

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vesna T. Tešić

**UTICAJ DUGOTRAJNE RESTRIKCIJE
HRANE NA EKSPRESIJU
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA
U PREDNJEM MOZGU PACOVA
TOKOM STARENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vesna T. Tešić

**THE EFFECT OF LONG-TERM FOOD
RESTRICTION ON THE EXPRESSION OF
GLUCOCORTICOID RECEPTOR IN THE
RAT FOREBRAIN DURING AGING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

dr Milka Perović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Selma Kanazir, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Sabera Ruždijić, naučni savetnik u penziji, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Desanka Milanović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je 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” (#ON173056, rukovodilac dr Selma Kanazir), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Hvala,

Dr Milki Perović, mojoj mentorki, na svemu što me je naučila i podstakla da naučim, na energiji i trudu koji je uložila u realizaciju ove teze, na nesebično pruženim savetima, na upornom preispitivanju, na spremnosti da me sasluša i uvaži moje mišljenje, na iskrenom prijateljstvu.

Dr Gordani Matić, na uloženom trudu, na inspirativnim pitanjima i savetima koji su unapredili ovu disertaciju.

Dr Selmi Kanazir, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici za rad u nauci, na uspešnom osmišljavanju tematike projekta u okviru koga je urađena ova disertacija, na posvećenosti, dobronamernim savetima i velikoj podršci.

Dr Saberi Ruždijić, na interesovanju sa kojim je pratila moj istraživački rad, kao i korisnim savetima i sugestijama proisteklim iz bogatog naučnog iskustva.

Dr Desi Milanović, na nepresušnoj energiji kojom me podsticala da težim ka višem i boljem, na velikoj i nesebičnoj pomoći, na kreativnosti i vedrini koju je unosila u svakodnevni laboratorijski život.

Kolegama Vesni, Aleksandri, Nataši, Kosari, Smilji, Divni, Nikolini i Vladimiru na brizi, savetima, prijatnim razgovorima i osećaju da na njih uvek mogu da računam.

Kolegama Željku i Marjani, na svim eksperimentima koje smo uradili uz smeh, na poverenju i pravom drugarstvu, na tome što je uz njih i sa njima svaki cilj bio dostižan.

Mojoj sestri Jasmini, što je verovala u mene i pružila mi neprocenjivu emotivnu i moralnu podršku.

Saši, Damjanu i Sari, na bezgraničnoj ljubavi, podršci, razumevanju, strpljenju, na tome što su mi bili oslonac i dali smisao mojim uspesima.

Mojoj majci Vinki, na ljubavi, odricanjima, istrajnosti... Uz beskrajnu zahvalnost, ovu tezu posvećujem njoj...

Uticaj dugotrajne restrikcije hrane na ekspresiju glukokortikoidnog receptora u prednjem mozgu pacova tokom starenja

Rezime

Dugotrajna restrikcija hrane produžava životni vek i odlaže pojavu mnogih bolesti koje se javljaju sa starenjem. Brojni literaturni podaci ukazuju da kod životinja kojima je unos hrane smanjen izostaje karakterističan starosno-zavistan pad u kognitivnim funkcijama, međutim, mehanizam ovakvog neuroprotektivnog dejstva restrikcije hrane nije u potpunosti razjašnjen. U isto vreme, kod životinja na dugotrajnoj restrikciji hrane se povećava nivo kortikosterona u plazmi što ukazuje da ovaj tretman deluje kao blagi stresor. Do sada nije ispitivano do kakvih promena u signalnom putu glukokortikoida dovodi smanjeni unos hrane tokom starenja u mozgu. Centralno polje istraživanja procesa starenja neizbežno podrazumeva ispitivanje promena do kojih dolazi u korteksu i hipokampusu, strukturama mozga koje su ključne za kognitivne funkcije. Sa druge strane, iste strukture učestvuju u regulaciji HHA ose kao važni regioni delovanja negativne povratne sprege.

Cilj doktorske disertacije je da se ispita uloga signalnog puta glukokortikoida u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja i pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane. Eksperimentalne životinje (mužjaci pacova soja *Wistar*) starosti 6 meseci su podeljene u dve grupe. Prva grupa, označena kao *ad libitum* (AL), je imala neograničen pristup hrani, dok je druga grupa (označena kao DR) podvrgnuta režimu redukovane ishrane koji je podrazumevao dobijanje 100% dnevnog unosa hrane AL životinja svakog drugog dana. Životinje su analizirane kada su dostigle starost od 18 i 24 meseca. Životinje stare 6 meseci su predstavljale kontrolnu grupu. Glukokortikoidna signalizacija u ispitivanim strukturama je praćena na prereceptorskom nivou, kao i na nivou ekspresije i aktivacije glukokortikoidnog receptora primenom imunoesej, imunoblot i PCR metoda, kao i imunohistohemijske analize.

Rezultati doktorske disertacije pokazuju da tokom starenja dolazi do povećanja koncentracije kortikosterona u korteksu pacova, dok dugotrajna restrikcija hrane povećava nivo kortikosterona u obe ispitivane strukture. Utvrđeno je da nivo ključnog enzima koji u moždanom tkivu reguliše dostupnost kortikosterona za receptore, 11 β -HSD1, raste u hipokampusu pacova koji imaju neograničen pristup hrani. Tretman dugotrajnom restrikcijom hrane dovodi do

povećanja nivoa 11 β -HSD1 u korteksu, dok u hipokampusu izostaje efekat na nivo ovog enzima. Najizraženije promene na nivou glukokortikoidnog receptora tokom starenja su uočene u hipokampusu životinja koje su imale slobodan pristup hrani. Detektovan je značajan pad nivoa glukokortikoidnog receptora, praćen smanjenim nivoom fosforilisanog oblika receptora. Pokazano je da primena dugotrajne restrikcije hrane povećava nivo glukokortikoidnog receptora i u korteksu i u hipokampusu, dok se uticaj na fosforilacioni status receptora ostvaruje samo u hipokampusu najstarije ispitivane grupe, gde se značajno povećava nivo fosforilisanog oblika receptora, kao i njegova jedarna lokalizacija u piramidalnim neuronima CA1 regiona i granularnim ćelijama dentatnog girusa. Funkcionalna posledica aktivacije glukokortikoidnog receptora u hipokampusu životinja podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane se ogleda u povećanju ekspresije *sgk-1* gena. Takođe, kod životinja kojima je unos hrane smanjen dolazi do porasta nivoa mineralokortikoidnog receptora u hipokampusu. Sa druge strane, dugotrajna restrikcija hrane u korteksu sprečava povećanje nivoa transkripcionog regulatora NF κ B u jedarnoj frakciji do kojeg dolazi sa starenjem i dalje deluje u pravcu održavanja reaktivnosti kortikalnih neurona tokom starenja, na šta ukazuje povećana ekspresija *c-fos* gena.

Utvrđeno je da dugotrajna restrikcija hrane ostvaruje uticaj na signalni put glukokortikoida na strukturno-specifičan način. Promene koje su detektovane u korteksu su uočljivije na prereceptorskom nivou, i ogledaju se u povećanoj koncentraciji kortikosterona i povećanom nivou enzima 11 β -HSD1. U hipokampusu je efekat restikcije hrane najizraženiji na nivou samog receptora, i ostvaruje se preko povećanja nivoa ukupnog receptora i njegove fosforilisane forme.

Rezultati dobijeni u okviru disertacije ukazuju na značaj signalnog puta glukokortikoida u ostvarivanju efekata dugotrajne restrikcije hrane, čime proširuju dosadašnje uvide u mehanizme neuroprotektivnog dejstva smanjenog unosa hrane. Imajući u vidu važnu ulogu signalnog puta glukokortikoida u procesima učenja i pamćenja, rezultati su značajni i sa aspekta potencijalnog korišćenja redukovane ishrane u očuvanju kognitivnih kapaciteta tokom starenja kod ljudi.

Ključne reči: dugotrajna restrikcija hrane, starenje, glukokortikoidni hormoni, 11 β -HSD1, glukokortikoidni receptor, korteks, hipokampus

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna neurobiologija

UDK broj: 577.25:[613.24:611.813]:591.139(043.3)

The effect of long-term food restriction on the expression of glucocorticoid receptor in the rat forebrain during aging

Abstract

Moderate restriction in food intake (dietary restriction, DR) extends the life-span and delays the onset of many age-related diseases. In addition, food-restricted animals exhibit attenuated cognitive deficits during aging as they perform better in learning and memory tasks than their *ad libitum* fed counterparts. At the same time, the animals on chronic food restriction have elevated levels of plasma corticosterone, which implies that this treatment could be considered as a mild stressor. So far, there are no literature data regarding the effects of food restriction on glucocorticoid signaling in the brain during aging and the mechanisms by which DR exhibits its neuroprotective effects are poorly understood. Two brain regions of interest are cortex and hippocampus, regions particularly prone to age-related changes. The same regions are also involved in cognition and regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activity.

The aim of the present study was to evaluate the effect of long-term food restriction on glucocorticoid signaling pathway in the cortex and hippocampus of rats during aging. Experimental animals (male *Wistar* rats, 6 months old) were divided into two groups. The AL group was fed *ad libitum*, whereas the food restricted group (DR) received 100% of the mean daily intake of the AL animals every other day. The animals were examined at the age of 18 and 24 months. Six-month-old animals were used as a control. Glucocorticoid signaling in specific brain regions was examined at the pre-receptor level, as well as regarding the level of expression and glucocorticoid receptor activity by using immunoassays, Western blot, PCR and immunohistochemistry.

The results of this study demonstrate an age-related increase in cortical corticosterone concentration. The increase in the hormone level was further detected in DR animals, in both brain regions examined. However, 11 β -HSD1, a key enzyme in brain tissue that regulates the availability of corticosterone to its receptors, was increased only in the hippocampi of AL rats and in the cortex of rats subjected to the long-term food restriction. The most pronounced changes in the level of glucocorticoid receptor during aging were observed in the hippocampi of

AL animals. A significant decrease in the level of glucocorticoid receptor protein was accompanied by the decrease in the level of phosphorylated receptor form (pGR). Conversely, following long-term food restriction, an increase in the level of glucocorticoid receptor both in the cortex and hippocampus was observed. The effect of food restriction on pGR was observed only in the hippocampi of old animals, where increased level of pGR together with its prominent nuclear staining in CA1 pyramidal and DG granule neurons of aged DR rats was observed. These changes were accompanied by increased *sgk-1* gene expression, pointing to upregulated transcriptional activity of GR. In the hippocampus, DR also induced an increase in the expression of the mineralocorticoid receptor. Furthermore, reduced food intake in the cortex prevented an age-related increase in the level of nuclear NF κ B and induced increase in the expression of *c-fos*, indicating that DR during aging tends to maintain the reactivity of cortical neurons.

The results presented herein reveal that long-term food restriction affects the glucocorticoid signaling pathway in a region-specific manner. In the cortex, more prominent changes were observed at the pre-receptor level, where increased corticosterone concentration and elevated 11 β -HSD1 level were detected. In the hippocampus, the most pronounced effects were on the receptor itself, as long-term food restriction induced an increase in the total GR and pGR levels.

Overall, this study demonstrates how long-term food restriction affects the glucocorticoid signaling pathway in the brain and thus provides new insights into the mechanisms by which reduced food intake exerts its neuroprotective effects. Considering the importance of glucocorticoid signaling pathway in learning and memory, these results also provide important information in relation to the potential use of reduced food intake in preserving cognitive capacity during aging in humans.

Keywords: long-term food restriction, aging, glucocorticoid hormones, 11 β -HSD1, glucocorticoid receptor, cortex, hippocampus

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular neurobiology

UDC number: 577.25:[613.24:611.813]:591.139(043.3)

SKRAĆENICE

AP-1	transkripcioni regulator AP-1 (eng. <i>activator protein 1</i>)
AB	Alchajmerova bolest
ACTH	adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AL	bez ograničenja (lat. <i>ad libitum</i>)
BDNF	moždani neurotrofinski faktor (eng. <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
C/EBP	transkripcioni regulator koji se vezuje za pojačivač CCAAT (eng. <i>CCAAT/enhancer binding protein</i>)
CBG	kortikosteroid-vezujući globulin (eng. <i>corticosteroid-binding globulin</i>)
CBP	protein koji se vezuje za CREB (eng. <i>CREB-binding protein</i>)
CDK	kinaze kojima aktivnost zavisi od ciklina (eng. <i>cyclin-dependent kinases</i>)
CNS	centralni nervni sistem
CREB	protein koji se vezuje za elemente koji odgovaraju na cAMP (eng. <i>cAMP responsive element binding protein</i>)
CRH	kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DBD	DNK vezujući domen (eng. <i>DNA-binding domain</i>)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DR	restrikcija hrane (eng. <i>dietary restriction</i>)
ERK	kinaze čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima (eng. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FKBP	protein koji vezuje FK506 (eng. <i>FK506 binding protein</i>)
GFAP	glijski kiseli fibrilarni protein (eng. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GILZ	protein sa motivom leucinskog zatvarača koji se indukuje glukokortikoidima (eng. <i>glucocorticoid-induced leucine zipper</i>)
GPCR	receptor spregnut sa G proteinima (eng. <i>G protein coupled receptor</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	sekvence DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. <i>glucocorticoid response elements</i>)
GRIP	protein koji interaguje sa glukokortikoidnim receptorom (eng. <i>glucocorticoid receptor-interacting protein</i>)
GSK	kinaza sintaze glikogena (eng. <i>glycogen synthase kinase</i>)
HES1	transkripcioni regulator HES1 (eng. <i>hairy and enhancer of split-1</i>)
hGR	humani glukokortikoidni receptor
HHA	hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa
11 β -HSD	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza (eng. <i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
Hsp	protein toplotnog stresa (eng. <i>heat-shock protein</i>)
IF	intermitentno gladovanje (eng. <i>intermittent fasting</i>)

IL	interleukin
IRF	regulacioni faktor interferona (eng. <i>interferon regulatory factor</i>)
I κ B α	inhibitorni κ B α protein (eng. <i>inhibitory κBα</i>)
JNK	kinaze N-terminalnog domena proteina c-Jun (eng. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
LBD	ligand vezujući domen (eng. <i>ligand-binding domain</i>)
LTP	dugotrajna potencijacija (eng. <i>long-term potentiation</i>)
MAPK	proteinske kinaze aktivirane mitogenima (eng. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MDR	višestruka rezistencija (eng. <i>multidrug resistance</i>)
MED14	medijator transkripcione podjedinice 14 RNK polimeraze II (eng. <i>mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14</i>)
MPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenima (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MR	mineralokortikoidni receptor
MRI	magnetna rezonanca (eng. <i>magnetic resonance imaging</i>)
NCoR	korepresor nuklearnih receptora (eng. <i>nuclear receptor co-repressor</i>)
NF κ B	nuklearni faktor κ B (eng. <i>nuclear factor-kappa B</i>)
nGRE	negativni GRE
NTD	N-terminalni transaktivirajući domen (eng. <i>N-terminal transactivation domain</i>)
PKA	protein kinaza A
PP5	protein fosfataza 5 (eng. <i>protein phosphatase 5</i>)
PVN	paraventrikularno jдро hipotalamusa (eng. <i>paraventricular nucleus of the hypothalamus</i>)
Sgk	kinaza regulisana serumom i glukokortikoidima (eng. <i>serum and glucocorticoid-regulated kinase</i>)
SIRT1	sirtuin 1
SMRT	utišavajući medijator receptora za retinoidne i tiroidne hormone (eng. <i>silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors</i>)
SOCS	supresor signalnog puta citokina (eng. <i>suppressor of cytokine signaling</i>)
STAT	protein koji prenosi signal i aktivira transkripciju (eng. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
SUMO	mali modifikatori srodni ubikvitinu (eng. <i>small ubiquitin-related modifier</i>)
TCR	receptor T-ćelija (eng. <i>T-cell receptor</i>)
TNF- α	faktor nekroze tumora α (eng. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TSG	protein osetljiv na tumor (eng. <i>tumor susceptibility gene</i>)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Starenje	1
1.1.1. Starenje mozga	2
1.1.2. Starenje i restrikcija hrane	5
1.1.3. Mehanizam dejstva restrikcije hrane	7
1.2. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa	9
1.2.1. Regulacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose	10
1.2.2. Mehanizam dejstva glukokortikoida	12
1.2.3. Post-translacione modifikacije GR-a	18
1.2.4. Regulacija dostupnosti glukokortikoida u mozgu	20
1.3. Glukokortikoidi i starenje mozga	21
1.4. Glukokortikoidi i restrikcija hrane	23
2. Cilj	26
3. Materijali i metode	28
3.1. Eksperimentalne životinje i eksperimentalna procedura	28
3.2. Određivanje koncentracije kortikosterona u moždanom tkivu pacova	29
3.3. RT-PCR u realnom vremenu	30
3.3.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT)	30
3.3.2. RQ-PCR	31
3.3.3. Semikvantitativni RT-PCR	32
3.4. Određivanje nivoa proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova	33
3.4.1. Izolovanje ukupnih ćelijskih ekstrakata iz moždanih struktura	33

3.4.2.	Izolovanje citoplazmatične i jedarne frakcije proteina iz tkiva korteksa	33
3.4.3.	Određivanje koncentracije proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima i ćelijskim frakcijama	34
3.4.4.	Elektroforeza proteina	34
3.4.5.	Elektrotransfer proteina	35
3.4.6.	Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - imunoblot metoda	36
3.4.7.	Semikvantitativna analiza imunoblotova	37
3.4.8.	Statistička obrada podataka	37
3.5.	Histološke analize	38
3.5.1.	Imunohistohemijsko obeležavanje	38
4.	Rezultati	39
4.1.	Nivo kortikosterona u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	39
4.2.	Analiza zastupljenosti proteina 11 β -HSD1 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	40
4.3.	Analiza zastupljenosti GR iRNK i proteina u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	42
4.4.	Analiza zastupljenosti fosforilisane forme proteina GR (pGR) u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	44
4.5.	Imunohistohemijska lokalizacija pGR-a u hipokampusu 6 i 24 meseca starih pacova	46
4.6.	Analiza zastupljenosti proteina CDK5 i p35/25 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	48
4.7.	Analiza zastupljenosti proteina FKBP51 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	50
4.8.	Analiza zastupljenosti proteina Hsp90 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	52

4.9.	Analiza zastupljenosti iRNK za MR u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	53
4.10.	Analiza zastupljenosti iRNK za sgk-1 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	54
4.11.	Analiza zastupljenosti iRNK za Gfap u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	55
4.12.	Analiza zastupljenosti iRNK za c-fos u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	57
4.13.	Analiza unutarćelijske raspodele proteina NFκB u korteksu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane	58
5.	Diskusija	60
6.	Zaključci	75
7.	Literatura	77

1. Uvod

1.1. Starenje

Prosečan ljudski vek se za poslednjih 100 godina povećao sa 47 na 78 godina i udeo starijih u opštoj populaciji se utrostručio. Očekuje se da će do 2025. godine 20% populacije biti starije od 65 godina. Nažalost, većina studija ukazuje da će se prosek godina praćenih dobrim opštim zdravstvenim stanjem uvećati umereno, dok će se znatno veći porast ostvariti u zastupljenosti godina sa slabim ili oštećenim fizičkim ili mentalnim sposobnostima. Poznato je da se sa starenjem povećava incidenca raznih oboljenja poput ateroskleroze, artritisa, kardiovaskularnih bolesti, kancera, dijabetesa, hipertenzije, kao i neurodegenerativnih bolesti poput Alchajmerove bolesti (AB) (de Grey, 2007). Starenje je praćeno i udaljavanjem iz socijalnog života usled umanjenja fizičkih sposobnosti, kao i opadanjem kognitivnih funkcija čak i kada ne postoji dijagnostifikovano oboljenje. Stoga su osnovna istraživanja usmerena na ispitivanje biološke osnove starenja nervnog sistema od ključne važnosti za razvoj strategija koje bi mogle da uspore starenje i obezbede što kvalitetniji život starim ljudima.

Savremene biološke teorije najčešće razmatraju starenje sa dva različita aspekta, kao programiran proces ili kao posledicu "grešaka". Prema teorijama koje zastupaju stanovište o starenju kao o programiranom procesu, starenje zavisi od biološkog sata koji vremenski reguliše životni vek, kao i gena koji sukcesivno aktiviraju ili gase signale upućene nervnom, endokrinom i imunom sistemu koji su odgovorni za održavanje homeostaze i aktivaciju odbrambenog odgovora organizma. Sa druge strane, teorije "greške" proces starenja dovode u vezu sa progresivnim oštećenjima do kojih dovode sredinski faktori na različitim nivoima (npr. oštećenja mitohondrijalne DNK, nakupljanje kiseoničnih radikala, oštećenja ćelijske membrane).

Razmatranje starenja kao programiranog procesa među naučnicima se donekle dovodi u pitanje shvatanjem da je sam proces stohastički i individualan (Hayflick, 2000; Holliday, 2000; Kirkwood, 2002; Kirkwood i Austad, 2000; Rattan, 2000a, 2003). Stopa kojom organizmi stare

je vrlo varijabilna u različitim vrstama, među organizmima unutar vrste, između tkiva i organa organizma, u subćelijskim kompartmanima u okviru istog tipa ćelija, kao i makromolekulima u ćeliji (Rattan, 2000a, 2000b). Potraga za jedinstvenim uzrokom u vidu jednog gena ili opadanja u funkciji jednog ključnog sistema se takođe prevazilazi, i starenje se danas posmatra kao izuzetno kompleksan, multifaktorski proces (Kowald i Kirkwood, 1996), koji utiče na više nivoa funkcionalne organizacije (Franceschi i sardnici, 2000). Stoga, sve je jasnije da niti postoji jedinstveni uzrok niti sveobuhvatan način kojim bi se definisao proces starenja (Davidovic i saradnici, 2010). U višećelijskim organizmima adekvantan uvid u proces starenja se može ostvariti samo uzimanjem u obzir svih unutrašnjih (genetičkih), spoljašnjih (sredinskih) i stohastičnih faktora (nasumična oštećenja vitalnih molekula).

Uzročni faktori koji leže u osnovi vremenski-zavisnih, štetnih procesa tokom starenja dakle još nisu u potpunosti definisani, ali je sve više opšte prihvaćen koncept koji definiše proces biološkog starenja kao nemogućnost organizma da održi homeostazu (Holliday, 1992). Na ovaj način definisano, starenje je posledica dva međusobno zavisna biološka procesa: gubitka funkcionalnosti i gubitka otpornosti ili prilagodljivosti na stres. Usled smanjene sposobnosti odgovaranja na stres, uzrokovane ili udružene sa povećanim homeostatskim disbalansom i povećanom incidencom različitih patologija, smrt je krajnja i neizbežna posledica starenja.

1.1.1. Starenje mozga

Promene koje se sa starenjem uočavaju u mozgu su kompleksne i obuhvataju više nivoa strukturne i funkcionalne organizacije. Delujući na molekule u ćeliji, proces starenja menja i same nervne ćelije, njihovu morfologiju i funkciju, što dalje utiče na anatomsku organizaciju mozga i funkcionalno, na kognitivne sposobnosti. Pored toga, promene se mogu sagledati i na nivou hormona ili pak neurotransmiterskih sistema, a u osnovi svih ovih promena pored genetskih i sredinskih faktora veliku ulogu ima i prethodno iskustvo.

Najevidentnija promena u mozgu tokom starenja je smanjenje njegovog ukupnog volumena (Brody, 1955; Dekaban, 1978; Matsumae i saradnici 1996) što je nedvosmisleno pokazano korišćenjem neinvazivnih metoda, pre svega magnetne rezonance (MRI, eng. *magnetic*

resonance imaging) (Raz i saradnici, 1999). Stopa kojom se odvija smanjenje volumena mozga je oko 5% po dekadi nakon četrdesete godine (Svennerholm i saradnici, 1997), a dodatno se povećava nakon sedamdesete godine života (Scahill i saradnici, 2003). Promenu u volumenu prati gubitak težine mozga (Ho i saradnici, 1980; Haug, 1997), kao i povećanje volumena moždanih komora (Foundas i saradnici, 1998). Ipak, jasno je i da se promene u mozgu ne dešavaju istim intenzitetom u svim regionima (Trollor i Valenzuela, 2001). Rezultati studija u kojima su upoređivani MRI nalazi ljudi mlađih od 30 i starijih od 60 godina pokazali su da su najugroženije strukture prefrontalni korteks i strijatum. Redukcija volumena takođe je pokazana za temporalni lobus, hemisfere i vermis cerebeluma, kao i hipokampus, dok je najmanje pogođen okcipitalni korteks (Raz, 2004). Literaturni podaci koji ukazuju da su prefontalni korteks i hipokampus strukture koje su pogođene procesom starenja (Anderton, 2002; Barnes, 2003) su u saglasnosti sa kognitivnim poremećajima koji se uočavaju sa starenjem.

