživljavanja, ali je danas poznato da oni regulišu mnoge aspekte neuronalnog razvića i funkcije, uključujući formiranje sinapsi i sinaptičku plastičnost (Lewin i Barde 1996; Bibel i Barde 2000; Kaplan i Miller 2000; Huang i Reichardt, 2001; Poo 2001; Shooter 2001; Sofroniew i saradnici 2001; Dechant i Barde 2002; Chao 2003; Huang i Reichardt 2003). Prvi otkriveni neurotrofin je NGF (Levi Montalcini 1987; Shooter, 2001). Nakon njega je okarakterisan i BDNF, koji je izolovan iz mozga svinja (Barde i saradnici, 1982).

Neurotrofini predstavljaju familiju sisarskih trofičkih faktora u koju spadaju BDNF, NGF, neurotrofin-3 (NT-3) i NT-4/5 (Chao, 2003). Dodatni članovi familije (NT-6, NT-7) su pronađeni u ribama (Hallbook i saradnici, 2001). Proteinski produkt svakog od ova četiri gena uključuje signalnu sekvencu i prodomen, koji je praćen zreloom neurotrofinskom sekvencom. Stoga svaki genski produkt mora biti podvrgnut proteolizi da bi se dobio zreli protein. Pokazano je da je regulacija maturacije neurotrofina važna posttranskripciona kontrolna tačka koja određuje njihovo delovanje (Lee i saradnici, 2001).

Neurotrofini su eksprimirani širom zrelog CNS-a, gde se u fiziološkim uslovima sintetišu predimantno u neuronima. BDNF se sintetiše u neuronima hipokampusa, moždanog stabla, kičmene moždine i kori prednjeg mozga. Odavde može biti anterogradno transportovan u ciljne regione, poput neostrijatuma. Pokazano je da neuronska aktivnost reguliše ekspresiju neurotrofina.

Svi neurotrofini imaju sposobnost da podstiču preživljavanje određenih populacija neurona i u CNS-u i u PNS-u. Ipak, svaki neurotrofin je aktivan u različitoj populaciji neurona (Huang i Reichardt, 2001). U CNS-u, BDNF ispoljava najdelotvorniju trofičku



aktivnost i predstavlja najjači faktor promocije sinaptičke plastičnosti, preko modulacije dugotrajne potencijacije (Patterson i saradnici, 1996; Zakharenko i saradnici, 2003; Korte i saradnici, 1996), povećanja oslobađanja presinaptičkih transmitera (Sala i saradnici, 1998) i modifikacije postsinaptičkih receptora (Brandoli i saradnici, 1998; Levine i saradnici, 1998). BDNF je takođe ključan za regulaciju rasta kortikalnih dendrita i razviće vizuelnog korteksa i njegovih veza (Huberman i McAllister, 2002; Cabelli i saradnici, 1995). Pored uloge u neuronalnoj plastičnosti tokom razvića, BDNF ima važnu ulogu u spašavanju povređenih neurona u adultnom mozgu, usled svoje sposobnosti da redukuje sinaptičku povredu i gubitak neurona u nekoliko eksperimentalnih modela humanih hroničnih neurodegenerativnih bolesti. Uz nekoliko izuzetaka, efikasnost BDNF kao faktora neuroprotekcije i preživljavanja je veća nego kod ostalih trofina. Postoje dokazi da BDNF promoviše neurogenezu i u adultnom CNS-u (Schmidt i Duman, 2007).

BDNF vezivanjem aktivira dva različita receptora: neurotrofinski receptor p75 (p75NTR), koji vezuje sve neurotrofine sa niskim afinitetom (Barker, 2004) i TrkB, člana superfamilije receptora spregnutih sa enzimskom aktivnošću tirozin kinaze (Klein i saradnici, 1991). Ova dva receptora mogu imati različite funkcije u zavisnosti od dostupnosti liganda i ćelijske sredine. Najveći deo neurotrofnih odlika BDNF-a se ostvaruje preko aktivacije receptora TrkB, koji vezuje BDNF sa velikim afinitetom. TrkB je sposoban da prenese signal preko fosforilacije tirozina u sopstvenom tirozin kinaznom domenu i preko određenog broja ciljnih proteina, uključujući fosfolipazu  $c\text{-}\gamma$ , fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI-3K) i vanćelijsku signalom-regulisanu kinazu (engl. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) (Kaplan i Miller, 2000).

U odnosu na ostale receptore neurotrofina, TrkB je najzastupljeniji u mozgu, naročito u telencefalonu (Yan i saradnici, 1997). Njegova ekspresija je uglavnom neuronska, pa za razliku od ostalih neurotrofina, BDNF ima potencijal za široku biološku aktivnost u adultnom mozgu. Ipak, postoji i skraćena izoforma TrkB receptora kojoj nedostaje katalitički kinazni domen i koja je eksprimirana uglavnom u glijskim ćelijama (Fryer i saradnici, 1996) i koja redukuje neurotrofnu efikasnost BDNF-a (Dorsey i saradnici, 2006).

Svi receptori Trk superfamilije imaju homologu strukturu i sekvencu. Svi se sastoje od oko 800 aminokiselina (Reichardt, 2006) i imaju tri funkcionalna domena: vanćelijski domen koji sadrži mesto vezivanja neurotrofina (Banfield i saradnici, 2001; Ultsch i saradnici, 1999), transmembranski domen koji je evolutivno očuvan (Peng i saradnici, 1995) i citoplazmatski region u okviru koga se nalazi četiri domena (Shc-vezujući, ATP-vezujući, kinazni i PLC $\gamma$ -vezujući domen) odgovorna za vezivanje različitih liganada i adapterskih proteina signalne transdukcije.

Istraživanja tokom poslednjih godina utvrdila su i vezu između holesterola i neurotrofinske signalizacije. Naime, pokazano je da receptori TrkB mogu biti aktivirani i u odsustvu liganda u uslovima smanjenog sadržaja holesterola u membranama (Martin i saradnici, 2008). Sa druge strane, BDNF predstavlja važan stimulus za de novo sintezu holesterola u neuronima (Suzuki i saradnici, 2007).

I pored izuzetne važnosti holesterola za funkcionisanje CNS-a, o njegovom metabolizmu u mozgu koji stari veoma malo se zna. Cilj ovog rada bio je da se detaljno analizira sinteza i katabolizam holesterola u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja određivanjem nivoa samog holesterola, njegovih prekursora (lanosterol, latosterol, dezmosterol) i derivata (24S-OHC, holestanol), kao i da se utvrdi efekat dugotrajne dijetalne restrikcije na ove procese. Pored metabolita, analizirana je i zastupljenost proteina koji učestvuju u procesima sinteze (HMGCR), transporta (ApoE), katabolizma (CYP46) i regulacije (LXRa) holesterolskog metabolizma u mozgu. S obzirom na sve veću upotrebu hrane obogaćene biljnim sterolima u svrhu regulacije lipidnog profila u cirkulaciji, ispitivana je i sudbina biljnih sterola u mozgu pacova pod navedenim eksperimentalnim uslovima i njihova potencijalna interferencija sa metabolizmom holesterola u mozgu. Takođe, u *in vivo* uslovima analizirana je i veza između metabolizma holesterola u mozgu i neurotrofinske signalizacije tokom starenja i pod dejstvom dugotrajnog redukovano unosa hrane.

Analiza metabolizma holesterola u mozgu tokom starenja može da produbi naša postojeća znanja o samom procesu starenja, a ispitivanje uticaja smanjenog unosa hrane tokom života može da pruži uvid u dodatni mehanizam dejstva dijetalne restrikcije i ukaže na još veći terapijski potencijal dijetalne restrikcije, prvenstveno u prevenciji hroničnih i neurodegenerativnih bolesti.

## 2. CILJ

Cilj rada formulisan je u skladu sa činjenicama da su korteks i hipokampus moždane strukture bitne za kognitivne procese i veoma osjetljive na starenje, kao i na značaju holesterola za normalno funkcionisanje mozga. Naime, narušavanje homeostaze holesterola u mozgu može negativno da utiče na sinaptičku transmisiju, kao i da dovede do razvoja neurodegenerativnih promena. Pored toga, lipidni profil u serumu predstavlja jedan od faktora rizika za pojavljivanje neurodegenerativnih bolesti. Redukovani unos hrane, sa druge strane, može da odloži negativne promene povezane sa starenjem i očuva kognitivne sposobnosti. Za sada se o delovanju dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u mozgu, kao jednom aspektu sinaptičke plastičnosti, malo zna.

Osnovni cilj teze bio je da se isprati metabolizam holesterola u korteksu i hipokampusu u funkciji starenja, kao i potencijal dugotrajne dijetalne restrikcije da utiče na metabolizam holesterola u mozgu. U skladu sa tim definisani su sledeći zadaci istraživanja:

1. ispitati efekat starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na količinu holesterola, njegovih prekursora i katabolita u serumu, korteksu i hipokampusu mužjaka pacova soja *Wistar*;
2. ispitati zastupljenost proteina uključenih u sintezu (HMGCR), transport (ApoE), katabolizam (CYP46) i regulaciju (LXR $\alpha$ ) holesterola u korteksu i hipokampusu mužjaka pacova soja *Wistar* tokom starenja i pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije;
3. ispitati da li starenje i dugotrajni redukovani režim ishrane utiču na ćelijsku ekspresiju proteina CYP46;
4. utvrditi efekat moždane traume na ćelijsku ekspresiju proteina CYP46;

5. posredno, preko količine holesterolskih prekursora utvrditi stopu sinteze holesterola u serumu, korteksu i hipokampusu mužjaka pacova soja *Wistar* pod datim eksperimentalnim uslovima;
6. analizirati efekat starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na količinu biljnih sterola u serumu, korteksu i hipokampusu mužjaka pacova soja *Wistar*;
7. ispitati zastupljenost neurotrofinskog faktora BDNF, odgovarajućeg receptorskog molekula TrkB i njegove aktivirane forme pTrkB tokom starenja i pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije u korteksu i hipokampusu mužjaka pacova soja *Wistar* .

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1 Eksperimentalne životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* iz vivarijuma Instituta za biološka istaživanja “Siniša Stanković” (IBISS). Starost životinja na početku eksperimenta je bila 3 meseca. Životinje su u toku eksperimenta gajene po 2-4 u kavezu, pri standardnim uslovima u prostoriji (temperatura:  $23\pm 2$  °C; relativna vlažnost vazduha: 60-70%), sa svetlosnim režimom 12 h svetlost / 12 h mrak i slobodnim pristupom vodi.

### 3.2 Eksperimentalni dizajn

Na početku eksperimenta određena je prosečna dnevna potrošnja hrane po životinji nakon sedmodnevnog merenja količine hrane koje su životinje konzumirale. Nakon toga, životinje su podeljene u dve grupe. Prva grupa, označena kao *ad libitum* (AL), je tokom čitavog eksperimenta dobijala 100% prosečnog dnevnog unosa hrane, dok je druga grupa (označena kao DR) podvrgnuta hroničnoj dijetalnoj restrikciji prema sledećem režimu: svaki drugi dan životinje su dobijale 100% prosečnog dnevnog unosa hrane. Obe grupe životinja su hranjene standardnom briketiranom hranom (45% ugljeni hidrati; 5% masti; 20% proteini). Svi eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog komiteta IBISS-a (rešenje broj 26/06).

Životinje iz obe eksperimentalne grupe su žrtvovane brzom dekapitacijom u trenutku dostizanja određene starosti, tj. 12 i 24 meseca. Na isti način su žrtvovane i životinje stare 3 meseca, koje su predstavljale kontrolnu grupu. Za biohemijske analize prikupljena je krv iz trupla. Serum je izolovan na sledeći način: krv je ostavljena da koaguliše 30 min na sobnoj temperaturi, a potom je centrifugirana 15 min na 1500 rpm. Supernatant je prebačen u sterilne epruvete i zamrznut (-70°C).

Za gasnu hromatografiju-masenu spektrometriju (GC-MS) i imunoblot analizu korišćeno je 5 životinja za svaku eksperimentalnu grupu. Kora prednjeg mozga i hipokampus izolovani su iz mozga žrtvovanih životinja na ledu, kako bi se ublažilo dejstvo

proteolitičkih enzima. Izolovano tkivo je čuvano na  $-70^{\circ}\text{C}$  do daljih analiza. Analiza uzoraka gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom je urađena u saradnji sa dr Diterom Lutjohanom (Dieter Lütjohann) iz Laboratorije za specijalnu lipidnu dijagnostiku Centra interne medicine Instituta za kliničku hemiju i kliničku farmakologiju Univerzitetske klinike u Bonu, Nemačka.

Za imunohistohemijske analize korišćene su 3 životinje za svaku eksperimentalnu grupu. Nakon izolacije, mozak je fiksiran u 4% paraformaldehidu 24 sata, a potom je dehidratisan u rastućem gradijentu saharoze (Sigma) rastvorene u fosfatnom puferu: 10%, 20% i 30%. Tkivo je stajalo u odgovarajućem rastvoru dok nije palo na dno, a zatim je prebačeno u rastvor veće koncentracije. Nakon dehidratacije u 30% rastvoru saharoze, tkivo je brzo zamrznuto u ohlađenom n-pentanolu i čuvano na  $-70^{\circ}\text{C}$  do sečenja. Poprečni preseki mozga debljine  $30\ \mu\text{m}$ , isečeni na kriotomu (Leica), su odlagani u ohlađeni 0,1 M fosfatni pufer u kome su čuvani do bojenja (najduže 7 dana). Za kasnije korišćenje, preseci su zamrzavani i čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  u rastvoru za zamrzavanje preseka (40% glicerol i 25% etilen glikol u fosfatnom puferu).

### **3.3. Određivanje biohemijskih parametara u serumu pacova**

Nivo insulina u serumu pacova određen je radioimunoesejem (RIA INS PEG test, INEP, Zemun, Srbija). Nivoi ostalih biohemijskih parametara određeni su komercijalno dostupnim kitovima (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy), a reagensi su pripremljeni prema uputstvima proizvođača. Svi eseji su urađeni na ILab 1800 kliničkom hemijskom analizatoru (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Glukoza u serumu pacova određena je metodom glukozo-oksidge. Trigliceridi su određeni enzimskim metodama. Lipoproteini visoke gustine (HDL) određeni su dekstran sulfat/kalcijum precipitacijom koju je pratila enzimatsko određivanje holesterola u supernatantu. Lipoproteini niske gustine (LDL) su određeni korišćenjem Fridvoldove (Friedewald) formule. Za određivanje koncentracije kortikosterona korišćen je komercijalni ELISA paket (Immunodiagnostic Systems), po uputstvu proizvođača.

### **3.4 Određivanje količine proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova**

#### **3.4.1 Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva**

Proteini su izolovani iz svežeg tkiva. Postupak disekcije korteksa i hipokampusa mozga žrtvovanih životinja, kao i postupak izolacije proteina, rađen je na ledu, kako bi se sprečilo dejstvo proteolitičkih enzima. Eksperimentalni uzorci su dobijeni spajanjem svih uzoraka kortikalnog i hipokampalnog tkiva (n=5) jedne eksperimentalne grupe (pulovanje uzoraka). Tkivo je homogenizovano u 10 zapremina pufera za liziranje, u staklenom homogenizeru zapremine 2 ml. Kao pufer za liziranje korišćen je RIPA pufer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) kome je neposredno pred upotrebu dodat kompletan koktel proteaznih inhibitora (Roche, Mannheim, Germany), kao i fosfatazni inhibitori (25 mM NaF, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Homogenati su sonifikovani i centrifugirani na 16000xg, 30 minuta na 4°C, a supernatant sa solubilnim proteinima uzet je za dalje analize. Do analiza, uzorci su čuvani na -70°C.

#### **3.4.2 Određivanje koncentracije ukupnih proteina**

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Pierce-u pomoću komercijalno nabavljenog kompleta (Micro BCA Protein Assay Kit; Pierce Inc., Rockford, USA), tzv. mikrometodom, po uputstvu proizvođača. Uzorci se prvo razblaže 10 puta (5 µl uzorka i 45 µl mQH<sub>2</sub>O). Zatim se u 115µl mQH<sub>2</sub>O doda 10 µl razblaženog uzorka i 125 µl boje. Nakon inkubacije koja traje 2 h na 37°C očitava se apsorbancu na 562nm korišćenjem ELISA čitača (Bio-Rad Laboratories). Za standardnu krivu korišćene su poznate koncentracije goveđeg albumina seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA; Sigma).

#### **3.4.3 Elektroforeza proteina**

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE) u tzv. diskontinualnom sistemu



(Laemmli, 1970). Za nalivanje gelova debljine 0.75 mm i samu elektroforezu korišćena je aparatura za elektroforezu Hoefer<sup>TM</sup> SE 260 (Amersham Biosciences). Gel za razdvajanje je pored akrilamid/bisakrilamida (Sigma) u odnosu 29:1, (finalne koncentracije 8% ili 10%), sadržao i 0.375 M Tris pH 8.8 i 0.1% SDS. Gel za koncentrisanje bio je sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0.125 M Tris pH 6.8 i 0.1% SDS. Za polimerizaciju je korišćeno 60 µl 10% amonijum persulfata (ICN) i 5 µl TEMED-a (Serva) na 10 ml rastvora akrilamida.

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina. Za ispitivane proteine nanošeno je po 15 µg (za CYP46 i ApoE), 20 µg (za LXR $\alpha$ , TrkB, pTrkB), 25 µg (za HMGCR), 30 µg (za BDNF) ukupnih proteina. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2 x Laemmli pufer (31.25 mM Tris pH 6.8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptoetanol; 0.025% bromfenol plavo) dodat uzorku u odnosu 1:1 (v/v). Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem 5 minuta na 95°C. Kao standard za molekulsku težinu korišćen je obojeni marker širokog opesega (10-170 kDa; Fermentas). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8.3; 0.1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V, dok boja ne stigne do kraja gela.

#### **3.4.4. Elektrotransfer proteina**

Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (polivinildifluorid) ili nitroceluloznu membranu (0.45 µm, GE Healthcare) rađen je po metodi Towbin-a (1979) korišćenjem sistema za polusubi elektrotransfer (GE Healthcare). Gel je najpre ekvilibrisan 15 minuta u puferu za transfer (10/20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8.3), a elektrotransfer proteina vršen je tokom 1-2 sata, pod konstantnom strujom od 8 mA/cm<sup>2</sup> gela. Po završenom transferu membrane su sušene na sobnoj temperaturi da bi se preneti proteini fiksirali. Potom su membrane bojene bojom Ponceau-S (1% boja Ponceau-S; 5%

glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda), dok su gelovi bojeni bojom Coomassie Brilliant Blue (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; destilovana voda) u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su dalje sušene na sobnoj temperaturi.

### **3.4.5. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - Western blot metoda**

Membrane su inkubirane u rastvorima antitela uz lagano mućkanje. Kao blokirajući agens korišćeno je 5% mleko (Santa Cruz) rastvoreno u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween-20 (TBST: 20 mM Tris-HCl pH 7.6; 137 mM NaCl; 0.05% Tween 20). Primarna antitela su razblažena samo u TBST-u, uz izuzetak HMGCR, koje je razblaženo u 3% rastvoru mleka u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween-20. Spisak korišćenih primarnih antitela, kao i korišćenih razblaženja i vremena inkubacije membrana naveden je u Tabeli 2. Nakon inkubacije sa antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween-20. Potom su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (anti- zečje ili anti-kozje, Santa Cruz) obeleženim peroksidazom rena u TBST-u (razblaženje 1: 2000 za anti-zečje, 1: 5000 za anti-kozje) 1 h na sobnoj temperaturi.

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

**Tabela 2. Spisak korišćenih primarnih antitela**

<b>antitelo na</b>	<b>tip antitela</b>	<b>proizvođač</b>	<b>razblaženje antitela</b>	<b>vreme inkubacije</b>
HMGCR	zečje poliklonsko	Millipore	1:300/3% mleko	preko noći, +4°C
LXR	kozje poliklonsko	Santa Cruz	1:200	preko noći, +4°C
ApoE	kozje poliklonsko	Calbiohem	1:5000	2 h, sobna temperatura
CYP46	zečje poliklonsko	poklon dr. David Russell	1:1000	2 h, sobna temperatura
BDNF	zečje poliklonsko	Santa Cruz	1:100	preko noći, +4°C
TrkB	zečje poliklonsko	Santa Cruz	1:5000	2 h, sobna temperatura
pTrkB	zečje poliklonsko	Abcam	1:1000/5% mleko	preko noći, +4°C
Aktin	zečje poliklonsko	Sigma	1:3000	2 h, sobna temperatura

### **3.4.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova**

Intenzitet imuno signala na skeniranim filmovima određen je densitometrijskom kvantitativnom analizom korišćenjem programskog paketa Image Quant (Version 5.2, GE Healthcare). Dobijene vrednosti svakog uzorka normalizovane su najpre u odnosu na odgovarajući aktin koji predstavlja endogenu kontrolu za nanesenu količinu totalnih proteina, čime su dobijene relativne vrednosti nivoa proteina. Potom su izračunate srednje vrednosti i standardna greška relativnih vrednosti za sve eksperimentalne grupe (n=8-12). Zarad razmatranja efekata starenja, rezultati imunoblot analize su izraženi kao stepen

promene u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolnu grupu 3 meseca starih životinja kojoj je dodeljena vrednost 1. Efekat dugotrajne dijetalne restrikcije izražavan je kao stepen promene date eksperimentalne grupe u odnosu na vrednosti dobijene za odgovarajuće starosne kontrole.

### **3.5. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje**

Za analizu ekspresije proteina CYP46 u glijskim ćelijama tokom starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije urađeno je dvojno imunohistohemijsko obeležavanje na slobodnoplivajućim presecima. Glijske ćelije su obeležene korišćenjem mišjeg monoklonskog antitela napravljenog protiv markera astrocita, GFAP (1:100, Boehringer), dok je za detekciju ekspresije proteina CYP46 korišćeno poliklonsko zečje antitelo (1:70).

Svi rastvori, kao i razblaženja primarnih i sekundarnih antitela su pravljani u 0,1M fosfatnom puferu, pH 7,4. Čitav postupak urađen je na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje, osim inkubacije u primarnom antitelu koja se vršila na + 4°C. Da bi se redukovala autofluorescenca, preseci su prvo inkubirani u 1% rastvoru glicina, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, preseci su ispirani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu. Blokiranje mesta za nespecifično vezivanja antitela je postignuto inkubacijom preseka u 10% rastvoru NGS. Preseci su prvo inkubirani sa primarnim antitelom GFAP preko noći na + 4°C. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, preseci su inkubirani u odgovarajućem anti-mišjem sekundarnom antitelu za koje je bila vezana Aleksa-555 boja (crveno)(1:200, Invitrogen), 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu i blokiranja u 7% serumu magarca, preseci su inkubirani u primarnom antitelu CYP46, preko noći na + 4°C. Preseci su isprani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu i inkubirani u odgovarajućem anti-zečjem sekundarnom antitelu za koje je bila vezana Aleksa-488 boja (zeleno)(1:200, Invitrogen), 2 h na sobnoj temperaturi. Poslednja serija ispiranja trajala je 4 h, uz promenu fosfatnog pufera svakih 15 minuta. Tri odgovarajuće negativne kontrole (bez jednog, drugog ili oba primarna antitela) korišćene su za praćenje nespecifičnog vezivanja.

### **3.6. Ablacija senzomotornog korteksa pacova soja Wistar i dvojno imunohistohemijsko obeležavanje**

U eksperimentima čiji je cilj bilo ispitivanje ekspresije proteina CYP46 u neuronima i glijskim ćelijama nakon traumatske povrede mozga urađeno je dvojno imunohistohemijsko obeležavanje na koronalnim presecima mozga pacova koji su bili podvrgnuti ablaciji senzomotornog korteksa. Ovi eksperimenti su urađeni u saradnji sa prof. Mirjanom Stojiljković iz Laboratorije za neurohemiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Ablacija senzomotornog korteksa urađena je prema proceduri opisanoj od strane Peković i saradnika (Peković i saradnici, 2005).

Za identifikaciju neuronalnih ćelija korišćena su mišja monoklonska antitela koja prepoznaju specifične neuronalne markere, poput markera ćelijskih tela neurona, NeuN (1:500, Millipore), markera dendrita, MAP-2 (1:200,Boehringer) i markeri aksona, SMI-32 (1:15000, Sternberger Monoclonals). Glijske ćelije su obeležene korišćenjem mišjih monoklonskih antitela napravljenih protiv markera astrocita, GFAP (1:100, Boehringer) i vimentina (1:500, Dako), i markera aktivirane mikroglije, ED1 (1:100, Serotec). Za detekciju ekspresije proteina CYP46 korišćeno je poliklonsko zečje antitelo (1:70). Svi rastvori, kao i razblaženja primarnih i sekundarnih antitela pravljeni su u 0,1M fosfatnom puferu, pH 7,4. Da bi se redukovala autofluorescenca, preseci su inkubirani u 1% rastvoru glicina, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, preseci su ispirani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu. Demaskiranje antigena je urađeno u citratnom puferu (10 mM natrijum-citrat, pH 6.0). Blokiranje mesta za nespecifično vezivanja antitela je postignuto inkubacijom preseka ili u 10% rastvoru NGS (za antitela GFAP, vimentin i MAP-2 ), ili u 5% rastvoru seruma magarca (NDS-DAKO, za antitela NeuN, SMI-32 and ED1). Preseci su inkubirani u primarnim antitelima preko noći na + 4°C. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, preseci su inkubirani u odgovarajućem sekundarnom antitelu za koje je bila vezana Aleksa-555 boja (crveno)(1:200, Invitrogen), 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu i blokiranja u 7% serumu magarca, 1 h na sobnoj temperaturi, preseci su inkubirani u primarnom antitelu CYP46, preko noći na + 4°C. Zatim su isprani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu i inkubirani u

odgovarajućem sekundarnom antitelu za koje je bila vezana Aleksa-488 boja (zeleno)(1:200, Invitrogen), 2 h na sobnoj temperaturi. Poslednja serija ispiranja trajala je 4 h, uz promenu fosfatnog pufera svakih 15 minuta. Tri odgovarajuće negativne kontrole (bez jednog, drugog ili oba primarna antitela) korišćene su za praćenje nespecifičnih vezivanja. Imunohistohemijsko bojenje je vizuelizovano na mikroskopu Axio Observer Microscope Z1 ( ZEISS) koji sadrži ApoTome softverski modul za generisanje optičkih preseka kroz fluorescentne uzorke. Sve slike su napravljene na uveličanju 100x.

### **3.7. Određivanje sterola u mozgu i serumu pacova**

Pre analize, uzorci korteksa i hipokampusa (po 20 mg za svaku životinju) su osušeni u vakumu (12mbar) (Savant AES 1000) tokom 24h da bi se koncentracije ispitivanih sterola izrazile u odnosu na težinu suvog uzorka. Steroli iz osušenog tkiva su izolovani u 1,5 ml mešavine hloroform-metanol (2:1) tokom 24h, na + 4°C. Jedan mililitar ekstrakta je evaporisan pod strujom azota na + 63°C i hidrolizovan 1h u 1ml 1M NaOH u 90% etanolu na + 50°C. U svaki uzorak je dodato 1ml destilovane vode. Da bi se ekstrahovali neutralni steroli dva puta je dodato 3 ml ciklodekstrana. Kombinovane ciklodekstranske faze su evaporisane pod strujom azota na + 63°C i steroli su rastvoreni u 100 µl n-dekana. Nakon prebacivanja u bočice za gasnu hromatografiju, steroli su konvertovani u trimetilsililetre (TMSis) dodavanjem 40 µl TMSi reagensa (piridin-heksametilidisilazin-trimetilhlorosilan, 9:3:1 v/v/v) i inkubirani 1h na + 60°C. Steroli iz seruma su izolovani na isti način, kao i iz tkiva (Lütjohann i saradnici, 2002).

Nivo holesterola u svakom uzorku određen je gasnim hromatografom sa plameno-jonizacionim detektorom (gas-chromatograph-flame ionization detector, GC-FID). Kao interni standard korišćeno je 50 µl rastvora 5α -holestana (1 mg/ml 5α -holestan u cikloheksanu). Nivoi biljnih sterola, holesterolskih prekursora (lanosterol, latosterol, dezmosterol) i metabolita (24S-OHC, holestanol) su određeni korišćenjem epikoprostanola kao internog standarda (Lütjohann i saradnici, 2002).

### 3.8. Statistička obrada podataka

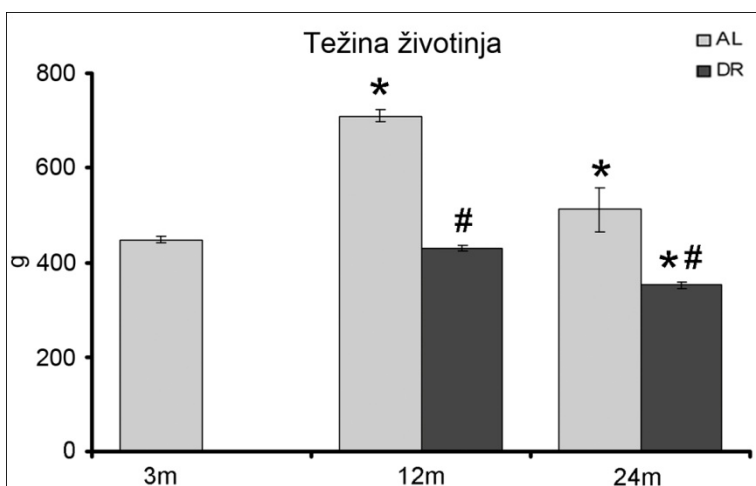
Za statističku obradu podataka korišćen je softverski paket STATISTICA 6.0. Najpre je proveravana normalna distribucija dobijenih podataka za svaku eksperimentalnu grupu. Za poređenja između starosnih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA (engl. *ANalysis of VAriance*) i potom Fišerov LSD test. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je  $p < 0.05$ . Za poređenje između grupa koje su bile na različitim režimima ishrane, korišćen je neparametrijski U-test. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je  $p < 0.05$ . Na graficima, statistički značajne promene su obeležene simbolom (\*) u odnosu na grupu od 3 meseci, ili pak (#) za promene do kojih je došlo pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije, a u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

## 4. Rezultati

### 4.1. Eksperimentalni dizajn

Eksperimenti u okviru ove disertacije rađeni su na mužjacima pacova soja *Wistar*. Na početku eksperimenta starost pacova bila je 3 meseca. Tada je izmerena prosečna dnevna potrošnja hrane po životinji. Nakon toga, životinje su podeljene u dve grupe. Prva grupa, označena kao *ad libitum* (AL), tokom čitavog eksperimenta je dobijala 100% prosečnog dnevnog unosa hrane, dok je druga grupa, označena kao DR, podvrgnuta hroničnoj dijetalnoj restrikciji prema sledećem režimu: svaki drugi dan životinje su dobijale 100% prosečnog dnevnog unosa hrane.

#### 4.1.1. Težina životinja



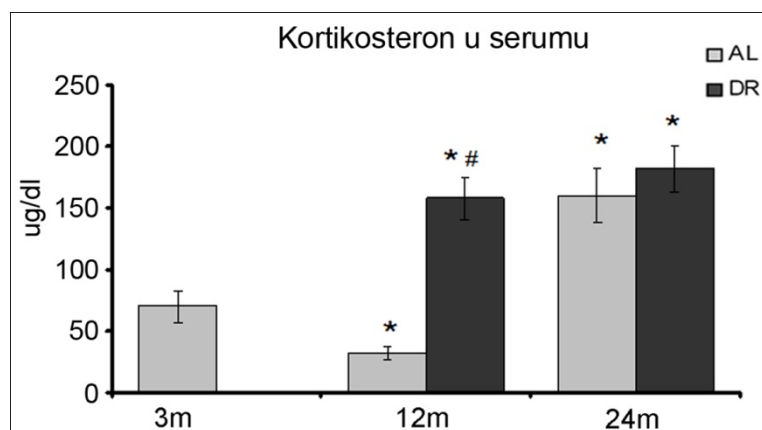
**Slika 8. Težina pacova tokom starenja i pod uticajem DR** (svetlu stubići-AL, tamni stubići-DR). Težina je izražena u gramima (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška). \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Merenjem težine tela eksperimentalnih životinja utvrđeno je da tokom starenja dolazi do statistički značajnog povećanja težine pacova u obe starosne grupe (12 i 24 meseca) hranjene *ad libitum*. Životinje koje su bile podvrgnute restriktivnom režimu ishrane (DR) imale su značajno manju telesnu težinu od svojih starosnih kontrola, bez obzira na starost. Grupa životinja starih 24m koja je bila na restriktivnom režimu ishrane



imala statistički značajno smanjenu težinu i u odnosu na kontrolnu grupu staru 3m (Slika 8)

#### 4.1.2. Kortikosteron u serumu



**Slika 9. Koncentracija kortikosterona u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR** (svetlu stubiće-AL, tamni stubiće-DR). Koncentracija kortikosterona određena je ELISA metodom. Rezultati su izraženi kao koncentracija u  $\mu\text{g/dl}$  (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška). \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu pacova pokazalo je da je nivo kortikosterona u serumu 12m starih životinja hranjenih *ad libitum* značajno niži u odnosu na 3m stare životinje (smanjenje od 55%). Nasuprot tome, u ovoj starosnoj grupi primenjeni restriktivni režim ishrane uzrokovao je značajno povećanje nivoa ovog endogenog glukokortikoida i u odnosu na starosnu kontrolu (povećanje od 393%), i u odnosu na kontrolnu grupu staru 3m (povećanje od 125%). Životinje stare 24m imale su značajno povišen nivo serumskog kortikosteroida u odnosu na životinje stare 3m, bez obzira na režim ishrane kome su bile podvrgnute (povećanje od 128% za 24mAL; 160% za 24mDR). U ovoj starosnoj grupi DR nije imala uticaja na koncentraciju kortikosterona u serumu (Slika 9).

### 4.1.3. Biohemijski parametri u serumu pacova

**Tabela 3. Biohemijski parametri u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Rezultati su izraženi u odgovarajućim jedinicama i predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna greška. \*p<0.05 u odnosu na kontrolu 3m; # p<0.05 u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Serum	jedinice	3m	12m		24m	
			AL	DR	AL	DR
glukoza	mmol/l	6.97 ± 0.40	4.90 ± 0.23 *	4.78 ± 0.35 *	4.20 ± 0.32 *	2.84 ± 0.13* #
insulin	mIU/L	247 ± 17	137 ± 29 *	116 ± 12 *	65 ± 22 *	24 ± 5 ** #
trigliceridi	mmol/l	1.00 ± 0.10	1.95 ± 0.20 *	1.05 ± 0.07 #	1.63 ± 0.37 *	0.36 ± 0.02* #
LDL	mmol/l	0.53 ± 0.06	0.82 ± 0.02 *	0.48 ± 0.05 #	0.95 ± 0.18 *	1.00 ± 0.07 *
HDL	mmol/l	0.64 ± 0.03	1.02 ± 0.10 *	0.94 ± 0.05 *	0.99 ± 0.12 *	1.43 ± 0.11* #

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije praćen je na nivou biohemijskih parametara u serumu pacova. Odgovarajuće analize su pokazale da tokom starenja dolazi do značajnog smanjenja koncentracije i glukoze i insulina u serumu pacova, bez obzira na primenjeni režim ishrane (glukoza: smanjenje od 30% za 12mAL, 31% za 12mDR, 40% za 24mAL, 59% za 24mDR; insulin: smanjenje od 45% za 12mAL, 53% za 12mDR, 74% za 24mAL, 90% za 24mDR u odnosu na 3m stare životinje). Dugotrajna dijetalna restrikcija primenjena u ovoj studiji je u grupi životinja starih 24m uzrokovala dodatno smanjenje količine glukoze (smanjenje od 32%) i insulina (smanjenje od 63%) u odnosu na starosnu kontrolu. Tokom starenja zabeleženo je statistički značajno povećanje koncentracije triglicerida u obe starosne grupe hranjene *ad libitum* (povećanje od 95% za 12mAL, 63% za 24mAL). Životinje koje su bile na dijetalnoj restrikciji imale su značajno niže koncentracije triglicerida u poređenju sa svojim starosnim kontrolama (smanjenje od 46% za 12mDR, 78% za 24mDR). Grupa životinja starih 24m koja je bila na restriktivnom režimu ishrane imala je statistički značajno redukovani sadržaj triglicerida i u odnosu na kontrolnu grupu staru 3m (smanjenje od 64%). Tokom starenja zabeleženo je i povećanje koncentracije LDL u serumu životinja koje su bile hranjene *ad libitum* (povećanje od 55%

za 12mAL, 79 % za 24mAL). Dijetalna restrikcija u grupi 12m starih životinja uzrokovala je značajno smanjenje zastupljenosti ovog lipoproteina u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 41%) i njegovo vraćanje na nivo izmeren kod kontrolnih životinja. U starijoj grupi životinja, restriktivni režim ishrane nije imao efekta na smanjenje LDL-a. Naime, i u ovoj grupi životinja je zabeležen povišen nivo LDL u odnosu na 3m stare životinje (povećanje od 89%). Povećan nivo HDL-a u odnosu na 3m stare životinje zabeležen je u svim eksperimentalnim grupama, bez obzira na režim ishrane (povećanje od 59% za 12mAL, 47% za 12mDR, 55% za 24mAL, 123% za 24mDR). U grupi životinja starih 24m dugotrajna DR dodatno je povećala nivo ovog lipoproteina u odnosu na starosnu kontrolu (povećanje od 44%) (Tabela 3).

#### **4.2. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcija na sterole u serumu pacova**

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na količinu holesterola, njegovih prekursora (lanosterol, latosterol, dezmosterol) i derivata (24S-hidroksiholesterol, 27-hidroksiholesterol, holestanol), kao i biljnih sterola u serumu laboratorijskih pacova određen je gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (GC/MS).

#### 4.2.1. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u serumu pacova

**Tabela 4. Holesterol, holesterolski prekursori i derivati u serumu pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Koncentracije sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su izraženi u odgovarajućim jedinicama i predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Serum	jedinice	3m	12m		24m	
			AL	DR	AL	DR
holesterol	mg/dl	60.6 $\pm$ 4.2	90.6 $\pm$ 8.8*	72.4 $\pm$ 3.7*	112.8 $\pm$ 17.5*	97.3 $\pm$ 3.7*
lanosterol	ug/dl	7.7 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 1.0*	6.8 $\pm$ 0.2#	8.4 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 0.2
latosterol	mg/dl	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.002*#	0.07 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01*#
dezmosterol	mg/dl	0.09 $\pm$ 0.1	0.10 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.05*#
24S-OHC	ng/ml	25.2 $\pm$ 0.6	27.2 $\pm$ 2.1	27.1 $\pm$ 0.9	31.3 $\pm$ 3.5	28.4 $\pm$ 1.0
27-OHC	ng/ml	48.2 $\pm$ 7.8	54.9 $\pm$ 6.1	55.5 $\pm$ 5.6	86.2 $\pm$ 8.4*	84.2 $\pm$ 7.2*
holestanol	mg/dl	0.39 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.06*	0.49 $\pm$ 0.05#	0.84 $\pm$ 0.04*	0.44 $\pm$ 0.05#

Rezultati analize seruma pacova prikazani su u Tabeli 4. Tokom starenja količina holesterola bila je povećana bez obzira na primenjeni režim ishrane (povećanje od 50% za 12mAL, 19% za 12mDR, 86% za 24mAL, 61% za 24mDR). Sama dijetalna restrikcija nije imala uticaja na količinu holesterola u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolnu gupu. Nivo holesterolskog prekursora lanosterola bio je povećan u grupi pacova starih 12m koji su bili hranjeni ad libitum (povećanje od 34%) u odnosu na životinje stare 3 m, dok je dijetalna restrikcija dovela do smanjenja količine njegove količine (smanjenje od 34%) u odnosu na starosnu kontrolu. Količina drugog holesterolskog prekursora latosterola nije se menjala tokom starenja. Međutim u grupi životinja starih 12 meseci koje su bile na dijeti izmereno je smanjenje latosterola od 49% u odnosu na starosnu kontrolu, odnosno od 42 % u odnosu na 3m stare životinje, dok je kod pacova starih 24m koji su bili na režimu redukovane ishrane detektovano smanjenje količine latosterola od 34% u odnosu na

starosnu kontrolu, odnosno od 30% u odnosu na 3m stare životinje. Treći precursor holesterola, dezmosterol, bio je promenjen jedino u najstarijoj grupi životinja koje su bile na režimu redukovane ishrane. Kod njih je zabeležen povećan nivo ovog prekursora od 177% u odnosu na starosnu kontrolu, odnosno od 268% u odnosu na 3m stare životinje. Zastupljenost moždano-specifičnog oksisterola, 24S-OHC, nije bila promenjena ni tokom starenja, ni pod delovanjem dijetalne restrikcije. Količina drugog oksisterola, 27-OHC, bila je povećana u najstarijoj grupi životinja, bez obzira na režim ishrane (povećanje od 79% za 24mAL, 75% za 24mDR ). Nivo holesterolskog derivata holestanola bio je povećan tokom starenja (povećanje od 126% za 12mAL, 115% za 24mAL). U grupi životinja starih 12m koji su bili podvrgnuti dijetalnoj restrikciji zabeleženo je smanjenje nivoa holestanola od 44% u odnosu na starosnu kontrolu, dok je u grupi 24m starih životinja to smanjenje iznosilo 48%.

#### 4.2.2. Analiza biljnih sterola u serumu pacova

**Tabela 5. Biljni steroli u serumu pacova pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Koncentracije biljnih sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su izraženi u odgovarajućim jedinicama i predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

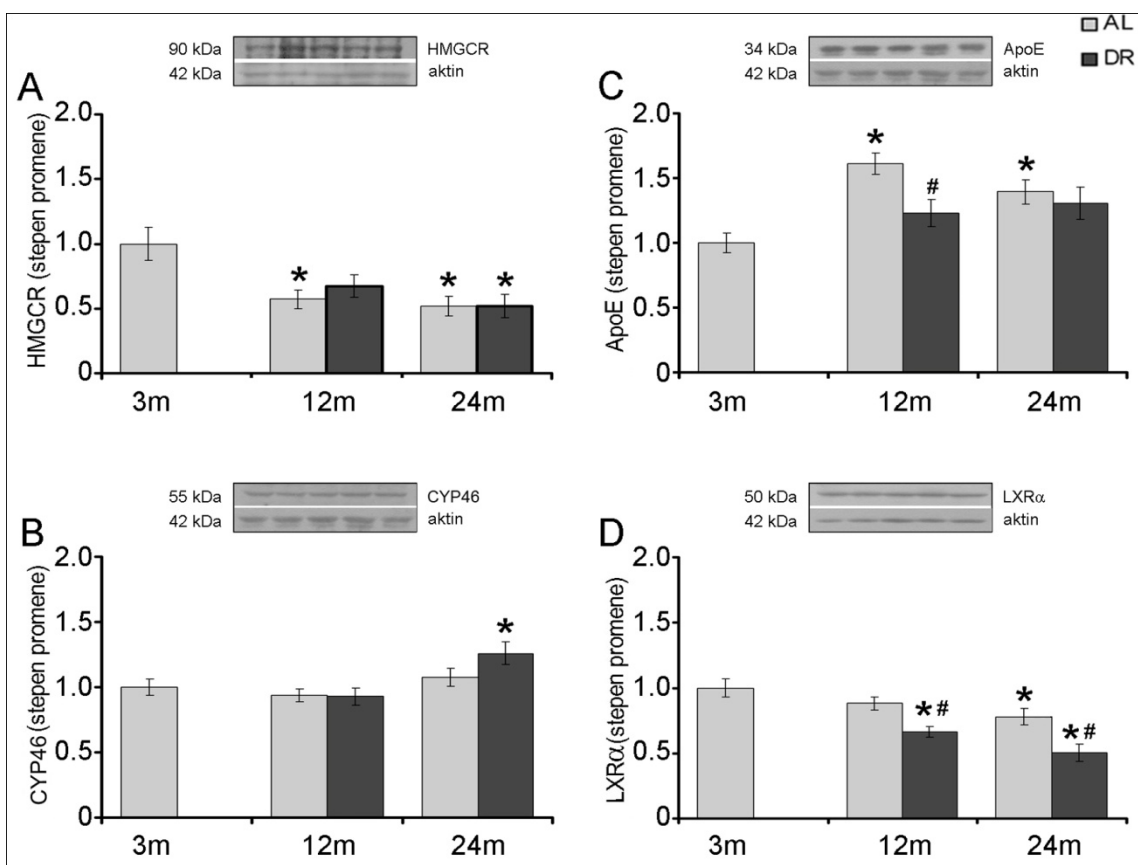
Serum	jedinice	3m	12m		24m	
			AL	DR	AL	DR
sitosterol	mg/dl	2.8 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.4 *	1.9 $\pm$ 0.3 #	3.9 $\pm$ 0.5 *	1.0 $\pm$ 0.1 * #
kampesterol	mg/dl	1.7 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.3 *	1.8 $\pm$ 0.2 #	3.0 $\pm$ 0.4 *	1.0 $\pm$ 0.1 * #
stigmasterol	ug/dl	24.3 $\pm$ 2.1	38.3 $\pm$ 2.8 *	22.1 $\pm$ 3.4 #	33.2 $\pm$ 1.5 *	12.9 $\pm$ 1.6 * #
brasikasterol	ug/dl	13.4 $\pm$ 0.01	12.3 $\pm$ 1.0 *	11.8 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.7	11.8 $\pm$ 0.9
sitostanol	ug/dl	61.8 $\pm$ 5.9	101.0 $\pm$ 8.6 *	32.8 $\pm$ 5.8 * #	79.8 $\pm$ 6.9 *	23.4 $\pm$ 3.9 * #
kampestanol	ug/dl	251.4 $\pm$ 27.0	559.4 $\pm$ 33.0 *	140.3 $\pm$ 30.6 #	447.4 $\pm$ 79.2 *	85.4 $\pm$ 21.0 #

U serumu eksperimentalnih životinja praćene su promene u nivou najzastupljenijih biljnih sterola i njihovih derivata (Tabela 5). Količina svih ispitivanih biljnih sterola, osim brasikasterola čija se količina nije menjala u analiziranim uslovima, bila je znatno povećana tokom starenja. Povećanje nivoa biljnih sterola se kretalo u rasponu od 29% za sitostanol izmeren u grupi 24mAL do 127% za kampesterol u grupi 12mAL. Primenjena dijetalna restrikcija uticala je na smanjenje količine biljnih sterola u serumu koje je iznosilo od 42% do 81% u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole. U nekim slučajevima, režim redukovane ishrane uticao je na smanjenje nivoa biljnih sterola i u odnosu na 3m stare životinje (smanjenje je iznosilo od 39% do 62%).

#### **4.3. Uticj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na proteine koji su uključeni u metabolizam holesterola u mozgu**

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u mozgu praćen je na nivou proteina ukljućenih u sintezu (HMGCR), transport (ApoE), katabolizam (CYP46) i regulaciju ( $LXR\alpha$ ) holesterola u korteksu i hipokampusu pacova. Ekspresija navedenih proteina praćena je imunoblot metodom.

### 4.3.1 Promene u korteksu



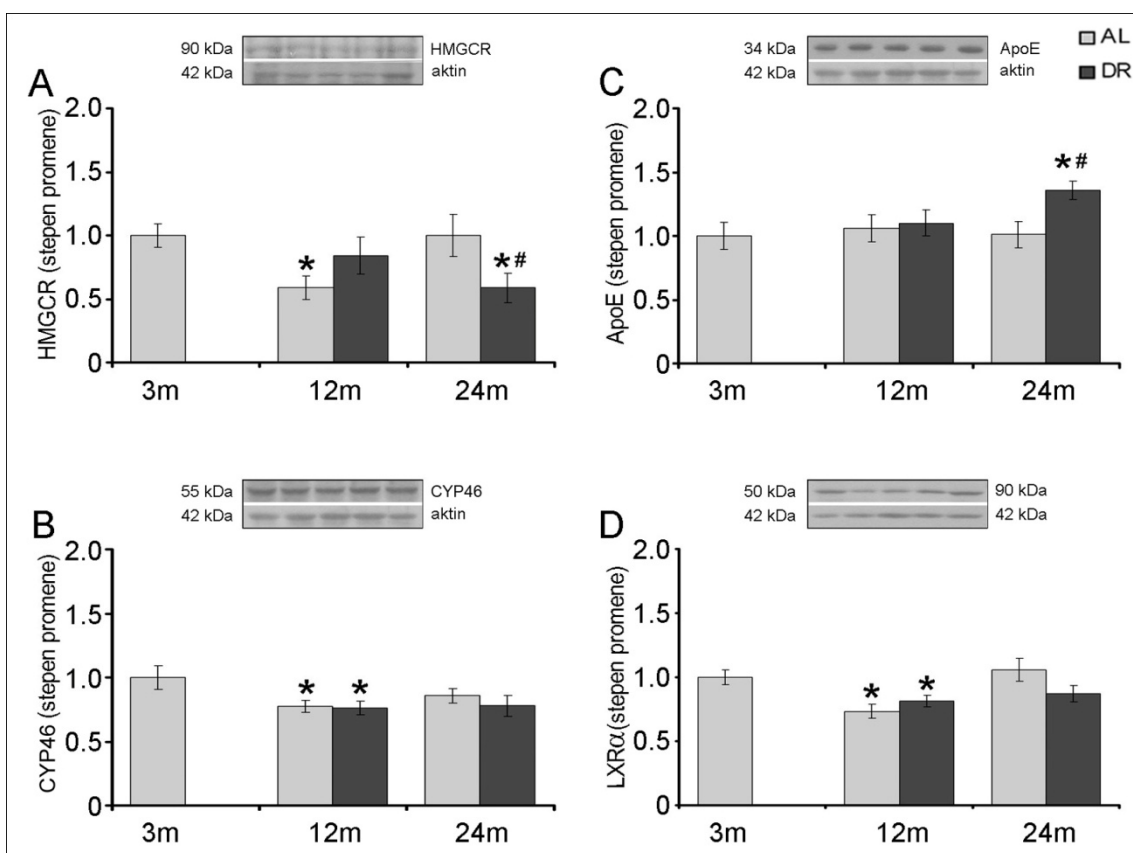
**Slika 9. Zastupljenost proteina HMGCR (A), CYP46 (B), ApoE (C) i LXRα (D) u korteksu pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Nivo ekspresije proteina određen je Western blot analizom u korteksu pacova koji su bili na različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost ± standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (3m) kojoj je dodeljena vrednost 1. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Ekspresija proteina koji su uključeni u metabolizam holesterola u korteksu pacova prikazana je na Slici 9. Analiza dobijenih podataka je pokazala da tokom starenja dolazi do redukcije količine proteina HMGCR u korteksu ispitivanih pacova i to za 38% kod životinja starih 12m, odnosno 31% kod životinja starih 24m. Primenjeni restriktivni režim ishrane nije imao uticaja na zastupljenost ovog proteina u odnosu na adekvatnu starosnu kontrolu. Šta više, i kod grupe životinja podvrgnutih dijetalnoj restrikciji detektovana je

manja količina proteina u odnosu na kontrolne životinje stare 3m, mada je ona bila statistički značajna samo u grupi najstarijih životinja (smanjenje od 34%) (Slika 9A). Zastupljenost enzima CYP46 nije se značajno menjala tokom starenja. Izuzetak je grupa pacova starih 24m koji su bili na dijetalnoj restrikciji, kod koji je zabeležena značajno veća količina proteina CYP46 (povećanje od 26%) u odnosu na kontrolne 3m stare životinje (Slika 9B). Tokom starenja zabeležena je značajno veća količina proteina ApoE u korteksu životinja starih i 12m (povećanje od 61%), i 24m (povećanje od 39%). Dijetalna restrikcija je u grupi 12 meseci starih životinja delovala suprotno starenju, smanjujući nivo ovog proteina za 24% u odnosu na starosnu kontrolu (Slika 9C). Tokom starenja došlo je do blagog smanjenja količine holesterolskog senzora, proteina LXR $\alpha$ , koje je statističku značajnost dostiglo u najstarijoj grupi životinja (smanjenje od 22%). Primenjena dugotrajna dijetalna restrikcija imala je značajan efekat na zastupljenost ovog proteina. Naime, količina LXR $\alpha$  u grupi životinja starih 12m koje su podvrgnute restriktivnom režimu ishrane bila je značajno manja i u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 25%), i u odnosu na 3m stare životinje (smanjenje od 34%). Isti profil promena detektovan je i u najstarijoj grupi životinja, kod koji je zabeleženo smanjenje ovog proteina od 35% u odnosu na starosnu kontrolu, odnosno od 49 % u odnosu na 3m stare životinje (Slika 9D).