Smatra se da je smanjenje volumena mozga pre posledica smanjenja volumena nego broja neurona. Stereološke procene su pokazale da se ukupan broj neurona u humanom mozgu smanjuje za manje od 10% u periodu od dvadesete do devedesete godine starosti (Pakkenberg i saradnici, 2003). Takođe, tokom starenja dolazi do promena u morfologiji samih neurona, tačnije, u dendritskom grananju, trnovima i sinapsama. Opisano je da tokom starenja dolazi do smanjenja broja dendritskih sinapsi i uopšte, gubitka sinaptičke plastičnosti (Barnes, 2003). Nasuprot tome, neke od studija su pokazale indukciju dendritskog grananja u starenju, za koju se smatra da predstavlja kompenzatorni mehanizam koji ima za cilj održanje broja sinapsi (Kolb i Wishaw, 1998; Anderton, 2002). Promene u funkcionalnoj organizaciji takođe mogu da utiču i na integritet bele mase (Raz, 2004). Pokazano je da se bela masa smanjuje sa starenjem, uz oštećenje mijelinskog omotača koje počinje oko četrdesete godine čak i u odsustvu dijagnostifikovanih oboljenja (Bartzokis i saradnici, 2003; Tullberg i saradnici, 2004; Head i saradnici, 2004; Artero i saradnici, 2004).

Navedene morfološke promene dalje dovode do promena na nivou neurotransmiterskih sistema i drugih signalnih molekula u mozgu. Najčešće razmatrani neurotransmiterski sistemi čije se promene povezuju sa starenjem su dopaminergički i serotonergički sistem. Nivo dopamina se tokom starenja smanjuje sa stopom od 10% po dekadi počevši od ranog adultnog

doba, a ovakva promena je dovedena u vezu sa smanjenim kognitivnim i motornim sposobnostima (Nyberg i Backman, 2004; Mukherjee i saradnici, 2002). Nivoi serotonina i moždanog neurotrofinskog faktora (BDNF, eng. *brain derived neurotrophic factor*) se takođe smanjuju sa starenjem, što može uticati na regulaciju sinaptičke plastičnosti i neurogeneze u adultnom mozgu (Mattson i saradnici, 2004). Pokazano je takođe da sa starenjem dolazi do veće produkcije slobodnih radikala koji ispoljavaju svoje dejstvo oštećujući moždano tkivo (Volchegorskii i saradnici, 2004). Ostali faktori za koje se smatra da mogu doprineti starenju mozga su deregulacija homeostaze kalcijuma (Toescu i saradnici, 2004) i mitohondrijalna disfunkcija (Melov, 2004). Dodatni faktor koji se razmatra kada je reč o starenju mozga i kognitivnim sposobnostima je hormonalni uticaj. Nivo hormona rasta se smanjuje sa starenjem, a pokazana je i korelacija njegovog nivoa sa smanjenim kognitivnim sposobnostima (Sytze van Dam i Aleman, 2004). Pokazano je takođe da terapija estrogenom ima protektivno dejstvo u bolestima povezanim sa starenjem, kao što je AB (Herlitz i Yonker, 2004; Tan i saradnici, 2005). Starenjem se menja i metabolizam glukoze u mozgu, pri čemu uzrok smanjenja količine glukoze može bar delimično biti posledica promena u efikasnosti vaskularnog sistema mozga. S druge strane, primećeno je da starenje prati i izmenjena propustljivost krvno-moždane barijere, što menja strogo kontrolisanu neuronalnu mikrosredinu i time utiče i na funkciju neurona (Bell i Zlokovic, 2009; Brown i Thore, 2011).

Promene do kojih dolazi sa starenjem finalno se odražavaju na kognitivne prosece. Memorijske funkcije koje se najčešće menjaju tokom procesa starenja su epizodna memorija, vid deklarativne memorije specifičnih podataka u kontekstu vremena ili prostora, i semantička memorija, koja podrazumeva pamćenje informacija nezavisno od konteksta (Reber, 1995). Smatra se da se kapacitet epizodne memorije smanjuje od srednjeg doba pa na dalje, dok se pad u kapacitetu semantičke memorije uočava tek kod starih osoba nakon postupnog povećanja koje je prisutno u srednjem dobu (Nyberg i Backman, 2004). Radna memorija, koja podrazumeva i kratkotrajno zadržavanje i aktivno procesovanje informacija, takođe je pogođena procesom starenja (Hasher i Zacks, 1988). Promene do kojih dolazi svakako utiču na neke od aspekata kognitivnih sposobnosti starih ljudi, prouzrokujući sporije vreme reagovanja, niži stepen pažnje, sporiju brzinu obrade podataka, oštećenje senzornih i perceptivnih funkcija, ili smanjenje

sposobnosti korišćenja naučenih strategija ponašanja (Nyberg i Backman, 2004; Cabeza, 2004; Lustig i Buckner, 2004; Cabeza i saradnici, 2004).

Literaturni podaci podržavaju hipotezu da se kognitivni procesi menjaju na sličan način tokom starenja kod različitih vrsta sisara, zbog čega razumevanje mehanizama koji dovode do promena kod pacova može pružiti bolji uvid u procese starenja mozga kod ljudi.

1.1.2. Starenje i restrikcija hrane

Restrikcija hrane (DR, eng. *dietary restriction*) je ne-genetička eksperimentalna intervencija za koju je pokazano da produžava život kod mnogih vrsta, uključujući kvasce, vinske mušice, nematode, ribe, miševе, pacove i pse (Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2005). Beskičmenjaci (poput kvasca, *Caenorhabditis elegans* i vinske mušice) predstavljaju pogodan model organizme za izučavanje mehanizma kojima DR usporava starenje zahvaljujući svojoj jednostavnosti i relativno kratkom životnom ciklusu (Fontana i saradnici, 2010; Kenyon, 2005). Međutim, metaboličke, anatomske i fiziološke razlike, kao i razlike u dužini života između ovih organizama i sisara su izuzetno velike. Zbog toga se za izučavanja mehanizama preko kojih deluje restrikcija hrane glodari smatraju mnogo pogodnijim model sistemom. Za glodare je pokazano da redukcija u unosu kalorija od 30–60% sa kojom se započne u ranijim životnim fazama, dovodi do proporcionalnog produžavanja maksimalnog životnog veka (Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2005). Ukoliko se sa redukcijom počne u kasnijem adultnom dobu (sa 12 meseci starosti) maksimalni životni vek se produži za svega 10–20% (Weindruch i Walford, 1982). Do sada, miševi i pacovi su jedini sisari za koje je nedvosmisleno pokazano da restrikcija unosa hrane bez potrahnjenosti dovodi do povećanja i prosečne i maksimalne dužine života, kao i do usporavanja starosno-zavisnih fizioloških i strukturnih promena u mnogim tkivima i organima. Pored toga, pokazano je da DR deluje povoljno na kvalitet života, sprečavajući ili odlažući pojavu velikog broja bolesti. Na primer, pokazano je da DR sprečava pojavu spontanih i indukovanih tumora u nekoliko modela kancera kod miša (Longo i Fontana, 2010). Važno je napomenuti da je kancer vodeći uzrok smrti kod glodara, odnosno da je uzrok 70–80% svih slučajeva smrti kod ovih eksperimentalnih životinja. DR

takođe sprečava ili odlaže pojavu hroničnih oboljenja bubrega i kardiomiopatija, koje su drugi uzrok smrti kod glodara (Weindruch i Walford, 1988; Shimokawa i saradnici, 1993). Takođe, pokazano je da se kod miševa na DR uočava sporija progresija aterosklerotičnih lezija, kao i njihova smanjena veličina u odnosu na miševe koji su imali slobodan pristup hrani (AL, od lat. *ad libitum*) (Guo i saradnici, 2002). DR sprečava i pojavu dijabetesa, autoimunih i respiratornih oboljenja (Weindruch i Walford, 1988; Masoro, 2005). Međutim, kod miševa koji su na dugotrajnoj DR usporeno je npr. zarastanje rana (Reed i saradnici, 1996). Pored toga, kod miševa koji rastu u kontrolisanim uslovima bez prisustva patogena, restriktivni režim ishrane povećava podložnost bakterijskim i virusnim infekcijama, iako je pokazano da DR odlaže pad u nekim od funkcija imunskog sistema koji se javlja sa starenjem (Kristan, 2008).

Neuroprotektivno dejstvo DR ogleda se u smanjenju stepena neurodegeneracije, patološkog taloženja proteina, kao i pospešenoj neurogenezi u animalnim modelima Alchajmerove, Parkinsonove i Hantingtonove bolesti (Cohen i saradnici, 2009; Mattson, 2005). Putevi signala preko insulinu-sličnih molekula i transkripcionih regulatora koje DR indukuje stimulišu sintezu neurotrofičkih faktora, antioksidantnih enzima i šaperonskih proteina koji sprečavaju pojavu neurodegenerativnih poremećaja (Martin i saradnici, 2006, Smiljanić i saradnici, 2015). Mnoge studije koje su ispitivale funkciju pamćenja koristeći testiranje u *Morris*-ovom vodenom lavirintu na miševima ili pacovima, pokazale su da DR donekle štiti ovu funkciju od pada koji se javlja sa starenjem (Bellush i saradnici, 1996; Adams i saradnici, 2008). To je posebno bilo izraženo nakon primene intermitentnog gladovanja (IF, eng. *intermittent fasting*), koje podrazumeva unos hrane svaki drugi dan (Martin i saradnici, 2006). DR pokazuje anti-konvulzivne efekte u nekoliko modela epilepsije i smanjuje trajanje i težinu napada (Azarbar i saradnici, 2010). Pored toga, pokazano je i da su hipokampalni neuroni zaštićeniji od hemijski indukovane neurodegeneracije nakon DR u trajanju od 2-4 meseca (Bruce-Keller i saradnici, 1999). DR može ispoljavati svoje dejstvo i na sinaptičkim završecima, štiteći ih od oksidativnih i metaboličkih poremećaja koji su posledica preuzimanja glutamata (Guo i saradnici, 2000). Poremećaji u preuzimanju glukoze nakon oksidativnih i metaboličkih povreda su takođe u velikoj meri ublaženi u sinaptozomima pacova na DR (Guo i saradnici, 2000). Treba napomenuti da postoje i studije u kojima se tvrdi da DR može poremetiti kognitivne funkcije (Green i

saradnici, 1995). Takođe, pokazano je i da DR nije u stanju da spreči gubitak broja sinapsi do kog dolazi sa starenjem u CA3 regionu hipokampusa (Adams i saradnici, 2010).

Ukoliko se uzme u obzir broj vrsta koje pozitivno odgovaraju na DR, postavlja se pitanje primenljivosti takve intervencije na ne-humane primare, kao i na ljudsku populaciju. Dve studije na primatima koje istražuju da li DR ima pozitivne efekte na dužinu životnog veka kod makaki majmuna dale su oprečne rezultate (Mattison i saradnici, 2012; Colman i saradnici, 2014), ukazujući da smo još uvek daleko od definitivnog odgovora.

1.1.3. Mehanizam dejstva restrikcije hrane

Prvu studiju efekta DR na životni vek objavio je još 1935 McCay sa saradnicima (McCay i saradnici, 1935). Od tada, pa do danas, postavljeno je nekoliko teorija o mogućim mehanizmima preko kojih deluje DR. Rane hipoteze objašnjavale su efekte DR preko usporavanja rasta i razvoja (McCay i saradnici, 1975) ili snižavanja stope metabolizma kod životinja na DR (Krystal i Yu, 1994). Međutim, mnogobrojne studije su pokazale da životinje na DR imaju veću metaboličku aktivnost od onih hranjenih *ad libitum* (Masoro, 1998; Speakman i saradnici, 2004; Speakman i saradnici, 2003).

Savremene teorije o efektima DR uključuju nekoliko mehanicistički različitih objašnjenja i grupisane su u, sa jedne strane, teorije koje razmatraju efekte DR na pre-sintetskom nivou i teoriju hormeze koja smatra da je za ispoljavanje efekta DR potrebna aktivna sinteza novih molekula. U prvu grupu teorija spadaju teorije koje ostvarivanje efekata DR objašnjavaju oslanjajući se na samo jednu od sledećih promena: smanjenje masnih naslaga (Berg i Simms, 1960); smanjenje nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (Barja, 2004; Merry, 2002); povećano preživljavanje ćelija (Mattson i saradnici, 2002b); sprečavanje starosno-zavisnog smanjenja procesa autofagije (Del Roso i saradnici, 2003; Tavernarakis i Driscoll, 2002); povećanje osetljivosti na insulin i održavanje niskih nivoa glukoze u krvi (Kalant i saradnici, 1988; Masoro, 1992) ili pak, uopšteno, promene u funkciji endokrinog sistema. Poznato je, naime, da DR menja nivo ključnih hormona, uključujući i kortikosteron (Sabatino i saradnici, 1991; Wan i saradnici, 2003; Mager i saradnici, 2006). Endokrini sistem utiče na životni vek, i neki hormoni svakako

imaju važnu ulogu u koordinisanju odgovora na DR, ali i dalje nije jasno da li je ovaj mehanizam osnovna efekata DR.

Hipoteza hormeze i puteva odgovora na stres se, umesto na pasivnim mehanizmima koji važe za prethodno navedene teorije, zasniva na aktivnom odbrambenom odgovoru organizma. Ova ključna razlika počiva na hipotezi da DR predstavlja biološki stres umerenog intenziteta, koji kontinuirano pomaže u odbrani od uzroka koji dovode do starenja (Anderson i saradnici, 2003; Rattan, 2004; Mattson i saradnici, 2002a). Već decenijama je naime poznata pozitivna korelacija između takvog stresa i povećane dugovečnosti, što je i navelo naučnike na razmatranje takvog shvatanja mehanizma DR. Stoga, termin “hormeza” se odnosi na povoljne karakteristike koje se javljaju kao rezultat odgovora organizma na umeren stres (Calabrese, 2004; Calabrese i saradnici, 1987). Hipoteza hormeze se zasniva na četiri ključna predviđanja:

1. DR aktivira unutarćelijske signalne puteve koji predstavljaju odgovor na ćelijski stres i nedostatak nutrijenata.
2. Aktivirani putevi pomažu u odbrani ćelija i tkiva od uzroka koji dovode do starenja.
3. Isti putevi regulišu metabolizam glukoze, lipida i proteina na takav način da povećavaju verovatnoću preživljavanja tokom perioda stresa.
4. Navedeni putevi su pod kontrolom endokrinog sistema čija je uloga da osigura koordinisan odgovor na nivou organizma.

Navedena teorija je i proširena shvatanjem da organizmi mogu da osete hemijske medijatore stresa koji potiču od drugih vrsta i da ih iskoriste da aktiviraju svoje odbrambene mehanizme kako bi se pripremili na štetne uslove. Tako proširena je nazvana hipotezom ksenohormeze (Howitz i saradnici, 2003; Lamming i saradnici, 2004).

Ono što hipotezu hormeze izdvaja od ostalih hipoteza koje nude objašnjenja dejstva DR je činjenica da je u stanju da objasni mnoge različite efekte koji su pokazani za DR, od sposobnosti životinja na DR i njihovih pojedinačnih ćelija da podnose stresne uslove, preko saznanja da organizmi imaju evolutivno očuvane puteve odgovora na stres koji istovremeno utiču i na dugovečnost, do povezanosti DR i endokrinog sistema.

1.2. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa

Uticaji životne sredine koji se zavisno od percepcije manifestuju bilo kao negativni (ugrožavajući) ili pozitivni (poput nagrađivanja), izazivaju spektar fizioloških promena koje se mogu tumačiti kao adaptivni odgovor organizma. Najvažniji sistem kontrole intenziteta i svrsishodnosti adaptivnog odgovora organizma zasniva se na interakciji struktura koje ulaze u sastav hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose. HHA osa se aktivira pod delovanjem spoljašnjih ili unutrašnjih činilaca koji su od strane oblasti najvišeg nivoa nervne kontrole prepoznati kao moguća pretnja homeostazi. Regioni koji kontrolišu aktivaciju HHA ose obuhvataju amigdale, prefrontalni korteks i hipokampus. Posredstvom ekscitatornih projekcija, ovi regioni aktiviraju neurone paraventrikularnog jedra hipotalamusa (PVN) koji oslobađaju kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH, eng. *corticotropin-releasing hormone*). On stimuliše prednji režanj hipofize da oslobađa pro-opiomelanokortin, čijom obradom nastaje adrenokortikotropni hormon (ACTH, eng. *adrenocorticotropic hormone*). ACTH dalje stimuliše koru nadbubrežne žlezde, koja oslobađa glukokortikoidne hormone kao efektorne molekule HHA ose. Ovi hormoni potom ispoljavaju svoje efekte, kako centralno tako i na periferiji, između ostalog, mobilisući energiju iz depoa i inhibirajući neesencijalne procese poput reproduktivne funkcije. Time omogućuju organizmu ponašanje koje će ga trenutno skloniti od izvora opasnosti, dok je njihova uloga nakon toga usmerena na vraćanje organizma u stanje homeostaze (Munck i saradnici, 1984). Glukokortikoidi, kortizol kod ljudi i kortikosteron kod pacova, su dakle glavni steroidni hormoni koji regulišu metaboličke, kardiovaskularne i imunske procese, kao i ponašanje (Charmandari i saradnici, 2005; Sapolsky i saradnici, 2000). Biološki efekti glukokortikoida su obično adaptivni, međutim, neadekvatna ili prekomerna aktivacija HHA ose može imati i patološku ulogu (Munck i saradnici, 1984; McEwen i Stellar, 1993).

1.2.1. Regulacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose

Normalna, fiziološka aktivnost HHA ose prati cirkadijalni ritam, i najveća je nakon buđenja čime se omogućuje uspostavljanje neophodnog funkcionalnog tonusa organizma. Količina hormona koja se dalje luči u toku dana je sve manja, sa najnižim vrednostima na početku neaktivne faze (faze sna). Izgleda da fiziološka sekrecija glukokortikoida ima ulogu u sinhronizaciji mozga i periferije usklađivanjem energetske potrebe organizama sa solarnim ritmom (Young i saradnici, 2004). Međutim, nakon izlaganja stresu dolazi do povećane aktivacije HHA ose sa ciljem da se održi homeostaza u novonastalim uslovima. Aktivacija HHA ose je stogo kontrolisan proces, sa brojnim negativnim povratnim petljama koje imaju za cilj da spreče prekomernu reakciju sistema. Glukokortikoidni hormoni nakon oslobađanja pokreću sistem negativne povratne sprege koji funkcioniše na svim nivoima HHA ose, čime se sprečava njihovo dalje oslobađanje (Antoni, 1986; Whitnall, 1993) i time ograničava intezitet i trajanje aktivacije ose (Keller-Wood i Dallman, 1984). Pored toga, i CRH i ACTH učestvuju u regulaciji HHA ose negativnom povratnom spregom. Sami glukokortikoidi utiču na aktivnost HHA ose vezivanjem za glukokortikoidni receptor (GR) u regionima mozga koji odgovaraju na stres (Reul i de Kloet, 1986). Nakon aktiviranja hormonom, GR se kao transkripcioni regulator vezuje za elemente koji odgovaraju na glukokortikoide (GRE, eng. *glucocorticoid response element*) u promotorima ciljnih gena ili pak, interaguje sa drugim transkripcionim regulatorima čime moduliše gensku ekspresiju (Bamberger i saradnici, 1996; Keller-Wood i Dallman, 1984). GR pokazuje nanomolarni afinitet prema glukokortikoidima koji okupiraju ove receptore u periodima povećane sekrecije do koje dolazi u odgovoru na stres (Reul i de Kloet, 1985). Glukokortikoidi se, međutim, u mozgu vezuju za još jednu klasu receptora, mineralokortikoidni receptor (MR), sa višim, subnanomolarnim afinitetom, tokom perioda bazalne sekrecije ovih steroidnih hormona (Reul i de Kloet, 1985; Reul i de Kloet, 1986). Smatra se da je, usled različitih afiniteta ovih receptora prema glukokortikoidima, MR zadužen za regulaciju bazalnog HHA tonusa, dok GR učestvuje u regulaciji negativne povratne sprege nakon izlaganja stresu (de Kloet i saradnici, 1998; Dallman i saradnici, 1989; Ratka i saradnici, 1989). GR je široko eksprimiran u mozgu, zbog čega je precizna anatomsko lokalizacija mesta negativne regulacije

sekrecije glukokortikoida još uvek nedovoljno definisana. Međutim, dva regiona mozga imaju ključnu ulogu u inhibiciji HHA ose. Prvi podrazumeva neurone PVN za koje je pokazano da visoko ekspimiraju GR. Pokazano je takođe da lokalno primenjeni glukokortikoidi smanjuju neuronalnu aktivnost u PVN i hipersekreciju ACTH do koje dolazi nakon adrenaletomije (Sawchenko, 1987; Kovacs i Makara, 1988; Kovacs i saradnici, 2000; Watts, 2005). Drugo ključno mesto povratnog inhibitornog dejstva na HHA osu je hipokampus. Hipokampus ekspimirira visoke nivoe i GR-a i MR-a, a infuzija kortikosteroida u ovu strukturu smanjuje i bazalni nivo glukokortikoida i oslobađanje glukokortikoida indukovano stresom (Jacobson i Sapolsky, 1991; Diorio i saradnici, 1993; McEwen, 2000). Takođe, hipokampus ima važnu ulogu u terminaciji odgovora HHA ose na stres (Jacobson i Sapolsky, 1991; Herman i saradnici, 2005). Stimulacija neurona hipokampusa smanjuje neuronalnu aktivnost u PVN i inhibira sekreciju glukokortikoida (Rubin i saradnici, 1987). Lezije hipokampalne strukture dovode do povećanog bazalnog nivoa cirkulišućih glukokortikoida (Knigge, 1961; Sapolsky i saradnici, 1991), povećanja ekspresije CRH (Herman i saradnici, 1992) i produženog oslobađanja ACTH i kortikosterona u odgovoru na stres (Sapolsky i saradnici, 1984; Herman i saradnici, 1995). Regulatorni uticaj hipokampusa na HHA osu je posredovan višestrukim sinaptičkim putevima i izgleda da je specifičan za stresor (Herman i saradnici, 2005).

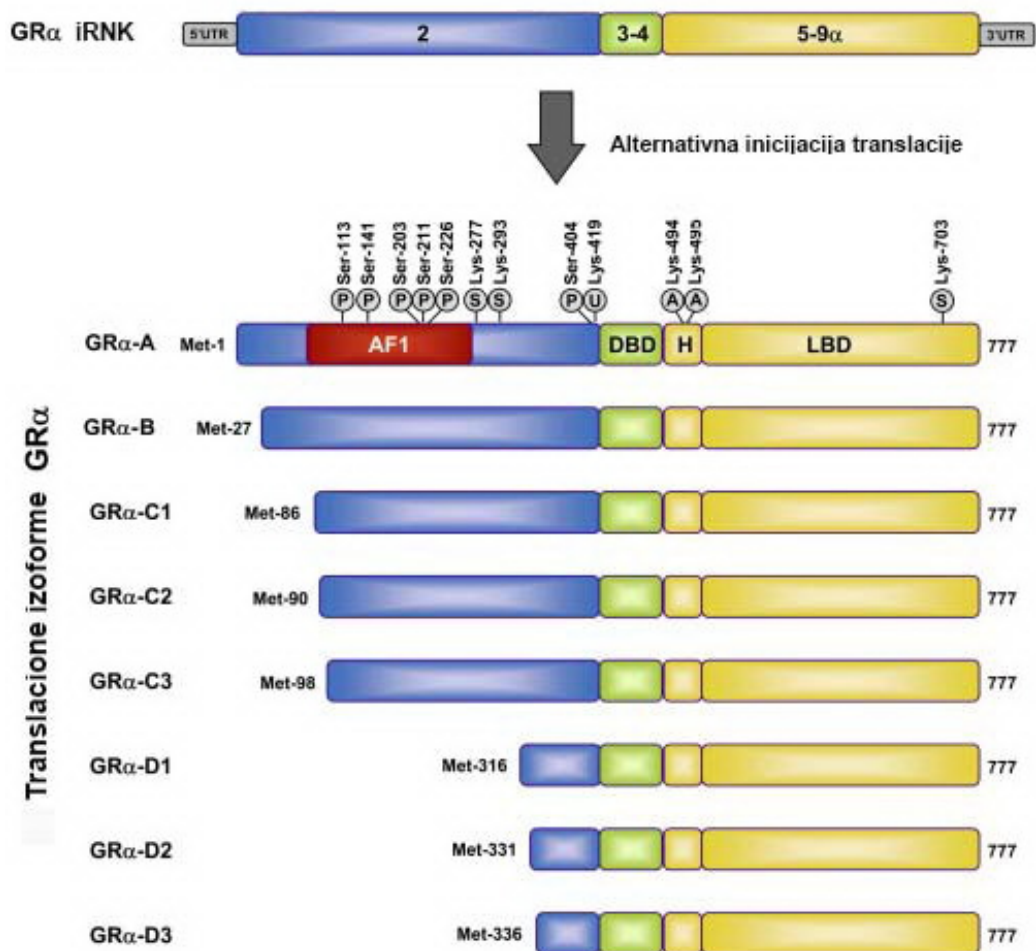
Prefrontalni korteks je još jedna od moždanih struktura koja je bitna za regulaciju aktivnosti HHA ose. Prefrontalni korteks može posredovati u negativnoj povratnoj sprezi HHA ose koja se ostvaruje posredstvom glukokortikoida, jer ekspimirira visok nivo GR-a (Ahima i Harlan, 1990). Neuroni medijalnog prefrontalnog korteksa se aktiviraju nakon izlaganja akutnom i hroničnom stresu (Finlay i saradnici, 1995; Jedema i saradnici, 1999). Bilateralna lezija anteriornog cingulatnog i prelimbičkog korteksa povećava sintezu ACTH i odgovor glukokortikoida na stres (Figueiredo i saradnici, 2003), što ukazuje na inhibitorni uticaj prefrontalnog korteksa na HHA osu. Takođe, infuzija glukokortikoida u medijalni prefrontalni korteks smanjuje nivoe ACTH i kortikosterona u odgovoru na stres imobilizacije (Diorio i saradnici, 1993; Akana i saradnici, 2001). Iako se korteks ne odlikuje visokom nivoima MR, neki procesi mogu indukovati njegovu ekspresiju. Pokazano je da se u uslovima hipoksije ili

hipoglikemije u neokorteksu indukuje ekspresija ovog receptora, i da taj proces ima neuroprotektivnu ulogu (Lai i saradnici, 2007; Macleod i saradnici, 2003).

1.2.2. Mehanizam dejstva glukokortikoida

Kao što je već navedeno, glukokortikoidi ostvaruju biološke uloge vezivanjem za dva bliska člana superfamilije nuklearnih receptora, GR i MR. Poput drugih nuklearnih receptora, GR poseduje tri karakteristična domena: N-terminalni transaktivirajući domen (NTD, eng. *N-terminal transactivation domain*); DNK vezujući domen (DBD, eng. *DNA-binding domain*) i C-terminalni ligand vezujući domen (LBD, eng. *ligand-binding domain*) (Oakley i Cidlowski, 2011). Humani GR (hGR) je produkt jednog gena (*NR3C1*, hromozom 5q31.3) i sadrži devet egzona. Na iRNK nivou postoji pet funkcionalno različitih varijanti nastalih alternativnom obradom, GR- α , GR- β , GR- γ , GR-A, i GR-P (Oakley i Cidlowski, 2011; Beck i saradnici, 2009). Fiziološka uloga ovih izoformi je malo izučavana, a najviše je opisana za GR- α i β izoforme (Oakley i Cidlowski, 2013). GR- α (777 aminokiselina (ak), molekulske mase 94 kDa) i GR- β (742 ak, 90 kDa) potiču od alternativnog spajanja egzona 8 sa različitim akceptorskim mestima u egzonu 9. Time je 50 ak C-terminusa GR α zamenjeno nehomologom sekvencom od 15 ak u GR β (Yudt i Cidlowski, 2001). Kod pacova nije nađena homologa izoforma GR β (Otto i saradnici, 1997), već izoforma označena kao rGR β , koja je kraća za 13 glutamina usled delecije u prvom egzonu (Ju i saradnici, 2009). Alternativna mesta inicijacije translacije dalje usložnjavaju raznovrsnost GR- α izoformi, čime nastaje osam različitih proteina sa skraćenim N-terminalnim domenom (GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 i GR α -D3) (Slika 1).

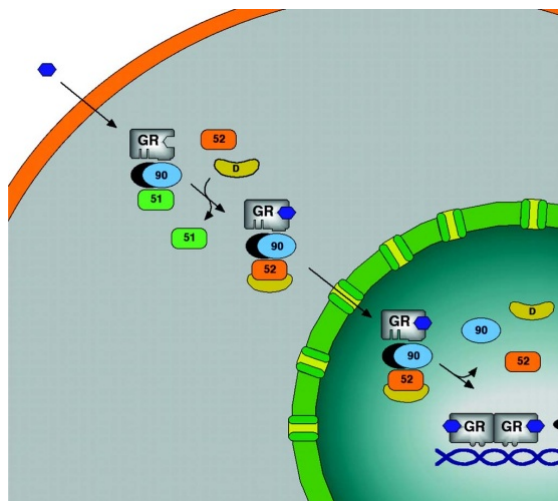
U odsustvu liganda, GR- α je smešten u citoplazmi, a nakon vezivanja liganda translocira se u jedro. Nasuprot tome, GR- β je uvek smešten u jedru, gde deluje kao dominantno-negativan inhibitor GR- α (Nicolaidis i saradnici, 2010). Bez obzira što GR- β ne vezuje ni endogene ni sintetske ligande, pokazano je da ima regulatornu ulogu koju ostvaruje pozitivno ili negativno modulišući transkripciju velikog seta gena koji se ne preklapaju sa onima koje reguliše GR- α (Taniguchi i saradnici, 2010). GR- α se u citoplazmi nalazi u sastavu proteinskog kompleksa koji



Slika 1. Alternativna mesta inicijacije translacije kojom nastaje osam različitih proteinskih izoformi GR- α sa skraćenim N-terminalnim domenom i post-translacione modifikacije GR- α (modifikovano iz Oakley i Cidlowsky, 2013)

sačinjavaju proteini toplotnog šoka (Hsp, eng. *heat-shock protein*) Hsp90, Hsp70, Hsp56 ili Hsp40, kao i košaperonski proteini p23 i p60, Src kinaze, i imunofilini poput FKBP51 i 52 (FKBP, eng. *FK506 binding protein*) (Kleiman i Tuckermann, 2007; Nicolaidis i saradnici, 2010; Stahn i saradnici, 2007). Šaperonski proteini prekrivaju sekvence za jedarnu lokalizaciju receptora i time sprečavaju transport u jedro pre vezivanja liganda. Pored toga, održavaju receptor u konformacionoj formi koja je optimalna za vezivanje liganda i njegovu translokaciju u jedro (Pratt i saradnici, 1997). Stoga su Hsp90 i ostali šaperoni verovatno povezani sa smanjenom funkcijom GR-a koja je pokazana u starenju i stresom uzrokovanim

neuropsihijatrijskim poremećajima (Murphy i saradnici, 2002; Raison i saradnici, 2003). Takođe, nedavno je pokazano da je imunofilin FKBP52 regulatorni molekul koji određuje gensku specifičnost odgovora na vezivanje GR-a (Wolf i saradnici, 2009). Uprkos činjenici da dele sličnu strukturnu organizaciju, kao i da je sličnost aminokiselinskih sekvenci FKBP51 i FKBP52 oko 60%, ova dva proteina su funkcionalno različita. FKBP52 se fosforiliše na treoninskom ostatku 143, što sprečava njegovo vezivanje sa Hsp90 (Miyata i saradnici, 1997). FKBP51 ne poseduje ovo mesto fosforilacije, što može da objasni činjenicu da je kompetitivno više zastupljen od FKBP52 u receptorskim kompleksima (Nair i saradnici, 1997; Banerjee i saradnici, 2008). Za razliku od FKBP52 koji je pozitivan regulator GR funkcije jer povećava afinitet receptora za vezivanje hormona (Riggs i saradnici, 2003), FKBP51 pokazuje opšti efekat smanjenja transkripcione aktivnosti receptora, zadržavajući receptor u citoplazmi i smanjujući njegov afinitet za vezivanje hormona (Davies i saradnici, 2002; Reynolds i saradnici, 1999; Davies i saradnici, 2005) (Slika 2). Može se pretpostaviti da recipročne uloge ova dva imunofilina na vezivanje hormona za GR predstavljaju način kojim se može regulisati lokalni odgovor tkiva na istu koncentraciju cirkulišućih glukokortikoida.



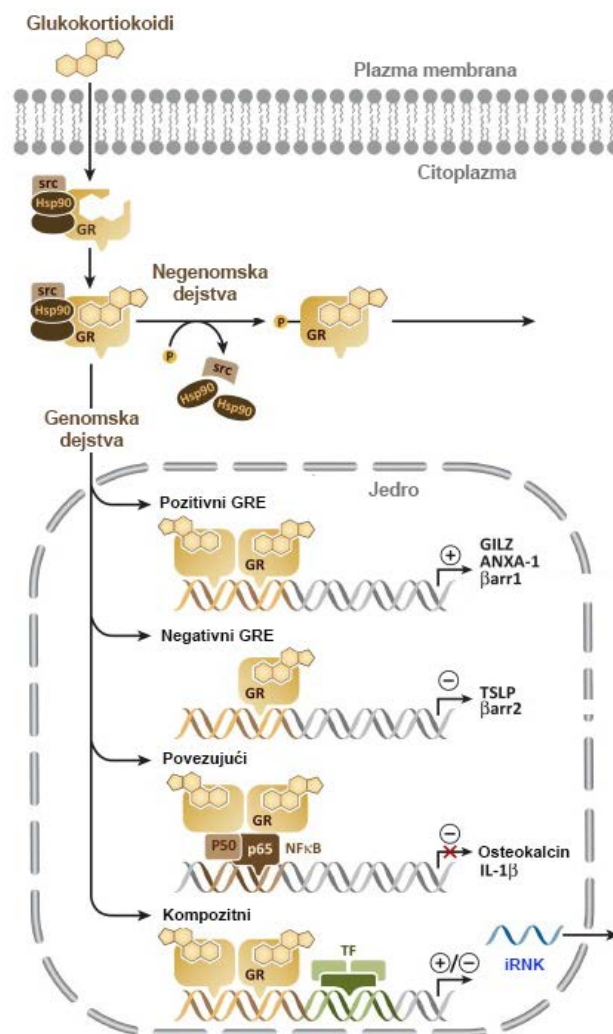
Slika 2. Model hormonalne aktivacije glukokortikoidnog receptora. Prva posledica vezivanja hormona za receptor u citoplazmi je zamena imunofilina FKBP51 sa FKBP52, a nakon toga sledi premeštanje receptorskog kompleksa u jedro (modifikovano iz Davies i saradnici, 2002)

Receptor sa vezanim ligandom moduliše ekspresiju gena kroz mnogostruke genomske i ne-genomske mehanizme.

Genomski mehanizmi

Vezivanje jednog molekula glukokortikoida za receptor dovodi do konformacione promene koja rezultuje oslobađanjem šaperona i demaskiranjem sekvence koja obezbeđuje jedarnu lokalizaciju. Kada se nađe u jedru, receptor se ne vezuje stabilno za DNK, već konstantno menja svoju poziciju između nukleoplazme i GRE sekvenci lokalizovanih u promotorima ili pojačivačima ekspresije gena koji odgovaraju na glukokortikoide (McNally i saradnici, 2000; Voss i saradnici, 2011). GRE sekvence pokazuju veliku raznolikost, ali se mogu podeliti u četiri kategorije: jednostavni pozitivni, kompozitni, povezujući i jednostavni negativni GRE (nGRE) (Slika 3). Jednostavni pozitivni GRE predstavljaju nesavršene palindromske sekvence sastavljene od invertovanih heksamera razdvojenih sa tri bazna para. Svaki heksamer predstavlja mesto vezivanja jednog monomera iz receptorskog homodimera. Nazvani su pozitivnim sekvencama jer vezivanje homodimera za ovakve GRE sekvence stimuliše gensku ekspresiju (proces transaktivacije) preko dekondezacije hromatina čime se dalje omogućava vezivanje ko-aktivatora. Na ovaj način je regulisana ekspresija potentnih inhibitora signalnih puteva (npr. I κ B α (eng. *inhibitory κ B α*), MPK-1 (eng. *mitogen-activated protein kinase 1*), IL-10 (interleukin-10), aneksina A1 (eng. *annexin A1*), GILZ (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*) i SOCS (eng. *suppressor of cytokine signaling*) proteina) (Abraham i saradnici, 2006; Bhattacharyya i saradnici, 2011; D'Adamio i saradnici, 1997; Zhao i saradnici, 2006). Kompozitni GRE su himerne sekvence koje prepoznaju GR vezan za drugi transkripcioni regulator, tačnije GR heterodimere. Povezujući GRE nemaju motive za vezivanje GR, i time se izdvajaju od ostalih GRE tipova. Oni vezuju druge komplekse transkripcionih regulatora, koji mogu da regrutuju GR preko protein-protein interakcija, i u tom slučaju se GR ne vezuje sa DNK. I kompozitni i povezujući GRE mogu da dovedu do direktne transaktivacije ili transrepresije, što zavisi od transkripcionih regulatora koji su u kompleksu sa GR-om. Na primer, povezujući GRE koji vezuje GR monomer povećava transkripciju gena koji odgovaraju na

transkripcione regulatore STAT3 i STAT5 (STAT, eng. *signal transducer and activator of transcription*), CREB (eng. *cAMP responsive element binding protein*) i C/EBP- α (eng. *CCAAT/enhancer binding protein*), a inhibira aktivnost transkripcionih regulatora NF κ B (eng. *nuclear factor-kappa B*), AP-1 (eng. *activator protein 1*) i IRF3 (eng. *interferon regulatory factor 3*) (Beck i saradnici, 2009; Oakley i Cidlowski, 2011; De Bosscher i saradnici, 2010). Četvrti tip, negativni GRE, poseduje dva invertovana ponovka za koje se pretpostavlja da ih prepoznaju GR homodimeri (Surjit i saradnici, 2011).



Slika 3. Mehanizam dejstva glukokortikoida. GR smešten u citoplazmi nakon vezivanja hormona prolazi kroz konformacionu promenu, hiperfosforiliše se i premešta u jedro, gde ispoljava genomska dejstva. GR takođe deluje i ne-genomskim mehanizmima (modifikovano iz Kadmiel i Cidlowski, 2013)

Nasuprot pozitivnim GRE, nGRE direktno reprimira transkripciju preko regrutovanja transrepresora NCoR (eng. *nuclear receptor co-repressor*) i SMRT (eng. *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*). nGRE su lokalizovani u mnogim genima koji su regulisani transkripcionim regulatorima NFκB i AP-1, a koji kodiraju proteine imunskog odgovora i inflamatorne medijatore. Najzad, preko takvog mehanizma glukokortikoidi smanjuju ekspresiju sopstvenih negativnih regulatora, poput HES1 (eng. *hairy and enhancer of split-1*), i time osiguravaju odgovarajuće promene u genskoj ekspresiji koje su posredovane glukokortikoidima (Revollo i saradnici, 2013).

Ne-genomski mehanizmi

Pored genomskih efekata, GR koji za sebe ima vezan ligand, takođe deluje na transkripciju gena posredstvom različitih ne-genomskih mehanizama. Ovi mehanizmi ne zahtevaju *de novo* sintezu proteina, odnosno posreduju u brzim efektima glukokortikoida. Ne-genomski mehanizmi uključuju iRNK destabilizaciju, kompeticiju za ko-aktivatore (na primer CBP (eng. *CREB-binding protein*), p300 i GRIP 1 (eng. *glucocorticoid receptor-interacting protein 1*), i interferiranje sa vezivanjem transkripcionih faktora sa DNK (Almawi i Melemedjian, 2002; Barnes, 2010; Flammer i Rogatsky, 2011; Reily i saradnici, 2006; Đorđević-Marković i saradnici, 1999; Kanazir i saradnici, 1979). Takođe, pretpostavlja se da drugi tipovi GR-a, kao što su GR ugrađeni u ćelijsku ili mitohondrijalne membrane, mogu da regulišu transkripcionu aktivnost, ali su mehanizmi kojima to ostvaruju još uvek slabo istraženi (Moutsatsou i saradnici, 2001; Strehl i saradnici, 2011; Groeneweg i saradnici, 2012; Vernocchi i saradnici, 2013). Mada još uvek nema definitivnog dokaza, smatra se da membranski GR može biti varijanta citoplazmatične forme proteina, nastala kao rezultat upotrebe alternativnog promotora, alternativne obrade ili postranslacionih modifikacija (Bartholome i saradnici, 2004). Dodatni ne-genomski mehanizmi delovanja GR-a sa vezanim ligandom uključuju direktne interakcije sa proteinima u membrani (na primer sa jonskim kanalima, GPCR (eng. *G protein coupled receptor*) ili TCR (eng. *T-cell receptor*) kompleksima i citoplazmatskim proteinima (MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinases*) kinazama i fosfolipazama), čime se indirektno

utiče na transkripcione regulatore čija aktivnost zavisi od promena u ovim proteinima (Stahn i Buttgerit, 2008; Stahn i saradnici, 2007; Löwenberg i saradnici, 2007).

1.2.3. Post-translacione modifikacije GR- α

Svaka od GR izoformi podleže post-translacionim modifikacijama koje nadalje modulišu aktivnost receptora i proširuju spektar funkcionalnih formi receptorskih proteina koji učestvuju u signalnom putu glukokortikoida (Slika 1). Fosforilacija GR je prva opisana, i najviše izučavana kovalentna modifikacija (Beck i saradnici, 2009; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009; Kumar i Calhoun, 2008). Najmanje šest serinskih ostataka humanog GR- α može biti fosforilisano (Ser¹¹³, Ser¹⁴¹, Ser²⁰³, Ser²¹¹, Ser²²⁶ i Ser⁴⁰⁴), a ova mesta su evolutivno očuvana kod miševa i pacova. Receptor je fosforilisan i u bazalnim uslovima, ali nakon vezivanja liganda postaje hiperfosforilisan (Avenant i saradnici, 2010; Wang i saradnici, 2002). Glavne kinaze koje učestvuju u fosforilaciji GR- α su MAPK, CDK (eng. *cyclin-dependent kinases*) i GSK-3 (eng. *glycogen synthase kinase-3*). Fosforilacija GR α menja njegovu transkripcionu aktivnost na način koji je specifičan za gen (Webster i saradnici, 1997). Pri tome, pokazano je da fosforilacija na Ser²¹¹ (kojoj odgovara fosforilacija Ser²³² kod pacova) koreliše sa funkcionalnom formom receptora, dok fosforilacija na Ser²²⁶ remeti kapacitet receptora da prenese signale (Wang i saradnici, 2002; Blind i Garabedian, 2008; Chen i saradnici, 2008). Takođe, izgleda da deficijencija u fosforilaciji na Ser²¹¹ može biti mehanizam razvoja rezistencije na glukokortikoide (Miller i saradnici, 2007; Miller i saradnici, 2005). Fosforilacija Ser²¹¹ takođe obezbeđuje ostvarivanje međusobnih uticaja GR α i ostalih signalnih puteva. Na primer, tretman estrogenom povećava ekspresiju fosfataze PP5 (eng. *protein phosphatase 5*) koja dovodi do defosforilacije na Ser²¹¹ čime se dalje inhibira aktivnost GR- α na nekoliko ciljnih gena (Zhang i saradnici, 2009). Fosforilacija na Ser⁴⁰⁴, koja je zavisna od glukokortikoida, remeti i aktivaciju i represiju ciljnih gena (Galliher-Beckley i saradnici, 2008). Fosforilacija na Ser²¹¹ povećava interakciju GR α sa ko-aktivatorom MED14 (eng. *mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14*) (Chen i saradnici, 2008), dok fosforilacija na Ser⁴⁰⁴ onemogućava interakciju sa ko-aktivatorom p300/CBP i p65 subjedinicom transkripcionog regulatora NF κ B (eng. *nuclear factor*

kappa B) (Galliher-Beckley i saradnici, 2008), što objašnjava različite efekte ove dve fosforilacije na aktivnost receptora.

Pored promena u transkripcionoj aktivnosti, fosforilacija menja i neke druge osobine receptora koje utiču na prenos glukokortikoidnih signala. Na primer, fosforilacija GR α utiče na nivo receptora modulišući njegov poluživot. TSG101 (eng. *tumor susceptibility gene 101*) protein preferencijalno interaguje sa nefosforilisanom formom GR α i time štiti receptor koji nema za sebe vezan ligand od degradacije u proteazomima (Ismaili i saradnici, 2005). Nasuprot tome, fosforilacija receptora u odgovoru na ligand povećava njegovu degradaciju (Webster i saradnici, 1997). Fosforilacija takođe utiče i na unutarćelijsku lokalizaciju receptora. GR α koji je fosforilisan na Ser²⁰³ je smešten u citoplazmi, i u skladu sa tim, pokazuje slabo vezivanje za regulatorne sekvence ciljnih gena (Wang i saradnici, 2002). Takođe, smanjen signalni kapacitet GR α fosforilisanog na Ser²²⁶ ili Ser⁴⁰⁴ može delimično biti posledica povećanog transporta receptora sa ovim modifikacijama iz jedra u citoplazmu (Galliher-Beckley i saradnici, 2008; Itoh i saradnici, 2002).

GR α podleže i brojnim drugim post-translacionim modifikacijama. Ubikvitinacija receptora se odvija na evolutivno očuvanim lizinskim ostacima, i time označava receptor kao ciljni molekul za degradaciju u proteazomima (Deroo i saradnici, 2002; Wallace i Cidlowski, 2001). Mutacije u ovim lizinskim ostacima sprečavaju smanjenje nivoa GR α i pojačavaju njegovu transkripcionu aktivnost (Wallace i Cidlowski, 2001). GR α je takođe i supstrat za sumoilaciju, kojom se SUMO (eng. *small ubiquitin-related modifier*) peptidi kovalentno vezuju za receptor na specifičnim lizinskim ostacima (Lys²⁷⁷, Lys²⁹³ i Lys⁷⁰³). Ova modifikacija značajno ubrzava degradaciju receptora i inhibira njegovu transkripcionu aktivnost pojačavajući interakcije sa ko-represorima (Davies i saradnici, 2008; Holmstrom i saradnici, 2008; Le Drean i saradnici, 2002; Tian i saradnici, 2002). Pored toga, MR i GR vezuju drugačije ko-regulatorne komplekse i procesi sumoilacije i aktivnost proteazomskog sistema različito utiču na njihove osobine (Meijer i saradnici, 2006; Tirard i saradnici, 2007). Pokazano je da se GR α acetiluje na Lys⁴⁹⁴ i Lys⁴⁹⁵ u odgovoru na glukokortikoide, kao i da ova modifikacija remeti antagonizam GR-a i NF κ B (Ito i saradnici, 2006). Mnogobrojni aspekti GR α funkcije se mogu regulisati različitim post-translacionim modifikacijama, čime se ćeliji omogućuje dodatni nivo

heterogenosti u kontroli efekata glukokortikoida i integrisanja delovanja GR α sa ostalim signalnim putevima.

1.2.4. Regulacija dostupnosti glukokortikoida u mozgu

Kao visoko lipofilni molekuli, i endogeni glukokortikoidi i njihovi egzogeni derivati, lako difunduju kroz krvno-moždanu barijeru i deluju na skoro sve tipove ćelija u centralnom nervnom sistemu (CNS). Međutim, biološka dostupnost ovih hormona, može značajno varirati u zavisnosti od tri ključne determinante: afiniteta za vezivanje za kortikosteroid-vezujuće globuline (CBG; eng. *corticosteroid-binding globulin*); preuzimanja od strane pumpi za izbacivanje smeštenih na krvno-moždanoj barijeri i lokalne enzimske obrade u ćelijama. Endogeni glukokortikoidi se transportuju kroz cirkulaciju vezani za transportne proteine plazme kao što su albumin i CBG. CBG vezuje do 90% cirkulišućih glukokortikoida, a ostatak hormona može biti vezan za albumin. Ovako vezani hormon je neaktivan. Smatra se da je samo 5% cirkulišućih glukokortikoida slobodno i time aktivno (De Kloet i saradnici, 1998; Henley i saradnici, 2011). Sintetski analozi glukokortikoida se efikasno izbacuju kroz krvno-moždanu barijeru putem tzv. MDR (eng. *multidrug resistance*) transportera koji se nalaze na endotelijalnim ćelijama barijere (Wyrwoll i saradnici, 2011). Dok transportni mehanizmi i proteini plazme ograničavaju ulazak u mozak, aktivnost hormona je takođe regulisana i na ćelijskom nivou enzimskom interkonverzijom bioaktivnih i inertnih formi 11 β -hidroksisteroid dehidrogenazama (11 β -HSD). Postoje dve forme ovog enzima, 11 β -HSD1, koja katalizuje generisanje aktivne forme hormona iz neaktivnih keto-derivata, i 11 β -HSD2 koja katalizuje reakciju u suprotnom smeru. Keto-derivati se ne vezuju za proteine plazme i ne spadaju u vrste koje se izbacuju pumpama kroz krvno-moždanu barijeru. Stoga keto-forma hormona lakše ulazi u CNS od bioaktivne forme. 11 β -HSD1 je široko rasprostranjen i u neuronima i u glijalnim ćelijama, dok se izoforma 11 β -HSD2 eksprimira u fetalnom mozgu, a u adultnom je ograničena na oblasti centralne kontrole krvnog pritiska i unosa soli (De Kloet i saradnici, 1998; Wyrwoll i saradnici, 2011; Gottfried-Blackmore i saradnici, 2010). 11 β -HSD1 značajno utiče na signalne puteve glukokortikoida, kontrolišući njihovu biološku dostupnost lokalnim amplifikovanjem aktivnog oblika hormona.