### 4.3.2. Promene u hipokampusu



**Slika 10. Zastupljenost proteina HMGCR (A), CYP46 (B), ApoE (C) i LXRα (D) u hipokampusu pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Nivo ekspresije proteina određen je Western blot analizom u hipokampusu pacova koji su bili na različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost ± standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (3m) kojoj je dodeljena vrednost 1. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; # $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

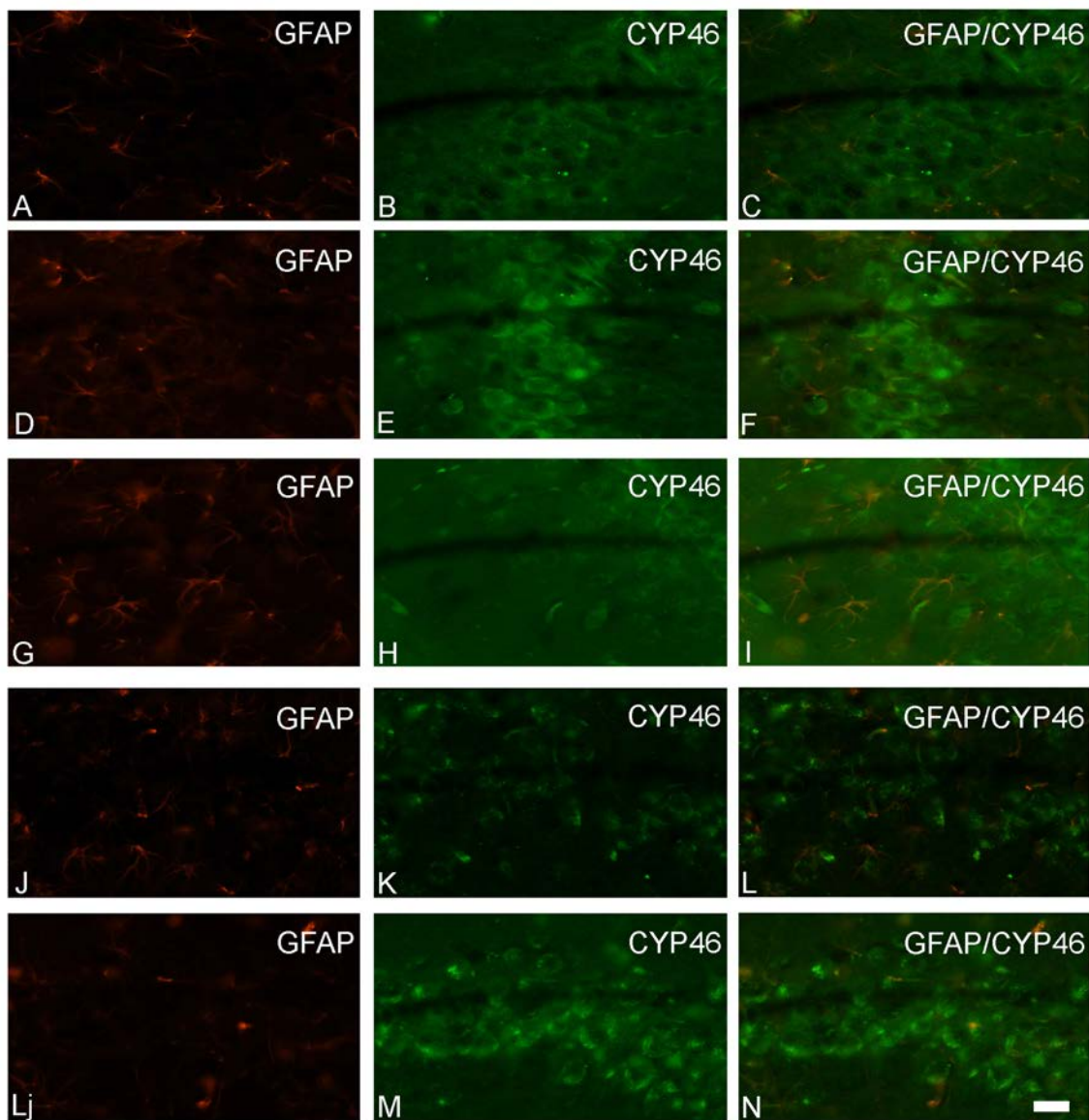
Ekspresioni profil proteina koji su uključeni u metabolizam holesterola u hipokampusu pacova tokom starenja i pod delovanjem dijetalne restrikcije prikazan je na Slici 10. Dobijeni podaci su pokazali da je tokom starenja u hipokampusu pacova došlo do statistički značajnog smanjenja zastupljenosti proteina HMGCR u 12m AL-hranjenim životinjama (smanjenje od 48%), i u životinjama starim 24 meseca koje su bile na dijetalnoj

restrikciji (smanjenje od 45%). Redukovana ishrana u grupi pacova starih 12m, odnosno samo starenje u najstarijoj grupi životinja nisu imali uticaja na količinu ispitivanog proteina (Slika 10A). Zastupljenost enzima CYP46 bila je značajno smanjena u grupi 12m starih životinja, bez obzira na režim ishrane (smanjenje od 22% za 12mAL, 24% za 12mDR). U najstarijoj grupi životinja nije primećen uticaj ni starenja, ni dijetalne restrikcije na zastupljenost proteina CYP46 (Slika 10B). Količina ApoE, glavnog apolipoproteina u mozgu, bila je stabilna tokom starenja. Primenjeni restriktivni režim ishrane nije uticao na zastupljenost ovog proteina u grupi životinja starih 12 meseci. Međutim, redukovana ishrana je značajno povećala količinu ApoE u najstarijoj grupi životinja, kod kojih je zabeleženo povećanje u količini ApoE od 35% u odnosu na starosnu kontrolu, odnosno od 36% u odnosu na kontrolne 3m stare životinje (Slika 10C). Analiza proteina LXR $\alpha$  pokazala je da je kod životinja starih 12m količina ovog proteina bila značajno smanjena u odnosu na 3m stare životinje, bez obzira na režim ishrane na kome su životinje bile (smanjenje od 27% za 12mAL, 19% za 12mDR). U grupi životinja starih 24 meseca ni starenje, ni dijetalna restrikcija ne utiču na zastupljenost ovog proteina (Slika 10D).

#### **4. 4. Ćelijska lokalizacija ekspresije proteina CYP46**

Dvojnim imunohistohemijskim obeležavanjem antitelima koji prepoznaju protein CYP46 i glijalni kiseli fibrilarni protein (engl. *glial fibrilar acidic protein*, GFAP), koji predstavlja dobro okarakterisani marker astrocita, odredili smo tip ćelija koje u mozgu eksprimiraju protein CYP46 pod određenim uslovima.

#### 4.4.1. Ekspresija proteina CYP46 tokom starenja i pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije

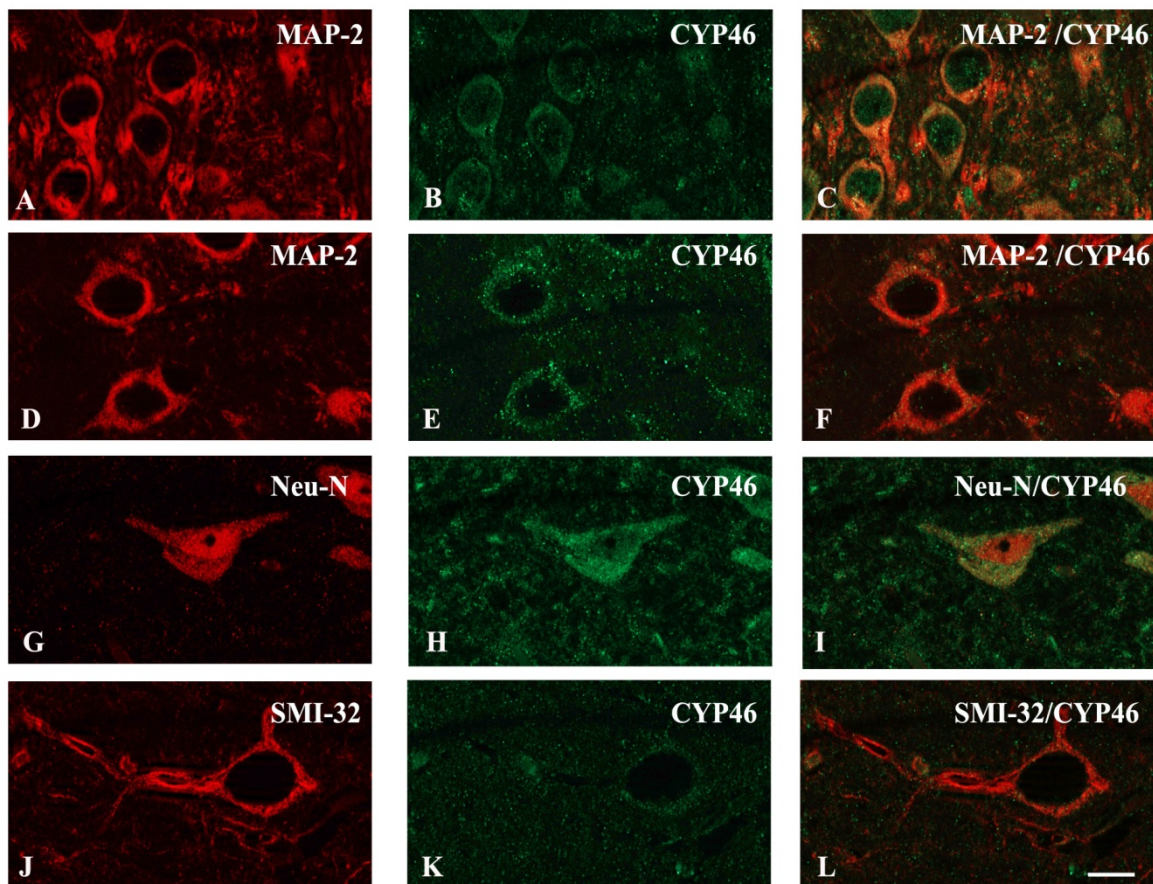


**Slika 11. Imunohistohemijaska detekcija CYP46 i GFAP u hipokampusu pacova tokom starenja i pod uticajem DR.** Ekspresije proteina CYP46 (Alexa 488, zeleno) i GFAP (Alexa 555, crveno) mozgu pacova starih 3m (A-C), 12mAL ((D-F), 12mDR (G-I), 24mAL (J-L) i 24mDR (Lj-N). Skala = 20 $\mu$ m.

S obzirom da starenje predstavlja najznačajniji faktor rizika za nastajanje i progresiju neurodegenerativnih bolesti, a da dijetalna restrikcija ima dokazani neuroprotektivni efekat, analizirali smo uticaj starenja i redukovane ishrane na ćelijsku

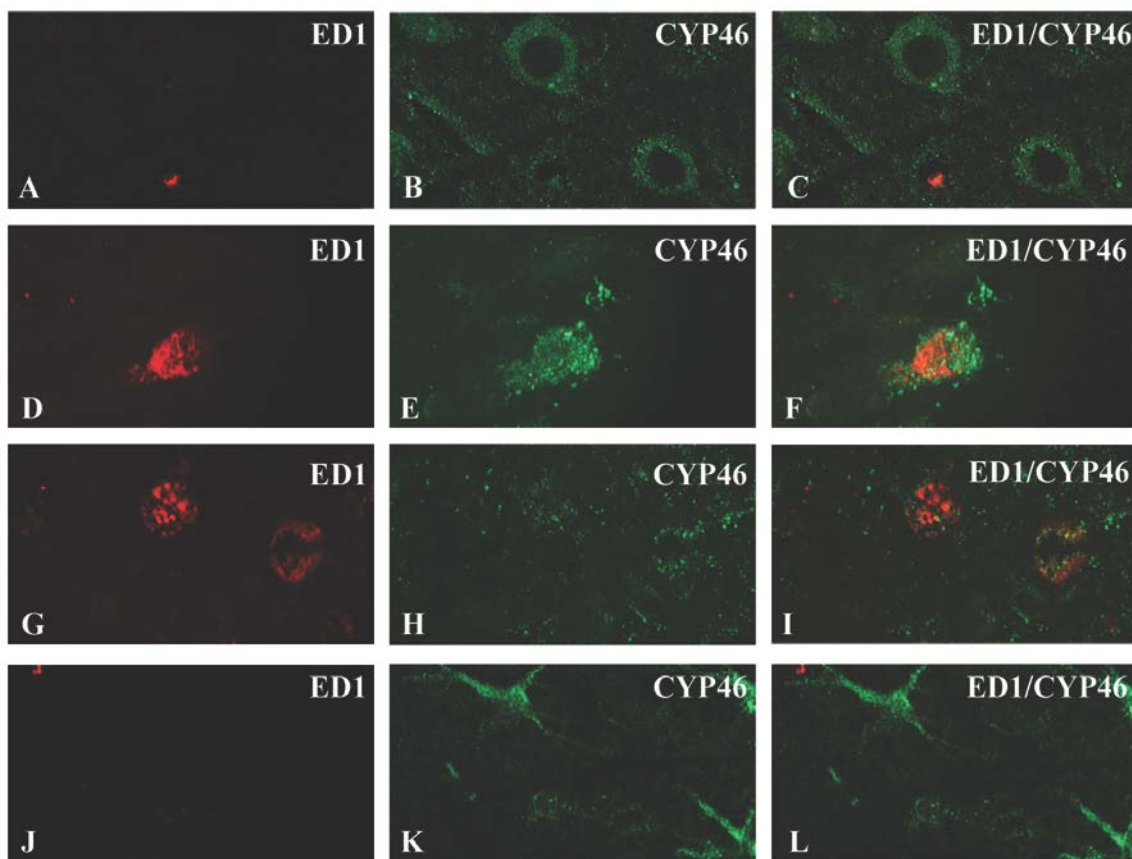
ekspresiju enzima CYP46 koji reguliše holesterolsku homeostazu u mozgu posredujući u najznačajnijem putu eliminacije viška holesterola iz mozga. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da ni starenje, ni dijetalna restrikcija ne predstavljaju dovoljno jake stimulse da dovedu do atipične ekspresije ovog proteina u astrocitima, što je dokumentovano odsustvom njegove kolokalizacije sa markerom astrocita, GFAP-om u analiziranim eksperimentalnim uslovima(Slika 11).

#### 4.4.2. Ekspresija proteina CYP46 nakon povrede mozga

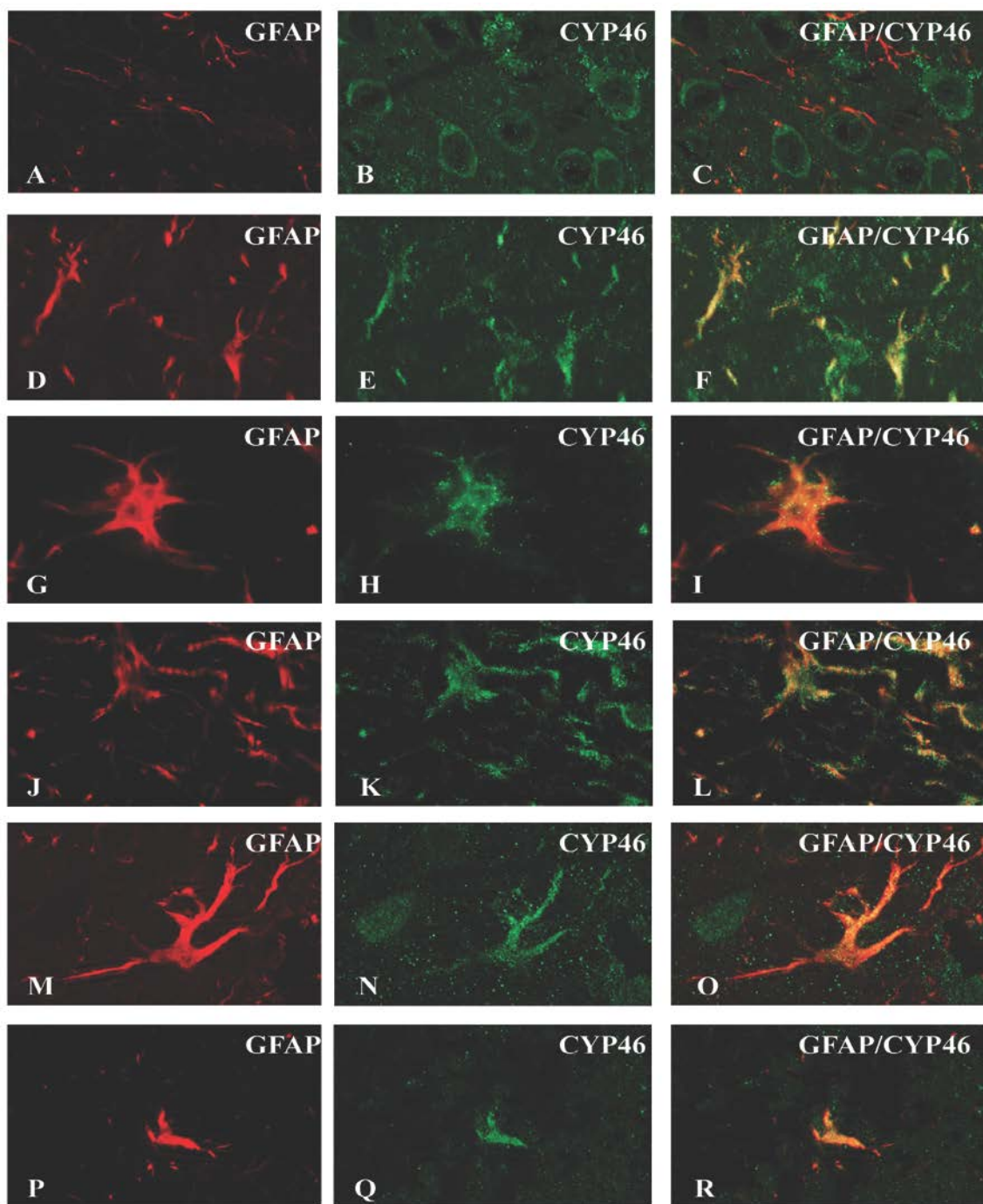


**Slika 12. Ekspresija proteina CYP46 u neuronima.** Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje. Kolokalizacija ekspresije proteina CYP46 (Alexa 488, zeleno) sa MAP-2 pozitivnim neuronima (Alexa 555, crveno) u korteksu mozga kontrolnih životinja (A-C). U blizini mesta povrede (D-L) ekspresija proteina CYP46 (Alexa 488, zeleno) je prisutna u dendritima (D-F) i ćelijskim telima (G-I) preostalih neurona što je potvrđeno njegovom kolokalizacijom sa markerima MAP-2 (Alexa 555, crveno) i NeuN (Alexa 555, crveno). Protein CYP46 nije detektovan u aksonima obeleženim markerom SMI-32 (Alexa 555, crveno) (J-L). D-L: reprezentativne slike povređenog korteksa 14 dana nakon povrede. Skala = 10 $\mu$ m.





**Slika 13. Ekspresija proteina CYP46 u aktiviranim ćelijama mikroglije.** Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje. Aktivirane mikroglijske ćelije obeležene markerom ED1 (Alexa 555, crveno) nisu detektovane u kontrolnom mozgu (A). Ekspresija proteina CYP46 (Alexa 488, zeleno) u ED1-pozitivnim ćelijama mikroglije (Alexa 555, crveno) u blizini mesta povrede 2 (D-F) i 7 (G-I) dana nakon lezije. 14 dana nakon povrede ED1-pozitivne ćelije nisu detektovane (J-L). Skala = 10 $\mu$ m.



**Slika 14.** Ekspresija proteina CYP46 u astrocitima. Dvojno imunohistohemijsko obeležavanje. U kontrolnom mozgu (A-C) fibrozni astroцити koji ekspiriraju GFAP (Alexa 555, crveno) ne pokazuju CYP46 imunoreaktivnost (Alexa 488, zeleno). Ekspresija proteina CYP46 (Alexa 488, zeleno) je kolokalizovana sa GFAP-pozitivnim astroцитима (Alexa 555, crveno) na mestu povrede 2 (D-F), 7 (D-I), 14 (J-L), 28 (M-O) i 45 dana (P-R) nakon povrede. Skala = 10 $\mu$ m.

Na osnovu literaturnih podataka koji ukazuju na ekspresiju enzima CYP46 u ćelijama glije u slučaju neurodegenerativnih bolesti i različitih povreda mozga, analizirali smo da li velika moždana trauma (ablacija senzomotornog korteksa) koja predstavlja model operativnog zahvata na mozgu ljudi, utiče na ćelijsku ekspresiju ovog proteina. Ovi eksperimenti su pokazali da je protein CYP46 i nakon moždane traume zadržao svoju tipičnu neuronalnu ekspresiju u ćelijskom telu i dendritima, što je potvrđeno kolokalizacijom sa specifičnim markerima (MAP-2, NeuN). Takođe, povreda mozga nije dovela do pomeranja ekspresije CYP46 u aksone, što je utvrđeno odsustvom kolokalizacije sa specifičnim aksonalnim markerom SMI-32 (Slika 12). Ovakva ekspresija se zadržala tokom čitavog perioda oporavka (2-28 dan).

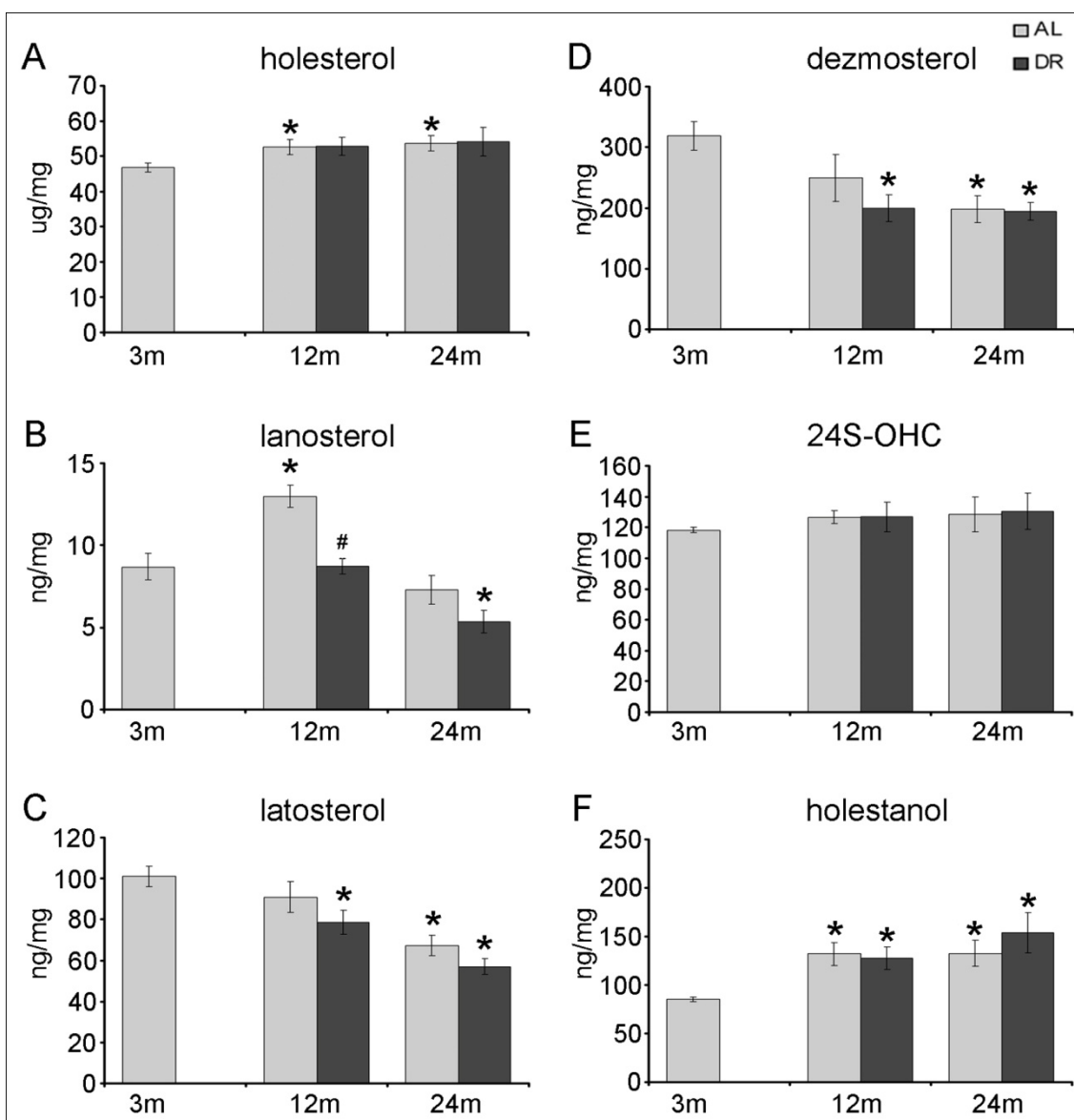
Ablacija senzomotornog korteksa je ipak uzrokovala atipičnu ekspresiju proteina CYP46 u glijskim ćelijama. Naime, kolokalizacija CYP46 sa markerom aktivirane mikroglije ED1 je pokazala da se CYP46 nakon teške povrede mozga eksprimira u mikrogliji 2 i 7 dana nakon povrede (Slika 13). Nasuprot mikrogliji, CYP46 se eksprimira u astrocitima tokom čitavog vremena oporavka (2-45 dana), što je potvrđeno njegovom kolokalizacijom sa markerima astrocита, GFAP-om (Slika 14).



#### **4. 5. Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcija na sterole u mozgu pacova**

S obzirom na detektovane promene na nivou proteina uključenih u metabolizam holesterola u mozgu u daljem radu hteli smo da vidimo uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na količinu holesterola, njegovih prekursora (lanosterol, latosterol, dezmosterol) i derivata (24S-hidroksiholesterol, holestanol), kao i biljnih sterola u korteksu i hipokampusu pacova. Količina sterola određena je gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (GC/MS).

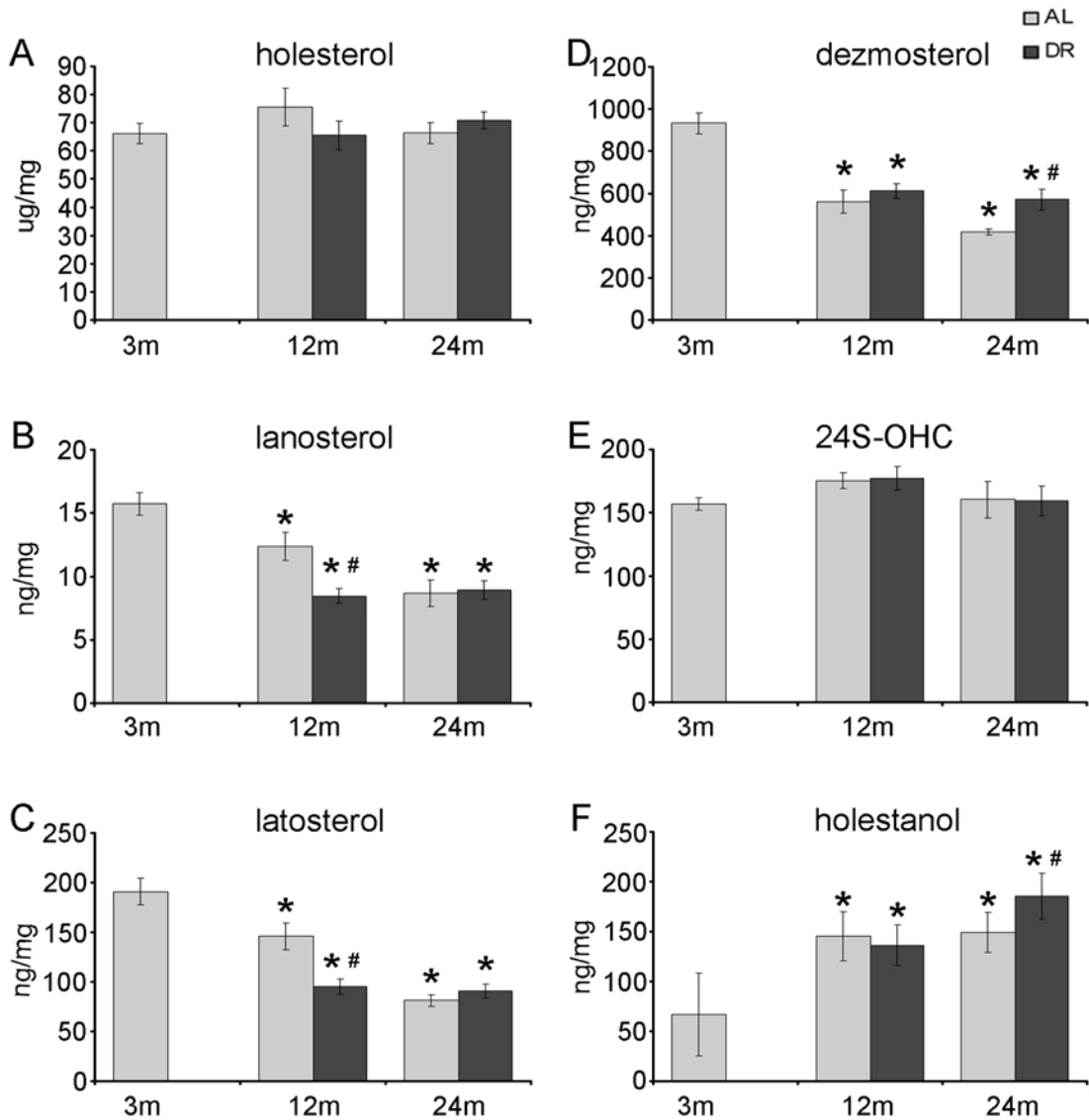
#### 4.5.1. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u korteksu pacova



**Slika 15. Zastupljenost holesterola, njegovih prekursora i derivata u korteksu pacova** koji su bili podvrgnuti različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Koncentracije sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Uticaj starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u korteksu pacova prikazan je na Slici 15. Analize su pokazale da tokom starenja dolazi do blagog, ali ipak statistički značajnog povećanja holesterola u korteksu pacova koji su hranjeni *ad libitum* (povećanje od 13% za 12mAL, 15% za 24mAL). Primenjeni restriktivni režim ishrane nije imao uticaja na zastupljenost holesterola ni u jednoj starosnoj grupi ispitivanih životinja (Slika 15A). Nivo lanosterola, prvog steroidalnog prekursora holesterola, bio je povećan u grupi 12mAL (povećanje od 34%), dok je dijeta revertovala ovo povećanje, smanjujući nivo lanosterola u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 33%). U najstarijoj grupi životinja starenje nije imalo efekta na količinu lanosterola, dok je primenjena DR smanjila njegov nivo u odnosu na 3m (smanjenje od 38%) (Slika 15B). Lanosterol, drugi prekursor holesterola, tokom starenja je bio manje zastupljen u odnosu na 3m stare životinje u svim analiziranim grupama, bez obzira na režim ishrane (smanjenje od 22% za 12mDR, 33% za 24mAL, 44% za 24mDR), dok uočeno smanjenje u 12m nije bilo statistički značajno (Slika 15C). Primenjena DR nije uticala na zastupljenost ovog sterola u okviru iste starosne grupe. I u slučaju direktnog holesterolskog prekursora dezmosterola, tokom starenja je došlo do redukcije u njegovoj zastupljenosti u svim eksperimentalnim grupama, mada smanjenje uočeno u grupi 12mAL nije bilo statistički značajno (smanjenje od 38% za 12mDR, 38% za 24mAL, 39% za 24mDR). Dijatelna restrikcija nije uticala na količinu dezmosterola u analiziranim grupama (Slika 15D). Analiza je pokazala da ni starenje ni DR nisu uticali na zastupljenost holesterolskog metabolita, 24S-OHC (Slika 15E). Nasuprot tome, količina drugog metabolita holesterola, holestanola, bila je značajno povećana tokom starenja u svim eksperimentalnim grupama, bez obzira na režim ishrane (povećanje od 49% za 12mAL, 44% za 12mDR, 49% za 24mAL, 73% za 24mDR) (Slika 15F).