1.3. Glukokortikoidi i starenje mozga

Pokazano je da sa starenjem raste koncentracija kortikosterona u plazmi kod životinja i ljudi (Meaney i saradnici, 1995; Sabatino i saradnici, 1991; Patel i Finch, 2002, Yau i saradnici, 1995; Lupien i saradnici, 1998), a štetni efekti farmakoloških doza glukokortikoida na hipokampalne neurone su opisani i kod glodara i kod primata (Sapolsky i saradnici, 1990). Na osnovu toga, Sapolsky i saradnici (Sapolsky, 1992; Sapolsky i saradnici, 1986) su predložili kaskadnu glukokortikoidnu hipotezu starenja, po kojoj usled štetnih efekata koje izazivaju ovi hormoni dolazi do smrti hipokampalnih neurona sa starenjem. Hipokampus je posebno osetljiv na neuronalna oštećenja do kojih mogu dovesti glukokortikoidi zbog visoke zastupljenosti oba tipa glukokortikoidnih receptora. Pored toga, ova struktura je uključena u regulaciju HHA ose negativnom povratnom spregom, pa oštećenja neurona u ovoj strukturi mogu dovesti do daljeg povećanja nivoa hormona (Sapolsky, 1992, Sapolsky i saradnici, 1986). Međutim, mnoge stereološke studije nisu detektovale gubitak neurona u hipokampusu miševa, pacova, majmuna ni ljudi tokom starenja (Leverenz i saradnici, 1999; Rapp i Gallagher, 1996; Rasmussen i saradnici, 1996; West i saradnici, 1994). Takođe, stereološkim ispitivanjem nije detektovan gubitak neurona u hipokampusu primata nakon hronične primene visokih doza glukokortikoida (Leverenz i saradnici, 1999). Pokazano je zapravo da atrofija hipokampusa, gubitak sinapsi i smanjena neurogeneza više korelišu sa funkcionalnim promenama tokom starenja, nego sam gubitak neurona (Lemaire i saradnici, 2000; Lupien i saradnici, 1998; McEwen, 2000; Smith i saradnici, 2000). Stoga, pokazano povećanje glukokortikoida tokom starenja može da bude posledica intracelularnog povećanja hormona ili promena na nivou receptora za glukokortikoidne hormone. Pokazano je da sa starenjem u korteksu i hipokampusu miševa raste nivo enzima 11 β -HSD1, što dovodi do poremećaja u kognitivnim funkcijama (Holmes i saradnici, 2010). Kod starih životinja kojima je genetičkim manipulacijama ukinuta ekspresija ovog enzima kognitivne funkcije su očuvane (Yau i saradnici, 2001). Pored toga, negativna povratna sprega HHA ose se smanjuje sa starenjem verovatno usled toga što dolazi do smanjenja nivoa GR receptora receptora, što takođe vodi povećanom nivou cirkulišućih glukokortikoida (Landfield i Eldridge,

1989; Masoro, 2007). Pojačana aktivnost HHA ose tokom starenja dovodi do viših bazalnih nivoa glukokortikoida kod ljudi i do povećanog nivoa ili produženog trajanja višeg nivoa glukokortikoida nakon stresa i u slučaju različitih bolesti (Nichols, 1998; Ferrari i saradnici, 1995; Wilkinson i saradnici, 2001). Smanjenje nivoa hipokampalnih receptora tokom starenja bi dovelo do toga da hipokampus postane manje osetljiv na delovanje glukokortikoida nego što se zahteva za održavanje homeostaze. Poznato je da i u nervnom sistemu, kao i svim drugim, efekti glukokortikoida variraju od permisivnih do supresivnih (Sapolsky i saradnici, 2000). Smanjeni odgovor na glukokortikoide tokom starenja bi mogao da dovede do poremećaja homeostaze, posebno ukoliko je pogođena supresivna funkcija koja sprečava prekomernu odbrambenu reakciju organizma (Nichols, 1998; Sapolsky i saradnici, 2000). Smanjeni nivo ekspresije GR receptora izazvan glukokortikoidima je pokazan u starenju (Issa i saradnici, 1990; Lupien i saradnici, 1998; Bizon i saradnici, 2001), ali ne u svim studijama (Yau i saradnici, 1994; Meijer i saradnici, 2005; Wang i saradnici, 2013). Pored toga, pokazano je da starenje smanjuje vezivanje liganda za GR, translokaciju u jedro i sposobnost receptora da se veže za DNK (Hassan i saradnici, 1999; Murphy i saradnici, 2002; Mizoguchi i saradnici, 2009; Lee i saradnici, 2012). Kod životinja kojima je genetičkim manipulacijama smanjena ekspresija GR-a ili farmakološki blokiran ovaj receptor, pokazani su poremećaji slični onima koji se uočavaju u starenju (Sapolsky i saradnici, 1984; Oitzl i saradnici, 1997). Stoga, mogao bi se izvesti zaključak da starenje mozga karakteriše smanjeni prenos glukokortikoidnog signala.

Još jedan od načina kojim bi smanjen odgovor na glukokortikoide mogao da doprinese procesu starenja je regulacija ekspresije gena u glijalnim ćelijama. Povećanje ekspresije GFAP-a (eng. *glial fibrillary acidic protein*) u astrocitima predstavlja biološki marker procesa starenja, sa intenzivnim porastom ekspresije kod ljudi preko 65 godina starosti (David i saradnici, 1997; Nichols, 1999). Povećana ekspresija iRNK za GFAP je pokazana u nekoliko regiona mozga tokom starenja i kod glodara (Nichols i saradnici, 1993; Morgan i saradnici, 1999). Studije globalne analize ekspresije gena kod miševa i pacova su potvrdile da je GFAP jedan od gena čija se ekspresija u mozgu menja sa starenjem (Goyns i saradnici, 1998; Lee i saradnici, 2000). Takođe, pokazano je da je ekspresija ovog gena negativno regulisana glukokortikoidima (Laping i saradnici, 1994). Stoga, smanjen odgovor na glukokortikoide može dovesti do povećanja

ekspresije GFAP gena tokom starenja. Smatra se da su promene u odgovoru na glukokortikoide u starenju posredovane promenama koje utiču na ekspresiju gena na transkripcionom nivou. Nesposobnost da se povećana ekspresija GFAP vrati na bazalni nivo može dovesti do produžene aktivacije glijalnih ćelija i gubitka sinapsi kao rezultata neuron-astrocitnih interakcija (Nichols, 1999). Zahvaljujući povezanosti astrocitnih nastavaka sa sinaptičkim pukotinama, aktivacija astrocita može dovesti do različitih efekata na neurotransmisiju i neurosekreciju, što finalno može uticati i na kognitivne sposobnosti (Garcia-Segura i saradnici, 1994; Geinisman i saradnici, 1995). Pretpostavlja se da poremećeni balans GR i MR receptora u mozgu može da promeni i odgovor na ekscitatorne stimuluse čime bi mogao da dovede do gubitka homeostaze tokom starenja (de Kloet, 1991). Povećan influks kalcijuma i smanjeni inhibitorni uticaji su povezani sa hroničnim povećanjem ili smanjenjem nivoa glukokortikoida, što čini neurone podložnim procesu neurodegeneracije (de Kloet i saradnici, 1999). Stoga, poremećen balans receptora može biti odgovoran za elektrofiziološke i sinaptičke promene koje su pokazane sa starenjem, što može promeniti funkcije glukokortikoida iz adaptivnih u štetne. Smatra se da kumulativni efekti stresa i stresnih hormona, posebno glukokortikoida, pojačavaju štetne efekte drugih povreda i tokom vremena uzrokuju funkcionalne poremećaje, uključujući i opadanje u kognitivnim sposobnostima.

1.4. Glukokortikoidi i restrikcija hrane

Brojna istraživanja na glodarima su pokazala da je kortikosteron u plazmi životinja na restrikciji hrane povećan (Sabatino i saradnici, 1991; Wan i saradnici, 2003; Mager i saradnici, 2006). Poznato je da kratkotrajni tretman kortikosteronom smanjuje nivo GFAP-a u korteksu i hipokampusu (Nichols i saradnici, 1990; O'Callaghan i saradnici, 1991), i da je povećanje ekspresije iRNK za GFAP u hipokampusu sa starenjem usporeno primenom restrikcije hrane (Krekoski i saradnici, 1996; Morgan i saradnici, 1997; Yoshida i saradnici, 1996). Smanjenje funkcionalnog GFAP-a povećava izrastanje neurita (Lefrancois i saradnici, 1997; Wei i saradnici, 2002), što sugerise protektivnu ulogu koju DR ostvaruje uticajem na nivo ovog gena. Poznato je da neuroinflamatorni procesi doprinose neurodegeneraciji (Akiyama i saradnici, 2000), a DR

može umanjiti aktivaciju mikroglije tokom starenja preko antiinflamatornog dejstva glukokortikoida. Ovo dejstvo se može ostvariti preko direktne interakcije GR-a sa transaktivacionim domenom NFκB, transkripcionog regulatora koji pokreće transkripciju gena inflamatornog odgovora (McKay i Cidlowski, 1999). Pored toga, oba navedena transkripciona regulatora su redoks-senzitivna. Oksidativni uslovi modifikuju mesta interakcije NFκB sa specifičnim mestima za vezivanje na DNK, dok isti uslovi sprečavaju translokaciju GR u jedro (Okamoto i saradnici, 1999). Sa starenjem eksponencijalno rastu markeri oksidativnog stresa, a DR deluje u pravcu njihovog smanjenja (Dubey i saradnici, 1996; Sohal i Weindruch, 1996), na osnovu čega se može očekivati da su u mozgu DR životinja funkcije GR-a očuvane.

Jedina studija koja je pratila ekspresiju GR u mozgu nakon tri meseca restrikcije hrane je urađena na adultnim životinjama starim 6 meseci (Lee i saradnici, 2000). Uloga sistema odgovora na stres u mehanizmima preko kojih DR ostvaruje svoje efekte je začuđujuće malo ispitivana, ako se uzme u obzir povećan nivo glukokortikoidnih hormona koji je prate. Poznato je da u uslovima produženog izlaganja stresu kao i kod hroničnog izlaganja glukokortikoidima dolazi do mnogih morfoloških i molekularnih promena u regionima mozga koji su zaduženi za kognitivne sposobnosti. Nakon produženog izlaganja stresu ili oralne primene kortikosterona kod glodara dolazi do atrofije dendrita u hipokampusu, posebno u CA3 regionu (Woolley i saradnici, 1990; Vyas i saradnici, 2002) i remeti se hipokampalna neurogeneza (Brummelte i Galea, 2010). Takođe, značajno se smanjuje ekspresija proteina koji su uključeni u sinaptičku plastičnost u hipokampusu, uključujući aktivnost ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinase*) kinaze i CREB transkripcionog faktora, kao i ekspresija BDNF trofinskog faktora (Gourley i saradnici, 2008; Lakshminarasimhan i Chattarji, 2012). Funkcionalno, hronično izlaganje glukokortikoidima remeti sinaptičku plastičnost (Pavlides i saradnici, 1993) i procese formiranja memorije (Dachir i saradnici, 1993). Uprkos tome, pokazano je da hronična DR smanjuje poremećaje u sinaptičkoj efikasnosti do kojih dolazi sa starenjem (Eckles-Smith i saradnici, 2000; Hori i saradnici, 1992). Pokazano je da DR može zaštititi mozak od oštećenja tokom starenja preko očuvanja sinaptičke plastičnosti indukcijom ekspresije neuroprotektivnih molekula poput BDNF-a (Duan i saradnici, 2001; Smiljanić i saradnici, 2015), i sprečavanjem smanjenja u ekspresiji sinaptičkih proteina do kojih dolazi sa starenjem (Mladenović Đorđević i

saradnici, 2010). Takođe, DR doprinosi održanju homeostaze holesterola u mozgu tokom starenja, što je značajno s obzirom da je holesterol, kao glavni konstituent lipidnih raftova, ključni činilac sinaptičke aktivnosti (Smiljanić i saradnici 2014). Aktivirani signalni putevi u sinaptičkim završecima mogu biti posebno važni za očuvanje sinaptičke plastičnosti i sprečavanje gubitka sinapsi i smrti neurona tokom starenja (Kim i Yoon, 1998). Takođe, DR ne smanjuje neurogenezu u hipokampusu, već povećava broj novih neurona i stopu njihovog preživljavanja (Lee i saradnici, 2000). Literaturni podaci pokazuju da DR može poboljšati funkcije učenja i pamćenja (Algeri i saradnici, 1991; Ingram i saradnici, 1987; Pitsikas i Algeri, 1992), koje opadaju sa starenjem. Poznato da u starenju dolazi do deregulacije prenosa signala posredovanih GR-om, a do sada nisu ispitivani efekti restrikcije hrane na ekspresiju GR-a i signalne puteve glukokortikoida tokom procesa starenja.

2. Cilj

Dugotrajna restrikcija hrane produžava životni vek i odlaže pojavu mnogih bolesti koje se javljaju sa starenjem. Životinje kojima je unos hrane smanjen pokazuju očuvane kognitivne funkcije tokom starenja, s obzirom na to da na testovima učenja i pamćenja postižu bolje rezultate od onih kojima unos hrane nije ograničen. U isto vreme, kod životinja na dugotrajnoj restrikciji hrane povećava se nivo kortikosterona u plazmi, što ukazuje da ovaj tretman deluje kao blagi stresor. Do sada nije ispitivano do kakvih promena u signalnom putu glukokortikoida dovodi smanjeni unos hrane tokom starenja u mozgu. Centralno polje istraživanja procesa starenja neizbežno podrazumeva ispitivanje korteksa i hipokampusa, struktura u mozgu koje su ključne za odvijanje kognitivnih funkcija. Sa druge strane, iste strukture učestvuju u regulaciji HHA ose kao važni delovi negativne povratne sprege.

U skladu sa navedenim, cilj doktorske disertacije je da se ustanove efekti dugotrajne restrikcije hrane na signalni put glukokortikoida u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja i stoga su postavljeni sledeći zadaci istraživanja:

1. Utvrđivanje koncentracije kortikosterona u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja, kao i efekata dugotrajne restrikcije hrane na nivo ovog steroidnog hormona;
2. Utvrđivanje zastupljenosti 11β -HSD1, ključnog enzima koji u moždanom tkivu reguliše dostupnost kortikosterona za njegove receptore, tokom starenja i pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane;
3. Utvrđivanje zastupljenosti glukokortikoidnog receptora tokom starenja i nakon podvrgavanja dugotrajnoj restrikciji hrane, kao i stepena njegove fosforilacije na serinskom ostatku 232 (Ser²³²) koja koreliše sa aktivnošću receptora kod pacova;

4. Utvrđivanje zastupljenosti CDK5 kinaze, za koju je pokazano da fosforiliše glukokortikoidni receptor na Ser²³², kao i zastupljenost aktivatorskih proteina za ovu kinazu, tokom starenja i pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane;
5. Utvrđivanje aktivnosti glukokortikoidnog receptora kao transkripcionog regulatora preko merenja nivoa iRNK za sgk-1 gen čija je ekspresija regulisana glukokortikoidima;
6. Utvrđivanje uticaja starenja i dugotrajne restrikcije hrane na nivo mineralokortikoidnog receptora, koji zajedno sa glukokortikoidnim receptorom determiniše finalni odgovor na glukokortikoidni hormon;

Poznato je da dve ispitivane moždane strukture pokazuju različitu osetljivost na tretman glukokortikoidima, pa su stoga postavljeni i dodatni zadaci istraživanja u okviru doktorske disertacije:

7. Utvrđivanje strukturnih specifičnosti u odgovoru komponenti glukokortikoidnog puta na tretman dugotrajnom restrikcijom hrane tokom procesa starenja;
8. Razjašnjavanje mogućih mehanizama preko kojih se ostvaruju različiti efekti u ispitivanim strukturama mozga.

3. Materijali i metode

3.1. Eksperimentalne životinje i eksperimentalna procedura

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar stari 6, 18 i 24 meseca iz vivarijuma Instituta za biološka istaživanja "Siniša Stanković". Životinje su gajene po 2-4 u kavezu, pod standardnim uslovima (temperatura: $23\pm 2^{\circ}\text{C}$; relativna vlažnost vazduha: 60-70%; svetlosni režim 12 sati svetlost/12 sati mrak; slobodan pristup vodi). Na početku eksperimenta određena je prosečna dnevna potrošnja hrane po životinji sedmodnevnim merenjem količine hrane koje su životinje konzumirale. Nakon toga su eksperimentalne životinje podeljene u dve grupe. Prva grupa, označena kao *ad libitum* (AL), je imala slobodan pristup hrani, dok je druga grupa životinja (označena kao DR) počevši od 6. meseca starosti podvrgnuta hroničnoj restrikciji hrane prema sledećem režimu: svaki drugi dan životinje su dobijale 100% prosečnog dnevnog unosa hrane AL grupe. Količina hrane za DR grupu je jednom mesečno prilagođavana unosu AL grupe ponovnim merenjem prosečne dnevne potrošnje hrane po životinji. 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 62/10).

Životinje iz obe eksperimentalne grupe su žrtvovane brzom dekapitacijom u trenutku dostizanja određene starosti, tj. kada su napunile 18 i 24 meseca. Na isti način su žrtvovane i životinje stare 6 meseci, koje su predstavljale kontrolnu grupu.

Za lančanu reakciju polimerizacije (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) i imunoblot analizu je iskorišćeno 35 životinja ($n = 5$ životinja za svaku starosnu grupu). Kora velikog mozga (korteks) i hipokampus izolovani su iz mozga žrtvovanih životinja na ledu, kako bi se ublažilo dejstvo proteolitičkih enzima. Eksperimentalni uzorci su dobijeni spajanjem svih uzoraka kortikalnog i hipokampalnog tkiva jedne eksperimentalne grupe. Po 100 mg ovako pulovanog tkiva svake eksperimentalne grupe je odvojeno za izolaciju RNK, dok je ostatak ostavljen na -80°C za dalju izolaciju proteina i merenje količine kortikosterona u tkivu.

Za imunohistohemijska bojenja iskorišćeno je 12 pacova (tri eksperimentalne grupe: 6 meseci stare AL, 24 meseca stare AL i 24 meseca stare DR životinje; n = 4). Nakon izolacije, mozak je fiksiran u 4% paraformaldehidu u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4, 24 sata, a potom je dehidratiran u rastućem gradijentu saharoze (10%, 20% i 30%; Sigma) u 0,1 M fosfatnom puferu. Nakon dehidratacije tkivo je brzo zamrznuto u ohlađenom n-pentanolu i čuvano na -80°C do sečenja. Poprečni preseći mozga debljine 30 µm, 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, preseći su čuvani na -20°C u odgovarajućem rastvoru (40% glicerol i 25% etilen glikol u 0,1 M fosfatnom puferu).

3.2. Određivanje koncentracije kortikosterona u moždanom tkivu pacova

Koncentracija kortikosterona u ispitivanim moždanim tkivima pacova je merana enzimskim imunoesejem velike osetljivosti (Corticosterone EIA, ENZO Life Sciences). Esej predstavlja kompetitivni ELISA test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) u kome je poliklonsko antitelo za kortikosteron vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Uzorci su pripremljeni iz ukupnog ćelijskog ekstrakta, iz kojeg je kortikosteron ekstrahovan tri puta ponovljenim vorteksovanjem sa 5 volumena dietil-etra u trajanju od 10 min. Nakon svakog koraka ekstrakcije smeša je centrifugirana 15 minuta na 4500g u mikrocentrifugi (Centrifuge 5417R; Eppendorf) i dobijene organske faze su spojene. Rastvarač je uparen preko noći na sobnoj temperaturi, i finalni uzorci dobijeni rastvaranjem ekstrahovanog kortikosterona u puferu za esej. Standardi, kontrolni uzorci i nepoznati uzorci su naneti na ploču u duplikatu i inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi sa antitelom za kortikosteron koje je konjugovano sa alkalnom fosfatazom. Ploča je zatim sukcesivno ispirana i dodat je hromogeni supstrat p-nitrofenil fosfat. Nakon jednog sata inkubacije na sobnoj temperaturi, enzimska reakcija je prekinuta dodavanjem trinatrijum fosfata, nakon čega je apsorbancija očitavana na 405 i 570 nm (korekciona OD) pomoću spektrofotometra (Multiskan Spectrum, Thermo Eelectron Corporation, Finska). Intenzitet razvijene boje je bio obrnuto proporcionalan koncentraciji kortikosterona u uzorku. Vrednosti koje su očitane sa semilogaritamske standardne krive (4PL kriva, GraphPad Prism 5)

su izražene u ng/g tkiva. Osetljivost eseja je bila 26.99 pg/ml a unutar- i međuesejske varijacije ispod 6%, odnosno 9%.

3.3. RT-PCR u realnom vremenu

Analiza promena na nivou iRNK urađena je metodom semikvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (RQ-PCR, eng. *relative quantification polymerase chain reaction*). Slično ostalim RT-PCR pristupima, metoda obuhvata najpre korak reverzne transkripcije u kome se ukupna iRNK prevodi u cDNK, i potom korak amplifikacije dela cDNK od interesa. Kod RT-PCR-a u realnom vremenu u svakom ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

3.3.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT)

Ukupna RNK je izolovana iz po 100 mg tkiva korteksa i hipokampusa svih eksperimentalnih grupa TRIZOL reagensom (Gibco BRL, Life Technologies), prema protokolu proizvođača. Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski, a kvalitet izolovane RNK proveren je na 1% agaroznom gelu. Moguća kontaminacija uzoraka hromozomskom DNK otklonjena je tretmanom 10 µg ukupne RNK sa 10 U RNase free DNase I (Fermentas) tokom 30 minuta na 37°C. DNaza I je inaktivirana dodavanjem EDTA i inkubacijom 10 minuta na 65°C, a potom je prečišćena RNK rastvorena u vodi tretiranoj 0.1% dietilpirokarbonatom (DEPC). Za reverznu transkripciju tj. sintezu cDNK je korišćen *High-Capacity cDNA Archive* komercijalni paket (Applied Biosystems) sa nasumičnim heksamerima, po sledećem protokolu: 10 minuta na 25°C, 120 min na 37°C i 5 minuta na 65°C. Reakciona smeša u zapremini od 50 µl je sadržavala: 1x RT pufer, 5.5 mM MgCl₂, 0.5 mM svakog nukleotida, 2.5 µM heksamera, 0.4 U/µl RNaznog inhibitora, 1.25 U/µl *MultiScribe* reverzne transkriptaze i 5 µg RNK.

3.3.2. RQ-PCR

U analizi zastupljenosti odgovarajućih iRNK su korišćeni komercijalni eseji (Assay-on-Demand Gene Expression Product, Applied Biosystems) (Tabela 1). Kao endogena kontrola korišćen je *gapdh* u skladu sa prethodno uređenim validacionim i eksperimentnima međukompatibilnosti eseja za starenje i restrikciju hrane kao tretman (Tanić i saradnici, 2007).

Reakciona smeša je sadžavala 1xTaqMan® Universal Master Mix-a sa AmpErase® Uracil N-glikozilazom (UNG), 1x Assay Mix MGB probe (eng. *minor groove binder probe* obeležene 6-FAM bojom) i 1ng RNK prevedene u cDNK. Korišćen je aparat *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* i sledeći program amplifikacije: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa sa po 15 sekundi na 95°C i zatim 1 minutom na 60°C. Nakon toga je određena vrednost eksperimentalnog praga reakcije (eng. *threshold*), a iz nje tzv. Ct (eng. *threshold cycle*) vrednost.

Tabela 1. Kataloški brojevi komercijalnih eseja korišćenih u reakcijama RQ-PCR-a

<i>gen</i>	<i>Kataloški broj eseja za RQ-PCR (Applied Biosystems)</i>
<i>gfap</i>	<i>Rn00566603_m1</i>
<i>gapdh</i>	<i>Rn99999916_s1</i>

Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja Ct vrednost je korišćena za dalju analizu. Zarad korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije svaki uzorak je normalizovan u odnosu na nivo ekspresije odgovarajuće endogene kontrole. Kvantifikacija je urađena $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom (Livak i Schmittgen, 2001), a statistička značajnost ($p \leq 0.05$) promena je testirana upotrebom kompjuterskog programa *RQ Study Add ON* v 1.1. Za efekte starenja i tretmana u obe ispitivane strukture i za sve ispitivane gene kao kalibrator je korišćen uzorak od 6 meseci, ali je potom, za efekte dugotrajne restrikcije hrane, kao kalibrator postavljana i odgovarajuća starosna kontrola. Rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu kojoj je dodeljena vrednost 1 (srednja vrednost \pm standardna greška).

3.3.3. Semikvantitativni RT-PCR

Semikvantitativnom RT-PCR analizom je određen nivo ekspresije gena od interesa i kontrolnog gena, njihovom paralelnom amplifikacijom u istoj reakcionoj smeši (dupleks PCR). Kao kontrolni geni korišćeni su *gapdh* i β -*aktin* geni. PCR reakcija je izvedena u finalnom volumenu od 25 μ l sa 150 ng cDNA, u reakcionoj smeši koja je sadržala 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP i 1 U Taq polimeraze (Fermentas). Reakcije su izvođene na *GeneAmp*® PCR System 9700 aparatu (Applied Biosystems). Sekvence prajmera su prikazane u Tabeli 2. Sve PCR reakcije su rađene iz dve nezavisne RT reakcije i ponovljene najmanje po tri puta. PCR protokol je bio sledeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 minuta na 95°C, nakon čega je sledio 31 ciklus koji je podrazumevao: denaturaciju (u trajanju od 15 sekundi na 95°C), aniling (u trajanju od 30 sekundi na 58°C) i elongaciju (u trajanju od 30 sekundi na 72°C), sa finalnom elongacijom na 72°C 5 min. Nakon toga uzorci su čuvani na 4°C.

Tabela 2. Sekvence parova prajmera korišćenih u semikvantitativnoj RT-PCR analizi i dužina produkata reakcije

Gen	Sekvence prajmera (5'-3')	Dužina PCR produkta (bp)
mr	AGCTCTTCTGTTAGCAGCCCGCTG CTGAAGTGGCATAGCTGAAGGCAT	472
gr	TGCAAACCTCAATAGGTCGACCAG TAAACTGGGCCAGTTTCTCTTGC	522
sgk-1	GGTGCCTTGCTGAGTTGGT GGGCCTTCACTTCTCTTTCC	597
c-fos	GACCGAGATTGCCAATCTAC GGAAACAAGAAGTCATCAAAGG	296
gapdh	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	306
β-aktin	TGGACATCCGCAAAGACCTGTAC TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	142

PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu. Na gelu je analiziran ukupan reakcioni volumen od 25 μ l u koji je dodato 5 μ l boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu). Nakon elektroforeze u 0.1 M TBE puferu produkti su vizuelizovani na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad) i kvantifikovani upotrebom kompjuterskog programa *Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System* (Gel Doc 1000, Bio Rad). Dobijene vrednosti signala za određeni gen u svakom uzorku su izražene u odnosu na vrednost signala endogene kontrole istog uzorka. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.4. Određivanje nivoa proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova

3.4.1. Izolovanje ukupnih ćelijskih ekstrakata iz moždanih struktura

Kao pufer za liziranje tkiva i izolaciju proteina korišćen je RIPA pufer (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% Na-deoksiholat; 0.1% SDS) u koji je, na 10 ml dodata po jedna tableta komercijalno nabavljenog koktela proteaznih inhibitora (Mini Protease Inhibitors Cocktail, Boehringer M). Tkivo je homogenizovano u 10 zapremina pufera za liziranje specijalnim tučkom za mikropruvete zapremine 1.5 ml (20 zaveslaja), a zatim je homogenat sonifikovan. Homogenat je potom centrifugiran na 20800g, 30 minuta na 4°C, a dobijeni supernatanti koji predstavljaju ukupne ćelijske ekstrakte moždanih struktura su čuvani na -80°C do upotrebe.

3.4.2. Izolovanje citoplazmatične i jedarne frakcije proteina iz tkiva korteksa

Citoplazmatična i jedarna frakcija proteina iz tkiva korteksa izolovane su pomoću komercijalno nabavljenog kompleta (NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Scientific), po uputstvu proizvođača. Ukratko, tkivo je usitnjeno, isprano u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7.4, i centrifugirano na 500g, 5 minuta na 4°C. Supernatant je odbačen, a pelet homogenizovan u odgovarajućem volumenu pufera za izolaciju citoplazmatične frakcije (CER I). Potom je homogenat snažno vorteksovan i inkubiran na ledu. Nakon dodavanja

sledećeg pufera za korak izolacije citoplazmatične frakcije (CER II) i snažnog vorteksovanja, homogenat je centrifugiran na 16000g 5 minuta. Izdvojeni supernatant predstavljao je citoplazmatičnu frakciju, koja je prebačena u nove mikroeprovete i čuvana na -80°C do upotrebe. Talog dobijen u prethodnom koraku, koji je sadržao jedra, je resuspendovan u puferu za lizu jedara (NER) i vorteksovan po 15 sekundi svakih 10 minuta u ukupnom trajanju od 40 minuta. Nakon centrifugiranja na 16000g u trajanju od 10 minuta, izdvojeni supernatant koji je predstavljao jedarnu frakciju proteina je prebačen u nove mikroeprovete i čuvan na -80°C do upotrebe.

3.4.3. Određivanje koncentracije proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima i ćelijskim frakcijama

Koncentracija proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima i ćelijskim frakcijama 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 najpre razblaženi 10 puta (5 µl uzorka i 45 µl mQH₂O) i potom je po 10 µl razblaženog uzorka dodato u 115µl dejonizovane H₂O i 125 µl boje. Nakon 2 h inkubacije na 37°C očitana je apsorbanca na 562 nm korišćenjem ELISA čitača (Bio-Rad Laboratories). Za standardnu krivu korišćene su poznate koncentracije goveđeg albumina seruma (BSA, eng. *Bovine serum albumin*, Sigma).

3.4.4. 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 mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories). 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 i 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 20 ili 40 µg ukupnih proteina. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2xLaemmli pufer (31.25 mM Tris pH 6.8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptioetanol; 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 opsega (10-170 kDa; Fermentas). Elektroforeza se odvijala 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.

3.4.5. Elektrotransfer proteina

Za prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (0.45 µm, Millipore) korišćen je mini sistem za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Gel je najpre ekvilibrisan 15 minuta u puferu za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8.3), a elektrotransfer proteina je vršen tokom 70 minuta, pod konstantnim naponom od 120 V. Po završenom transferu membrane su sušene 2 sata na sobnoj temperaturi da bi se fiksirali preneti proteini. Potom su membrane bojene bojom Ponceau-S (1% boja Ponceau-S; 5% glacijalna sirćetna kiselina), dok su gelovi bojani bojom komazi plavom (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi i potom osušene na sobnoj temperaturi. Do daljeg rada su skladištene na 4°C.

3.4.6. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima - imunoblot metoda

Membrane su inkubirane u rastvorima antitela uz lagano mućkanje. Kao blokirajući agens korišćeno je 5% obrano mleko u prahu ili 2% BSA rastvoren 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. Korišćena su sledeća primarna antitela (razblaženje v/v): zečje anti-GR (1:300; P-20, Santa Cruz); zečje anti-pGR (1:500; Cell Signaling); kozje anti-11 β -HSD1 (1:1000; R&D); zečje anti-CDK5 (1:1000; Santa Cruz); zečje anti-p35 (1:2000; Santa Cruz); zečje anti-FKBP51 (1:1000; Santa Cruz); mišje anti-Hsp90 (1:5000; Santa Cruz); zečje anti-NF κ B (1:1000; Santa Cruz); zečje anti- β -aktin (1:10000; Sigma) i kozje anti-GAPDH (1:1000; Santa Cruz).

Membrane su inkubirane u rastvoru primarnog antitela preko noći na 4°C, a potom ispirane 5 puta po 5 minuta u TBST-u i dalje inkubirane 1h na 4°C, sa odgovarajućim sekundarnim antitelom. Korišćene su dve vrste sekundarnih antitela – antitela direktno obeležena fluorescentnom bojom Aleksa-488 (1:2000; Invitrogen) i antitela obeležena enzimom, peroksidazom rena (HRP, eng. *horse radish peroxidase*). Nakon inkubacije sa fluorescentnim sekundarnim antitelom u mraku, membrane su ispirane 5 puta po 5 minuta u TBST-u i osušene na sobnoj temperaturi. Signal je detektovan na STORM sistemu za neradioaktivnu detekciju (GE Healthcare) upotrebom svetlosti talasne dužine 450 nm. Za detekciju hemiluminiscentnog 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 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.

3.4.7. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet imuno signala na skeniranim membranama i filmovima određen je denzitometrijskom, kvantitativnom analizom korišćenjem programskog paketa Image Quant (Version 5.2, GE Healthcare). Dobijene vrednosti svakog uzorka normalizovane su najpre u odnosu na odgovarajuću endogenu kontrolu 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 6 meseci starih životinja kojoj je dodeljena vrednost 1. Efekat restrikcije hrane izražavan je kao stepen promene u odnosu na vrednosti dobijene za odgovarajuće starosne kontrole.

3.4.8. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka dobijenih analizom imunoblotova korišćen je kompjuterski program STATISTICA 6.0. Najpre je proveravana normalna distribucija dobijenih podataka za svaku eksperimentalnu grupu. Za poređenja između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA (eng. *ANalysis of VAriance*) i potom Fišerov LSD test. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je $p \leq 0.05$. Na graficima, statistički značajne promene u odnosu na grupu od 6 meseci su obeležene simbolom *, ili pak # za promene do kojih je došlo pod uticajem restrikcije hrane, a u odnosu na odgovarajuću starosnu kontrolu.

3.5. Histološke analize

3.5.1. Imunohistohemijsko obeležavanje

Specifično imunohistohemijsko obeležavanje za konfokalnu mikroskopiju urađeno je "free-floating" metodom. Čitav postupak, osim inkubacije u primarnom antitelu, urađen je na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje, a rastvori su pravljani u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7.4. Preseci su najpre dobro isprani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, nakon čega je urađeno demaskiranje antigena u zagrejanom citratnom puferu (10 mM natrijum-citrat, pH 6.0). Nakon ponovnog ispiranja 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, blokirana su mesta nespecifičnog vezivanja antitela inkubiranjem preseka jedan sat u 10% serumu kože (Dako) i 0.1% Triton X-100 (BDH Chemicals) u fosfatnom puferu. Ovako pripremljeni preseci su prebačeni u rastvor zečjeg anti-pGR antitela (1:25; Cell Signaling) u fosfatnom puferu koji je sadržao 1% serum kože i inkubirani preko noći na 4°C. Nevezana primarna antitela uklonjena su ispiranjem u fosfatnom puferu 3 puta po 5 minuta, a zatim su preseci inkubirani 90 minuta sa sekundarnim kozjim-anti-zečjim IgG antitelom (1: 250; Invitrogen) obeleženim Aleksa-488 bojom (zeleno). Preseci su potom opet isprani 5 puta 5 minuta u fosfatnom puferu sa dodatim 0.05% Triton X-100 (BDH Chemicals), nakon čega su postavljeni na SuperFrost® pločice (Dako) i osušeni na vazduhu 30 minuta. Pločice sa presecima su potom potopljene 10 minuta u rastvor DAPI fluorescentne boje (1:1500) koja obeležava jedra ćelija specifično se vezujući za dvolančanu DNK. Pločice su opet ispirane 3 puta po 5 min u fosfatnom puferu i dalje standardno pripremljene nakapavanjem medijuma za fluorescentno mikroskopiranje (Dako). Imunohistohemijsko bojenje je analizirano na konfokalnom mikroskopu *Leica TSC SP8 (Leica Microsystems)*, a fotomikrografije su snimljene digitalnom kamerom (objektiv x63). Odgovarajuća negativna kontrola (bez primarnog antitela) potvrdila je odsustvo nespecifičnog vezivanja.

4. Rezultati

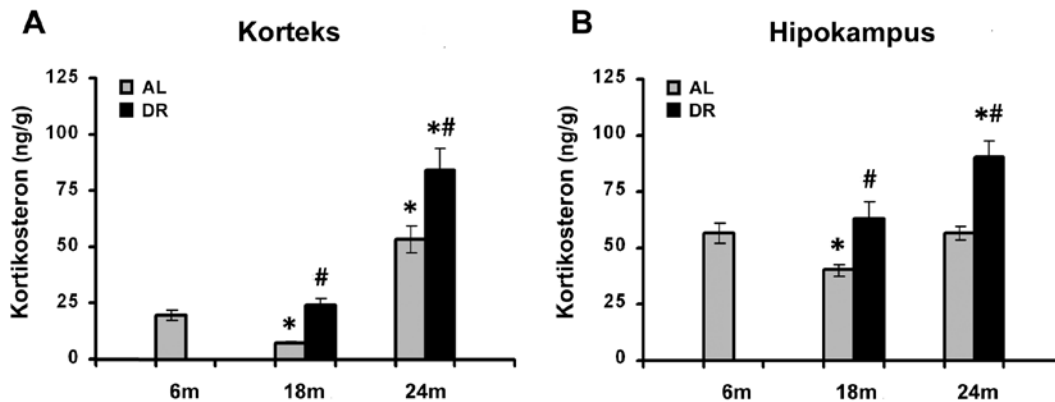
4.1. Nivo kortikosterona u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Koncentracije kortikosterona u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja i kod životinja koje su izlagane dugotrajnoj restrikciji hrane, dobijene enzimskim imunoesejem, prikazane su na Slici 4. Analiza je pokazala da se kod pacova soja Wistar nivo ovog endogenog glukokortikoida menja sa starenjem i pod uticajem restrikcije hrane u obe ispitivane strukture.

Nivo kortikosterona u korteksu 18 meseci starih životinja koje su imale neograničen unos hrane bio je smanjen za 61%, dok je kod 24 meseca starih AL životinja povećan 2,7 puta u odnosu na nivo detektovan kod kontrolne grupe 6 meseci starih životinja (Slika 4A; * $p < 0.05$). U odnosu na istu kontrolnu grupu, koncentracija kortikosterona kod životinja koje su bile podvrgnute restrikciji hrane bila je značajno povećana samo kod najstarije ispitivane grupe životinja, čak 4,3 puta (* $p < 0.05$). Kod grupe 18 meseci starih DR životinja nivo kortikosterona se nije značajno razlikovao od nivoa detektovanog kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci. U odnosu na odgovarajuće starosne kontrole, međutim, detektovani nivo kortikosterona je bio povećan u obe ispitivane starosne tačke u korteksu DR životinja, i to 3,1 put kod 18 meseci starih i za 58% kod 24 meseca starih životinja (# $p < 0.05$).

U hipokampusu je detektovan pad u nivou kortikosterona za 30% kod 18 meseci starih AL životinja, a u odnosu na 6 meseci stare kontrole (Slika 4B; * $p < 0.05$). Kod 24 meseca starih AL životinja nivo kortikosterona je ostao nepromenjen u odnosu na nivo detektovan kod istih kontrolnih životinja, dok je kod životinja podvrgnutih restrikciji hrane detektovan značajan porast nivoa kortikosterona samo kod najstarije ispitivane grupe životinja (za 58%, * $p < 0.05$). Ispitivane DR grupe su imale značajno povišen nivo kortikosterona u hipokampusu i u odnosu na odgovarajuće starosne AL kontrole (za 57% kod 18 meseci starih i za 59% kod 24 meseca starih DR životinja, # $p < 0.05$).

Dobijeni rezultati pokazuju da dugotrajna restrikcija hrane povećava nivo kortikosterona kod obe starosne grupe i u obe analizirane moždane strukture.



Slika 4. Bazalni nivo kortikosterona u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Koncentracija kortikosterona je određena enzimskim imunoesejem u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja i izražena u ng/g tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

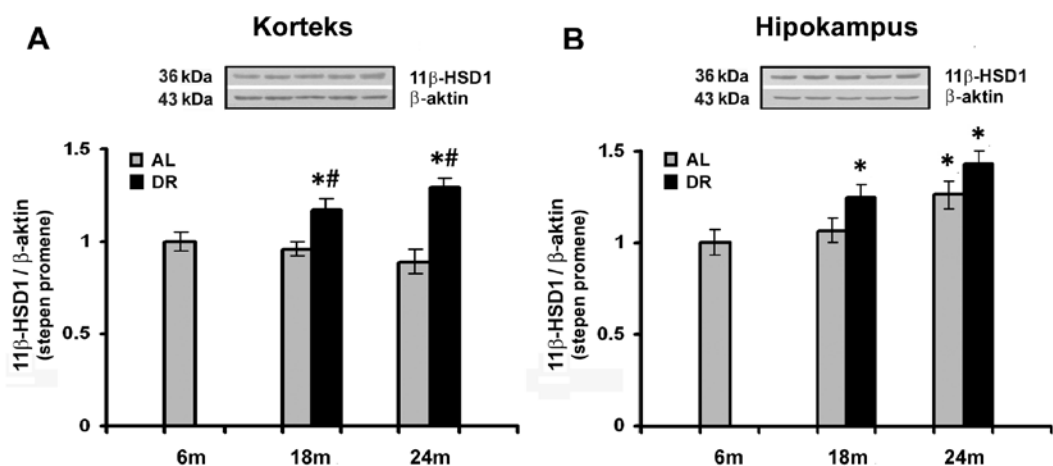
4.2. Analiza zastupljenosti proteina 11β -HSD1 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Enzim 11β -HSD1 lokalno povećava koncentraciju aktivnih glukokortikoida. Da bi se utvrdilo da li postoji korelacija između detektovanih promena u nivou kortikosterona i ekspresije ovog enzima u korteksu i hipokampusu pacova, dalje je analizirana proteinska ekspresija 11β -HSD1.

Analiza rezultata dobijenih imunoblot metodom je pokazala da ekspresija ovog enzima u korteksu tokom starenja ostaje nepromenjena (Slika 5A). Nakon dugotrajne restrikcije hrane dolazi do povećane ekspresije ovog enzima, sa izraženijom promenom kod grupe nastarijih ispitivanih životinja. Nivo detektovan kod grupe 18 meseci starih DR životinja bio je povećan za svega 17%, mada je povećanje statistički značajno, dok je kod DR životinja starih 24 meseca nivo 11β -HSD1 povećan za 30% u odnosu nivo detektovan kod kontrolnih, 6 meseci starih životinja (* $p < 0.05$). Kod obe DR grupe, povećanje je bilo statistički značajno i u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole (za 22% kod 18 meseci starih i za 45% kod 24 meseci starih DR životinja, # $p < 0.05$).

Nivo 11β -HSD1 proteina u hipokampusu 18 meseci starih AL životinja se nije razlikovao od nivoa detektovanog kod životinja starih 6 meseci, dok je kod najstarije ispitivane AL grupe isti bio povećan za 26% (Slika 5B; $*p<0.05$). U obe starosne tačke, nivo ekspresije 11β -HSD1 bio je povećan kod DR grupa životinja (za 25% kod 18 i za 43% kod 24 meseca starih DR životinja, $*p<0.05$).

U obe ispitivane starosne grupe nivo enzima raste nakon dugotrajne restrikcije hrane u odnosu na kontrolne životinje stare 6 meseci, i to u sličnom obimu u obe strukture. U korteksu je nivo 11β -HSD1 značajno povećan u poređenju sa odgovarajućim starosnim kontrolama, dok u hipokampusu nema razlike u ekspresiji 11β -HSD1 između AL i DR grupa iste starosti.



Slika 5. Zastupljenost proteina 11β -HSD1 u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β -Aktin je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. $*p<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); $\#p<0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

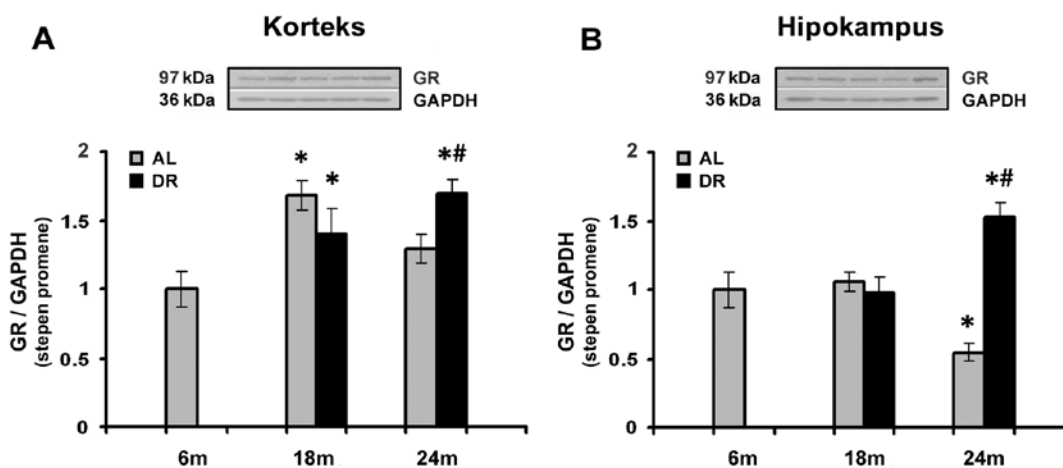
4.3. Analiza zastupljenosti GR iRNK i proteina u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Imunoblot metodom je analizirana zastupljenost proteina GR u korteksu i hipokampusu pacova, kao i efekat dugotrajne restrikcije hrane kod ispitivanih starosnih grupa. Rezultati su prikazani na Slici 6.

Dobijeni podaci pokazuju da je u korteksu AL pacova starih 18 meseci nivo GR-a povećan za 68% u odnosu na nivo uočen kod 6 meseci starih kontrolnih životinja, dok nivo proteina detektovan kod najstarije ispitivane AL grupe nije bio značajno različit od nivoa utvrđenog kod istih kontrola (Slika 6A; * $p < 0.05$). Nakon primene restriktivnog režima ishrane, međutim, dolazi do povećanja u ekspresiji GR-a u odnosu na kontrolnu grupu 6 meseci starih životinja, i to za 40% kod DR grupe životinja starih 18 meseci i za 70% kod DR grupe 24 meseca starih životinja (* $p < 0.05$). Detektovane promene kod DR grupe pacova starih 18 meseci se ne razlikuju od *ad libitum* hranjenih starosnih kontrola, dok 24 meseca stare DR životinje pokazuju značajno povećanu ekspresiju GR proteina i u odnosu na AL grupu iste starosti (za 32%, # $p < 0.05$).

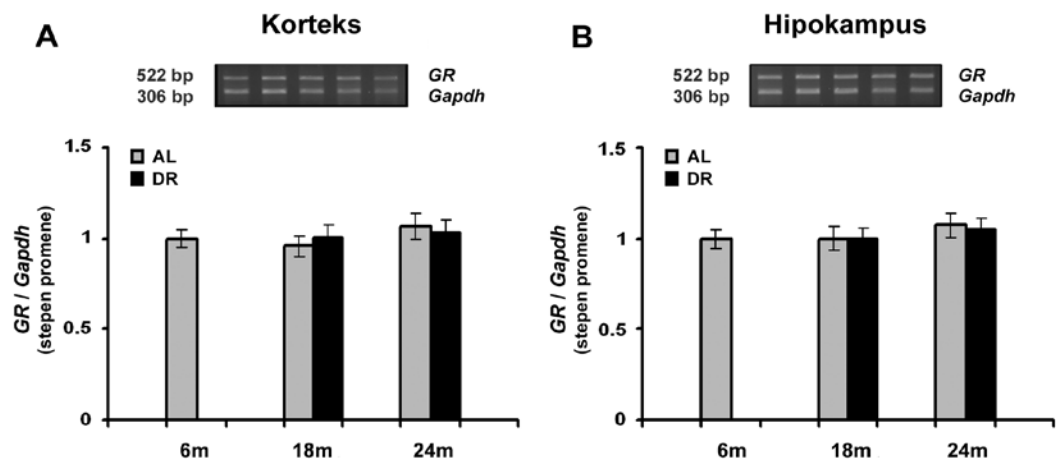
U hipokampusu AL životinja starih 18 meseci nema razlike u nivou GR proteina u poređenju sa ekspresijom detektovanom kod kontrolnih 6 meseci starih životinja, bez obzira na primenjeni režim ishrane (Slika 6B). Međutim, kod najstarije ispitivane grupe, ekspresija GR-a se značajno smanjuje kod AL grupe životinja (za 45% u odnosu na istu kontrolu, * $p < 0.05$), dok se kod DR grupe detektuje povećanje od 53% u nivou ovog proteina u odnosu na nivo detektovan kod 6 meseci starih životinja (* $p < 0.05$). Životinje stare 24 meseca koje su podvrgnute dugotrajnoj restrikciji hrane imaju za 2,8 puta veći nivo GR proteina od *ad libitum* hranjenih pacova iste starosti (# $p < 0.05$).