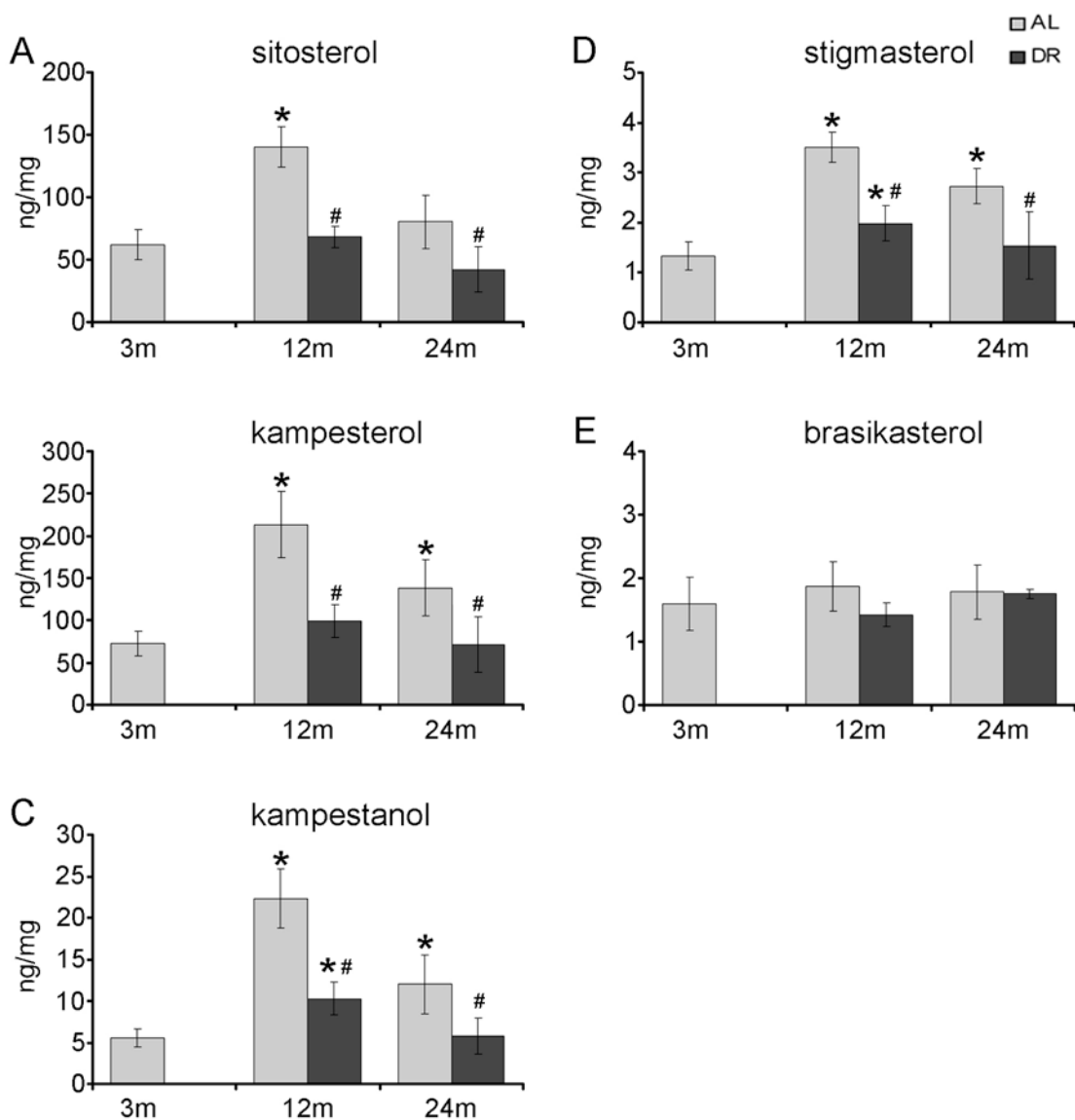
#### 4.5.2. Analiza holesterola, njegovih prekursora i derivata u hipokampusu pacova



**Slika 16. Zastupljenost holesterola, njegovih prekursora i derivata u hipokampusu pacova** koji su bili podvrgnuti različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Koncentracije sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su izraženi u odgovarajućim jedinicama i predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Analiza uticaja starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola u hipokampusu laboratorijskih pacova prikazana je na Slici 16. Dobijeni rezultati su pokazali da ni starenje ni primenjeni restriktivni režim ishrane nisu imali uticaja na zastupljenost holesterola u hipokampusu analiziranih životinja (Slika 16A). Starenje je uzrokovalo redukciju u količini lanosterola, bez obzira na režim ishrane (smanjenje od 21% za 12mAL, 46% za 12mDR, 45% za 24mAL, 43% za 24mDR), dok je DR dodatno smanjila nivo lanosterola u grupi 12m starih životinja u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 32%) (Slika 16B). Isti profil promena je uočen i za latosterol (Slika 16C). Naime, i u slučaju ovog holesterolskog prekursora, tokom starenja je došlo do smanjenja njegove količine u svim eksperimentalnim grupama (smanjenje od 24% za 12mAL, 50% za 12mDR, 57% za 24mAL, 53% za 24mDR), dok je redukovana ishrana smanjila nivo latosterola u grupi 12m starih životinja i u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 35%). Uočena je redukcija i trećeg prekursora holesterola, dezmosterola, tokom starenja u svim analiziranim grupama, bez obzira na režim ishrane (smanjenje od 40% za 12mAL, 34% za 12mDR, 55% za 24mAL, 39% za 24mDR). Ono što dezmosterol razlikuje od ostalih prekursora je uticaj dijetalne restrikcije. Naime, kod najstarijih pacova, restriktivna ishrana uticala je na povećanje nivoa dezmosterola u odnosu na starosnu kontrolu (povećanje od 38%), mada njegova vrednost ipak ostaje značajno manja u odnosu na 3m stare životinje (Slika 16D). Količina oksidovanog derivata holesterola, 24S-OHC, nije bila promenjena ni u jednoj ispitivanoj grupi (Slika 16E). Nasuprot njemu, tokom starenja je detektovana povećana zastupljenost holestanola u svim starosnim grupama (povećanje od 116% za 12mAL, 103% za 12mDR, 122% za 24mAL, 178% za 24mDR). Dugotrajna DR je dodatno povećala nivo ovog derivata u hipokampusu najstarijih životinja u odnosu na starosnu kontrolu (povećanje od 25%) (Slika 16F).

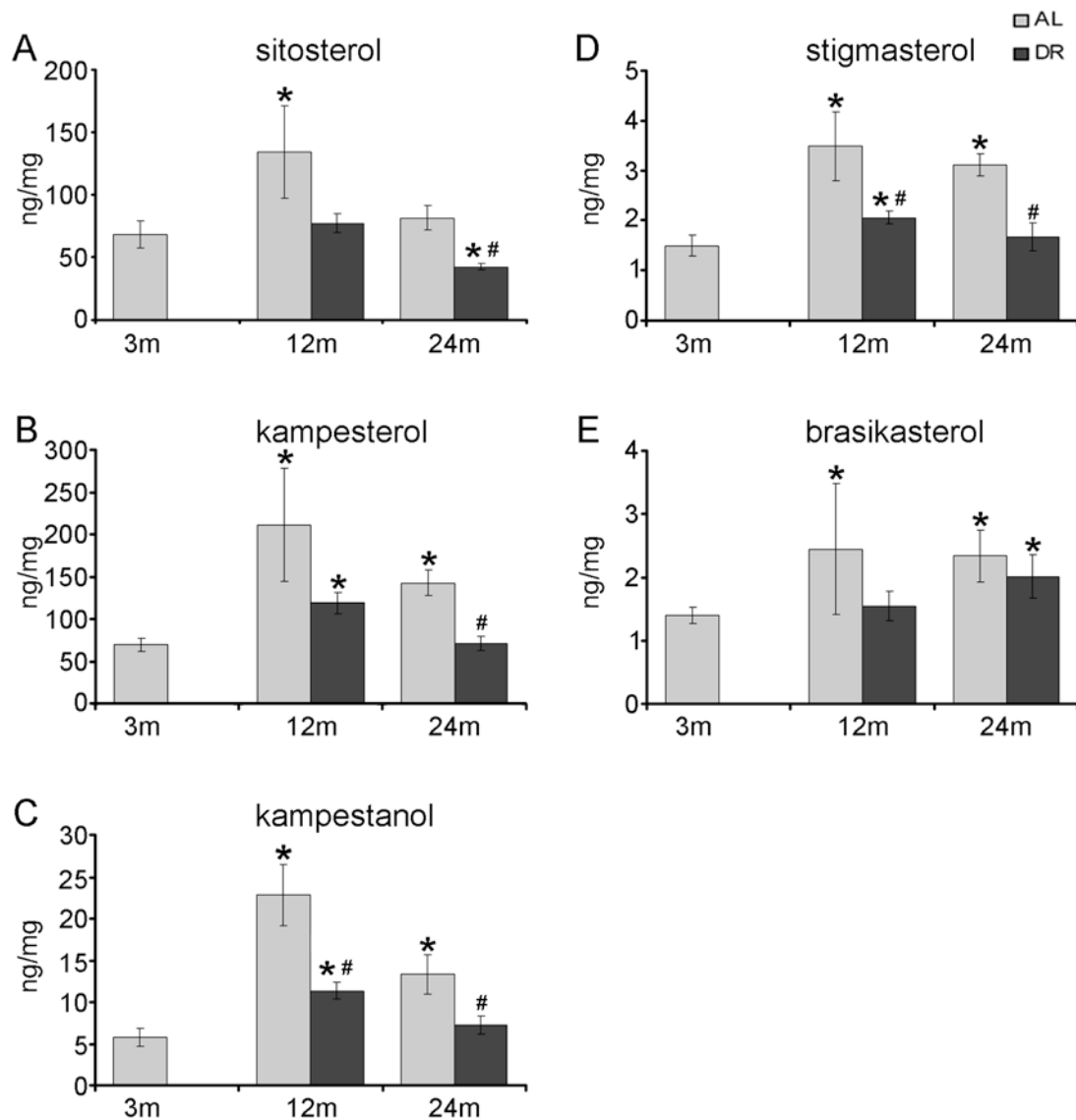
#### 4.5.3. Analiza biljnih sterola u korteksu pacova



**Slika 17. Zastupljenost biljnih sterola u korteksu pacova** koji su bili podvrgnuti različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Koncentracije biljnih sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Zastupljenost biljnih sterola u korteksu laboratorijskih pacova tokom starenja i pod dejstvom dugotrajne dijetalne restrikcije prikazana je na Slici 17. Dobijeni podaci su pokazali da je tokom starenja došlo do povećanja u količini sitosterola, mada je statistička značajnost uočena samo kod 12m starih životinja koje su hranu dobijale *ad libitum* (povećanje od 127%). Dijetalna restrikcija je značajno smanjivala količinu sitosterola u obe starosne grupe u odnosu na starosne kontrole (smanjenje od 51% za 12mDR, 47% za 24mDR), dok u odnosu na 3m stare životinje nije bilo promena (Slika 17A). Tokom starenja došlo je do značajnog povećanja u obe starosne grupe i u količini kampesterola (196% za 12mAL i 192% za 24mAL, Slika 17B), njegovog derivata kampestanola (305% za 12mAL i 118% za 24maAL, Slika 17C ) i stigmasterola (169% za 12mAL i 108% za 24mAL, Slika 17D). Dijetalna restrikcija je delovala suprotno starenju, snižavajući nivo biljnih sterola u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole. Smanjenje je iznolilo 54% za 12mDR i 49% za 24mDR za kampesterol (Slika 17B), 54% za 12mDR i 52% za 24mDR za kampestanol (Slika 17C), 43% za 12mDR i 44% za 24mDR za stigmasterol (Slika 17D). Treba napomenuti da je količina kampestanola i stigmasterola u 12m starim životinjama koje su bile podvrgnute dijetalnoj restrikciji ipak bila značajno viša u odnosu na kontrolne 3m stare životinje (povećanje od 87% za kampestanol, Slika 17C, 54% za stigmasterol, Slika 17D). Za razliku od prethodno navedenih fitosterola, količina brasikasterola je ostala nepromenjena tokom starenja, bez obzira na režim ishrane kome su životinje bile podvrgnute (Slika 17E).

#### 4.5.4. Analiza biljnih sterola u hipokampusu pacova

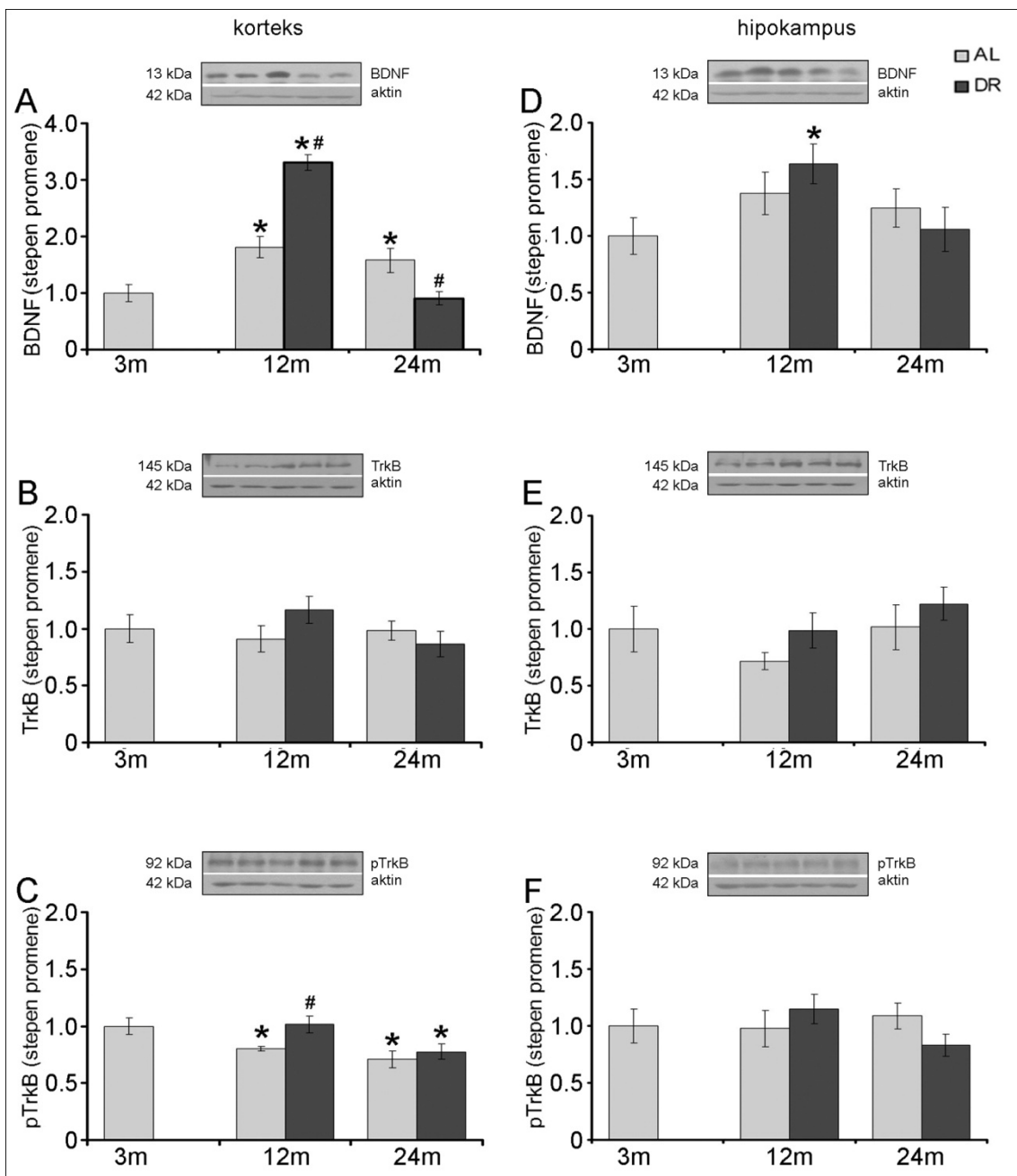


**Slika 18. Zastupljenost biljnih sterola u hipokampusu pacova** koji su bili podvrgnuti različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Koncentracije biljnih sterola određene su gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati su izraženi u odgovarajućim jedinicama i predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.



Analiza biljnih sterola u hipokampusu, pokazala je sličan obrazac promena kao u korteksu. Dobijeni podaci su prikazani na Slici 18. U hipokampusu 12m starih životinja došlo je do statistički značajnog povećanja količine sitosterola (povećanje od 96%) u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 18A). Uticaj primenjenog restriktivnog režima ishrane bio je uočljiv jedino u grupi najstarijih životinja, gde je značajno niži nivo sitosterola izmeren i u odnosu na starosnu kontrolu (smanjenje od 48%), i u odnosu na kontrolne, 3m stare životinje (smanjenje od 38%). Starenje je uzrokovalo akumulaciju kampestarola (povećanje od 205% za 12mAL, 72% za 12mDR, 106% za 24mAL). U grupi 24m starih životinja DR je delovala suprotno starenju, izazivajući redukciju njegove količine (smanjenje od 50%) u odnosu na starosnu kontrolu (Slika 18B). Tokom starenja detektovana je značajno veća količina kampestanola (povećanje od 293% za 12mAL, 97% za 12mDR, 129% za 24mAL, Slika 18C) i stigmasterola (povećanje od 133% za 12mAL, 40% za 12mDR, 107% za 24mAL, Slika 18D). U odnosu na odgovarajuće starosne kontrole redukovana ishrana je uzrokovala značajno smanjenje i kampestanola (smanjenje od 50% za 12mDR, 46% za 24mDR, Slika 18C), i stigmasterola (smanjenje od 40% za 12mDR, 45% za 24mDR, Slika 18D). Za razliku od korteksa, zastupljenost brasikasterola u hipokampusu bila je značajno povećana tokom starenja u odnosu na kontrolne životinje, mada u grupi 12 meseci starih životinja koje su bile na dijeti promena nije bila statistički značajna (povećanje od 71% za 12mAL, 64% za 24mAL, 43% za 24mDR%). U slučaju ovog biljnog sterola, dijetalna restrikcija nije imala uticaja na njegovu zastupljenost (Slika 18E).

**4.6. Uticaj starenja i dijatalne restrikcije ekspresiju zrelog proteina BDNF, njegovog ukupnog (TrkB) i aktiviranog (pTrkB) receptora u korteksu i hipokampusu pacova**



**Slika 19. Zastupljenost zrelog proteina BDNF, njegovog ukupnog (TrkB) i aktiviranog (pTrkB) receptora u korteksu (A, B, C) i hipokampusu (D, E, F) pacova tokom**

**starenja i pod uticajem DR.** Nivo ekspresije proteina određen je Western blot analizom u mozgu pacova koji su bili na različitim režimima ishrane tokom starenja (svetli stubići-AL, tamni stubići-DR). Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (3m) kojoj je dodeljena vrednost 1. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolu 3m; #  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

Imunoblot analizom ispitivana je zastupljenost BDNF, njegovog ukupnog (TrkB), kao i aktiviranog, tj. fosforilisanog receptora (pTrkB) u korteksu i hipokampusu pacova soja *Wistar* (Slika 19). Dobijeni podaci su pokazali da tokom starenja dolazi do povećanja količine trofina BDNF (povećanje od 81% za 12mAL, 58% za 24mAL). Rezultati su pokazali i uticaj dugotrajne dijetalne restrikcije na zastupljenost BDNF. Naime, redukcija u ishrani je uzrokovala povećanje količine proteina BDNF u 12m starim pacovima i u odnosu na starosnu kontrolu (povećanje od 82%), i u odnosu na 3m stare kontrolne životinje (povećanje od 230%). Nasuprot tome, dijetalna restrikcija je dovela do smanjenja njegove količine u najstarijoj grupi životinja (smanjenje od 43%) u odnosu na starosnu kontrolu (Slika 19A). Količina receptora TrkB nije bila promenjena ni tokom starenja, ni pod uticajem dijetalne restrikcije (Slika 19B). Međutim, količina aktiviranog receptora bila je značajno smanjena tokom starenja. Značajno manja količina ovog proteina detektovana je u korteksu životinja starih 12m (smanjenje od 20%), kao i kod najstarijih životinja, bez obzira na režim ishrane (smanjenje od 29% za 24mAL, 23% za 24mDR). Dijetalna restrikcija je kod 12m starih životinja delovala suprotno starenju. Kod tih životinja detektovana je veća količina aktiviranog receptora (povećanje od 28%) (Slika 19C) u odnosu na starosnu kontrolu. U hipokampusu analiziranih životinja starenje nije uticalo na zastupljenost proteina BDNF. Jedina promena je uočena kod životinja starih 12m koje su bile izložene dijetalnoj restrikciji, kod kojih je zabeleženo povećanje količine BDNF od 15% u odnosu na 3m stare kontrolne životinje (Slika 19D). Takođe, količina receptora TrkB (Slika 19E), kao i aktiviranog receptora pTrkB (Slika 19F) nisu se menjale ni tokom starenja, ni pod uticajem primenjenog režima dijetalne restrikcije.

## 5. Diskusija

Iako se prosečni životni vek produžio, ne može se reći da se radi o zdravom životnom veku, sudeći po broju hroničnih bolesti koje produženi životni vek nosi sa sobom, uključujući visceralnu gojaznost, dijabetes tipa 2, hroničnu respiratornu bolest, bolesti srca i krvnih sudova, maligne neoplazije i AB (Eyre i saradnici, 2004). Više od 80% ljudi starijih od 65 godina imaju bar jednu od gorenavedenih bolesti, a 50% ima najmanje dve takve bolesti (Deaths: Final Data for 2005, 2008). Najveći faktor rizika za nastajanje najčešćih hroničnih bolesti je konzumiranje hrane bogate tzv. "praznim" kalorijama, a siromašne hranljivim materijama, zatim fizička neaktivnost i pušenje. Gojaznost je povezana sa povećanim rizikom za demenciju (Kivipelto i saradnici, 2005). Ukoliko ne dođe do značajnog smanjenja ovih faktora rizika, ekonomski troškovi lečenja kardiovaskularnih bolesti, kancera i dijabetesa, kao i gubitak ljudskih života će rasti u budućnosti.

Dijetalna restrikcija je jedan od najbolje proučenih pristupa za koji je dokazano da može da produži životni vek različitih vrsta, od kvasca do primata (Narasimhan i saradnici, 2009). Pored toga, DR ima i dodatne korisne efekte specifične za nervni sistem, uključujući povećanu otpornost neurona na ekscitotoksičnost, oksidativne i metaboličke povrede, dok kod primata odlaže atrofiju mozga do koje dolazi tokom starenja (Colman i saradnici, 2009). Nekoliko studija je pokazalo da dijetalna restrikcija primenjena tokom adultnog perioda može da smanji starosno-zavisno kognitivno propadanje. Na primer, kada je započeta u srednjem životnom dobu redukovana ishrana sprečava kognitivno propadanje kod miševa (Means i saradnici, 1993), a dugotrajna restrikcija hrane poboljšava memoriju analiziranu različitim testovima ponašanja (Hashimoto i Watanabe, 2005). Kod pacova, DR sprečava starosno-zavisni deficit u dugotrajnoj potencijaciji (LTP) i nivoima NMDA i AMPA glutamatnih receptora u hipokampusu (Eckles-Smith i saradnici, 2000; Shi i saradnici, 2007). Međutim, postoje i podaci da redukovana ishrana nije uvek korisna za kognitivno funkcionisanje tokom starenja. Na primer, pokazano je da dugotrajna DR dovodi do pogoršanih rezultata pacova testiranih u vodenom lavirintu kada su stari (Yanai i

saradnici, 2004) a razlog za ovakav rezultat može biti prekomerna restrikcije energije. Stoga treba voditi računa da redukcija hrane ne dovede do pothranjenosti, već da dijeta predstavlja umereni stres. Naime, smatra se da je blagi metabolički stres povezan sa dijetalnom restrikcijom jedan od mehanizama dejstva koji indukuje ekspresiju proteina stresa u ćelijama, što dalje vodi povećanoj otpornosti ćelija (Lee i saradnici, 2000; Yu i Mattson, 1999; Sharma i Kaur, 2005). Pored toga, izloženost redukovanom režimu ishrane može dovesti do povećane produkcije neurotrofinskih faktora u mozgu (Mattson i Furukawa, 1996) za koje je pokazano sa štite neurone od smrti u eksperimentalnim modelima, *in vivo* i *in vitro* (Cheng i Mattson, 1994; Ren i Finklestein, 1997).