Dugotrajna restrikcija hrane kao tretman ne utiče na ekspresiju GR-a u odnosu na AL hranjene životinje starosti 18 meseci ni u jednoj od struktura koje su analizirane. Međutim, smanjeni unos hrane kod 24 meseca starih životinja u obe strukture značajno povećava ekspresiju ovog proteina u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole.



Slika 6. Zastupljenost proteina GR u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. GAPDH je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

Da bi se utvrdilo da li su dobijene razlike na proteinskom nivou posledica promenjene transkripcije GR gena tokom starenja ili pod uticajem smanjenog unosa hrane, RT-PCR metodom analiziran je nivo iRNK za GR. Dobijeni rezultati su pokazali da se u obe strukture nivo iRNK za GR ne menja ni kod jedne ispitivane starosne grupe, bez obzira na primenjeni režim ishrane (Slika7).



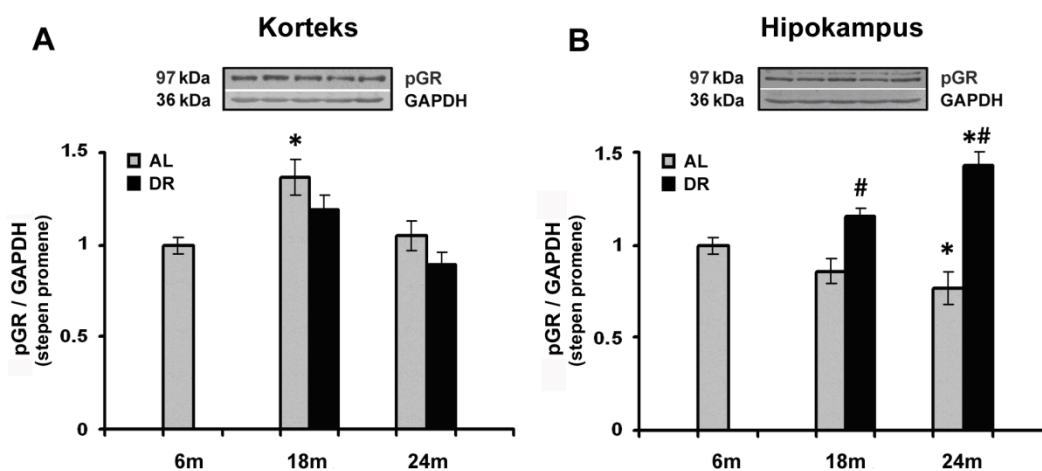
Slika 7. Zastupljenost iRNK za GR u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo ekspresije gena je određen RT-PCR metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. *Gapdh* je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni gel, sa naznačenim dužinama dobijenih produkata. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa genske ekspresije (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1.

4.4. Analiza zastupljenosti fosforilisane forme proteina GR (pGR) u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Fosforilacija GR-a na serinskom ostatku 232 kod pacova koreliše sa aktivacijom ovog receptora. Uzimajući u obzir da su naši rezultati pokazali povećanje ekspresije samog GR-a nakon primene dugotrajne restrikcije hrane, zastupljenost njegove fosforilisane forme razmatrana je kao pokazatelj funkcionalnog statusa receptora. Rezultati dobijeni imunoblot metodom prikazani su na Slici 8.

Analiza dobijenih podataka je pokazala da se nivo pGR-a u korteksu 18 meseci starih životinja koje su imale neograničen pristup hrani povećava za 37% u odnosu na nivo detektovan kod kontrolnih životinja starih 6 meseci (Slika 8A; $*p < 0.05$). Međutim, kod 18 meseci starih životinja kojima je unos hrane bio ograničen, kao i kod 24 meseca starih AL i DR životinja, nivo fosforilisane forme GR-a se nije razlikovao od nivoa detektovanog kod kontrolne grupe životinja starosti 6 meseci.

U hipokampusu, nivo pGR-a kod 18 meseci starih AL životinja se nije razlikovao od nivoa detektovanog kod životinja starih 6 meseci, dok je kod najstarije ispitivane AL grupe zabeležen pad od 27% u odnosu na istu kontrolu (Slika 8B; * $p < 0.05$). Dugotrajna restrikcija hrane je dovela do povećanja nivoa fosforilisane forme receptora kod obe ispitivane starosne grupe u odnosu na *ad libitum* hranjene životinje iste starosti (za 35% kod 18 i za 86% kod 24 meseca starih DR grupa, # $p < 0.05$). Efekat restriktivnog režima ishrane je bio izraženiji kod najstarije ispitivane grupe, gde je nivo pGR-a povećan za 43% i u odnosu na kontrolnu grupu 6 meseci starih životinja (* $p < 0.05$).

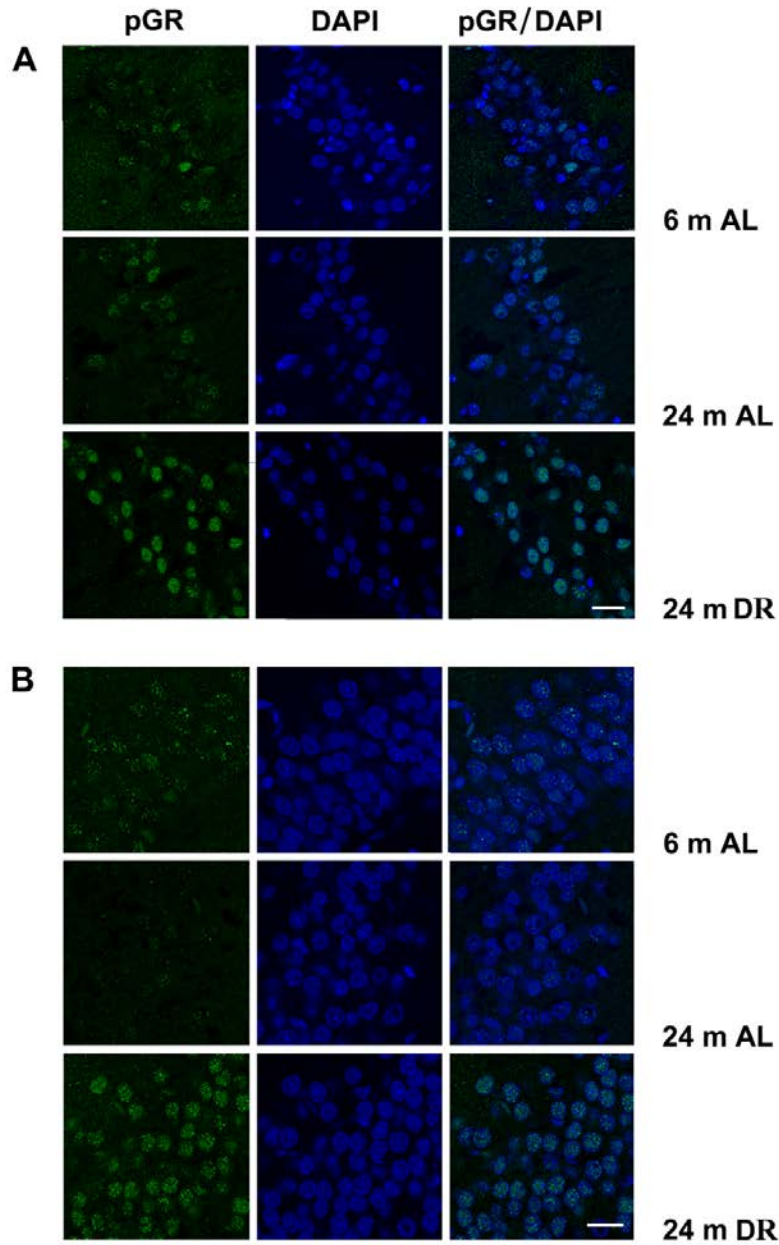


Slika 8. Zastupljenost fosforilisane forme proteina GR (pGR) u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. GAPDH je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.5. Imunohistohemijska lokalizacija pGR-a u hipokampusu 6 i 24 meseca starih pacova

Izražene promene u nivou pGR-a pod uticajem restriktivnog režima ishrane dobijene imunoblot metodom u hipokampusu 24 meseca starih životinja, potvrđene su imunohistohemijskim bojenjem. Dobijeni obrazac bojenja za pGR bio je u saglasnosti sa bojenjem opisanim za nefosforilisanu formu receptora u hipokampalnom tkivu (Morimoto i saradnici, 1996). Signal većeg intenziteta detektovan je u CA1 i CA2 regionima, kao i u dentatnom girusu (DG), dok je obeležavanje u CA3 regionu bilo znatno slabijeg intenziteta.

Imunohistohemijska lokalizacija pGR-a prikazana je na reprezentativnim fotomikrografijama u CA1 regionu hipokampusa (Slika 9A) i granularnom sloju DG (Slika 9B). U cilju potvrde jedarne lokalizacije preseki su obojeni i DAPI kontrastnom bojom. Na Slici 9 se uočava tačkast obrazac pGR imunohistohemijskog obeležavanja u oba prikazana hipokampalna regiona kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci, pri čemu su pojedina jedra bez jasno uočljive pravilnosti intenzivnije obojena u odnosu na druga. Kod životinja starih 24 meseca koje su imale slobodan pristup hrani uočava se smanjenje u intenzitetu pGR bojenja u odnosu na kontrolnu grupu 6 meseci starih životinja, dok se u grupi pacova starih 24 meseca kojima je unos hrane bio ograničen jasno uočava povećan intenzitet bojenja, ponovo u oba ispitivana regiona. Pored toga, pGR signal je kod 24 meseca starih DR životinja bio uglavnom smešten u jedrima piramidalnih neurona CA1 regiona i granularnih ćelija dentatnog girusa. Intenzitet bojenja u jedarnim regionima kod 24 meseca starih DR životinje je bio veći i od pGR signala detektovanog u jedrima kontrolne grupe životinja starih 6 meseci.



Slika 9. Reprezentativne fotomikrografije koronalnih kriopreseka hipokampusa bojenih na pGR u nivou CA1 regiona (A) i granularnog sloja DG (B). Bojeni su preseki kontrolnih pacova starih 6 meseci (6m), kao i 24 meseca starih pacova hranjenih *ad libitum* (24m AL) i podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (24m DR). Na presecima životinja izloženih dugotrajnoj restrikciji hrane uočava se izražena jedarna lokalizacija pGR (zeleno), potvrđena bojenjem kontrastnom DAPI bojom (plavo). Skala - 20 μ

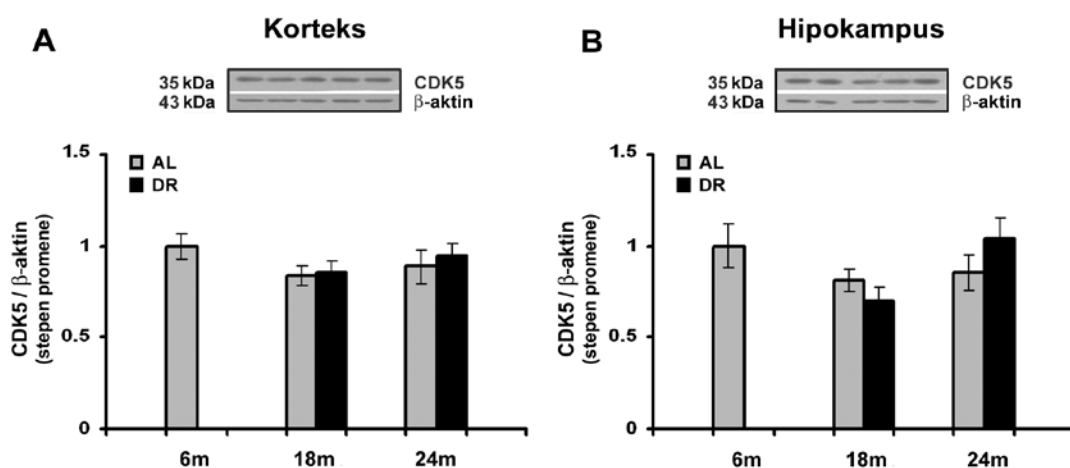
4.6. Analiza zastupljenosti proteina CDK5 i p35/25 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Enzim CDK5 pripada grupi kinaza za koje je poznato da mogu da fosforilišu GR na serinskom ostatku 232 u moždanom tkivu pacova. Shodno tome, promene u nivou ove kinaze ili u nivoima njenih aktivatorskih proteina mogu biti u osnovi razlika u fosforilacionom statusu GR-a koje su uočene kod različitih eksperimentalnih grupa u našem modelu. Stoga je dalje ispitana ekspresija CDK5 kinaze i njenih aktivatora p35 i p25 imunoblot metodom.

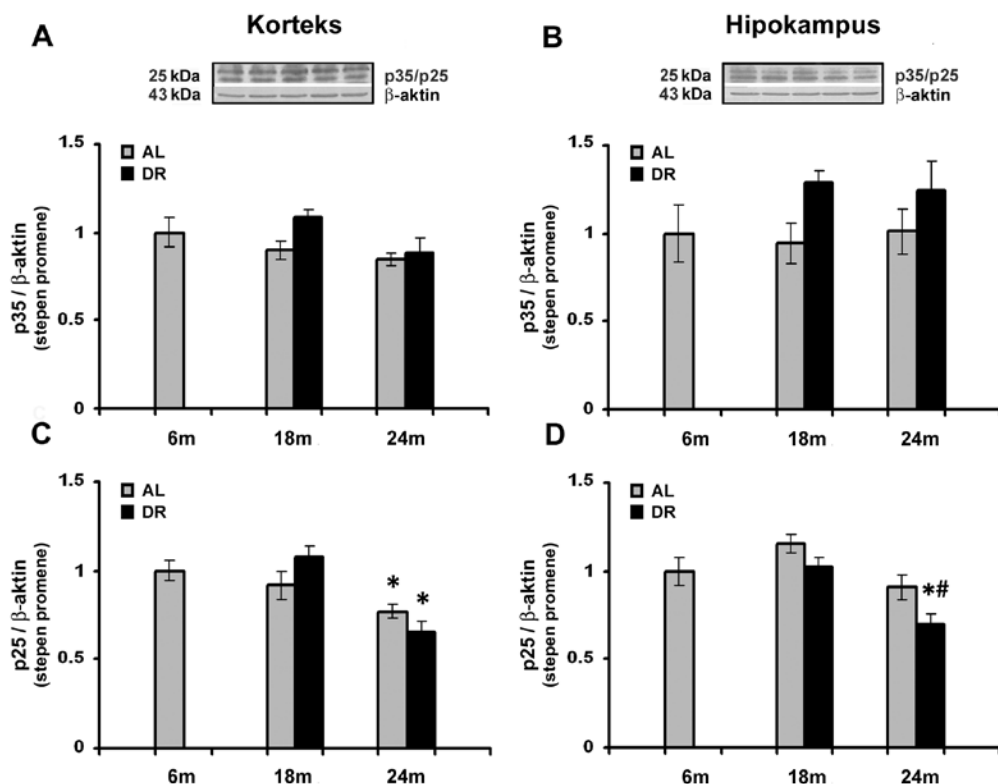
Analiza dobijenih rezultata je pokazala da u obe analizirane strukture ne postoje značajne razlike u nivou CDK5 proteina ni kod jedne od ispitivanih grupa, bez obzira na primenjeni režim ishrane (Slika 10A i B). Takođe, nivo p35 aktivatora se ne menja u korteksu i hipokampusu ni tokom starenja, ni nakon primene dugotrajne restrikcije hrane kao tretmana (Slika 11A i B). Nivo fragmenta p25 takođe ostaje nepromenjen u obe strukture kod grupa životinja starih 18 meseci, hranjenih i AL i podvrgnutih restriktivnom režimu ishrane.

U korteksu životinja starih 24 meseca koje su imale slobodan pristup hrani nivo p25 je, međutim, smanjen za 23% u odnosu na nivo detektovan kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci (Slika 11C, * $p < 0.05$). Životinje stare 24 meseca, kojima je unos hrane bio ograničen takođe imaju smanjen nivo p25 u odnosu na nivo detektovan kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci (za 34%, * $p < 0.05$), ali detektovani nivo nije značajno različit od nivoa kod AL kontrola iste starosti. Dobijeni rezultati pokazuju da izlaganje dugotrajnoj restrikciji hrane ne menja nivo p25 proteina u korteksu pacova u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole, kao i da smanjenje unosa hrane ne utiče na pad u nivou ovog proteina do koga dolazi u grupi 24 meseca starih životinja. Dugotrajna restrikcija hrane kao tretman u hipokampusu životinja starih 24 meseca dovodi do pada u nivou p25 proteina za 30% u odnosu na nivo detektovan kod 6 meseci starih životinja, a pad je značajan i u odnosu na nivo proteina detektovan u AL grupi iste starosti (smanjenje za 23% u odnosu na AL starosnu kontrolu, Slika 11D; # $p < 0.05$).

Analiza uticaja primenjenog restriktivnog režima ishrane na ekspresiju kinaze CDK5 i njenih aktivatorskih proteina je pokazala da DR kao tretman utiče na obradu aktivatorskog proteina p35 u hipokampusu 24 meseca starih životinja koja se ogleda u smanjenju nivoa njegovog proteolitičkog fragmenta p25.



Slika 10. Zastupljenost proteina CDK5 u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β -Aktin je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1



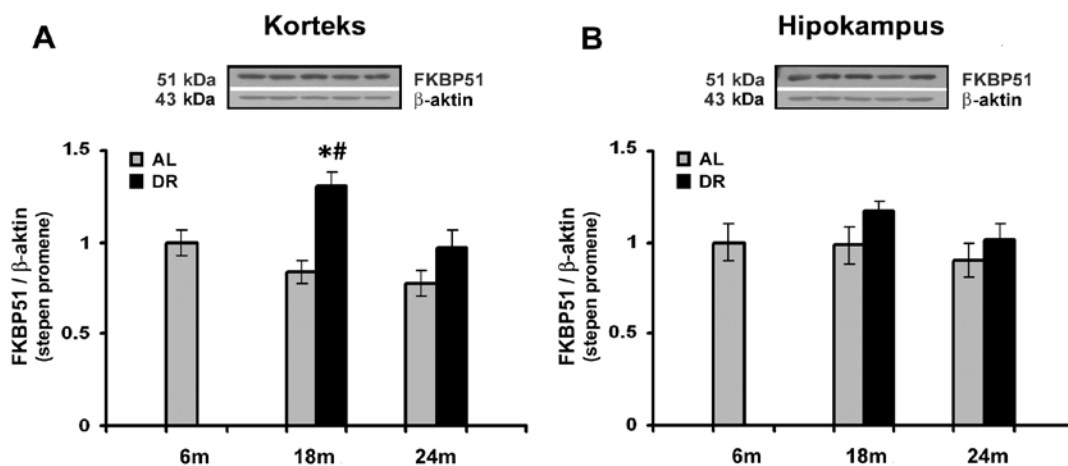
Slika 11. Zastupljenost proteina p35 (A i B) i p25 (C i D) u korteksu (A i C) i hipokampusu (B i D) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β-Aktin je korišćen kao endogena kontrola. Grafikonima su pridruženi reprezentativni imunoblotovi sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost ± standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.7. Analiza zastupljenosti proteina FKBP51 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

GR receptorski kompleks se nakon aktivacije indukovane vezivanjem liganda transportuje do jedra kako bi mogao da ostvari ulogu koju ima kao transkripcioni regulator. Protein FKBP51 smanjuje transkripcionu aktivnost GR-a zadržavajući receptor u citoplazmi, zbog čega je dalje analizirana njegova ekspresija da bi se utvrdilo da li promene u nivou ovog

proteina doprinose pokazanim strukturnim razlikama u lokalizaciji aktivnog receptora u ispitivanom modelu.

Rezultati ekspresije proteina FKBP51 u korteksu i hipokampusu pacova tokom starenja i pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane su dobijeni imunoblot metodom i prikazani na Slici 12. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da je u korteksu jedina statistički značajna promena na nivou proteina FKBP51 predstavljala porast kod životinja starih 18 meseci koje su bile podvrgnute restriktivnom režimu ishrane, i to za 30% u odnosu na nivo utvrđen kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci (Slika 12A; * $p < 0.05$). Pokazani porast je bio značajan i odnosu na AL grupu iste starosti (za 55%, # $p < 0.05$). Kod 24 meseca starih životinja nisu detektovane promene u nivou ekspresije ovog proteina, bez obzira na režim ishrane. Ekspresija proteina FKBP51 je bila nepromenjena i u hipokampusu, bez obzira na starost životinja kao i na to da li su životinje imale slobodan pristup hrani ili je količina hrane koju su unosile bila ograničena (Slika 12B).



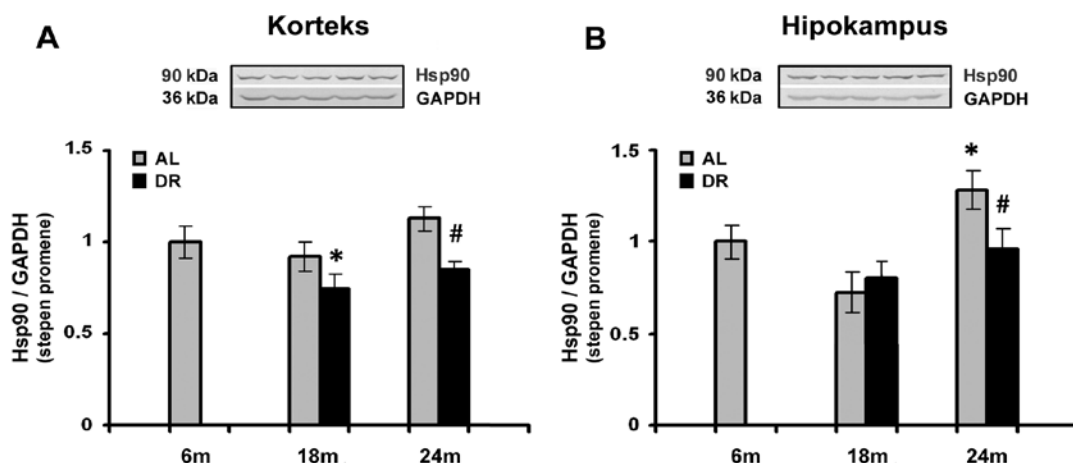
Slika 12. Zastupljenost proteina FKBP51 u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β -Aktin je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.8. Analiza zastupljenosti proteina Hsp90 u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Da bi smo dalje utvrdili da li dugotrajna restrikcija hrane tokom procesa starenja utiče na komponente GR receptorskog kompleksa, analizirali smo ekspresiju proteina Hsp90. Rezultati dobijeni imunoblot metodom prikazani su na Slici 13.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da tokom starenja u korteksu pacova ne dolazi do promene u nivou proteina Hsp90 (Slika 13A). Pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane dolazi do pada u nivou ovog šaperona u korteksu 18 meseci starih životinja za 25% u odnosu na kontrolnu grupu životinja starih 6 meseci (* $p < 0.05$), međutim detektovan nivo se ne razlikuje značajno od nivoa izmerenog kod odgovarajućih starosnih kontrola. Kod grupe životinja starih 24 meseca koje su bile na restriktivnom režimu ishrane detektovan nivo proteina Hsp90 se ne razlikuje od nivoa kod 6 meseci starih kontrolnih životinja, ali je značajno smanjen u odnosu na *ad libitum* hranjene životinje iste starosti (za 25%, # $p < 0.05$).

U hipokampusu 18 meseci starih AL hranjenih životinja, kao i u korteksu, nisu detektovane promene u ekspresiji proteina Hsp90 (Slika 13B). Međutim, u hipokampusu najstarije ispitivane AL grupe dolazi do porasta nivoa ovog proteina za 28% u odnosu na nivo detektovan kod kontrolnih životinja starih 6 meseci (* $p < 0.05$). Izlaganje dugotrajnoj restrikciji hrane ne dovodi do promena u ekspresiji proteina Hsp90 kod 18 meseci starih životinja, ali kod grupe 24 meseca starih životinja smanjuje nivo proteina Hsp90 u odnosu na *ad libitum* hranjene životinje iste starosti (za 25%, # $p < 0.05$), čime održava nivo ovog šaperona nepromenjenim u odnosu na 6 meseci stare kontrolne životinje.