Cilj ove studije bio je da se utvrde međusobni uticaji starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na metabolizam holesterola kako u periferiji, tako i u korteksu i hipokampusu, regionima mozga koji su izuzetno važni za procese učenja i pamćenja, a istovremeno veoma osetljivi na proces starenja. Iako mozak čini samo oko 2% ukupne težine tela, on sadrži oko četvrtinu ukupnog holesterola prisutnog u telu. Holesterol reguliše fluidnost i propustljivost bioloških membrana i organizaciju lipidnih splavova, što dalje reguliše endocitozu (Dietschy i Turley, 2004) i ćelijsku signalizaciju (Dietschy i Turley, 2004). Sa ovakvom funkcionalnom raznolikošću, jasno je da holesterol predstavlja glavnog regulatora neuronalne funkcije usled konstantne potrebe ovih ćelija za tesnom kontrolom jonske ravnoteže, endocitoze i unutarćelijske signalizacije. Značaj holesterola za normalno funkcionisanje mozga ogleda se i u činjenici da je njegov metabolizam u mozgu nezavisan od holesterola u cirkulaciji i njegovih fluktuacija (Dietschy i Turley, 2001). Metabolizam holesterola je analiziran na nivou samog holesterola, njegovih prekursora i derivata, kao i proteina koji učestvuju u procesima sinteze, transporta i degradacije holesterola u mozgu. U ovim eksperimentima takođe su analizirani i biljni steroli i njihova količina u mozgu pod datim eksperimentalnim uslovima u svetlu sve veće upotrebe hrane obogaćene biljnim sterolima i njihove interferencije sa metabolizmom holesterola. Pored toga, analizirana je i zastupljenost BDNF i njegovog receptora TrkB kao i njihova međusobna veza sa metabolizmom holesterola.

U ovom radu opredelili smo se za režim ishrane koji je u svojoj osnovi intermitentan. Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su da su tokom starenja životinje

koje su bile podvrgnute dijetalnoj restrikciji imale značajno manju telesnu težinu od svojih starosnih AL kontrola, koje su dobijale na težini, iako su tokom starenja konzumirale manju količinu hrane u poređenju sa 3 meseca starim kontrolnim životinjama. Ovakvi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Naime, novija studija na mužjacima pacova soja Wistar pokazala je da se telesna težina životinja povećala tokom starenja, kao i da su životinje nakon navršene 33. nedelje života počele da smanjuju količinu hrane koju su dnevno konzumirale (Nistiari i saradnici, 2012)..

Još jedan značajan parametar delovanja DR je nivo kortikosterona u serumu za koji je pokazano da se menja i sa starenjem, i pod dejstvom dijetalne restrikcije. Brojne studije su zaista i pokazale porast kortikosterona sa starošću pacova (Sapolski i saradnici 1983, 1986; Hauger i saradnici, 1994). Međutim, pokazano je i da uticaj starenja na nivo kortikosterona u serumu pacova zavisi i od soja koji je analiziran. Tako je, npr. kod pacova soja Wistar ustanovljeno da tokom starenja dolazi do smanjenja nivoa kortikosterona u cirkulaciji (Hassan i saradnici, 1996). Rezultati iz naše studije koja je rađena na istom soju pacova su takođe pokazali da je tokom starenja u grupi 12 meseci starih životinja došlo do smanjenja količine serumskog kortikosterona. Međutim, u najstarijoj grupi pacova detektovan je značajan porast kortikosterona, pa se može zaključiti da je starenje ipak dovoljno jak stres da indukuje povećanu sekreciju ovog hormona u kasnijim stadijumima života. Kod životinja koje su bile podvrgnute redukovanom režimu ishrane detektovan je povećan nivo glukokortikoida u serumu u svim starosnim grupama. Ovaj podatak odgovara konceptu tzv. "glukokortikoidnog paradoksa", odnosno činjenici da neuroprotektivni efekti dijetalne restrikcije nadmašuju pogubne efekte glukokortikoida, tj. da povećan nivo glukokortikoida posreduje u neuroprotektivnim efektima dijetalne restrikcije (Patel i Finch, 2002). Molekularna osnova "glukokortikoidnog paradoksa" dijetalne restrikcije i njegovi efekti na signalne puteve posredovane glukokortikoidima u mozgu još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Analiza biohemijjskih parametara pokazala je da tokom starenja dolazi do redukcije glukoze u serumu pacova korišćenih u našoj studiji. Koncentracija insulina tokom starenja pratila je koncentraciju glukoze. Studija na zečevima, sa druge strane, pokazala je da starenje ne utiče na količinu glukoze u serumu (Yamada i saradnici, 2004), dok je kod ljudi

tokom starenja detektovano povećanje nivoa kako glukoze, tako i insulina (Raymond i saradnici, 1982). Postoji dosta eksperimentalnih podataka koji pokazuju uticaj različitih režima ishrane na biohemijske parametre u serumu. Naši rezultati pokazuju da dugotrajna dijetalna restrikcija koja podrazumeva 100% prosečnog dnevnog unosa hrane svakog drugog dana smanjuje nivo glukoze i insulina u serumu, što je u skladu sa podacima dobijenim iz studije mužjaka pacova (Masoro i saradnici, 1992). Isti rezultati su dobijeni i u eksperimentima na rezus majmunima (Kemnitz i saradnici, 1994). Na osnovu ovih podataka smatra se da dugotrajna DR i intermitentna ishrana hronično redukuju cirkulišuće nivoje insulina što posledično dovodi do poboljšane mobilizacije glukoze i/ili poboljšane osetljivosti na insulin (Martin i saradnici, 2006). Međutim, treba istaći i nalaze da u serumu mužjaka pacova soja Wistar nije detektovana promena količine glukoze ni tokom starenja, ni pod dejstvom DR (Quintas i saradnici, 2012).

Starenje je uzrokovalo i nepovoljan lipidni profil u serumu pacova iz naše studije. Naime, tokom starenja su detektovani povećani nivoi triglicerida, kao i HDL, LDL i ukupnog holesterola. Ovakvi rezultati su u velikoj meri u skladu sa do sada objavljenim literaturnim podacima (Altura i saradnici, 1983; Porta i saradnici, 2009). Na osnovu povećane količine holesterolskog prekursora lanosterola može se zaključiti da je njegova sinteza bila povećana tokom starenja. Povećana količina holestanola u serumu može se smatrati faktorom rizika jer povećani sadržaj holestanola može uticati na funkcionisanje bioloških membrana (Seyama, 2003). Tokom perioda sisanja kod svih sisara je zabeležen povišen nivo holesterola u plazmi (Dietschy i Turley, 2004). Promene u nivou holesterola u cirkulaciji nakon odvikavanja od sisanja zavise od konzumirane hrane (Dietschy i Turley, 2004). Važno je istaći ulogu hormona rasta u metabolizmu holesterola. Naime, pokazano je da hormon rasta ima veoma važnu ulogu u nekim aspektima metabolizma holesterola u adultnim jedinkama, uključujući i ljude i životinja (Angelin i Rudling, 1994; Friedman i saradnici, 1970; Leonsson i saradnici, 1999). Sekretija ovog hormona je smanjena tokom godina (Corpas i saradnici, 1993). Eksperimenti na glodarima pokazali su da administracija hormona rasta u stanju da potpuno preokrene starosno-zavisno povećanje u nivou holesterola u plazmi (Parini i saradnici, 1999). Ovo pokazuje da smanjena sekretija hormona rasta tokom starenja može biti uzročni faktor koji doprinosi starosno-zavisnom

povećanju serumskog holesterola. Nivo holesterola i LDL u plazmi raste tokom normalnog starenja i kod ljudi i kod glodara (Parini i saradnici, 1999). Ovo može biti povezano sa smanjenim metabolizmom holesterola do žučnih kiselina koje je zabeleženo kod glodara koji stare (Parini i saradnici, 1999; Wang, 2002), kao i sa povećanom intestinalnom apsorpcijom holesterola u starim miševima i pacovima (Wang, 2002). Tokom poslednjih četrdesetak godina, kako je definisana uloga lipoproteina u razvoju ateroskleroze, obnovilo se interesovanje za mogućnost da nivo cirkulišućeg holesterola na neki način utiče na funkcionisanje CNS-a. Postulirano je da koncentracija cirkulišućeg holesterola u plazmi novorođenčadi može da utiče na razviće mozga, pa čak i na inteligenciju. Smatra se da nizak nivo holesterola u cirkulaciji kod adultnih jedinki može uzrokovati depresiju i nasilno ponašanje, pa čak dovesti i do suicidalnog ponašanja (Olie i saradnici, 2011). Incidenca demencije je direktno povezana sa nivoom holesterola u cirkulaciji (Panza i saradnici, 2006). Nivo LDL u plazmi ljudi se tokom normalnog starenja povećava za oko 40% u periodu od 20. do 60. godine (Wilhelmsen i saradnici, 1997). Ovo se može objasniti smanjenom količinom LDL receptora u jetri pacova (Field i Gibbons, 2000). Povećan sadržaj 27-OHC u grupi najstarijih pacova detektovan u našoj studiji mogao bi ukazivati da se u kasnijem životnom periodu kod pacova soja Wistar biosinteza žučnih kiselina odvija uglavnom alternativnim ili tzv. kiselim putem (Princen i saradnici, 1997). 27-OHC je najzastupljeniji oksisterol u cirkulaciji. Osim što ima ulogu u biosintezi žučnih kiselina, poznato je da posreduje u efektima hiperholesterolemije, odnosno da može predstavljati primarni patogeni faktor u razvoju AB (Shafaati i saradnici, 2011).

Kao što je ranije napomenuto, zastupljenost lipida u plazmi adultnih jedinki zavisi od kvantiteta i kvaliteta lipida unetih hranom. Efekti ishrane bogate mastima (engl. *high fat diet*, HFD) na homeostazu holesterola su intenzivno proučavani i kod životinja, i kod ljudi. Studije na ljudima pokazale su da konzumiranje HFD dovodi do povećanja ukupnog holesterola i LDL u plazmi, kao i do značajne redukcije HDL (Shanmugasundaram i saradnici, 1986). Zna se da je visok nivo LDL povezan sa povećanim rizikom za AB (Lehtonen i Luutonen, 1986, Lesser i saradnici, 2001). Dugotrajno konzumiranje hrane bogate mastima dovodi do značajnog povećanja i telesne težine (Yan, 2006). Studije na hiperholesterolemičnih zečevima kao modelima za aterosklerozu i AB su pokazale da HFD



ishrana može da indukuje značajno povećanje količine holesterola u plazmi i jetri, ali da ne utiče na količinu holesterola u mozgu (Kalman i saradnici, 2001). Za razliku od ishrane bogate mastima, tzv. mediteranska ishrana koja uključuje nerafinisanu hranu i hranu bogatu antioksidansima, a siromašnu mastima povezana je sa redukovanim rizikom za razvoj AB i ostalih tipova demencije, ali se još uvek tačno ne zna da li se ovo postiže smanjenjem LDL u plazmi izazvanim ishranom, ili preko dodatnih antiinflamatornih svojstava ovakve hrane (Serhan, 2005).

Lipidni profil u cirkulaciji u najvećoj meri se reguliše upotrebom statina, lekova koji inhibiraju enzim HMGCR koji katalizuje sintezu mevalonata i kao što je ranije rečeno predstavlja ograničavajući enzim u mevalonatskom putu sinteze holesterola. U cirkulaciji, inhibicija sinteze holesterola dovodi do indukcije receptora za lipoproteine niske gustine (LDLR) i čišćenja ovih lipoproteina iz cirkulacije. Pokazano je da simvastatin, jedan od članova familije statina, redukuje nivoe holesterola i LDL u plazmi pacijenata obolelih od AB nakon tretmana koji traje 12 nedelja. Ovakav tretman nije imao uticaja na nivoe triglicerida i HDL (Serano-Pozo i saradnici, 2010).

Opisani tretman simvastatinom doveo je do značajne redukcije nivoa holesterolskih prekursora, latosterola i dezmosterola, u cirkulaciji, posredno ukazujući na smanjenu sintezu holesterola. Pored toga, koncentracija 24S-OHC bila je značajno snižena, što predstavlja indirektan pokazatelj inhibitornog dejstva simvastatina na sintezu holesterola u mozgu. Nije bilo promene u količini 27-OHC i holestanola u plazmi (Serano-Pozo i saradnici, 2010). U CSF simvastatinski tretman je uticao na smanjenje latosterola, bez uticaja na ostale metabolite (Serano-Pozo i saradnici, 2010). Varijacije u stopi sinteze holesterola povezane su sa promenama u količini njegovih intermedijera. Promene nivoa holesterolskih prekursora mogu ranije da se detektuju i da budu uočljivije od odgovarajućih promena nivoa holesterola (Acimovic i saradnici, 2009). Ranije je ustanovljeno da količina latosterola u plazmi predstavlja osetljivi marker biosinteze holesterola (Bjorkhem i saradnici, 1987). Na osnovu ovih činjenica, merenje holesterolskih prekursora u ćeliji, tkivu ili plazmi se često koristi za procenu sinteze holesterola pod različitim uslovima (Acimovic i saradnici, 2009). Analogno sintezi, eliminacija holesterola iz mozga može se pratiti

određivanjem količine 24S-OHC u plazmi ispitivanih subjekata (Bjorkhem i saradnici, 1999).

Redukovani režim ishrane primenjen u našoj studiji je doveo do smanjenog nivoa LDL u serumu ispitivanih pacova, bez uticaja na nivo samog holesterola. Posledica ovakvog režima ishrane bilo je i povećanje nivoa HDL koji posreduje u reverznom transportu holesterola, najznačajnijem mehanizmu eliminacije viška holesterola na ćelijskom nivou (Weingartner i saradnici, 2010). Takođe, dugotrajna DR primenjena u ovoj studiji može se smatrati korisnijom od tretmana simvastatinom, pošto je, za razliku od simvastatina (Serano-Pozo i saradnici, 2010), dovela do redukcije količine triglicerida u serumu ispitivanih pacova. Ovakav tip redukovane ishrane dovodi do snižavanja nivoa holesterolskih prekursora lanosterola i latosterola u serumu pacova, ukazujući na činjenicu da je došlo do smanjene sinteze holesterola. Važan aspekt delovanja DR ogleda se i u povećanom nivou desmosterola. Poznato je da je sinteza holesterola preko ovog prekursora karakteristična za mlade životinje (Thelen i saradnici, 2006), te se može smatrati da je izmena puta biosinteze holesterola još jedan od načina na koji DR ispoljava svoje korisno dejstvo u starim životinjama. Naime, sinteza holesterola preko desmosterola, direktnog prekursora, dovodi do uštede energije. Na nivou promena u desmosterolu se takođe ogleda značajna razlika između dijetalne restrikcije i efekata simvastatina jer je pokazano da simvastatin snižava nivo ovog holesterolskog prekursora (Serano-Pozo i saradnici, 2010).

S obzirom da se eliminacija holesterola iz mozga može posredno odrediti preko količine 24S-OHC u serumu (Bjorkhem i saradnici, 1999), pokazali smo da ni starenje, ni dugotrajna dijetalna restrikcija nemaju uticaja na proces eliminacije holesterola iz mozga, s obzirom da je nivo ovog metabolita u serumu nepromenjen. Činjenica da primena redukovane unosa hrane nije uticala na promene količine 27-OHC u serumu, govori da DR nije uticala na proces sinteze žučnih kiselina. Sa druge strane, DR u našoj studiji uzrokovala je smanjenje nivoa holestanola. S obzirom da se zna da holestanol može biti toksičan za ćeliju (Seyama, 2003), smanjenje količine holestanola može se posmatrati kao dodatni korisni efekat dugotrajne dijetalne restrikcije.

Konзумiranje hrane obogaćene biljnim sterolima/stanolima može dovesti do regulacije lipida u cirkulaciji kroz redukciju LDL i triglicerida. Takođe, biljni steroli mogu

uticati i na markere inflamacije, koagulacione parametre i funkcionisanje endotelnih ćelija i trombocita (Christos i saradnici, 2010). Mnogi od ovih efekata su pokazani *in vitro* i u animalnim modelima. Biljni steroli mogu biti inkorporirani u ćelijske membrane (Ratnayake i saradnici, 2000), međutim ovo može imati štetan efekat. Naime, pokazano je da povećana inkorporacija fitosterola u membranu crvenih krvnih ćelija čini eritrocite fragilnijim i otežava njihov prolazak kroz kapilare (Ratnayake i saradnici, 2000; de Jong i saradnici, 2003).

Naša studija je pokazala da je tokom starenja došlo do akumulacije biljnih sterola u serumu pacova, dok je redukovani unos hrane delovao suprotno starenju, održavajući nivo fitosterola na nivou izmerenom kod kontrolnih životinja starih 3 meseca. Rezultati dobijeni u ovoj studiji nisu pokazali korelaciju biljnih sterola sa količinom triglicerida ili LDL u serumu ispitivanih životinja. Naime, povećana količina biljnih sterola tokom starenja nije dovela do redukcije ni triglicerida, ni LDL-a, što ukazuje da povećan sadržaj biljnih sterola ipak nije imao protektivni efekat na lipidni profil u serumu pacova

Značaj holesterola u mozgu ogleda se u strogoj regulaciji njegovog nivoa, koji je nezavisan od holesterola u cirkulaciji i njegovog fluktuiranja (Dietschy i Turley, 2001). Holesterol prisutan u mozgu je produkt *in situ* sinteze. Tokom embrionalnog razvića i neuroni i ćelije glije sintetišu holesterol, pa je stopa sinteza holesterola relativno visoka, dok u adultnom mozgu pada na veoma nizak nivo (Dietschy i saradnici, 1983).

Podaci koji ukazuju na sudbinu holesterola u mozgu koji stari su kontradiktorni. Umereni gubitak holesterola *in vitro* i *in vivo* pronađen je u membranama starih hipokampalnih neurona (Martin i saradnici, 2008; Soderberg i saradnici, 2011). Ovi podaci su u skladu sa podacima da kod ljudi nakon dvadesete godine života dolazi do redukcije količine holesterola u frontalnom i temporalnom korteksu (Svennerholm i saradnici, 1994), kao i sa malim, ali ipak značajnim smanjenjem koje je detektovano u humanom hipokampusu i cerebelumu (Soderberg i saradnici, 1990) ili u sinaptozomima izolovanim iz starih miševa (Soderberg i saradnici, 2011). Svi ovi rezultati zajedno ukazuju da je starenje udruženo sa smanjenom sintezom i povećanim katabolizmom holesterola što zajedno dovodi do smanjenja nivoa ovog lipida. Međutim, značajne promene u nivou holesterola tokom starenja nisu otkrivene u svim regionima mozga (Soderberg i saradnici, 1990), kao

ni u sinaptičkim membranama dobijenim iz čitavog mozga glodara (Igbavboa i saradnici, 1996). Takođe, objavljeni su i podaci o povećanoj količini holesterola u totalnom ekstraktu mozga starih pacova (Aureli i saradnici, 2000). Pokazano je da se sinteza holesterola smanjuje u humanom hipokampusu, dok se količina holesterola ne menja (Thelen i saradnici, 2006). Sa druge strane, predložena je direktna korelacija između stope sinteze holesterola i aktivnosti hipokampusa. U skladu sa tim, narušavanje sinteze holesterola ili lipoproteinskog transporta smanjuje sinaptičku plastičnost, a samim tim i kognitivne funkcije (Kotti i saradnici, 2006; Blalock i saradnici, 2003; Matthies i saradnici, 1997). Nasuprot tome, opisane su promene u asimetriji holesterola u lipidnom dvosloju membrane, gde je kao posledica starenja došlo do povećane količine holesterola u spoljašnjem sloju membranskog dvosloja u odnosu na mlade miševе (Igbavboa i saradnici, 1996). Rezultati u našoj studiji predstavljaju još jednu potvrdu da metabolizam holesterola u mozgu nije uniforman. Naime, naši podaci ukazuju da tokom starenja dolazi do povećanja količine holesterola u korteksu ispitivanih životinja. Iako je količina enzima HMGCR bila smanjena tokom čitavog starenja, što bi ukazivalo na smanjenu sintezu holesterola u mozgu, količina njegovog prekursora lanosterola latosterola je bila povećana, što posredno pokazuje da je nivo biosinteze holesterola u korteksu ipak ostao na visokom nivou. Za razliku od lanosterola, nivoi ostala dva holesterolska prekursora bili su značajno smanjeni tokom starenja. Nivo moždano-specifičnog metabolita holesterola, 24S-OHC, nije bio promenjen tokom starenja u korteksu pacova. Ovakav rezultat je očekivan, s obzirom na činjenicu da je i ekspresija enzima koji konvertuje holesterol u 24S-OHC, CYP46, bila nepromenjena tokom starenja. Međutim, drugi derivat holesterola, holestanol, bio je značajno povećan u korteksu tokom starenja. Za razliku od korteksa, nivo holesterola u hipokampusu nije se menjao tokom starenja. Smanjena ekspresija ograničavajućeg enzima u mevalonatskom putu sinteze holesterola, kao i smanjena količina svih prekursora holesterola ukazuju da tokom starenja dolazi do smanjenja stope sinteze ovog sterola. Količina 24S-OHC u hipokampusu pacova bila je stabilna tokom starenja. S obzirom na podatak da je nivo enzima CYP46 bio smanjen tokom starenja, može se tumačiti da je u uslovima smanjene količine enzima njegova aktivnost pojačana, ali za ovaj zaključak je neophodna

eksperimentalna potvrda. Količina drugog derivata holesterola, holestanola, takođe je bila povećana tokom starenja u hipokampusu.

Pored razlika u količini holesterola, različite studije su ukazale i na regionalne razlike u ekspresiji enzima koji učestvuju u sintezi holesterola (Runquist i saradnici, 1995). Unutarćelijski nivo HMGCR regulisan je potrebom ćelije za sterolima. Ova regulacija uključuje promene na transkripcionom, kao i na posttranslacionom nivou, menjanjem enzimske stabilnosti. Naime, kada je potreba za sterolima velika, stopa transkripcije gena je visoka, a sam enzim je relativno stabilan. Kada je zahtev za sterolima zadovoljen, transkripcija se smanjuje, a protein se relativno brzo degraduje (Goldstein i Brown, 1990; Edwards i Ericsson, 1999). Kao što je ranije napomenuto, količina holesterolskih prekursora detektovana u našoj studiji ukazala je na smanjenu sintezu holesterola tokom starenja, što je potvrđeno i smanjenom količinom ovog enzima u obe ispitivane strukture. Međutim, sintezu holesterola nemoguće je pratiti samo preko enzima uključenog u njegov biosintetski put. Naime, proteini koji učestvuju u metabolizmu holesterola međusobno su veoma povezani. Tako oksisterol 24S-OHC, metabolički produkt enzima CYP46, indukuje transkripciju ApoE, proteinsku sintezu i sekreciju, na dozno i vremenski zavisani način (Abildayeva i autori, 2006).

Uloga ApoE u starenju mozga je proučavana u animalnim modelima, pri čemu su dobijeni kontradiktorni rezultati. Originalno razvijeni kao životinjski modeli za proučavanje ateroskleroze, ApoE<sup>-/-</sup> miševi su se pokazali korisnim i za proučavanje uloge ovog apolipoproteina u CNS-u, naročito tokom starenja i u različitim bolestima. U nekim studijama ovi miševi nisu ispoljili znake sinaptičke degeneracije (Cambon i saradnici, 2000), pokazali su normalnu histologiju mozga i odsustvo neurodegenerativnih markera (Moghadasian i saradnici, 2001), nisu pokazivali narušavanje holinergičkog sistema (Fagan i saradnici, 1998; Anderson i saradnici, 1998, Bronfman i saradnici, 2000) i ispoljili su normalnu neuronalnu funkciju (Anderson i saradnici, 1998, Anderson i Higgins, 1997). U drugim studijama, ovi miševi su, pak, ispoljili ozbiljne deficite u prostornom učenju i pamćenju (Oitzl i saradnici, 1997). Poirier i saradnici su sugerisali da nedostatak ApoE utiče da miševi izgube proceduralnu komponentu Morisovog vodenog lavirinta, pre nego što im je uništena prostorna memorija *per se* (Champagne i saradnici, 2002). Neslaganje

rezultata različitih studija sa ovim miševima mogu se objasniti genetičkom osnovom sojeva (Lominska i saradnici, 2001), sredinskim varijablama i metodološkim pristupima (Buttini i saradnici, 1999), kao i testovima ponašanja koji su korišćeni (Champagne i saradnici, 2002). Na osnovu rezultata de se ekspresija ApoE u jetri povećava na starosno-zavisan način (Gee i saradnici, 2005), smatra se da pored prisustva, i nivo ApoE može biti važan za održavanje homeostaze u mozgu tokom starenja. Ipak, još uvek nije jasno da li se ekspresija ApoE u mozgu menja tokom starenja. Studije na miševima su pokazale da se ekspresija ApoE smanjuje više od 5 puta u starom hipotalamusu i korteksu (Jiang i saradnici, 2001), ali da raste u hipokampusu (Terao i saradnici, 2002). U starim pacovima, glijska ekspresija ApoE je povećana na region-specifičan način (Morgan i saradnici, 1999). Ipak, u novijim istraživanjima Gee i saradnika je pokazano da nema promena u nivoima iRNK i proteina ApoE u korteksu, strijatumu i hipokampusu starih pacova (Gee i saradnici, 2005). Autori ukazuju da nemogućnost mozga da poveća ekspresiju ApoE tokom starenja može doprineti smanjenoj sposobnosti mozga da odgovori na stres tokom starijeg životnog doba. Sa druge strane, Kadish i saradnici (Kadish i saradnici, 2009) su opisali povećanje količine ApoE tokom srednjeg životnog doba i objasnili da višak slobodnog holesterola nastaje kao sporedni produkt lizozomske degradacije mijelinskih fragmenata bogatih holesterolom, što za posledicu ima aktivaciju ApoE i drugih gena/proteina koji učestvuju u transportu holesterola u astrocitima. Povećana količina holesterola tokom starenja detektovana u korteksu pacova analiziranih u našoj studiji bila je praćena i povećanom količinom njegovog glavnog transportnog molekula, ApoE, što sugerise efikasan transport i iskorišćenost holesterola u uslovima njegovog povećanog sadržaja.

*De novo* sinteza holesterola i njegova konverzija u 24S-OHC je tesno povezana i vremenski promenljiva i zavisna od starosti organizma i njegovih potreba za holesterolom (Lund i saradnici, 2003). Tokom prve tri nedelje života kod miša dolazi do značajnog pada nivoa iRNK za HMGCR, a paralelno sa ovim padom dolazi do porasta iRNK za CYP46, dok nivo 24S-OHC raste 6 puta tokom prve 3 nedelje života. Nakon toga, nivo ova dva enzima ostaje relativno konstantan, reflektujući balans koji postoji između holesterolske sinteze i ekskrecije.