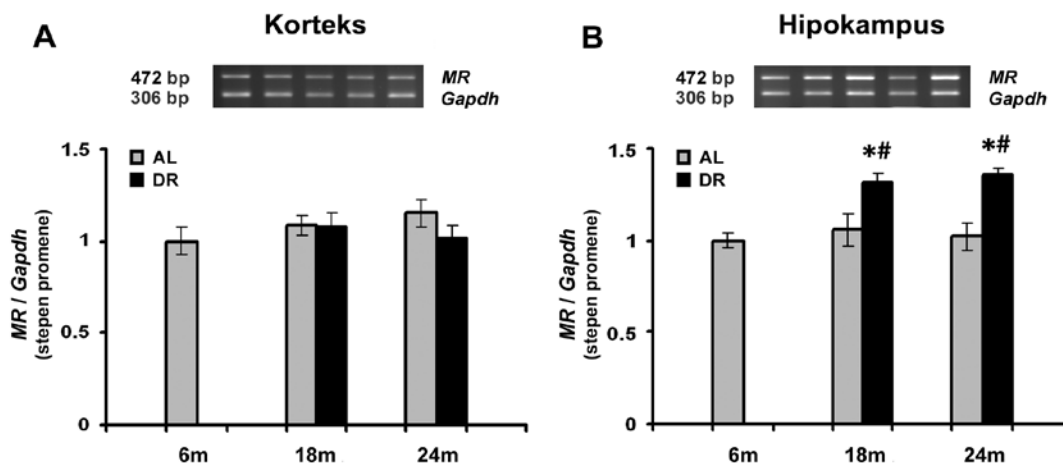


Slika 13. Zastupljenost proteina Hsp90 u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. GAPDH je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost ± standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.9. Analiza zastupljenosti iRNK za MR u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

U ispitivanim regionima mozga pacova finalni odgovor na glukokortikoidni signal determiniše balans MR i GR receptora. Stoga smo u korteksu i hipokampusu ispitali ekspresiju MR-a na iRNK nivou primenom RT-PCR metode (Slika 14).

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da je nivo iRNK za MR nepromenjen u korteksu tokom starenja, bez obzira na režim ishrane kojem su životinje bile izložene (Slika 14A). U hipokampusu se nivo iRNK za MR takođe nije menjao kod *ad libitum* hranjenih životinja starih 18 i 24 meseca, ali su životinje iz obe ispitivane starosne grupe koje su bile na restriktivnom režimu ishrane pokazale povećanu ekspresiju MR-a (Slika 14B). Nivo izmeren kod DR grupa je bio značajno povećan kako u odnosu na AL starosne kontrole (za 24% kod 18 i za 33% kod 24 meseca starih DR životinja, # $p < 0.05$), tako i odnosu na nivo detektovan kod 6 meseci starih životinja (za 31% kod 18 i za 36% kod 24 meseca starih DR životinja, * $p < 0.05$).



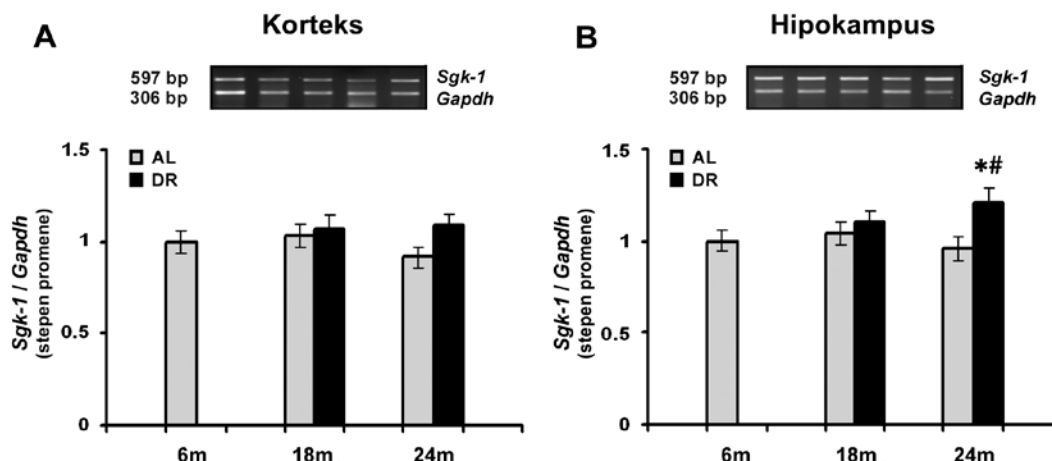
Slika 14. Zastupljenost iRNK za MR u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo ekspresije gena je određen RT-PCR metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. *Gapdh* je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni gel, sa naznačenim dužinama dobijenih produkata. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa genske ekspresije (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.10. Analiza zastupljenosti iRNK za *sgk-1* u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Promotorski region *sgk-1* (eng. *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*) gena sadrži ponovljene GRE sekvence, posredstvom kojih glukokortikoidi stimulišu ekspresiju ovog gena kod ljudi i pacova (Webster i saradnici, 1993; Itani i saradnici, 2002). Određivanje nivoa ekspresije ovog gena je podatak koji ukazuje na aktivnost GR-a kao transkripcionog regulatora u našem modelu.

Analiza rezultata dobijenih RT-PCR-om je pokazala da starenje ne utiče na nivo iRNK za *sgk-1* ni u jednoj od ispitivanih moždanih struktura (Slika 15). U korteksu se nivo ekspresije ovog gena ne menja kod životinja kojima je smanjen unos hrane, kako u odnosu na životinje iste starosti hranjene *ad libitum*, tako i u odnosu na 6 meseci stare kontrolne životinje. Dugotrajna restrikcija hrane kao tretman u hipokampusu pokazuje efekat samo kod grupe 24 meseca starih životinja. Detektovani porast u nivou iRNK za *sgk-1* u hipokampusu najstarije ispitivane grupe

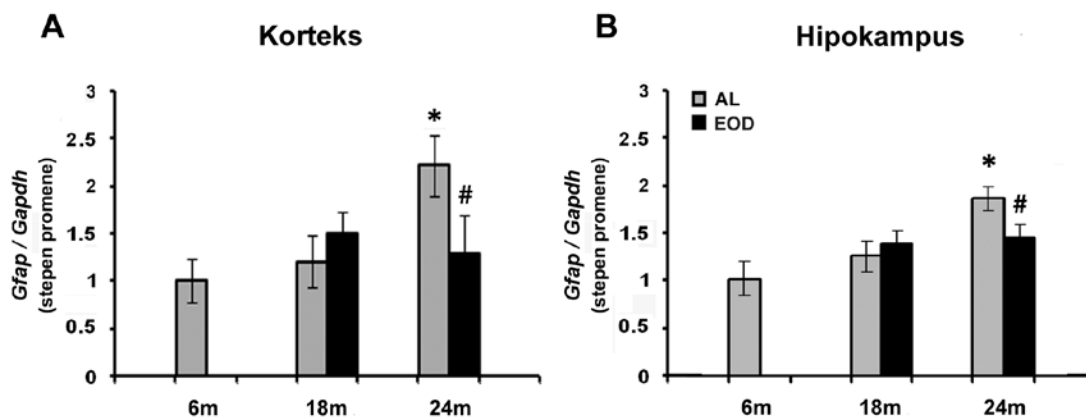
je bio značajan kako u poređenju sa AL starosnim kontrolama (za 26%, Slika 15B; # $p < 0.05$), tako i u odnosu na nivo izmeren kod 6 meseci starih kontrolnih životinja (za 21%, Slika 15B; * $p < 0.05$).



Slika 15. Zastupljenost iRNK za *sgk-1* u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo ekspresije gena je određen RT-PCR metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. *Gapdh* je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni gel, sa naznačenim dužinama dobijenih produkata. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa genske ekspresije (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

4.11. Analiza zastupljenosti iRNK za *Gfap* u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Poznato je da se tokom starenja povećava nivo *Gfap*-a, koji odražava povećanu inflamaciju, kao i da primena dugotrajne restrikcije hrane kao tretmana smanjuje ekspresiju ovog gena. U cilju potvrde antiinflamatornog dejstva glukokortikoida u našem modelu dalje je ispitana ekspresija *Gfap* gena na iRNK nivou. Rezultati dobijeni metodom RT-PCR-a u realnom vremenu su prikazani na Slici 16.

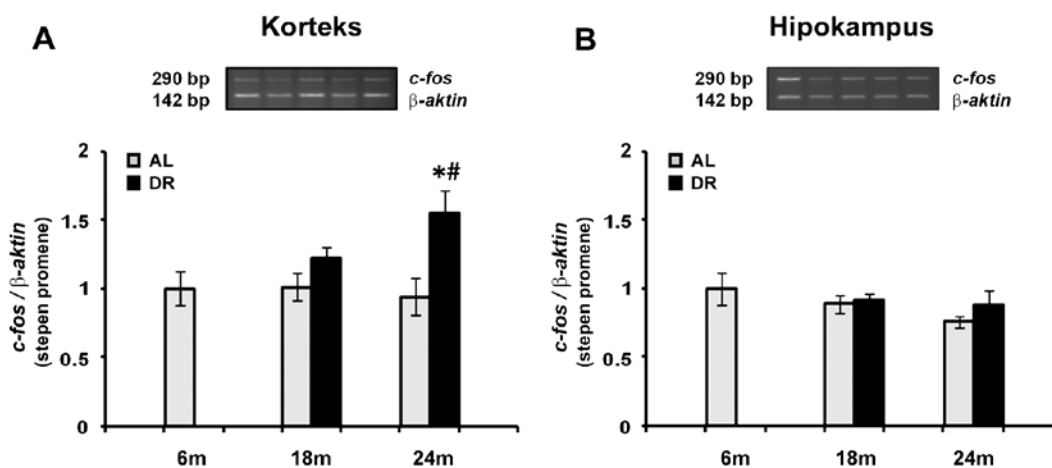


Slika 16. Zastupljenost iRNK za Gfap u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo ekspresije gena je određen metodom RT-PCR-a u realnom vremenu u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. *Gapdh* je korišćen kao endogena kontrola. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa genske ekspresije (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

U obe ispitane strukture nivo ekspresije ovog gena se menja sa starenjem, kao i pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane kao tretmana. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da tokom starenja u obe strukture dolazi do postepenog porasta u nivou iRNK za Gfap, koji kod najstarije ispitivane grupe AL životinja dostiže statistički značajno povećanje u odnosu na nivo detektovan kod kontrolne grupe 6 meseci starih životinja. Detektovano povećanje nivoa ekspresije je izraženije u korteksu 24 meseca starih životinja, gde je izmereni nivo Gfap-a 2,2 puta veći od nivoa ekspresije ovog gena kod 6 meseci starih kontrola (Slika 16A; * $p < 0.05$), dok je u hipokampusu nivo iRNK za Gfap povećan za 85% kod najstarije ispitane grupe u odnosu na nivo detektovan kod kontrolnih životinja starih 6 meseci (Slika 16B; * $p < 0.05$). Kod životinja na dugotrajnoj restrikciji hrane nivo iRNK za Gfap se održava nepromenjenim u odnosu na nivo izmeren kod kontrolne grupe 6 meseci starih životinja u obe ispitane strukture. Ekspresija ovog gena je značajno smanjena kod 24 meseca starih DR životinja u odnosu na odgovarajuće starosne AL grupe, a promena je opet intenzivnija u korteksu (za 43% u korteksu, Slika 16A, i za 22% u hipokampusu, Slika 16B; # $p < 0.05$).

4.12. Analiza zastupljenosti iRNK za *c-fos* u korteksu i hipokampusu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Da bismo ispitali da li dugotrajna restrikcija hrane tokom starenja utiče na aktivnost neurona, analizirali smo ekspresiju *c-fos* gena na nivou iRNK. Rezultati dobijeni RT-PCR metodom su prikazani na Slici 17.



Slika 17. Zastupljenost iRNK za *c-fos* u korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo ekspresije gena je određen RT-PCR metodom u odgovarajućim tkivima 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β -aktin je korišćen kao endogena kontrola. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa genske ekspresije (srednja vrednost \pm standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

Dobijeni rezultati su pokazali da starenje ne utiče na ekspresiju *c-fos* gena ni u jednoj od analiziranih struktura u mozgu pacova. Dugotrajna restrikcija hrane primenjena kao tretman u korteksu nema uticaja na nivo iRNK za *c-fos* kod 18 meseci starih životinja, ali kod najstarije grupe životinja dovodi do povećanja nivoa ekspresije ovog gena. Nivo izmeren u korteksu 24 meseca starih DR životinja je značajno veći kako u odnosu na AL hranjene starosne kontrolne životinje (za 65%, Slika 17A; # $p < 0.05$), tako i u odnosu na kontrole stare 6 meseci (za 55%,

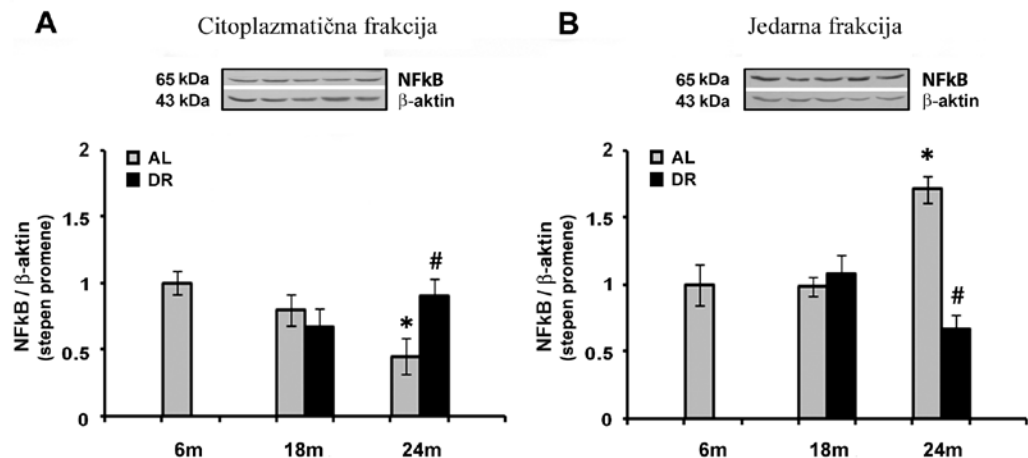
Slika 17A; $*p < 0.05$). Za razliku od korteksa, u hipokampusu ne dolazi do promene u nivou iRNK za c-fos kod DR životinja ni u jednoj od ispitivanih starosnih grupa (Slika 17B).

4.13. Analiza unutarćelijske raspodele proteina NFκB u korteksu pacova različite starosti - uticaj dugotrajne restrikcije hrane

Hronična restrikcija hrane koju smo primenili kao tretman ostvaruje isti efekat na nivo iRNK za gfap u obe strukture. Pošto naši rezultati pokazuju da u korteksu AL i DR životinja starih 24 meseca nema razlike u nivou pGR-a, analizirali smo unutarćelijsku raspodelu drugog transkripcionog regulatora, NFκB, kako bismo ispitali da li je promenjeni balans ova dva transkripciona regulatora u jedru omogućio da restrikcija hrane i bez značajne razlike u nivou aktivacije GR-a ostvari antiinflamatorno dejstvo u korteksu starih životinja. Rezultati unutarćelijske raspodele proteina NFκB dobijeni imunoblot metodom prikazani su na Slici 18.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da tokom starenja u korteksu pacova dolazi do smanjenja nivoa NFκB u citoplazmi (Slika 18A), i premeštanja ovog transkripcionog regulatora u jedro (Slika 18B). U citoplazmatskoj frakciji korteksa 24 meseca starih životinja nivo NFκB se smanjuje za 55% u odnosu na nivo izmeren kod kontrolne grupe životinja starih 6 meseci (Slika 18A; $*p < 0.05$), dok se u jedarnoj frakciji iste grupe životinja detektuje povećanje nivoa ovog transkripcionog regulatora za 71% u odnosu na grupu 6 meseci starih životinja (Slika 18B; $*p < 0.05$). Nasuprot tome, pod uticajem restrikcije hrane, nivo NFκB se u unutarćelijskim frakcijama korteksa pacova održava nepromenjenim u odnosu na 6 meseci stare kontrolne životinje. Detektovani nivo NFκB u citoplazmatskoj frakciji korteksa kod 24 meseca starih životinja koje su podvrgnute restrikciji hrane je dva puta veći u odnosu na AL starosne kontrole (Slika 18A; $\#p < 0.05$), dok je u jedarnoj frakciji značajno smanjen u odnosu na životinje iste starosti kojima je hrana bila dostupna bez ograničenja (za 61%, Slika 18B; $\#p < 0.05$).

Korteks



Slika 18. Zastupljenost proteina NFκB u citoplazmatičnoj (A) i jedarnoj (B) frakciji proteina izolovanih iz korteksa pacova hranjenih *ad libitum* (AL, sivi stubići) ili podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane (DR, crni stubići) tokom starenja. Relativni nivo proteina je određen imunoblot metodom u odgovarajućim frakcijama 6, 18 i 24 meseca (m) starih životinja. β-Aktin je korišćen kao endogena kontrola. Svakom grafikonu je pridružen reprezentativni imunoblot sa naznačenim molekulskim težinama proteina. Rezultati su izraženi kao stepen promene relativnih vrednosti nivoa proteina (srednja vrednost ± standardna greška) u odnosu na vrednost dobijenu kod kontrolne grupe (6m) kojoj je dodeljena vrednost 1. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu (6m); # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću starosnu AL grupu

5. Diskusija

Literaturni podaci o efektima glukokortikoida i njihovoj ulozi u starenju mozga nisu konzistentni. Hipoteze koje se baziraju na stavu da hronično izlaganje glukokortikoidima i stresu promovišu proces starenja mozga, posebno u hipokampusu (Landfield i saradnici, 1978; Sapolsky i saradnici, 1986; McEwen 1992; Porter i Landfield, 1998; Conrad 2008), potkrepljene su studijama u kojima je pokazano da se različite promene do kojih dolazi tokom procesa starenja mogu ubrzati u uslovima koji povećavaju nivo glukokortikoida ili usporiti blokiranjem uticaja ovih hormona (de Kloet, 2008; Meaney i saradnici, 1988; Sapolsky i saradnici, 1986; Wei i saradnici, 2007; Seckl i Meaney, 2004; Issa i saradnici, 1990). U skladu sa tim, pokazano je da sa starenjem raste koncentracija kortikosterona u plazmi kod životinja i ljudi (Meaney i saradnici, 1995; Sabatino i saradnici, 1991; Patel i Finch, 2002, Yau i saradnici, 1995; Lupien i saradnici, 1998) i da ovaj porast koreliše sa kognitivnim poremećajima (Issa i saradnici, 1990; Meaney i saradnici, 1995; Yau i saradnici, 1995; Lupien i saradnici, 1996, 1998). U pojedinim studijama, međutim, nisu nađene promene u bazalnom nivou glukokortikoida u plazmi tokom starenja (Meijer i saradnici, 2005, Segar i saradnici, 2009). Takođe, druge studije su pružile dokaze da glukokortikoidi ne ubrzavaju starenje mozga i da na neke od promena do kojih dolazi sa starenjem deluju u pravcu suprotnom od procesa starenja (Chrousos i Kino, 2009; Swaab i saradnici, 2005; O'Callaghan i saradnici, 1989; Nichols i Finch, 1994; McReynolds i saradnici, 2010; Beerli i saradnici, 2012; Landfield i saradnici, 2007). Razmatranje dejstva glukokortikoida dodatno komplikuje i zavisnost efekata koje izazivaju od koncentracije hormona. Poznato je da njihovo delovanje karakteriše invertovani U-oblik zavisnosti doze i funkcije, tačnije da i visoki i niski nivoi hormona mogu imati štetne posledice, a da je odgovarajuća količina sekretovanih glukokortikoida neophodna za održavanje optimalnih kognitivnih funkcija (de Kloet i saradnici, 1999; Herman, 2013; Joëls, 2006).

U mnogim studijama dejstvo glukokortikoida se razmatra u skladu sa koncentracijom hormona koja je detektovana u plazmi u datoj eksperimentalnoj postavci i zastupljenošću intracelularnih receptora u ciljnom tkivu. Poznato je da pacovi izloženi DR imaju povećan nivo

kortikosterona u plazmi u odnosu na one hranjene AL (Sabatino i saradnici, 1991; Wan i saradnici, 2003; Mager i saradnici, 2006). Međutim, pravac i obim u kom se menja koncentracija glukokortikoida koja se detektuje u plazmi ne mora da odgovara promenama u koncentraciji hormona koja se detektuje u mozgu (Droste i saradnici, 2009a, Droste i saradnici, 2009b, Croft i saradnici, 2008, Lengvári i Liposits, 1977, Little i saradnici, 2008). Za razmatranje efekata glukokortikoida je stoga neophodno utvrditi nivo hormona u samom ciljnom tkivu. Studija u kojoj je praćen nivo kortikosterona u mozgu tokom starenja je pokazala da sa starenjem dolazi do povećanja bazalnog nivoa slobodnog hormona u korteksu i hipokampusu (Garrido i saradnici, 2012a), ali ni u jednoj studiji do sada nije ispitano na koji način se povećanje kortikosterona u plazmi životinja na restrikciji hrane odražava na nivo hormona u mozgu.

Rezultati dobijeni u našem modelu su pokazali da nivo hormona u korteksu raste sa starenjem, dok u hipokampusu nije detektovan porast koncentracije kortikosterona. Isti nivo kortikosterona u hipokampusu 6 i 24 meseca starih životinja u našem modelu je suprotnosti sa studijom Garrido i saradnika, verovatno usled razlike u primenjenoj metodologiji, jer su autori navedene studije odredili nivo slobodnog kortikosterona, dok je u našoj eksperimentalnoj postavci određen ukupan kortikosteron u ciljnom tkivu. Sa druge strane, obe ispitivane strukture u našem modelu pokazuju isti odgovor na tretman dugotrajnom restrikcijom hrane, jer je detektovan porast nivoa kortikosterona u obe ispitivane starosne tačke i u korteksu i u hipokampusu u odnosu na AL hranjene životinje. Povećanje nivoa kortikosterona u odgovoru na stres je odlika pravilnog funkcionisanja HHA ose, i ako se primenjeni tretman razmatra kao blagi stresor, ovo povećanje u nivou kortikosterona može ukazati na očuvano funkcionisanje HHA ose kod životinja kojima je unos hrane smanjen. Porast u nivou kortikosterona je adaptivni odgovor na stresne situacije i važan je i za pravilno odvijanje kognitivnih funkcija. U skladu sa tim je i skorašnja studija koja pokazuje da je niža sekrecija kortikosterona u odgovoru na akutni stres kod starijih povezana sa slabijom deklarativnom i radnom memorijom (Almela i saradnici, 2014). Detektovani porast nivoa kortikosterona u korteksu DR životinja može biti posledica i povećanog nivoa 11β -HSD1, jer životinje izložene hroničnoj restrikciji hrane pokazuju viši nivo ovog enzima u korteksu u odnosu na nivo detektovan kod AL starosnih kontrola. Međutim, u korteksu starih AL životinja nema povećanja u nivou ovog enzima, dok je nivo hormona

značajno povećan u odnosu na 6 meseci stare životinje. Povećanje kortikosterona u korteksu starih AL životinja se dešava u odsustvu promena na nivou 11 β -HSD1, GR-a i pGR-a što ukazuje na poremećaje u odgovoru na hormon u ovoj strukturi. Sa druge strane, povećanje u nivou 11 β -HSD1 u hipokampusu najstarije ispitane AL grupe nije praćeno povećanjem u nivou hormona. Mada literaturni podaci pokazuju da povećan nivo glukokortikoida može indukovati transkripciju 11 β -HSD1 (Sai i saradnici, 2008), u obe ispitane strukture 24 meseca starih AL životinja u našem modelu ovakva regulacija izostaje. U korteksu se nivo hormona povećava bez promene u nivou enzima, a u hipokampusu porast nivoa enzima nije praćen porastom u nivou hormona, što ukazuje da starenje remeti regulatorne mehanizme kojima glukokortikoidi utiču na ekspresiju 11 β -HSD1 na strukturno-specifičan način.