Ranije je napomenuto da tokom starenja dolazi do povećanog katabolizma holesterola u mozgu koji je posredovan enzimom CYP46, koji katalizuje konverziju holesterola u 24S-OHC. U skladu sa ovakvim stanovištem, Lund i saradnici (Lund i saradnici, 1999) su pokazali povećanu količinu CYP46 u mozgovima starih ljudi i miševa u poređenju sa mladima. Pokazano je da ovo povećanje nivoa CYP46 uzrokuje smanjenje membranskog holesterola u hipokampalnim neuronima *in vitro* i *in vivo* (Martin i saradnici, 2008). Gubitak holesterola pokreće aktivaciju TrkB/Akt puta preživljavanja, štiteći neurone u uslovima povećanog stresa *in vivo* i *in vitro* (Martin i saradnici, 2008). Ovo zapažanje je u skladu sa podacima dobijenim u eksperimentima sa miševima kojima nedostaje gen za CYP46 koji su pokazali da redukcija stope sinteze holesterola u mozgu miša produžava život (Halford i saradnici, 2009). Mada nivoi holesterola u mozgovima ovih miševa ostaju nepromenjeni (Xie i saradnici, 2003; Lund i saradnici, 2003), varijacije u nivou holesterola u membranama specifičnih neuronalnih populacija ili u starim miševima koji ne ekspimiraju gen za CYP46 su nejasne. Razumevanje uzroka starosno-zavisne varijacije u nivoima CYP46 još uvek predstavlja izazov. Interesantni su i mehanizmi koji kontrolišu njegovu ekspresiju. Naime, Ohyama i saradnici (Ohyama i saradnici, 2006) su pokazali da gen koji kodira ovaj protein nije osetljiv na nivoe sterola, kao što je to slučaj sa HMGCR. Za sada je poznato da na ekspresiju ovog enzima utiče starenje, oksidativni stres i tretman deksametazonom i interleukinom-6 (Perović i saradnici, 2009; Ohyama i saradnici, 2006). Analiza ekspresije enzima CYP46 u okviru ove studije pokazala je da ni starenje ni dijetalna restrikcija nisu dovoljno jak stimulus da uzrokuju ekspresiju ovog proteina u glijskim ćelijama, kao ni da dovedu do promene broja ćelija koje ekspimiraju ovaj protein. Smanjena količina CYP46 koja je detektovana u hipokampusu životinja starih 12 meseci verovatno je posledica suprimirane sinteze ovog proteina od strane ćelija koje ga konstitutivno ekspimiraju tokom čitavog života. Proširivanjem ove studije izučavanjem ekspresije CYP46 u korteksu pacova nakon ablacije senzomotornog korteksa, ustanovljeno je da tako teška povreda mozga, za razliku od starenja i DR-e, dovodi do promene ćelijskog tipa koje ekspimiraju ovaj enzim. Naime, u mozgu povređenih životinja CYP46 su, pored neurona, ekspimirale i ćelije mikroglije, kao i astrociti. Ekspresija CYP46 u ćelijama mikroglije mogla bi predstavljati trenutni i brzi odgovor mozga na narušenu homeostazu

holesterola. Naime, ostaci umrlih ćelija doveli su do lokalnog povećanja nivoa holesterola, što dovodi do potrebe za njegovom brzom eliminacijom. Sa druge strane, ekspresija CYP46 u astrocitima tokom čitavog perioda oporavka koji je analiziran u ovoj studiji oslikava novouspostavljenu homeostazu holesterola. Posle ablacije senzomotornog korteksa, došlo je do smanjenja broja neurona, ćelija koje u normalnim uslovima ekspimiraju CYP46, dok je broj ćelija koje sintetizuju holesterol, astrocita, ostao nepromenjen, ili se čak povećao, pa se ukazala potreba za ponovnim uspostavljanjem ravnoteže između sinteze i eliminacije holesterola. Tako je deo astrocita preuzeo funkciju izgubljenih neurona. Treba istaći da su ove promene ekspresije CYP46 imale lokalizovan karakter. Naime, astrociti i ćelije mikroglije koji ekspimiraju CYP46 nalazili su se samo oko mesta povrede.

Produkt enzima CYP46, 24S-OHC, pored uloge u eliminaciji viška holesterola iz mozga, značajan je i kao potencijalni marker neurodegenerativnih promena. Naime, postoje podaci o mogućoj ulozi 24S-OHC u predikciji pojave AB kod starijih osoba sa očuvanim kognitivnim sposobnostima (Den Heijer i saradnici, 2006), a pokazano je i da količina 24S-OHC može značajno da ukaže na veličinu hipokampusa (Koschack i saradnici, 2007), za koji se zna da je redukovano kod AB i pacijenata obolelih od blagog kognitivnog oštećenja (engl. *mild cognitive impairment*, MCI) (Gosche i saradnici, 2002), i tako ukaže na moguću pojavu AB. Tokom normalnog starenja dolazi do promene nivoa 24S-OHC u plazmi, pa je taj nivo pet puta viši kod dece u prvoj dekadi života, nego kod ljudi koji imaju preko 50 godina (Lutjohann i saradnici, 1996). Takođe je detektovan trend ka smanjenju 24S-OHC u hipokampusu starih ljudi u poređenju sa mladim subjektima (Thelen i saradnici, 2006). U skladu sa tim su i podaci da tokom starenja dolazi do smanjenja sinteze holesterola u humanom hipokampusu (Thelen i saradnici, 2006).

24S-OHC i drugi oksisteroli su represori gena uključenih u sintezu ili preuzimanje holesterola (Bjorkhem, 2009). Oni takođe aktiviraju LXR receptore (Janowski i saradnici, 1996; Lehmann i saradnici, 1997) koji regulišu različite gene uključene u lipidnu homeostazu (Edwards i saradnici, 2002; Repa i Mangelsdorf, 2000). 24S-OHC je prirodni ligand X receptora jetre (Mitro i saradnici, 2007). Miševi kojima nedostaju ovi geni pokazuju različite defekte CNS-a tokom starenja, uključujući akumulaciju lipidnih kapi u ćelijama, proliferaciju astrocita i narušenu organizaciju mijelinskog omotača (Peet i



saradnici, 1998). Takođe, pokazano je da svaka izoforma ovog receptora ima različit set ciljanih gena, tako da oni mogu imati i potpuno nezavisne uloge u metabolizmu holesterola (Peet i saradnici, 1998; Lehmann i saradnici, 1997; Edwards i saradnici, 2002). Eksperimenti u okviru ove studije su pokazali da tokom starenja dolazi do blagog, ali značajnog smanjenja količine LXRA u obe analizirane strukture. Ovi podaci predstavljaju još jednu potvrdu da se različiti regioni mozga različito menjaju tokom starenja, u zavisnosti od svojih metaboličkih potreba.

Tokom poslednje decenije statini, grupa lekova za snižavanje holesterola u cirkulaciji, a samim tim i za snižavanje rizika za kardiovaskularne bolesti, privukli su dosta pažnje zbog potencijalno korisnog efekta za prevenciju AB (Hoyer i Riederer, 2007; Fonseca i saradnici, 2010; McGuinness i Passmore, 2010). U kulturi neurona tretman statinima smanjuje količinu holesterola i promovise neamiloidogeni put obrade APP-a (Shepardson i saradnici, 2011) Takođe, ovakav tretman redukuje hiperfosforilaciju proteina tau i štiti od glutamatske ekscitotoksičnosti (Fan i saradnici, 2001; Zacco i saradnici, 2003; Bosel i saradnici, 2005; Kojro i saradnici, 2010). U CNS-u najveća korist se očekuje od lipofilnih statina, simvastatina i lovastatina, koji prolaze krvno-moždanu barijeru i deluju direktno u mozgu (Sierra i saradnici, 2011) i njihove rane, preventivne upotrebe (Siegel i saradnici, 2008). Mehanizmi potencijalnog neuroprotektivnog efekta statina još uvek nisu jasni. Neki autori smatraju da statini indirektno utiču na sintezu holesterola u mozgu snižavajući nivo holesterola u plazmi (Sparks i saradnici, 2002), što ukazuje da je smanjenje holesterola u krvi najsigurniji način za redukciju holesterola u mozgu, iako ovakvo stanovište podrazumeva da dolazi do razmene holesterola između cirkulacije i mozga (Lutjohann i saradnici, 2002). Sa druge strane, neki autori smatraju da se efekat statina na metabolizam holesterola u mozgu ostvaruje indirektno, na nivou zidova malih krvnih sudova u okviru krvno-moždane barijere (Kirsch i saradnici, 2003).

Ipak, efekti dugotrajne inhibicije neuralne biosinteze holesterola na održavanje i funkcionisanje sinapsi nisu u potpunosti poznati. Uz potencijalne korisne efekte statina na funkcionisanje centralnog nervnog sistema, opisani su i njihovi neželjeni efekti. U nekoliko studija je pokazano da simvastatin uzrokuje poremećaje spavanja (de Vries i Cohen, 1993; Saheki i saradnici, 1994), kao i da je upotreba statina povezana sa problemima sa

memorijom (Wagstaff i saradnici, 2003), direktno inhibirajući dugotrajnu potencijaciju koja se smatra markerom sinaptičke plastičnosti (Kotti i saradnici, 2006). Takođe, visoke doze simvastatina i pravastatina dovode do redukcije količine holesterola u korteksu (Johnson-Anuna i saradnici, 2005), što može imati štetne posledice za rast neurona i signalnu transdukciju.

Pored statina, spoljašnja manipulacija koja, uz efekat na metabolizam holesterola u cirkulaciji, pokazuje uticaj i na metabolizam holesterola u mozgu je redukovani režim ishrane, mada su do sada dobijeni rezultati o efektima smanjenog unosa hrane na holesterol u mozgu kontradiktorni i šturi. Naime, eksperimenti na miševima koji su gladovali 20 sati su pokazali da iako gladovanje nije uticalo na sadržaj samog holesterola u mozgu, značajne promene su detektovane na postskvalenskim matabolitima u biosintezi holesterola (Fon Tacer i saradnici, 2010). Redukcija količine ovih metabolita pokazala je da je sinteza holesterola u mozgu nakon gladovanja smanjena. Nivo samog holesterola je ostao nepromenjen verovatno zbog homeostatskog mehanizma u mozgu koji uključuje efikasnu iskorišćenost holesterola (Dietschy i Turley, 2004). I Hayakawa i saradnici su takođe pokazali da nema razlike u nivoima holesterola u serumu i mozgu između miševa koji su bili na DR i onih koji su hranjeni uobičajeno (Hayakawa i saradnici, 2007). Ipak, postoje i podaci da IF ili režim ishrane koji podrazumeva unošenje 60% prosečnog dnevnog unosa hrane, iako u manjoj meri, ipak utiču na količinu slobodnog holesterola u mozgu (Mulas i saradnici, 2005). Slično DR, kratkotrajni tretman visokom dozom simvastatina i pravastatina nema uticaja na nivo holesterola u homogenatu celog mozga. Međutim, ovakav tretman značajno je smanjio nivo holesterola u mozgu, ukazujući na redukovanu sintezu holesterola (Thelen i saradnici, 2006).

Naši rezultati su pokazali da različite moždane strukture, kao i u slučaju starenja, različito reaguju i na dugotrajnu dijetalnu restrikciju. Primenjeni redukovani režim ishrane nije uticao na količinu samog holesterola ni u korteksu, ni u hipokampusu ishrane. Uticaj redukovanog režima ishrane ispitivanog u ovoj studiji na metabolizam holesterola u korteksu pacova bio je uočljiv preko smanjenog nivoa holesterola, što može ukazati da je sinteza holesterola u korteksu pacova smanjena u uslovima redukovanog energetskeg unosa.

Za razliku od korteksa, promene metabolizma holesterola u hipokampusu pod delovanjem dijetalne restrikcije bile su izraženije i mogle su se uporediti sa promenama uočenim u serumu. Naime, u hipokampusu nije zabeležen promenjen nivo samog holesterola, kao ni 24S-OHC, dok su lanosterol i latosterol bili značajno redukovani, ukazujući na smanjenu sintezu holesterola u hipokampusu pacova pod delovanjem dugotrajne DR. Međutim, poput seruma, i u hipokampusu je redukovani unos hrane uzrokovao povećan nivo dezmosterola u najstarijoj grupi životinja. Kao što je već napomenuto, put sinteze holesterola preko ovog prekursora je zastupljeniji u mladim životinjama, s obzirom na činjenicu da je dezmosterol važan za proces mijelinizacije (Thelen i saradnici, 2006a; Lutjohaann i saradnici, 2002). Sa druge strane, značajno veći nivoi dezmosterola detektovani su kod miševa koji su generisani tako da ne mogu da sintetišu sam holesterol. Ovi miševi mogu da dožive adultni period sa nivoom dezmosterola koji predstavlja 99% ukupnih sterola, sugerišući da ovaj holesterolaski prekursor može da preuzme ulogu holesterola (Wechsler i saradnici, 2003), uprkos činjenici da se biofizičke i funkcionalne karakteristike dezmosterola značajno razlikuju od holesterola (Vainio i saradnici, 2006). Pored toga, u istoj grupi životinja detektovana je i povećana koncentracija holestanola. Uzimajući u obzir nalaze Wechsler-a i saradnika može se pretpostaviti da DR preko povećanja količine dezmosterola održava ravnotežni odnos sa povećanim sadržajem holestanola i na taj način štiti ćelijske membrane.

Kao što je ranije rečeno, najznačajniji korak u regulaciji sinteze holesterola je sinteza mevalonata koju katalizuje enzim HMGCR. Kratkotrajna regulacija ovog enzima ostvaruje se procesima fosforilacije i defosforilacije, dok se dugotrajna regulacija postiže kontrolom sinteze i degradacije ovog enzima (Martini i saradnici, 2008). Aktivnost HMGCR je povećana tokom starenja i u jetri i u mozgu, bez promena u količini enzima (Pallottini i saradnici, 2003). Pokazano je da DR utiče na aktivnost samo u jetri (Pallottini i saradnici, 2003). Mehanizam koji leži u osnovi narušene degradacije ovog proteina je starosno-zavisni poremećaj u funkcionisanju proteazoma koji DR nije u stanju da spreči (Pallottini i saradnici, 2004). Ipak, rezultati iz ove studije pokazuju da predloženi režim redukovane ishrane redukuje nivo HMGCR u hipokampusu i tako verovatno na neki način interferira sa proteazomskom funkcijom u mozgu.

Mozak pokazuje mozaične promena u ekspresiji proteina ApoE i pod dejstvom spoljašnjih faktora poput dijetalne restrikcije. Tako korpus kalozum i bazalne ganglije tokom starenja pokazuju povećanje nivoa proteina ApoE, koje je bilo donekle umanjeno pod dejstvom DR-e, dok je naprotiv, u hipokampusu detektovan pad ekspresije iRNK za ApoE bio intenziviran pod uticajem dijetne (Morgan i saradnici, 1999). Smanjenje količine ApoE u korteksu pacova analiziranih u našoj studiji koji su bili podvrgnuti dijetalnoj restrikciji odgovara smanjenoj sintezi holesterola koja je takođe zabeležena u ovoj grupi životinja. Sa druge strane, povećana količina ApoE u hipokampusu najstarije grupe pacova koji su bili na restriktivnom režimu ishrane, bez promena u količini holesterola, može ukazivati da je iskorišćenost već postojećeg holesterola povećana. S obzirom na činjenicu da su starenje i oksidativni stres koji ga prate značajni faktori koji doprinose narušavanju i curenju krvno-moždane barijere (Fullerton i saradnici, 2001; Hafezi-Moghadam i saradnici, 2007), a da ApoE ima važnu ulogu u održavanju integriteta krvno-moždane barijere (Fullerton i saradnici, 2001) i ima antioksidativne sposobnosti (Miyata i Smith, 1996; Lomnitski i saradnici, 1999; Ramassamy i saradnici, 2001), povećanje ApoE se može posmatrati i u svetlu još jednog korisnog efekta dijetalne restrikcije. Treba ipak imati na umu da različiti režimi ishrane različito utiču na zastupljenost ApoE u mozgu pacova. Naime, rezultati naše ranije studije su pokazali da restriktivnija dijetalna restrikcija (50% prosečnog dnevnog unosa svakog drugog dana) dovodi do značajnog smanjenja količine ApoE u hipokampusu pacova soja Wistar starih 24 meseca (Perović i saradnici, 2009).

Efekat dugotrajne DR ne zastupljenost ovog receptora evidentan je samo u korteksu ispitivanih životinja. Ako se zna da LXRA ima ulogu u supresiji biosinteze holesterola (Wang i saradnici, 2008), ovi podaci su u skladu sa redukovanom količinom enzima HMGCR, kao i sa detektovanim smanjenjem stope sinteze holesterola u mozgu koje je još izraženije u grupi životinja podvrgnutih redukovanom unosu hrane.

Može se zaključiti da obrazac ekspresije proteina uključenih u metabolizam holesterola u mozgu zavisi od režima redukovane ishrane. Šta više, kao što je ranije pokazano (Perović i saradnici, 2009; Mladenović Djordjević i saradnici, 2010), različiti regioni mozga različito odgovaraju na dugotrajnu dijetalnu restrikciju.

Posljednjih godina, hrana obogaćena biljnim sterolima se sve više koristi za regulaciju holesterola u cirkulaciji, dok je donekle zanemaren efekat biljnih sterola na metabolizam holesterola u mozgu. U skladu sa činjenicom da je struktura biljnih sterola veoma slična strukturi holesterola, dugo smatralo se da ovi steroli ne mogu proći krvno-moždanu barijeru i ući u mozak. Ipak, u mozgu su detektovani fitosteroli, iako u veoma malim količinama (Yu i saradnici, 2004; Lutjohann, 2002). Pokazano je da su povećani nivoi biljnih sterola u cirkulaciji, koji predstavljaju rezultat unosa hrane obogaćene biljnim sterolima, povezani sa povećanim nivoom biljnih sterola u mozgu. Prolazak fitosterola kroz krvno-moždanu barijeru bio je moguć samo u okviru HDL partikula. Povećane koncentracije biljnih sterola u mozgu ne utiču značajno na sveukupan metabolizam holesterola u mozgu. Ipak, važno je napomenuti da biljni steroli imaju ćelijsko-specifični efekat. Naime, pokazano je da sitosterol indukuje ekspresiju ApoE u kulturi humanog astrocitoma, ali ne i u kulturi neuroblastoma. Za razliku od ApoE, sitosterol nema efekta na ekspresiju CYP46 (Jansen i saradnici, 2006). Sitosterol je snažniji regulator proteinske ekspresije od holesterola, dok kampesterol ne utiče na ApoE. Takođe, poznato je da sitosterol utiče na karakteristike membrana zbog nepovoljnije interakcije sa fosfolipidima u odnosu na holesterol (Halling i Slotte, 2004). Određivanjem količine biljnih sterola u model-sistemu korišćenom u ovoj studiji utvrđeno je da tokom starenja dolazi do akumulacije fitosterola i u korteksu i u hipokampusu analiziranih laboratorijskih pacova. Izuzetak je brasikasterol u korteksu čiji nivo se nije menjao kod starih životinja. Povećan sadržaj biljnih sterola u mozgu koji stari je interesantan i zbog činjenice da je tokom izvođenja eksperimenta redovnom kontrolom eksperimentalnih životinja utvrđeno da stare životinje unose manje hrane od mlađih. Dobijeni rezultati se mogu stoga posmatrati u svetlu promene metabolizma biljnih sterola do koje dolazi tokom starenja. Povećana količina ApoE detektovana u korteksu pacova korišćenih u ovoj studiji delom se može objasniti povećanom količinom sitosterola u istoj strukturi.

Što se tiče uticaja dijetalne restrikcije na nivo fitosterola u mozgu pacova, naši rezultati su pokazali da redukovani režim ishrane teži da održi količinu biljnih sterola na nivou mladih kontrolnih životinja, odnosno da očuva metabolizam biljnih sterola.

Veza holesterola i neurotrofina pokazana je kada je utvrđeno da neurotrofinska signalizacija, pored prisustva liganda, zavisi i od sadržaja holesterola u ćelijskoj membrani (Martin i saradnici, 2008). Pored toga, pokazano je i da je BDNF važan stimulus za *de novo* neuronalnu sintezu holesterola (Suzuki i saradnici, 2007). Od ranije je poznato da nivo BDNF i TrkB varira u starim pacovima u zavisnosti od soja. Tako je količina BDNF bila povećana u hipokampusu, a smanjena u cerebralnom korteksu, hipotalamusu i strijatumu tokom starenja pacova soja Sprague Dawley (Kato-Semba i saradnici, 1998). Druga studija na istom soju pacova pokazala je blago, ali statistički značajno smanjenje sadržaja BDNF u hipokampusu i hipotalamusu (Silhol i saradnici, 2005). Croll i saradnici su, sa druge strane, u svojim eksperimentima pokazali da starenje ne utiče na količinu BDNF u mozgu pacova (Croll i saradnici, 1998). Pokazana je i redukcija količine receptora TrkB u hipokampusu starih pacova (Silhol i saradnici, 2005). Eksperimenti u kojima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar pokazali su da tokom starenja dolazi do značajnog povećanja količine BDNF i njegove proforme, dok je katalitički receptor TrkB bio značajno smanjen (Silhol i saradnici, 2007). Interesantno je napomenuti da je nivo ovog receptora, ali ne i sam BDNF bio kao kod mladih životinja kada su stari pacovi podvrgnuti treningu prostorne memorije (Silhol i saradnici, 2007). U pacovima soja Lou/C koji predstavlja inbridovani soj koji potiče od soja Wistar, a koji se pokazao kao dobar animalni model uspešnog starenja, jer ima duži životni vek od većine laboratorijskih sojeva (Alliot i saradnici, 2002), pokazano je da se količina BDNF ne menja tokom starenja. Šta više, kod ovih životinja je zabeležen niži nivo proBDNF, kao i TrkB u poređenju sa starim pacovima soja Wistar (Silhol i saradnici, 2007). Pored različitih sojeva pacova koji su korišćeni u eksperimentima, objašnjenje za ove protivurečnosti u dobijenim podacima može se potražiti i u različitim metodološkim pristupima koji su primenjeni u analizi količine neurotrofina u mozgu pacova. Analize ekspresije neurotrofina BDNF i njegovog specifičnog receptora u našem model sistemu pokazale su da se korteks i hipokampus različito ponašaju u datim eksperimentalnim uslovima. Naime, u korteksu laboratorijskih pacova zabeležena je značajno povećana količina BDNF tokom starenja, dok je količina katalitičkog receptora TrkB bila nepromenjena tokom starenja. Međutim, količina aktiviranog receptora bila je značajno manja tokom starenja. Nasuprot korteksu, u

hipokampusu nisu zabeležene značajne promene u količini ni BDNF, ni odgovarajućih receptora. Ovakav donekle iznenađujući rezultat može biti objašnjen biohemijskim modifikacijama receptora (glikacijom, karbonilacijom...), što sa metodološkog aspekta može sprečiti prepoznavanje receptora od strane antitela, a sa fiziološkog od strane liganda (Silhol i saradnici, 2007), što za krajnju posledicu može imati smanjenu signalnu transdukciju BDNF u mozgu.

Postoji tesna korelacija između spoljašnjih faktora ili određenih fizioloških situacija (starenje, stres, deprivacija hrane, fizička aktivnost) i ekspresije BDNF (Tapia-Arancibia i saradnici, 2004). Tako je pokazano da dijetalna restrikcija indukuje ekspresiju BDNF u dentatnom girusu (Lee i saradnici, 2000, 2002; Gomez-Pinilla i saradnici, 2008). Mladi pacovi soja Sprague-Dawley koji su bili na intermitentnom režimu ishrane imali su petostruko povećanje nivoa BDNF u celom hipokampusu u odnosu na starosne kontrole hranjene AL (Duan i saradnici, 2001; Lee i saradnici, 2000). Nasuprot tom rezultatu, studija iz 2005.godine na hibridnim pacovima F344 × BN (Newton i saradnici, 2005) pokazala je da DR nije uticala na količinu BDNF u hipokampusu mladih pacova. U istoj studiji povećanje količine BDNF od 8-10% zabeleženo je u sredovečnim i starim pacovima podvrgnutim DR, ali samo u CA1 regionu hipokampusa. Takođe je poznato da različiti protokoli redukovane ishrane različito utiču na ispitivane parametre i procese (Newton i saradnici, 2005). Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su uticaj DR na zastupljenost BDNF samo u korteksu ispitivanih pacova. Treba napomenuti da je primenjeni restriktivni režim ishrane u našoj studiji na različite načine uticao na količinu BDNF u zavisnosti od starosti životinja. DR je takođe uticala na zastupljenost fosforilisanog receptora u grupi životinja starih 12 meseci i to tako što je delovala suprotno starosno-zavisnom smanjenju količine aktiviranog receptora. Ovakav rezultat bi se, u svetlu ranije navedenih biohemijskih promena receptora tokom starenja, mogao objasniti kao potencijalno korisni efekat redukovane unosa hrane u cilju očuvanja signalne transdukcije pokrenute BDNF.

Jedan od mehanizama kojim lipidi doprinose značajnom preživljavanju neurona tokom starenja je preko promena u organizaciji lipidnih ostrvca koji služe kao platforme za aktivnost brojnih receptora preživljavanja i u neuronima i u neneuronalnim ćelijama (Paratcha i saradnici, 2002; Martin i saradnici, 2009). Izuzetak nije ni ćelijska signalizacija

posredovana BDNF-om. Tokom razvića, neurotrofinski receptor TrkB je aktiviran vezivanjem BDNF-a u procesu koji je neophodan za preživljavanje, diferencijaciju i rast posebnih tipova neurona (Reichardt, 2006). U zreлом nervnom sistemu, put BDNF-TrkB je važan za modulaciju neuronskih veza i plastičnosti zavisne od aktivnosti (engl. *activity-dependent plasticity*), a ne za preživljavanje (Conover i saradnici, 1997; Blum i Konnerth, 2005). Iako nema sumnje da je BDNF glavni modulator aktivnosti receptora TrkB, postoje dokazi koji ukazuju da lipidne promene mogu da pojačaju aktivnost ovog receptora nezavisno od liganda tokom sazrevanja i starenja neurona, tako da je blagi gubitak holesterola koji se dešava kod starih hipokampalnih neurona povezan sa povećanom fosforilacijom/aktivacijom TrkB *in vivo* i *in vitro* (Martin i saradnici, 2008). Postojanje direktne veze između gubitka holesterola i aktivacije receptora TrkB je podržana opažanjima da blaga redukcija holesterola u membranama olakšava aktivaciju TrkB u mladim hipokampalnim neuronima u kulturi, dok dodavanje holesterola starim ćelijama sprečava aktivaciju receptora (Martin i saradnici, 2008). Iako spekulativna u ovom trenutku, promena sadržaja holesterola do koje dolazi tokom starenja može da poveća signalni potencijal receptora preko indukcije grupisanja receptora u "novim" lipidnim splavovima starih neurona, i kao posledicu dovede do pojačane dimerizacije i fosforilacije. Rezultati naše studije pokazali su da tokom starenja dolazi do povećanje sadržaja holesterola u korteksu analiziranih životinja. Ovo povećanje holesterola moglo bi, analogno rezultatima Martina i saradnika (Martin i saradnici, 2008) biti povezano sa smanjenom fosforilacijom/aktivacijom receptora, čak i u uslovima povećane količine samog liganda. Naime, povećana količina holesterola mogla bi da dovede do rearanžmana lipidnih ostrvaca na način koji bi uzrokovao smanjenu interakciju liganda i receptora i posledično uzrokovao smanjenu signalnu transdukciju. Ipak, treba napomenuti da su za ovakav zaključak potrebni dodatni eksperimenti, kako *in vitro*, tako i *in vivo*.

Ova studija imala je za cilj izučavanje metabolizma holesterola u mozgu kao jednog od aspekata sinaptičke plastičnosti. Holesterol je, kao što je već napomenuto, neophodan za funkcionisanje CNS-a u celini, a naročito je važan za funkcionisanje sinapsi i sinaptičku transmisiju. Korteks i hipokampus su regioni mozga najodgovorniji za procese učenja i pamćenja, i kao takvi su veoma osetljivi na starenje i oštećenja koje starenje izaziva.



Rezultati dobijeni u ovoj studiji su još jedna potvrda da korteks i hipokampus ne pokazuju uniformne promene tokom starenja, verovatno zbog različitih adaptivnih mehanizama i metaboličkih zahteva. Takođe, ove moždane strukture pokazuju i različit kapacitet da se na njih deluje spoljašnjim manipulacijama, kakva je dugotrajna dijetalna restrikcija. Naime, ova studija je pokazala da se na metabolizam holesterola u mozgu može delovati redukovanom ishranom koja je u svojoj osnovi intermitentna. Ovakav režim ishrane ispoljio je potencijal da redukuje sintezu holesterola u mozgu, ne utičući na količinu samog holesterola, što obezbeđuje dovoljno holesterola za optimalno funkcionisanje centralnog nervnog sistema. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da je hipokampus, iako neznatno osetljiviji od korteksa na starenje, podložniji za delovanje dijetalne restrikcije i njeno korisno dejstvo koje se ostvaaruje kroz povećanu antioksidativnu zaštitu u starom mozgu preko povećane količine ApoE. Do sada su se svi pokušaji da se utiče na metabolizam holesterola u mozgu svodili na upotrebu medikamenata, koji su pored željenih korisnih rezultata ispoljili i niz sporednih efekata koji su se pokazali štetnim za CNS. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazali su na mogućnost primene dijetalne restrikcije kao alternative statinima. Dugotrajna dijetalna restrikcija započeta još u ranijem životnom dobu predstavlja neagresivan tretman bez štetnih sporednih efekata koji može povoljno uticati na metabolizam holesterola u mozgu. Pored toga, sticanjem zdravih navika u ishrani stvara osnov za zdravije starenje manjom incidencom hroničnih i neurodegenerativnih bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije su ukazali na specifične promene u metabolizmu holesterola tokom starenja u korteksu i hipokampusu pacova kao i na efekat koji na ove promene ispoljava primenjena dugotrajna dijetalna restrikcija. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Dugotrajna dijetalna restrikcija tokom starenja sprečava starosno-zavisno povećanje telesne težine.
2. U serumu dugotrajna dijetalna restrikcija tokom starenja:
  - uzrokuje povećanje nivoa kortikosterona bez obzira na starost životinja;
  - pojačava efekat starenja na smanjenje koncentracije glukoze i insulina;
  - održava poželjan lipidni profil, odnosno smanjuje holsterol, LDL i trigliceride, a povećava HDL;
  - deluje sinergistički sa starenjem povećavajući količinu holesterolskog prekursora dezmosterola;
  - sprečava starosno-zavisnu akumulaciju biljnih sterola.

Ove promene podržavaju koncept delovanje dijetalne restrikcije preko tzv. "glukokortikoidnog paradoksa" i ukazuju na pozitivno delovanje dijetalne restrikcije preko održavanja povoljnog biohemijskog profila u serumu.

3. Tokom starenja i pod delovanjem dugotrajne dijetalne restrikcije zapažene su promene na nivou proteina uključenih u sintezu (HMGCR), transport (ApoE), katabolizam (CYP46) i regulaciju (LXR $\alpha$ ) holesterola:
  - tokom starenja dolazi do smanjenja količine proteina HMGCR i LXR $\alpha$ , a do povećanja nivoa ApoE u korteksu. Dijetalna restrikcija uzrokuje smanjenje nivoa proteina ApoE i LXR $\alpha$  u odnosu na starosne kontrole;
  - u hipokampusu tokom starenja dolazi do smanjenja ekspresije proteina HMGCR, CYP46 i LXR $\alpha$ . U grupi životinja starih 24 meseca koje su bile podvrgnute dijetalnoj restrikciji došlo je do povećanja nivoa proteina ApoE.

4. Ni starenje, ni redukovana ishrana ne utiču na neuron-specifičnu ekspresiju proteina CYP46, enzima odgovornog za katabolizam holesterola u mozgu. Povreda mozga uzrokuje atipičnu ekspresiju ovog proteina u astrocitima i ćelijama mikroglije ukazujući na važnu ulogu ovog enzima u uspostavljanju nove homeostaze holesterola u okolini oštećenog tkiva.
5. Tokom starenja i pod delovanjem dugotrajne dijetalne restrikcije zapažene su promene na nivou sterola u mozgu :
  - starenje dovodi do povećanja sadržaja holesterola u korteksu. Stopa sinteze holesterola je smanjena tokom starenja, dok se katabolizam, određen preko nivoa 24S-OHC ne menja. Količina holestanola je povećana tokom starenja, bez obzira na režim ishrane;
  - starenje ne utiče na količinu holesterola u hipokampusu, kao ni na njegov katabolizam. Stopa sinteze holesterola tokom starenja bila je smanjena. Primenjeni restriktivni režim ishrane dodatno smanjuje stopu sinteze holesterola, ne utičući na njegovu zastupljenost. Tokom starenja dolazi i do povećanja nivoa holestanola, bez obzira na režim ishrane;
  - u svim starosnim grupama dezmosterol je znatno zastupljeniji u hipokampusu nego u korteksu;
  - tokom starenja se zapaža akumulacija ispitivanih biljnih sterola u korteksu i hipokampusu, dok dijetalna restrikcija deluje suprotno starenju, smanjujući njihove količine u odnosu na starosne kontrole.
6. Efekat starenja i dugotrajne dijetalne restrikcije na zastupljenost BDNF-a, ukupnog i fosforilisanog TrkB receptora je izraženiji u korteksu nego u hipokampusu. U korteksu je tokom starenja povećan nivo BDNF-a, a smanjen nivo pTrkB. Dijetalna restrikcija uzrokuje dodatno povećanje nivoa BDNF-a u grupi 12m starih životinja, a smanjenje u najstarijoj grupi životinja u odnosu na starosnu kontrolu, dok je pTrkB u 12m starim životinjama na nivou detektovanom kod 3m starih kontrolnih životinja. Ekspresija ukupnog TrkB receptora nije se menjala u ispitivanim uslovima. Jedina promena koja je detektovana u hipokampusu je povećanje

ekspresije BDNF-a u grupi 12m meseci starih životinja koje su bile podvrgnute restriktivnom režimu ishrane.

Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da starenje i dugotrajna dijetalna restrikcija uzrokuju različite promene u metabolizmu holesterola u korteksu i hipokampusu. Najveće promene uočene su na nivou prekursora holesterola, ukazujući na smanjenu stopu sinteze holesterola, dok eliminacija holesterola iz mozga određena njegovim katabolitom, 24S-OHC, nije bila promenjena pod datim eksperimentalnim uslovima. Rezultati ove studije pokazali su kapacitet dugotrajne dijetalne restrikcije da utiče na metabolizam holesterola u mozgu smanjujući njegovu sintezu, pri čemu količina holesterola ostaje nepromenjena, na taj način ukazujući na još jedan od mehanizama pozitivnog delovanja dijetalne restrikcije. Ovi rezultati su značajni i sa aspekta potencijalnog korišćenja redukovane ishrane kao alternative široko primenjivanim antilipidemicima statinima koji smanjujući količinu holesterola u mozgu narušavaju sinaptičku plastičnost.

## 7. LITERATURA

- Abildayeva K, Jansen PJ, Hirsch-Reinshagen V, Bloks VW, Bakker AH, Ramaekers FC, de Vente J, Groen AK, Wellington CL, Kuipers F, Mulder M. (2006) 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281: 12799–12808
- AbuMweis SS, Vanstone CA, Ebine N, Kassis A, Ausman LM, Jones PJH, Lichtenstein AH (2006) Intake of a single morning dose of standard and novel plant sterol preparations for 4 weeks does not dramatically affect plasma lipid concentrations in humans. *J Nutr* 136:1012-1016
- Acimovic J, Lövgren-Sandblom A, Monostory K, Rozman D, Golicnik M, Lutjohann D, Björkhem I (2009) Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:2081–2086
- Ahmed A and Tollefsbol T (2001) Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc* 49:1105–1109
- Alirezai M, Kemball CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL, Kiosses WB (2010) Shortterm fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* 6:702-710
- Alirezai M, Kemball CC, Lindsay Whitton J (2011) Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease. *Eur J Neurosci* 33:197-204
- Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N (2002) The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B312–20
- Ames BN (2004) Delaying the mitochondrial decay of aging. *Ann NY Acad Sci* 1019:406–411
- Anderson JM, Hubbard BM, Coghill GR, Slidders W (1983) The effect of advanced old age on the neurone content of the cerebral cortex. Observations with an automatic image analyser point counting method. *J Neurol Sci* 58:235–246
- Anderson R and Higgins GA (1997) Absence of central cholinergic deficits in ApoE knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 132:135-144
- Anderson R, Barnes JC, Bliss TV, Cain DP, Cambon K, Davies HA, Errington ML, Fellows LA, Gray RA, Hoh T, Stewart M, Large CH, Higgins GA (1998) Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. *Neuroscience* 85:93-110
- Angelin B, Rudling M (1994) Growth hormone and hepatic lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 5:160-165
- Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP (2003) Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6216–6220
- Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y (2003) Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke* 34:875–880
- Artandi SE (2006) Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med* 355:1195–1197
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated

- receptors and liver X receptor- $\alpha$  in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319–1327
- Babiker A and Diczfalusy U (1998) Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochim Biophys Acta* 1392:333–339
- Ball MJ (1977) Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol (Berl)* 37:111–118
- Banfield MJ, Naylor RL, Robertson AG, Allen SJ, Dawbarn D, Brady RL (2001) Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* 9:1191–1199
- Barker PA (2004) p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42:529–533
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3:205–214
- Bastiaanse E M, Hold K M, Van der Laarse A (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc Res* 33:272–283
- Begley DJ and Brightman MW (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* 61:39–78
- Benes FM and Lange N (2001) Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *Trends Neurosci* 24:11–17
- Berg BN, Simms HS (1960) Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and the onset of disease with different levels of intake. *J Nutr* 71:255–263
- Berrigan D, Perkins SN, Haines DC, Hursting SD (2002) Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* 23:817–822
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME (2005): Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E429–438
- Bi X, Yong AP, Zhou J, Ribak CE, Lynch G (2001) Rapid induction of intraneuronal neurofibrillary tangles in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8832–8837
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919–2937
- Björkhem I (2009) Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *J Lipid Res Suppl*:S213–218
- Bjorkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A (1997) Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 272:30178–30184
- Bjorkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J (1998) Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 39:1594–1600

- Bjorkhem I, Miettinen T, Reihner E, Ewerth S, Angelin B, Einarsson K (1987) Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver. *J Lipid Res* 28:1137–1143
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW (2003) Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23:3807–3819
- Blinkov S, Glezer I (1968) *The human brain in figures and tables: a quantitative handbook*. Plenum: New York
- Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20:70–78
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I (2001) On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett* 314:45-48
- Bordone L, Guarente L (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:298– 305
- Bosel J, Gandor F, Harms C et al (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J. Neurochem* 92:1386–1398
- Bourre JM, Clement M, Gerard D, Legran R, Chaudiere J (1990) Precursors for cholesterol synthesis (7-dehydrocholesterol, 7-dehydrodesmosterol, and desmosterol): cholesterol/7-dehydrocholesterol ratio as an index of development and aging in PNS but not in CNS. *J Neurochem* 54:1196–1199
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 76:1501–1513
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH *et al* (1989) A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 83: 1015–1031
- Brandoli C, Sanna A, De Bernardi MA, Follesa P, Brooker G, Mocchetti I (1998) Brain-derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:7953-7961
- Bretillon L, Lutjohann D, Stahle L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, Diczfalusy U, Björkhem I (2000) Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res* 41:840–845
- Bretillon L, Siden A, Wahlund LO, Lutjohann D, Minthon L, Crisby M, Hillert J, Groth CG, Diczfalusy U, Björkhem I (2000) Plasma levels of 24Shydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett* 293:87–90
- Brody H (1955) Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 102:511–516
- Bronfman FC, Tesseur I, Hofker MH, Havekens LM, Van Leuven F (2000) No evidence for cholinergic problems in apolipoprotein E knockout and apolipoprotein E4 transgenic mice. *Neuroscience* 97:411-418

- Brown D A and London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:111–136
- Brown-Borg HM (2007) Hormonal regulation of longevity in mammals. *Ageing Res Rev* 6:28–45
- Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP (1999) Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann Neurol* 45:8-15
- Buell SJ, Coleman PD (1981) Quantitative evidence for selective dendritic growth in normal human aging but not in senile dementia. *Brain Res* 214:23–41
- Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci* 57:1577-1592
- Buttini M, Orth M, Bellosta S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L, Mahley RW (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe<sup>-/-</sup> mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 19:4867-4880
- Cambon K, Davies HA, Stewart MG (2000) Synaptic loss is accompanied by an increase in synaptic area in the dentate gyrus of aged human apolipoprotein E4 transgenic mice. *Neuroscience* 97:685–692
- Cartagena CM, Ahmed F, Burns MP, Pajoohesh-Ganji A, Pak DT, Faden AI, Rebeck GW (2008) Cortical injury increases cholesterol 24S- hydroxylase (Cyp46) levels in the rat brain. *J Neurotrauma* 25:1087-1098
- Case EM, Haldane JB (1941) Human physiology under high pressure: I. Effects of Nitrogen, Carbon Dioxide, and Cold. *J Hyg (Lond)* 41:225-249
- Champagne D, Dupuy JB, Rochford J, Poirier J (2002) Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114:641-654
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309
- Cheng B, Mattson MP (1994) NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res* 640:56-67
- Child P, Kuksis A (1983) Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro *J Lipid Res* 24:1196–1209
- Child P, Kuksis A (1986) Investigation of the role of micellar phospholipid in the preferential uptake of cholesterol over sitosterol by dispersed rat jejunal villus cells *Biochem Cell Biol* 64:847–853
- Ching YP, Davies SP, Hardie DG (1996) Analysis of the specificity of the AMP-activated protein kinase by site-directed mutagenesis of bacterially expressed 3-hydrox 3-methylglutaryl-CoA reductase, using a single primer variant of the unique-site-elimination method. *Eur J Biochem* 237:800–808
- Cho CG, Kim HJ, Chung SW, Jung KJ, Shim KH, Yu BP, Yodoi J, Chung HY (2003) Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp Gerontol* 38:539–548
- Christensen H (2001) What cognitive changes can be expected with normal ageing? *Aust NZ J Psychiatry* 35:768–775



- Coffey CE, Wilkinson WE, Parashos IA, Soady SA, Sullivan RJ, Patterson LJ, Figiel GS, Webb MC, Spritzer CE, Djang WT (1992) Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain: a cross-sectional study using magnetic resonance imaging *Neurology* 42:527–536
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201–204
- Conover JC, Yancopoulos GD (1997) Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice. *Rev Neurosci* 8:13–27
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families *Science* 261:921–923
- Corpas E, Harman SM, Blackman MR (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14:20–39
- Cotman CW and Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295–301
- Cournil A and Kirkwood TBL (2001) If you would live long, choose your parents well. *Trends Genet* 17:233–235
- Cowan CM, Thai J, Krajewski S, Reed JC, Nicholson DW, Kaufmann SH, Roskams AJ (2001) Caspases 3 and 9 send a pro-apoptotic signal from synapse to cell body in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 21:7099–7109
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ (1998) Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res* 812:200–208
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy* 1:131–140
- Cummings SR (2007) The biology of aging. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7:340–341
- Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL (1985) Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 260:6240–6247
- de Chaves EI, Rusinol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE (1997) Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J Biol Chem* 272:30766–30773
- de Chaves EP and Narayanaswami V (2008) Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol* 3:505–530
- de Jong A, Plat J, Mensink RP (2003) Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J Nutr Biochem* 14:362–369
- De La Fuente M (2002) Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 56:S5–S8
- De Vries AC, Vermeer MA, Bredman JJ, Bär PR, Cohen LH (1993) Cholesterol content of the rat lens is lowered by administration of simvastatin, but not by pravastatin. *Exp Eye Res* 56:393–399

- Deaths: Final Data for 2005. (2008) National Vital Statistics Reports 56, Number 10. [http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr56/nvsr56\\_10.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr56/nvsr56_10.pdf) (accessibility verified 10.02.2011).
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5:1131-1136
- Dekaban AS (1978) Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol* 4:345-356.
- den Heijer T, Sijens PE, Prins ND, Hofman A, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Breteler MM (2006) MR spectroscopy of brain white matter in the prediction of dementia. *Neurology* 66:540-544
- Derdemezis CS, Filippatos TD, Mikhailidis DP, Elisaf MS (2010) Review article: effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 15:120-134
- Dietschy JM, Turley SD (2004) Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45:1375-1397
- Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105-112
- Dietschy JM, Kita T, Suckling KE, Goldstein JL, Brown MS (1983) Cholesterol synthesis in vivo and in vitro in the WHHL rabbit, an animal with defective low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res* 24:469-480
- Dorsey SG, Renn CL, Carim-Todd L, Barrick CA, Bambrick L, Krueger BK, Ward CW, Tessarollo L (2006) In vivo restoration of physiological levels of truncated TrkB.T1 receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model. *Neuron* 51:21-28
- Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Li XJ, Mattson MP (2003) Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2911-2916
- Duan W, Guo Z, Mattson MP (2001) Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem* 76:619-626
- Eckles KE, Dudek EM, Bickford PC, Browning MD (1997) Amelioration of age-related deficits in the stimulation of synapsin phosphorylation. *Neurobiol Aging* 18:213-217
- Eckles-Smith K, Clayton D, Bickford P, Browning MD (2000) Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain Res Mol Brain Res* 78:154-162
- Edwards PA, Ericsson J (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 68:157-185
- Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA (2002) LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol* 38:249-256
- Elias MF, Robbins MA, Budge MM, Elias PK, Brennan SL, Johnston C, Nagy Z, Bates CJ (2006) Homocysteine, folate, and vitamins B6 and B12 blood levels in relation to cognitive performance: the Maine- Syracuse study. *Psychosom Med* 68:547-554
- Era P, Jokela J, Heikkinen E (1986) Reaction and movement times in men of different ages: a population study. *Percept Motor Skills* 63:111-130

- Esiri M. Dementia and normal aging: neuropathology. In *Dementia and Normal Aging*, Huppert F, Brayne C, O'Connor D (eds). Cambridge University Press: Cambridge, 1994; 385–436.
- Esiri MM (2007) The interplay between inflammation and neurodegeneration in CNS disease. *J Neuroimmunol* 184:4-16
- Espenshade PJ and Hughes AL (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41:401-427
- Eyre H, Khan R, Robertson RM (2004) Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the ACS, the ADA and the AHA. *CA Cancer J Clin* 54:190–207
- Fabris N (1991) Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to ageing. *Arch Gerontol Geriatr* 12:219–230
- Fagan AM, Murphy BA, Patel SN, Kilbridge JF, Mobley WC, Bu G, Holtzman DM (1998) Evidence for normal aging of the septo-hippocampal cholinergic system in apoE (-/-) mice but impaired clearance of axonal degeneration products following injury *Exp Neurol* 151:314–325
- Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M (2001) Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J. Neurochem* 76:391–400
- Feramisco JD, Goldstein JL, Brown MS (2004) Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem* 279:8487–8496
- Field PA and Gibbons GF (2000) Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *J Lipid Res* 41:492-498
- Fon Tacer K, Pompon D, Rozman D (2010) Adaptation of cholesterol synthesis to fasting and TNFalpha: profiling cholesterol intermediates in the liver, brain, and testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:619-625
- Fonseca AC, Resende R, Oliveira CR, Pereira CM (2010) Cholesterol and statins in alzheimer's disease: current controversies. *Exp Neurol* 223:282–293
- Fontana L, Klein S (2007) Aging, adiposity and calorie restriction. *JAMA* 297:986–994
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy lifespan— from yeast to humans. *Science* 328:321–326
- Franceschi C (1989) Cell proliferation and cell death in the aging process. *Aging Clin Exp Res* 1:3–13
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000a). Inflamm-aging—An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–254
- Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G (2000b) The network and remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35:879–896
- Friedman M, Byers SO, Elek SR (1970) Pituitary growth hormone essential for regulation of serum cholesterol. *Nature* 225:464-467
- Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF (1996) Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 374:21-40

- Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengård JH, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF (2000) Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet* 67:881-900
- Gaussin V, Skarlas P, Ching YP, Hardie G, Hue L (1997) Distinct type-2A protein phosphatases activate HMG-CoA reductase and acetyl- CoA carboxylase in liver. *FEBS Lett* 413:445-448
- Gazzaley AH, Thakker MM, Hof PR, Morrison JH (1997) Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol Aging* 18:549-553
- Gee JR and Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1145-1150
- Geelen MJ, Gibson DM, Rodwell VW (1986) Hydroxymethylglutaryl- CoA reductase the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 201:183-186
- Gilman CP and Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromol Med* 2:197-214
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430
- Gomez-Pinilla F (2008) The influences of diet and exercise on mental health through hormesis. *Ageing Res Rev* 7:49-62
- Goritz C, Mauch DH, Pfrieger FW (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol- induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29:190-201
- Gosche KM, Mortimer JA, Smith CD, Markesbery WR, Snowdon DA (2002) Hippocampal volume as an index of Alzheimer neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurology* 58:1476-1482
- Gould RG, Jones RJ, LeRoy GV, Wissler RW, Taylor CB (1969) Absorbability of beta-sitosterol in humans. *Metabolism* 18: 652-662
- Gray DA, Tsigiotis M, Woulfe J (2003) Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Sci Aging Knowl Environ* 2003:RE6
- Gredilla R and Barja G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology*, 146:3713-3717
- Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JP, Gomez-Isla T, Hyman BT (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 38:254-259
- Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Wagner DD (2007) ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1256-1262
- Halford NG (2009) New insights on the effects of heat stress on crops. *J Exp Bot* 60:4215-4216
- Hall T, Miller K, Corsellis JA (1975) Variations in the human Purkinje cell population according to age and sex. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1:267-292
- Halling KK, Slotte JP (2004) Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim Biophys Acta* 1664:161-171

- Han SH, Einstein G, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Saunders AM, Pericak-Vance M, Roses AD, Schmechel DE (1994) Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:535–544
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885–889
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460
- Harman D (1957) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2:298–300
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145–147
- Harman D (2003) The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5:557–561
- Harris FM, Tesseur I, Brecht WJ, Xu Q, Mullendorff K, Chang S, Wyss-Coray T, Mahley RW, Huang Y (2004) Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:3862–3868
- Hashimoto T and Watanabe S (2005) Chronic food restriction enhances memory in mice--analysis with matched drive levels. *Neuroreport* 16:1129-1133
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF (1996) Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol* 140:43-52
- Haug H (1985) Are neurons of the human cerebral cortex really lost during ageing? A morphometric examination. In *Senile Dementia of the Alzheimer Type*, Trabert J, Gispen W (eds). Springer: Berlin; 150–163
- Hauger RL, Thiruvikraman KV, Plotsky PM (1994) Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats. *Endocrinology* 134:1528-1536
- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Aoyama Y, Ogata A, Harada K, Fujioka M, Abe K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2007) High-cholesterol feeding aggravates cerebral infarction via decreasing the CB1 receptor. *Neurosci Lett* 414:183-187
- Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE (2004) Glial cell lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures *J Biol Chem* 279:14009–14015
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614–636
- Hayflick L (2000) The future of ageing. *Nature* 408:267–269
- He X, Jenner AM, Ong WY, Farooqui AA, Patel SC (2006) Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainate injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:652-663
- Heilbronn LK and Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78:361–369

- Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E, Pennington CALERIE Team (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *Jama* 295:1539–1548
- Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K (1993) Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 23:827-831
- Henderson G, Tomlinson BE, Gibson PH (1980) Cell counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using an image analysing computer. *J Neurol Sci* 46:113–136
- Hendriks HF, Weststrate JA, van Vliet T, Meijer GW (1999) Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 53:319-327
- Herz J (2009) Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 20:190–196
- Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A (1993) Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell. Biol* 13:2909–2918
- Ho KC, Roessmann U, Straumfjord JV, Monroe G (1980) Analysis of brain weight. I. Adult brain weight in relation to sex, race, and age. *Arch Pathol Lab Med* 104:635–639
- Hof PR and Morrison JH (2004) The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci* 27:607–613
- Hofman A, Ott A, Breteler MMB, Bots ML, Slieterer AJC, van Harskamp F, van Duijn CN, van Broeckhoven C, Grobbee DE (1997) Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet* 349:151–154
- Holliday R (2006) Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann NY Acad Sci* 1067:1–9
- Holtzman DM, Fagan AM (1998) Potential role of apoE in structural plasticity in the nervous system; implications for disorders of the central nervous system. *Trends Cardiovasc Med* 8:250–255
- Howard C, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy*. Bios Scientific: London, 1998.
- Hoyer S and Riederer P (2007) Alzheimer disease – no target for statin treatment. A mini review. *Neurochem Res* 32:695–706
- Huang EJ and Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736
- Huang EJ and Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642
- Huberman AD and McAllister AK (2002) Neurotrophins and visual cortical plasticity. *Prog Brain Res* 138:39-51
- Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC (2003) Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu Rev Med* 54:131–152

- Idrobo F, Nandy K, Mostofsky DI, Blatt L, Nandy L (1987) Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Arch Gerontol Geriatr* 6:255–262
- Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW et al (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1125–1129
- Ikonen E (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13:470–477
- Ikonen E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125–138
- Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA, Roth GS (2004) Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Ann NY Acad Sci* 1019:412–423
- Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, Renquist DM, Knapka JJ, April M, Belcher CT, Clark MA, Hatcherson CD, Marriott BM, Roth GS (1990) Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. *J Gerontol* 45:148–163
- Ingram DK, Weindruch R, Spangler EL, Freeman JR, Walford RL (1987) Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J Gerontol* 42:78–81
- Istvan ES and Deisenhofer J (2000) The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta* 1529:9-18
- Jacobs B, Driscoll L, Schall M (1997) Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol* 386:661–680
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731
- Jansen PJ, Lutjohann D, Abildayeva K, Vanmierlo T, Plosch T, Plat J, von Bergmann K, Groen AK, Ramaekers FC, Kuipers F, Mulder M (2006) Dietary plant sterols accumulate in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1761:445-453
- Jernigan TL, Press GA, Hesselink JR (1990) Methods for measuring brain morphologic features on magnetic resonance images. Validation and normal aging. *Arch Neurol* 47:27–32
- Jiang XC, Qin S, Qiao C, Kawano K, Lin M, Skold A, Xiao X, Tall AR (2001) Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med* 7:847-852
- Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, Schubert-Zsilavecz M, Karas M, Müller WE, Wood WG (2005) Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 312:786-793
- Kálmán J, Kudchodkar BJ, Krishnamoorthy R, Dory L, Lacko AG, Agarwal N (2001) High cholesterol diet down regulates the activity of activator protein-1 but not nuclear factor-kappa B in rabbit brain. *Life Sci* 68:1495–1503
- Kanungo MS (1975) A model for aging. *J Theor Biol* 53:253–261
- Kaplan DR and Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381–391

- Katoh-Semba R, Semba R, Takeuchi IK, Kato K (1998) Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Res* 31:227-234
- Keller JN, Lauderback CM, Butterfield DA, Kindy MS, Yu J, Markesbery WR (2000) Amyloid  $\beta$ -peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurochem* 74:1579-1586
- Kelley RI and Hennekam RC (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 37:321-335
- Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN (1994) Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 266:540-547
- Kemnitz JW, Weindruch R, Roecker EB, Crawford K, Kaufman PL, Ershler WB (1993) Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: design, methodology, and preliminary findings from the first year of study. *J Gerontol* 48:17-26
- Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120: 449-460
- Keuker JI, Luiten PG, Fuchs E (2003) Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 24:157-165
- Kim MJ, Aiken JM, Havighurst T, Hollander J, Ripple MO, Weindruch R (1997) Adult-onset energy restriction of rhesus monkeys attenuates oxidative stress-induced cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 127:2293-2301
- Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE (2003) Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 65:843-56
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, K areholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A (2005) Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 62:1556-1560
- Klebanov S, Diais S, Stavinoha WB, Suh Y, Nelson JF (1995) Hyperadrenocorticism, attenuated inflammation, and the life prolonging action of food restriction in mice. *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci* 50:78-82
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66:395-403
- Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* 109:347-358
- Kojro E, Fuger P, Prinzen C, Kanarek AM, Rat D, Endres K, Fahrenholz F, Postina R (2010) Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis* 20:1215-1231
- Korte M, Griesbeck O, Gravel C, Carroll P, Staiger V, Thoenen H, Bonhoeffer T (1996) Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12547-12552
- Koschack J, L utjohann D, Schmidt-Samoa C, Irlle E (2009) Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals. *Neurobiol Aging* 30:898-902



- Kotti TJ, Ramirez DM, Pfeiffer BE, Huber KM, Russell DW (2006) Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3869–3874
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 15:621-627
- Kurzchalia T V and Parton R G (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11:424–431
- Kyle D. The role of docosahexaenoic acid in the evolution and function of the human brain. In *Brain Lipids and Disorders in Biological Psychiatry*, Skinner E (ed.). Elsevier Science: Amsterdam, 2002; 1–22
- Kyng KJ and Bohr VA (2005) Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Aging Res Rev* 4:579–602
- Ladu MJ, Reardon C, Van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, Getz GS (2000) Lipoproteins in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 903:167–175
- Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont EM, Cutler RG, Roth GS (1996) Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4159–4164
- Lane MA, Ingram DK, Roth GS (1999) Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicol Sci* 52:41–48
- Lauderback CM, Hackett JM, Keller JN et al (2001) Vulnerability of synaptosomes from apoE knock-out mice to structural and oxidative modifications induced by A $\beta$ 1–40: implications for Alzheimer’s disease. *Biochemistry* 40:2548–2554
- Law M (2000) Plant sterol and stanol margarines and health. *Br Med J* 320:861–864
- Lazar MA and Willson TM (2007) Sweet dreams for LXR. *Cell Metab* 5:159–161
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701–713
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000) Gene-expression profile of the aging brain in mice. *Nat Genet* 25:294–297
- Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM (1977) Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 28:325-338
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997 272:3137-3140
- Lehtonen A and Luutonen S (1986) High-density lipoprotein cholesterol levels of very old people in the diagnosis of dementia. *Age Ageing*. 15:267-270
- Leon DA (2011) Trends in European life expectancy: a salutary view. *International Journal of Epidemiology* 40:271–277

- Leoni S, Spagnolo S, Conti Devirgiliis L, Dini L, Mangiantini MT, Trentalance A (1985) Hormonal control of cholesterol synthesis and related enzymes in isolated rat hepatocytes during pre- and postnatal development. *J Cell Physiol* 125:507–511
- Leoni V, Masterman T, Diczfalusy U, De Luca G, Hillert J, Björkhem I (2002) Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 331:163–166
- Leonsson M, Oscarsson J, Bosaeus I, Lundgren BK, Johannsson G, Wiklund O, Bengtsson BA (1999) Growth hormone (GH) therapy in GH-deficient adults influences the response to a dietary load of cholesterol and saturated fat in terms of cholesterol synthesis, but not serum low density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1296–1303
- Lesser G, Kandiah K, Libow LS, Likourezos A, Breuer B, Marin D, Mohs R, Haroutunian V, Neufeld R (2001) Elevated serum total and LDL cholesterol in very old patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12:138–145
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154–1162
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10235–10239
- Lewin GR and Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289–317
- Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P, Chan L (1985) Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of ApoE mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues. *Biochemistry* 24:3751–3756
- Liu JP, Tang Y, Zhou S, Toh BH, McLean C, Li H (2010) Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Neurosci* 43:33–42
- Lominska C, Levin JA, Wang J, Sikes J, Kao C, Smith JD (2001) Apolipoprotein E deficiency effects on learning in mice are dependent upon the background strain. *Behav Brain Res* 120:23–34
- Lomnitski L, Oron L, Sklan D, Michaelson DM (1999) Distinct alterations in phospholipid metabolism in brains of apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurosci Res* 58(4):586–592
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429:883–891
- Lütjohann D, Stroick M, Bertsch T, Kühl S, Lindenthal B, Thelen K, Andersson U, Björkhem I, von Bergmann K, Fassbender K (2004) High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. *Steroids* 69:6431–6438
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999) cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a regulator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7238–7243
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Björkhem I (1996) Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9799–9804

- Lutjohann D, Brzezinka A, Barth E et al (2002) Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. *J Lipid Res* 43:1078–1085
- Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R (2000) Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41:195–198
- Maor I, Kaplan M, Hayek T, Vaya J, Hoffman A, Aviram M (2000) Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun* 269:775–780
- Martin B, Mattson MP, Maudsley S (2006) Caloric restriction and intermittent fasting; two potential diets for successful brain aging. *Ageing Research Reviews* 5:332–353
- Martinez M, Brice A, Vaughan JR, Zimprich A, Breteler MM, Meco G, Filla A, Farrer MJ, Betard C, Singleton A, Hardy J, De Michele G, Bonifati V, Oostra BA, Gasser T, Wood NW, Durr A (2005) Apolipoprotein E4 is probably responsible for the chromosome 19 linkage peak for Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B:72–74
- Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*,6:352-361
- Martini C, Pallottini V, De Marinis E, Marin M, Cavallini G, Donati A, Straniero S, Trentalance A (2008) Omega-3 as well as caloric restriction prevent the age-related modifications of cholesterol metabolism. *Mech Ageing Dev* 129:722–727
- Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apo E-deficient mice *Exp Neurol* 136:107–122
- Masoro EJ (2000) Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35:299–305
- Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126: 913–922
- Masoro EJ (2007) The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Interdiscip. Top Gerontol* 35:1–17
- Masoro EJ (2009) Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1790:1040–1048
- Masoro EJ, McCarter RJ, Katz MS, McMahan CA (1992) Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J Gerontol.* 47:B202-8
- Masterman T and Hillert J (2004) The telltale scan: APOE epsilon4 in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:331
- Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, Mouton PR, Quigley C, Mattson MP, Ingram DK (2004) Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18171-18176
- Matthews RT and Beal MF (1996) Increased 3-nitrotyrosine in brains of ApoE-deficient mice. *Brain Res* 718:181–184
- Matthies H Jr, Schulz S, Holtt V, Krug M (1997) Inhibition by compactin demonstrates a requirement of isoprenoid metabolism for long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 79:341–346

- Mattson MP and Furukawa K (1996) Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Restor Neurol Neurosci* 9:191-205
- Mattson MP, Duan W, Guo Z (2003) Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem* 84:417-431
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev* 3:445-464
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357
- McCay CM, Crowel MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10:63-79
- McGuinness B and Passmore P (2010) Can statins prevent or help treat alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis* 20:925-933
- Means LW, Higgins JL, Fernandez TJ (1993) Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiol Behav* 54:503-508
- Meier-Ruge W, Iwangoff P, Reichlmeier K, Sandoz P (1980) Neurochemical findings in the aging brain. *Adv Biochem Psychopharmacol* 23:323-338
- Mensink RP, Ebbing S, Lindhout M, Plat J, van Heugten MM (2002) Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis* 160:205-213
- Merrill DA, Roberts JA, Tuszyński MH (2000) Conservation of neuron number and size in entorhinal cortex layers II, III, and V/VI of aged primates. *J Comp Neurol* 422:396-401
- Merry BJ (2002) Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:1340-1354
- Manzanero S, Gelderblom M, Magnus T, Arumugam TV (2011) Calorie restriction and stroke. *Exp Transl Stroke Med* 12;3:8.
- Miller AK and Corsellis JA (1977) Evidence for a secular increase in human brain weight during the past century. *Ann Hum Biol* 4:253-257
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15:575-591
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V et al (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219-223
- Mitter D, Reisinger C, Hinz B, Hollmann S, Yelamanchili SV, Treiber-Held S et al. (2003) The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J Neurochem* 84:35-42
- Miyata M and Smith JD (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14:55-61

- Mladenovic Djordjevic A, Perovic M, Tesic V, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S (2010) Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem Int* 56:250-255
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G (1992) Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 269:375–382
- Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J* 15:2623–2630
- Muiras ML, Muller M, Schachter F, Burkle A (1998) Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J Mol Med* 76:346-354
- Mulas MF, Demuro G, Mulas C, Putzolu M, Cavallini G, Donati A, Bergamini E, Dessi S (2005) Dietary restriction counteracts age-related changes in cholesterol metabolism in the rat. *Mech Ageing Dev* 126:648-654
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 43:477–503
- Mutka AL, Lusa S, Linder MD, Jokitalo E, Kopra O, Jauhiainen M et al (2004) Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J Biol Chem* 279: 48654–48662
- Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA (2009) Converging pathways in lifespan regulation. *Curr Biol* 19:R657–666
- Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS) (2001) Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* 357:169–175
- Newton IG, Forbes ME, Legault C, Johnson JE, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR (2005) Caloric restriction does not reverse aging-related changes in hippocampal BDNF. *Neurobiol Aging* 26:683–688
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcriptase PCR. *Yakugaku Zasshi* 125:369–375
- Nistiar F, Racz O, Lukacinova A, Hubkova B, Novakova J, Lovasova E, Sedlakova E (2012) Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47:1224-1233
- Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, Ekström L, Brafman A, Shafir M, Andersson U, Olin M, Eggertsen G, Diczfalusy U, Feinstein E, Bjorkhem I (2006) Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 281:3810-3820
- Oitzl MS, Mulder M, Lucassen PJ, Havekes LM, Grootendorst J, de Kloet ER (1997) Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res* 752:189-196
- Olié E, Picot MC, Guillaume S, Abbar M, Courtet P (2011) Measurement of total serum cholesterol in the evaluation of suicidal risk. *J Affect Disord* 133:234-238

- Oosterveer MH, van Dijk TH, Grefhorst A, Bloks VW, Havinga R, Kuipers F et al (2008) Lxralpha deficiency hampers the hepatic adaptive response to fasting in mice. *J Biol Chem* 283:25437–25445
- Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL (1917) The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats. *Science* 45:294–295
- Ostlund Jr RE, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, Spilburg CA (2002) Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy  $\Delta$  5- phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E911-916
- Pallottini V, Marino M, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A (2003) Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. *Biogerontology* 4:371-378
- Pallottini V, Montanari L, Cavallini G, Bergamini E, Gori Z, Trentalance A (2004) Mechanisms underlying the impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in aged rat liver. *Mech Ageing Dev* 125:633-639
- Panza F, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Del Parigi A, Seripa D, Pilotto A, Capurso A, Solfrizzi V (2006) Diet, cholesterol metabolism, and Alzheimer's disease: Apolipoprotein E as a possible link? *J Am Geriatr Soc* 54:1963-1965
- Paratcha G. and Ibanez C F (2002) Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol* 12:542–549
- Parini P, Angelin B, Rudling M (1999) Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:832-839
- Park DC and Reuter-Lorenz P (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol* 60:173–196
- Park SK and Prolla TA (2005) Lessons learned from gene expression profile of aging and caloric restriction. *Aging Res Rev* 4:55–65
- Patel NV and Finch CE (2002) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiol Aging* 23:707-717
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145
- Pawelek G, Effros C, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R (1999) T cells and aging. *Front Biosci* 4:216–269
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704
- Peng X, Greene LA, Kaplan DR, Stephens RM (1995) Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritegenesis. *Neuron* 15:395-406
- Perls T, Kunkel LM, Puca AA (2002) The genetics of exceptional human longevity. *J Mol Neurosci* 19:233-238

- Perovic M, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S (2009) Expression of cholesterol homeostasis genes in the brain of the male rat is affected by age and dietary restriction. *Biogerontology* 10:735-745
- Peters A, Leahu D, Moss MB, McNally KJ (1994) The effects of aging on area 46 of the frontal cortex of the rhesus monkey. *Cereb Cortex* 4:621-635
- Peterson DW (1958) Plant sterols and tissue cholesterol levels. *Am J Clin Nutr* 6:644-649
- Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, Rawles JM, Zipursky RB, Lim KO (1994) A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol* 51:874-887
- Pfenninger KH (2009) Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci* 10:251-261
- Pfriege FW (2003) Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1610:271-280
- Pfriege FW (2003a) Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25:72-78
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:939-966
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161
- Pitas RE, Ji Z-S, Weisgraber KH, Mahley RW (1998) Role of apolipoprotein E in modulating neurite outgrowth: potential effect of intracellular apolipoprotein E. *Biochem Soc Trans* 26:257-262
- Pitsikas N and Algeri S (1992) Deterioration of spatial and non-spatial reference and working memory in aged rats: protective effects of life-long caloric restriction. *Neurobiol Aging* 13:369-373
- Pitsikas N, Garofalo P, Zanotti A, Algeri S (1992) Effect of lifelong hypocaloric diet on discrete memory of the senescent rat. *Aging* 3:147-152
- Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP (2000) Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 54:671-677
- Poirier J (2008) Apolipoprotein E represents a potent gene-based therapeutic target for the treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Demen* 4:S91-S97
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodeling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55:81-90
- Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res* 11:97-106
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32

- Porta M, Jarrod M, López T, Pumarega J, Puigdomènech E, Marco E, Malats N, Grimalt JO, Real FX; PANKRAS II Study Group (2009) Correcting serum concentrations of organochlorine compounds by lipids: alternatives to the organochlorine/total lipids ratio. *Environ Int* 35:1080-1085
- Prinz WA (2007) Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog Lipid Res* 46:297-314
- Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R (1999) Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 20:157-165
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6:345-351
- Quintas A, de Solís AJ, Díez-Guerra FJ, Carrascosa JM, Bogónez E (2012) Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. *Exp Gerontol.* 47:198-201
- Ramassamy C, Krzykowski P, Averill D, Lussier-Cacan S, Theroux L, Christen Y, Davignon J, Poirier J (2001) Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 86:76-83
- Ramirez DM, Andersson S, Russell DW (2008) Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol* 507:1676-1693
- Ratnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, Trick K (2000) Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 130:1166-1178
- Ravid T, Doolman R, Avner R, Harats D, Roitelman J (2000) The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 275:35840-35847
- Raymond RM, Rosenfeld GA, Emerson TE Jr (1982) Direct effects of insulin and endotoxin on glucose uptake by skeletal muscle during high cardiac index sepsis in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 155:881-887
- Raz N. The ageing brain: structural changes and their implications for cognitive ageing. In *New Frontiers in Cognitive Ageing*, Dixon R, Backman L, Nilsson L (eds). Oxford University Press: Oxford, 2004; 115-134
- Rebeck GW, Kindy M, LaDu MJ (2002) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of ApoE2 and E3. *J Alzheimers Dis* 4:145-154
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564
- Ren JM and Finklestein SP (1997) Time window of infarct reduction by intravenous basic fibroblast growth factor in focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 327:11-16
- Repa JJ and Mangelsdorf DJ (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:459-481
- Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C (2003) Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci* 23:3295-3301
- Rhyu MS (1995) Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 87:884-894



- Roth GS, Handy AM, Mattison JA, Tilmont EM, Ingram DK, Lane MA (2002) Effects of dietary caloric restriction and aging on thyroid hormones of rhesus monkeys. *Horm Metab Res* 34:378–382
- Roth GS, Mattison JA, Ottinger MA, Chachich ME, Lane MA, Ingram DK (2004) Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science* 305:1423–1426
- Ruffman T, Henry JD, Livingstone V, Phillips LH (2008) A meta-analytic review of emotion recognition and aging: implications for neuropsychological models of aging. *Neurosci Biobehav Rev* 32:863–881
- Runquist M, Parmryd I, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G (1995) Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain. *J Neurochem* 65:2299–2306
- Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T (2009) Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* 78:1017-1040
- Sacher G.A, Life table modifications and life prolongation, in: C.E. Finch, L. Hayflick (Eds.), *Handbook of the Biology of Aging*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1977, pp. 582–638
- Saheki A, Terasaki T, Tamai I, Tsuji A (1994) In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm Res* 11:305-311
- Sakamoto H, Ukena K and Tsutsui K (2001) Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 21:6221–6232
- Salen G, Ahrens Jr EH, Grundy SM (1970) Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest* 49:952-967
- Salthouse TA (1982) *Adult Cognition*. Springer-Verlag, New York.
- Salthouse TA (1996) *Mechanisms of Age-cognition Relations in Adulthood*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ.
- Sanz A, Caro P, Ibañez J, Gómez J, Gredilla R, Barja G (2005) Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr* 37:83-90
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983) The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol* 18:55-64
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301
- Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 60:989–994
- Schaie KW (1996) *Intellectual Development in Adulthood*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schmidt HD and Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18:391-418
- Serhan CN (2005) Novel  $\omega$ -3-derived local mediators in antiinflammation and resolution. *Pharmacol Ther* 105:7–21

- Serrano F and Klann E (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Aging Res Rev* 3:431–443
- Serrano-Pozo A, Vega GL, Lütjohann D, Locascio JJ, Tennis MK, Deng A, Atri A, Hyman BT, Irizarry MC, Growdon JH (2010) Effects of simvastatin on cholesterol metabolism and Alzheimer disease biomarkers. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24:220–226
- Seyama Y (2003) Cholesterol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications. *J Med Food* 6:217-224
- Shafaati M, Olin M, Båvner A, Pettersson H, Rozell B, Meaney S, Parini P, Björkhem I (2011) Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *J Intern Med* 270:377-387
- Shanmugasundaram KR, Visvanathan A, Dhandapani K, Srinivasan N, Rasappan P, Gilbert R, Alladi S, Kancharla S, Vasanthi N (1986) Effect of high-fat diet on cholesterol distribution in plasma lipoproteins, cholesterol esterifying activity in leucocytes, and erythrocyte membrane components studied: importance of body weight. *Am J Clin Nutr* 44:805–815
- Sharma S and Kaur G (2005) Neuroprotective potential of dietary restriction against kainate-induced excitotoxicity in adult male Wistar rats. *Brain Res Bull* 67:482-491
- Sheng DT, Laskowitz GB, Mackensen M, Kudo RD, Pearlstein DS, Warner (1999) Apolipoprotein E deficiency worsens outcome from global cerebral ischemia in the mouse. *Stroke* 30:1118–1124
- Shenkin SD, Bastin ME, MacGillivray TJ, Deary IJ, Starr JM, Wardlaw JM (2003) Childhood and current cognitive function in healthy 80 year-olds: a DT-MRI study. *NeuroReport* 14:345–349
- Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch Neurol* 68:1239–1244
- Shi L, Adams MM, Linville MC, Newton IG, Forbes ME, Long AB, Riddle DR, Brunso-Bechtold JK (2007) Caloric restriction eliminates the aging-related decline in NMDA and AMPA receptor subunits in the rat hippocampus and induces homeostasis. *Exp Neurol*. 2007 206:70-9
- Shooter EM (2001) Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci* 24:601-29
- Siegel GJ, Chauhan NB, Feinstein DL, Li G, Larson EB, Breitner JC, Montine TJ (2008) Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of alzheimer disease. *Neurology* 71:383
- Sierra S, Ramos MC, Molina P, Esteo C, Vazquez JA, Burgos JS (2011) Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J. Alzheimers Dis* 23: 307–318
- Silhol M, Arancibia S, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2007) Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 146:962-973
- Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132:613-624
- Simons K and Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39

- Simons K. and Ehehalt R (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110:597–603
- Smith DE, Rapp PR, McKay HM, Roberts JA, Tuszyński MH (2004) Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. *J Neurosci* 24:4373–4381
- Soccio RE and Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1150–1160
- Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (1990) Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem* 54:415–423
- Sodero AO, Trovò L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG, Martin MG (2011) Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *J Neurochem* 116:747–755
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217–1281
- Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H (1994) Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* 76:215–224
- Spady DK and Dietschy JM (1983) Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J Lipid Res* 24:303–315
- Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ, Lopez JE, Sabbagh MN (2002) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advised to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging* 6:324–331
- Spector A A and Yorek M A (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26:1015–1035
- Staff RT, Murray AD, Deary IJ, Whalley LJ (2004) What provides cerebral reserve? *Brain* 127:1191–1199
- Stewart J, Mitchell J, Kalant N (1989) The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging* 10:669–675
- Storch J, Xu Z (2009) Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1791:671–678
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid  $\beta$  peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8098–8102
- Sudhop T, Sahin B, Lindenthal B, Hahn C, Lüers C, Berthold HK, von Bergmann K (2002) Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut* 51:860–863
- Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashihara M, Hara T, Koshimizu H, Kojima M (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci* 27:6417–6427

- Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L (1994) Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J Neurochem* 63:1802–1811
- Swanson LW, Simmons DM, Hofmann SL, Goldstein JL, Brown MS (1988) Localization of mRNA for low density lipoprotein receptor and a cholesterol synthetic enzyme in rabbit nervous system by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:9821–9825
- Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008) New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 59:201– 220
- Terao A, Apte-Deshpande A, Dousman L, Morairty S, Eynon BP, Kilduff TS, Freund YR (2002) Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J Neuroimmunol* 132:99-112
- Terry RD, DeTeresa R, Hansen LA (1987) Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol* 21:530–539
- Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lütjohann D (2006) Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett* 403:15–19
- Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, von Eckardstein A, Björkhem I, Lütjohann D (2006) Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1146–1152
- Tilley L, Morgan K, Grainger J, Marsters P, Morgan L, Lowe J, Xuereb J, Wischik C, Harrington C, Kalsheker N (1999) Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet* 7:659-663
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
- Tooyama T, Kawamata H, Akiyama SK, Moestrup J, Gliemann PL, McGee (1993) Immunohistochemical study of alpha 2 macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Mol Chem Neuropathol* 18:153–160
- Trojanowski JQ and Mattson MP (2003) Overview of protein aggregation in single, double, and triple neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med* 4:1–6
- Trollor JN and Valenzuela MJ (2001) Brain ageing in the new millennium. *Aust NZ J Psychiatr* 35:788–805
- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* 290:149-159
- Vainio S, Jansen M, Koivusalo M, Róg T, Karttunen M, Vattulainen I, Ikonen E (2006) Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *J Biol Chem* 281:348-355
- Valenza M and Cattaneo E (2006) Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list? *Prog Neurobiol* 80:165-176
- Vance E, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE (1994) Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons *J Neurochem* 62:329–337
- von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D (2005) Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* 96:10D-14D

- Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BM, Doraiswamy PM (2003) Statin-associated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. *Pharmacotherapy* 23:871-880
- Wang DQ (2002) Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice. *J Lipid Res* 43:1950-1959
- Wang N, Yvan-Charvet L, Lutjohann D, Mulder M, Vanmierlo T, Kim TW *et al* (2008) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J* 22:1073-1082
- Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burris TP (2008) Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem* 283:26332-26339
- Waterham HR (2006) Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 580:5442-5449
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS (1990) Cell-mediated immunity as predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 45:M45-48
- Wechsler A, Brafman A, Shafir M, Heverin M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S, Spivak I, Moshkin O, Fridman E, Becker Y, Skaliter R, Einat P, Faerman A, Björkhem I, Feinstein E (2003) Generation of viable cholesterol-free mice. *Science* 302:2087
- Weindruch R and Walford RL (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215:1415-1418
- Weindruch R and Walford RL (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL
- Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA (2002) Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mech Aging Dev* 123:177-193
- Weinert BT and Timiras PS (2003) Theories of aging. *J Appl Physiol* 95:1706-1716
- Weingärtner O, Lütjohann D, Böhm M, Laufs U (2010) Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 210:362-365
- Weisgraber KH, Pitas RE, Mahley RW (1994) Lipoproteins, neurobiology and Alzheimer's disease: structure and function of apolipoprotein E. *Curr Opin Struct Biol* 4:507-515
- Weraarchakul N, Strong R, Wood WG, Richardson A (1989) Effect of aging and dietary restriction on DNA repair. *Exp Cell Res* 181:197-204
- West MJ (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14:275-285
- West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 22:51-61
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769-772
- Weststrate JA and Meijer GW (1998) Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 52:334-343

- White F, Nicoll JA, Horsburgh K (2001) Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion. *Exp Neurol* 169:307–318
- Whitney KD, Watson MA, Collins JL, Benson WG, Stone TM, Numerick MJ, Tippin TK, Wilson JG, Winegar DA, Kliewer SA (2002) Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol Endocrinol* 16:1378-1385
- Wilhelmsen L (1996) ESC Population Studies Lecture 1996. Cardiovascular monitoring of a city over 30 years. *Eur Heart J* 18:1220-1230
- Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans M, Heyman RA, Mangelsdorf DJ (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9:1033–1045
- Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Floel A (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:1255–1260
- Wolf BB, Lopes MB, VandenBerg SR, Gonias SL (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am J Pathol*, 141:37–42
- Xie C, Lund EG, Turley SD, Russell DW, Dietschy JM (2003) Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J Lipid Res* 44:1780-1789
- Xiong J, Verkhratsky A, Toescu EC (2002) Changes in mitochondrial status associated with altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices. *J Neurosci* 22:10761–10771
- Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL et al (1999) Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* 154:601–611
- Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Ervin J, Rothrock-Christian TR, Hulette C, Schmechel DE (1999) Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* 154:601–611
- Yamada S, Ito T, Tamura T, Shiomi M (2004) Age-related changes in serum/plasma biochemical parameters of WHHLMI rabbits. *Exp Anim* 53:159-163
- Yamauchi K, Tozuz M, Hidaka H, Hidaka E, Y. Kondo, Katsuyama T (1999) Characterization of apolipoprotein E-containing lipoproteins in cerebrospinal fluid: effect of phenotype on the distribution of apolipoprotein E. *Clin Chem* 45:1431–1438
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 378:135-157
- Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H (2004) Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol Aging* 25:325-332
- Yeagle P L (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822:267–287
- Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA (1985) Life span study of SPF Fischer 344 male rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol* 40:657–670
- Yu Y (2012) Educational differences in obesity in the United States: a closer look at the trends. *Obesity (Silver Spring)* 20:904–908

- Yu ZF and Mattson MP (1999) Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* 57:830-839
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 23:11104–11111
- Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39:975-990
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5:863–873

## BIOGRAFIJA AUTORA

Kosara Smiljanić je rođena 23.4.1978. godine u Užicu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1997. godine, a završila 2004. godine na studijskoj grupi Opšta biologija sa opštim uspehom 8,71 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije je upisala 2006. godine na smeru Molekularna biologija na Biološkom fakultetu. Od 2005. godine je zaposlena na Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživački rad Kosare Smiljanić realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. U periodu 2005 - 2006. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost mozga: neuronalna genska ekspresija u fiziološkim i patološkim uslovima“ (projekat 1641, Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). U periodu 2006 - 2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Molekularna i bihevioralna ispitivanja plastičnosti mozga“ (projekat 143004, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). Od 2011. godine učesnik je projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (projekat ON173056, Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije, rukovodilac dr Selma Kanazir). U okviru ovoga projekta je i istraživački zadatak koji se odnosi na izradu njene doktorske teze pod mentorstvom dr Selme Kanazir i dr Bata Koraća. U periodu 2006 – 2007. godine bila je član istraživačkog tima na projektu „Efekat dijetalne restrikcije na sinaptičku plastičnost mozga tokom starenja“ u okviru slovenačko-srpske bilateralne saradnje. Takođe, učestvuje i u realizaciji bilateralnog DAAD projekta sa Nemačkom („Uticaj dijetalne restrikcije na plastičnost centralnog i enteričkog nervnog sistema tokom starenja”; 2011-2012).

Koautor je 4 rada u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih kongresnih saopštenja.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Косара Смиљанић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ ИО060042 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај старења и дуготрајне дијеталне рестрикције на метаболизам  
холестерола у предњем мозгу 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, \_\_\_\_\_ 01.06.2012. \_\_\_\_\_

*Косара Смиљанић*

---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Косара Смиљанић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ ИО060042 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_ Утицај старења и дуготрајне дијеталне рестрикције на метаболизам холестерола у предњем мозгу пацова \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Селма Каназир и др Бато Кораћ \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Косара Смиљанић \_\_\_\_\_

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, \_\_\_\_\_ 01.06.2012. \_\_\_\_\_

*Косара Смиљанић*

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Утицај старења и дуготрајне дијеталне рестрикције на метаболизам холестерола у предњем мозгу 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, \_\_\_\_\_ 01.06.2012. \_\_\_\_\_



---

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.