Ekspresija 11 β -HSD1 u strukturama mozga koje predstavljaju važne regulatore aktivnosti HHA ose (prefrontalni korteks, hipokampus, hipotalamus i hipofiza) govori tome da ovaj enzim može uticati na aktivnost HHA ose. Očekivalo bi se da koncentracija glukokortikoida u plazmi bude viša u slučaju gubitka enzimske reaktivacije glukokortikoida u ovim strukturama. To je i pokazano kod miševa koji su deficitarni za 11 β -HSD1 i koji ispoljavaju smanjenu osetljivost HHA ose na glukokortikoide (povećane jutarnje vrednosti koncentracije kortikosterona, povećane adrenalne žlezde i prekomeran glukokortikoidni odgovor na stres) (Harris i saradnici, 2001). Povećana ekspresija 11 β -HSD1 i povećani nivo kortikosterona kod životinja na restrikciji hrane u našem modelu bi mogli imati ulogu u održavanju sistema negativne povratne regulacije HHA ose. Međutim, pokazano je i da ekspresija 11 β -HSD1 raste sa starenjem i koreliše sa kognitivnim poremećajima (Holmes, 2010), kao i da navedeni poremećaji mogu da se ublaže dejstvom selektivnih inhibitora 11 β -HSD1 (Sooy i saradnici, 2010; Yau i saradnici, 2015a). Efekti poboljšanja memorije dobijeni ukidanjem enzimske reaktivacije kortikosterona kod starih životinja ne uključuju promene u nivou GR-a i MR-a u hipokampusu, jer je pokazano da nema razlike u ekspresiji ovih receptora između starih *wild tipe* i 11 β -HSD1^{-/-} miševa (Yau i saradnici, 2011). U stresnim uslovima, povećan nivo kortikosterona može da doprinese poremećajima memorije kod starih životinja (Yau i saradnici, 2015b), a poznato je da restrikcija hrane štiti ovu funkciju od pada koji se javlja sa starenjem (Bellush i saradnici, 1996; Adams i saradnici, 2008). Povećan nivo glukokortikoidnog receptora u korteksu i hipokampusu starih DR životinja u

odnosu na životinje koje su imale neograničen pristup hrani, pokazan u našem modelu, može doprineti tome da restrikcija hrane kao tretman ostvaruje protektivne efekte na kognitivne funkcije i pored povećanja nivoa kortikosterona. Pored toga, merenja nivoa hormona su pokazala da deficijencija 11 β -HSD1 ne utiče na bazalni nivo hipokampalnog kortikosterona ni kod mladih ni kod starih životinja (Yau i saradnici, 2015b). Poznato je da kortikosteron u mozgu ne potiče samo iz cirkulacije, već i nastaje kao rezultat lokalne aktivnosti 11 β -HSD1. Procena proporcionalnog doprinosa ova dva procesa ukupnoj koncentraciji kortikosterona izvedena na mozgu miševa deficijentnih za ekspresiju enzima je pokazala da u nedostatku enzimske regeneracije postoji relativno malo smanjenje aktivnog oblika kortikosterona (Cobice i saradnici, 2013). To ukazuje da je doprinos 11 β -HSD1 unutarćelijskoj koncentraciji kortikosterona u bazalnim uslovima relativno umeren i da je povećani kortikosteron kod životinja na restrikciji hrane verovatno većim delom poreklom iz cirkulacije.

Kod pacova, ekperimentalni protokoli koji održavaju nizak nivo glukokortikoida, poput postnatalne manipulacije životinjama, povećavaju ekspresiju GR i poboljšavaju negativnu povratnu spregu HHA ose, sprečavajući kasnije morfološke promene u hipokampusu i deficit prostornog učenja tokom starenjem (Landfield i saradnici, 1981; Meaney i saradnici, 1988). Pored toga, i rezultati dobijeni u hipokampusu najstarije grupe životinja u našem modelu potvrđuju studije koje su pokazale da se sa starenjem smanjuje broj GR receptora (Sapolsky i saradnici, 1983; van Eekelen i saradnici, 1992; Rigter i saradnici, 1984; Zoli i saradnici, 1991; Cizza i saradnici, 1995, Bizon i saradnici, 2001; Murphy i saradnici, 2002; Mizoguchi i saradnici, 2009). Miševi koji su heterozigotni za ekspresiju GR (GR+/-) imaju predispoziciju za razvoj depresije (Ridder i saradnici, 2005), što ukazuje na moguću ulogu smanjene ekspresije i funkcije GR-a i u patogenezi psihijatrijskih poremećaja koji su povezani sa stresom (Holsboer, 2000; de Kloet i saradnici, 2005). Potvrda su smanjeni broj i/ili funkcija GR-a i povećana sekrecija kortizola kod ljudi koji pate od velike depresije (Pariante i Lightman, 2008). Pored puno izučavanih promena u GR-u, ispitivanja su pokazala da u bolestima koje prati deregulacija HHA ose dolazi i do smanjenja nivoa MR-a (Lopez i saradnici, 1998; Webster i Carlstedt-Duke, 2002; Xing i saradnici, 2004), kao i da hroničan tretman kortikosteronom smanjuje ekspresiju MR-a u hipokampusu, dok ekspresija GR-a ostaje nepromenjena (Xu i saradnici, 2010). Stoga se

može zaključiti da smanjenje ili GR-a ili MR-a može poremetiti negativnu povratnu spregu koja reguliše HHA osu. Ispitivanja efekata hroničnog stresa su pokazala da su nivoi GR-a različito regulisani u korteksu i hipokampusu (Mizoguchi i saradnici, 2003). I naši rezultati pokazuju da postoji strukturna specifičnost u promenama proteinskog nivoa GR-a pod uticajem starenja. Takođe, promene u nivou ekspresije oba kortikosteroidna receptora, koje se uočavaju pod uticajem restrikcije hrane, najizraženije su kod 24 meseca starih životinja. U obe ispitivane strukture najstarije DR grupe povećana je ekspresija GR-a, što može doprineti održavanju funkcionalnosti glukokortikoidnog signalnog puta. Pokazano je da je povećanje u ekspresiji GR-a mehanizam koji normalizuje poremećene funkcije HHA ose u 11β -HSD1^{-/-} miševima (Carter i saradnici, 2009). Takođe, dugotrajna restrikcija hrane povećava ekspresiju MR-a u hipokampusu starih životinja, dok se u korteksu ne uočavaju promene nivoa ovog receptora. Kako se razlika u nivou MR-a u hipokampusu između AL i DR hranjenih životinja uočava već kod 18 meseci starih životinja, može se sugerisati da mehanizam kojim restrikcija hrane utiče na ekspresiju kortikosteroidnih receptora u hipokampusu najpre uključuje promene u ekspresiji MR-a, dok promene u proteinskom nivou GR-a slede kasnije tokom starenja. Povećanje u nivou ekspresije MR-a može doprineti pozitivnim efektima koji su pokazani za dugotrajnu restrikciju hrane, jer je poznato da je porast u neuronalnoj iRNK za MR povezan sa poboljšanim preživljavanjem neurona (Almeida i saradnici, 2000, Macleod i saradnici, 2003) kao i da se time poboljšava konsolidacija ne-prostorne memorije (Ferguson i Sapolski, 2007).

Promene u ekspresiji GR-a mogu biti praćene i promenama u njegovoj fosforilaciji, kao što je pokazano u izučavanju efekata hroničnog stresa u kulturi hipokampalnih neurona (Anacker i saradnici, 2011). Rezultati koje smo dobili ukazuju da nivo fosforilacije GR-a kod AL životinja prati obrazac promena koje se detektuju za nefosforilisan receptor tokom starenja, i to u obe strukture i svim ispitanim vremenskim tačkama. Sa druge strane, naši rezultati pokazuju i razdvajanje efekata restrikcije hrane na fosforilacioni status GR-a u zavisnosti od posmatrane strukture. Tačnije, bez obzira što restrikcija hrane kao tretman menja ekspresiju nefosforilisane forme receptora na isti način u obe strukture jer je nivo GR-a u odnosu na AL starosne kontrole najpre nepromenjen kod 18 meseci starih životinja, a potom povećan u najstarijoj ispitivanoj grupi, fosforilisana forma se menja na različit način u korteksu i hipokampusu. U korteksu se

nivo fosforilisanе forme receptora održava nepromenjenim u odnosu na 6 meseci stare kontrole, dok u hipokampusu promene u nivou fosforilisanе forme prate promene u ukupnom receptoru i nivou njegovog liganda. Moguće je da povećana ekspresija FKBP51 i smanjena ekspresija Hsp90 u korteksu 18 meseci starih DR životinja smanjuju afinitet receptora za hormon i time sprečavaju aktivaciju receptora. Pokazano je da hronični umereni stres povećava ekspresiju FKBP51, čime se inhibira translokacija GR-a u jedro, i taj efekat je pokazan i u korteksu i u hipokampusu (Guidotti i saradnici, 2013). Nasuprot tome, u korteksu 24 meseca starih DR životinja nema promena u nivou FKBP51, ali je p25 aktivatorski protein CDK5 kinaze smanjen i u AL i DR grupi. Time se može objasniti činjenica da nema povećane fosforilacije receptora i pored detektovanog povećanja i GR-a i njegovog liganda u korteksu starih DR životinja. Sa druge strane, bez obzira na smanjeni nivo p25 i Hsp90, u hipokampusu starih životinja na restrikciji hrane detektuje se povećana fosforilacija GR-a, što ukazuje na očuvan odgovor receptora na povećani nivo liganda u ovoj strukturi DR životinja.

Fosforilacioni status receptora je bitan u regulaciji aktivacije, unutarćelijske lokalizacije, transkripcije gena i proteinskog obrta GR-a (Chen i saradnici, 2008; Ismaili i Garabedian, 2004). Sam receptor može biti fosforilisan usled vezivanja liganda (Ismaili i Garabedian, 2004; Rogatsky i saradnici, 1998), ali i aktivacijom različitih signalnih puteva, uključujući protein kinazu A (PKA) (Anacker i saradnici, 2011; Rangarajan i saradnici, 1992), ciklin-zavisne kinaze (CDK) (Krstic i saradnici, 1997), kinazu glikogen sintaze-3 (GSK-3) i JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinases*) kinazu (Rogatsky i saradnici, 1998), koji mogu modulirati senzitivnost i funkciju GR-a. Poznato je da, pored CDK5, MAPK kinaze ERK i p38 fosforilišu GR na Ser²³² kod pacova. Dugotrajna restrikcija hrane sprečava smanjenje aktivacije ERK kinaze do koga dolazi sa starenjem (Zhen i saradnici, 1999), ali nije poznato koliki uticaj na fosforilaciju GR-a ova promena može ostvariti.

Poznato je da se u uslovima izlaganja hroničnom stresu smanjuje fosforilacija GR-a na Ser²³² (Guidotti i saradnici, 2013), a da inkubacija humanih neuronalnih matičnih ćelija sa sintetskim glukokortikoidom dekasametazonom, agonistom GR-a, povećava nivo fosforilacije na ovom mestu (Anacker i saradnici, 2011). Dakle, može se zaključiti da glukokortikoidi primenjeni kao akutni tretman podstiču fosforilaciju GR-a koja vodi jedarnoj translokaciji receptora, dok u

uslovima hroničnog stresa poremećaj funkcije GR-a uključuje i smanjen Ser²³² fosforilisan oblik receptora. Restrikcija hrane u našem modelu bez obzira na to što je primenjena kao hroničan tretman dovodi do povećanja fosforilacije GR-a na Ser²³² u hipokampusu. Fosforilacija na Ser²³² koreliše sa povećanom transkripcionom aktivnošću receptora, dok sprečavanje fosforilacije smanjuje kapacitet receptora da prenese signale (Wang i saradnici, 2002; Blind i Garabedian, 2008; Chen i saradnici, 2008). Na primer, pokazano je da deficijencija u fosforilaciji Ser²³² može biti uzrok rezistencije na glukokortikoide kod malignih limfoidnih ćelija (Miller i saradnici, 2005). Održanje optimalnog fosforilacionog statusa je ključno za normalno funkcionisanje, što u slučaju hipokampusa ukazuje da restrikcija hrane deluje u pravcu održavanja funkcionalnosti receptora. GR kod koga je mutacijom ukinuto fosforilaciono mesto ima promenjenu sposobnost da aktivira neke od gena koji odgovaraju na glukokortikoide, ali neki od promotora ne pokazuju zavisnost nivoa ekspresije od fosforilacije receptora (Webster i saradnici, 1997). Uticaj fosforilacionog statusa receptora na transkripciju gena zavisi od tipa promotora i jačine vezivanja GR-a za DNK (Chen i saradnici, 2006). Smatra se da u uslovima niskih koncentracija hormona ekspresija više zavisi od Ser²³² fosforilacije, dok pri višim koncentracijama postaje nezavisna od fosforilacionog statusa za gene sa jakim GRE sekvencama u svom promotorskom regionu, poput GILZ (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*) gena. Sa druge strane, za gene sa slabim GRE sekvencama poput IRF8 (eng. *interferon regulatory factor 8*), ekspresija je potpuno zavisna od fosforilacije na Ser²³² i vezivanja kofaktora MED14, što navodi na zaključak da je osnovna uloga Ser²³² olakšavanje interakcije GR-a sa kofaktorima, što za rezultat ima pojačavanje transkripcione funkcije receptora (Chen i saradnici, 2008). Naši rezultati ukazuju da bi trebalo očekivati da dugotrajna restikcija hrane u korteksu uglavnom ispoljava efekte na ekspresiju gena koji su manje zavisni od fosforilacionog statusa GR-a, dok u hipokampusu DR verovatnije utiče na ekspresiju gena čiji promotori zahtevaju interakciju sa kofaktorima i zavise od fosforilacije GR-a. Sa druge strane, fosforilacija utiče i na druge osobine receptora koje utiču na prenos glukokortikoidnog signala, koje takođe mogu doprineti razlikama u efektima DR između ispitivanih struktura. Na primer, fosforilacija receptora koja zavisi od prisustva liganda ubrzava njegovu degradaciju, jer je GR kojem je mutacijom ukinuto mesto fosforilacije stabilniji u prisustvu glukokortikoida (Webster i saradnici, 1997). Pored toga, GR koji za sebe nema vezan

ligand je zaštićen od degradacije vezivanjem za TSG101 protein, koji preferencijalno interaguje sa nefosforilisanim oblikom receptora (Ismaili i saradnici, 2005).

Različiti hipokampalni subregioni odgovaraju na različit način na promene u koncentraciji kortikosterona, verovatno usled toga što regionalne razlike u nivou ekspresije glukokortikoidnih receptora uslovljavaju drugačiji MR/GR odnos. Pokazano je da je nedostatak kortikosterona oštećuje granularne ćelije dentatnog girusa, dok su visoke koncentracije hormona toksične prvenstveno za neurone CA3 regiona, koji, zanimljivo, pokazuju najmanju zastupljenost GR receptora (Morimoto i saradnici, 1996). CA neuroni i DG neuroni pokazuju i različite elektrofiziološke i ćelijske i molekularne promene sa starenjem (Burke i saradnici, 2010). Mada ni sa starenjem ni pod uticajem restrikcije hrane ne dolazi do promena u broju sinapsi u CA1 i DG (Shi i saradnici, 2007, Newton i saradnici, 2008), analize ekspresije gena su pokazale da su neuroni CA1 regiona podložniji stresu koji je posledica starenja, dok CA3 i DG bolje odgovaraju na restrikciju hrane kada je u pitanju usporavanje procesa starenja (Zeier i saradnici, 2011). Međutim, i pored navedenih razlika, fosforilisani GR u oba ispitana regiona hipokampusu starih DR životinja odgovara na isti način na restrikciju hrane, jer se u oba detektuje povećana jedarna lokalizacija pGR-a, i to u obimu koji prevazilazi i nivo detektovan kod 6 meseci starih kontrola. Pored toga, ekspresija se uglavnom uočava u jedrima neurona u ova dva subregiona, što je u skladu sa istraživanjima koja pokazuju da je ekspresija GR-a u jedrima glijskih ćelija niska u odnosu na onu koja se detektuje u neuronima (Kasckow i saradnici, 2009; Cintra i saradnici, 1994). Dugotrajna restrikcija hrane očigledno sprečava poremećaje u transportu GR-a u jedro, za koje je pokazano da se odvijaju sa starenjem u hipokampusu (Murphy i saradnici, 2002). Poznato je da glukokortikoidi olakšavaju formiranje memorije u različitim testovima učenja kod životinja (Sandi, 1998; Roozendaal, 2000). Pretpostavlja se da je ovaj efekat posredovan GR-om, jer su kod miševa kojima je genetičkim manipulacijama ukinuta ekspresija GR-a pokazani poremećaji prostornog učenja i pamćenja (Oitzl i saradnici, 1997; Rousse i saradnici, 1997). Povećanjem aktivacije GR-a u odnosu na AL životinje dugotrajna restrikcija hrane može uticati na poboljšanje kognitivnih sposobnosti.

Ispitivanja promena u ekspresiji gena nakon hroničnog izlaganja glukokortikoidima u hipokampusu su pokazala da je pod uticajem tretmana, između ostalih, aktivirana ekspresija gena

koji su uključeni u regulaciju sinaptičke plastičnosti i u procese učenja i pamćenja, kao i neuronalne/metaboličke procese, dok je sa druge strane reprimirana ekspresija gena gljalne reaktivnosti (uključujući inflamatorno/imuni odgovor i astrogliozu) (Chen i saradnici, 2013). Pored toga, poređene su promene u ekspresiji gena koji odgovaraju na glukokortikoide sa pravcem promena koje se detektuju sa starenjem u hipokampusu, kako bi se utvrdilo da li su geni koji odgovaraju na hroničan tretman glukokortikoidima uključeni u ubrzavanje procesa starenja. Da je glukokortikoidna hipoteza starenja tačna, glukokortikoidi i starenje bi trebalo da regulišu ekspresiju zajedničkih ciljnih gena u istom pravcu (Landfield i saradnici, 2007). Međutim, velika većina gena, tačnije 67% gena zajedničkih za oba transkriptoma, se menjaju na suprotan način sa starenjem i pod uslovima hroničnog tretmana kortikosteronom, što ukazuje da glukokortikoidi imaju efekte koji deluju u suprotnom pravcu od procesa starenja za mnoge od svojih ciljnih molekula (Chen i saradnici, 2013).

Transkripcioni profil promena koje se dešavaju kao posledica restrikcije hrane kod starih miševa pokazuje da DR povećava ekspresiju gena uključenih u energetski metabolizam, sinaptičku plastičnost i smanjuje ekspresiju gena uključenih u inflamaciju (Mladenovic Đorđević i saradnici, 2010; Lee i saradnici, 1999; Zeier i saradnici, 2011). Isti putevi su promenjeni hroničnim tretmanom glukokortikoidima (Chen i saradnici, 2013), što sugeriše da se bar neki od efekata restrikcije hrane mogu pripisati održavanjem funkcionalnosti GR-a u mozgu tokom starenja.

Proces starenja remeti normalno funkcionisanje hipokampusa preko promena koje uključuju smanjenu sinaptičku plastičnost (Nakamura i saradnici, 1999), kognitivne funkcije (Winocur, 1998) i neurogenezu (Kuhn i saradnici, 1996). Neurogeneza se odvija i u nekoliko regiona u adultnom mozgu, uključujući i dentatni girus, ali se progresivno smanjuje sa starenjem (Bernal i Peterson 2004; Arbous i saradnici, 2005). Restrikcija hrane podstiče neurogenezu kod glodara (Lee i saradnici, 2002a), što doprinosi neuroprotektivnim efektima ove intervencije. Broj ćelija obeleženih bromodeoksiuridinom (markerom novosintetisane DNK koji ukazuje na proliferišuće ćelije) u dentatnom girusu je veći kod životinja koje su podvrgnute restrikciji hrane nego kod AL životinja iste starosti, što ukazuje na poboljšano preživljavanje novonastalih ćelija (Lee i saradnici, 2002b; Bondolfi i saradnici, 2004), a novi neuroni mogu imati važnu ulogu u

procesima učenja i pamćenja (Aimone i saradnici, 2006; Lledo i saradnici, 2006). Neurogenezu u hipokampusu starih životinja podstiče i iskustvo (Kempermann i saradnici, 1998), što je u skladu sa studijama koje pokazuju da obogaćena sredina poboljšava prostorno učenje u hipokampusu (Lee i saradnici, 2003). Obogaćena sredina takođe povećava ekspresiju GR-a i *sgk-1* gena u hipokampusu (Lee i saradnici, 2003), što uz naše rezultate ukazuje da se indukcija neuroprotektivnih mehanizama možda odvija istim putevima kod restikcije hrane i u slučaju obogaćenja sredine. Pokazano je dalje i da *sgk-1* gen igra važnu ulogu u konsolidaciji memorije tokom prostornog učenja kod pacova. Transfekcija normalnog *sgk-1* gena poboljšava, dok transfekcija mutiranog gena remeti izvođenje zadataka na testu vodenog lavirinta (Tsai i saradnici, 2002). Pored toga, ekspresija *sgk-1* je uglavnom indukovana glukokortikoidima (Webster i saradnici, 1993), a *sgk-1* olakšava formiranje dugotrajne potencijacije (LTP, eng. *Long-term potentiation*), (Ma i saradnici, 2006), što potvrđuje ne samo ulogu *sgk-1* u olakšavanju formiranja dugotrajne memorije (Tsai i saradnici, 2002), već je takođe u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da glukokortikoidi poboljšavaju konsolidaciju memorije u različitim testovima učenja (Roozendaal, 2000). Pored toga, poremećaji u učenju i motornoj koordinaciji koji se javljaju sa starenjem kod glodara su smanjeni kod životinja na restrikciji hrane (Mattson i saradnici, 2003). Pacovi na dijeti sa smanjenim brojem kalorija koja je započeta sa 3 nedelje starosti, a koji su testirani kad su dostigli starost od dve godine su pokazali značajno bolje rezultate nego AL hranjene životinje iste starosti na prostornim i ne-prostornim testovima učenja (Pitsikas i saradnici, 1990; Pitsikas i Alegri, 1992). Pored toga, DR takođe sprečava deficite u hipokampalnom LTP-u, procesu koji je uključen u formiranje memorije (Hori i saradnici, 1992; Eckles-Smith i saradnici, 2000; Okada i saradnici, 2003). Neki od ovih efekata se verovatno ostvaruju održavanjem signalnih puteva glukokortikoida u hipokampusu tokom starenja, preko povećanja ekspresije *sgk-1* gena.

Sa druge strane, u korteksu se ne menjaju nivo pGR-a ni genska ekspresija MR-a, a nema povećanja ni u nivou iRNK za *sgk-1* i pored povećanja u nivou kortikosterona kod starih životinja na restrikciji hrane. To ukazuje da se mehanizmi kojim restrikcija hrane ostvaruje svoje efekte koji nastaju kao posledica povećanja nivoa glukokortikoida drugačiji u korteksu, nego u hipokampusu. Bez obzira na to što su obe strukture uključene u zaustavljanje glukokotrikoidnog

odgovora na stres (Diorio i saradnici, 1993), poznato je da korteks pokazuje veću osetljivost na strukturne promene do kojih dolazi u uslovima hroničnog stresa u odnosu na druge moždane regione. Dok je za pojavu strukturnih promena u hipokampusu potrebno čak nekoliko nedelja izlaganja stresu (McEwen, 2004), dendriti u korteksu počinju da se menjaju nakon samo jedne nedelje (Brown i saradnici, 2005) ili čak i jednog izlaganja (Izquierdo i saradnici, 2006). Nedavno je pokazano da postoji korelacija između nivoa kortizola i smanjenja debljine korteksa kod sredovečnih ljudi, dok nije pokazana značajna veza volumena hipokampusa sa nivoom ovog hormona (Kremen i saradnici, 2010). Pored toga, u nekoliko studija je pokazano da akutni umereni stres remeti normalno odvijanje kognitivnih funkcija koje zavise isključivo od korteksa (Murphy i saradnici, 1996; Arnsten i Goldman-Rakic, 1998; Shansky i saradnici, 2006). Nasuprot tome, akutni stres umerenog intenziteta nema efekta, ili čak može poboljšati neke od funkcija koje su pod kontrolom hipokampusa (McEwen, 2004). Hormonalni odgovor na stres pokazuje izuzetnu kompleksnost, jer i dinamička reaktivnost sistema (povećana ili smanjena reaktivnost) kao i unutrašnja regulacija (kraći ili duži period izloženosti) utiču na krajnji ishod (Lupien i saradnici, 2009).

Novija istraživanja su dovela u pitanje tvrdnju da je neurodegeneracija karakteristika normalnog procesa starenja, jer unapređena stereološka ispitivanja nisu pokazala gubitak neurona u korteksu i hipokampusu kod starih ljudi, primata, niti pacova (Rapp i Gallagher, 1996; Rasmussen i saradnici, 1996; West i saradnici, 1994). Promene u putevima prenosa signala i sinaptičkoj plastičnosti koje utiču na aktivnost neurona mogu imati veći značaj u poremećajima u starenju, od onog koji im se pripisivao u dosadašnjim istraživanjima. Smanjenje u kognitivnim kapacitetima koji zavise od pomenutih struktura je stoga pre posledica poremećaja u aktivnosti neurona. Ekspresija gena ranog odgovora, c-fos-a, se koristi kao marker preko koga se utvrđuje neuronalna aktivacija moždanih struktura u odgovoru na različite stimulse (Hoffman i Lyo, 2002; Kovács, 1998). Mada se bazalna ekspresija c-fos-a ne menja u mozgu sa starenjem (D'Costa i saradnici, 1991; Desjardins i saradnici, 1997; Nagahara i Handa, 1997), što pokazuju i naši rezultati, pokazano je da akutni stres dovodi do smanjene neuronalne aktivacije u korteksu starih pacova u poređenju sa mladim životinjama (Nagahara i Handa, 1997; Shoji i Mizoguchi, 2010). Smanjena aktivacija kortikalnih neurona tokom odgovora na akutni stres može biti

posledica oštećenja u moždanom tkivu kod starih životinja (Boguszewski i Zagrodzka, 2005; Salchner i saradnici, 2004). Takođe, smanjenje aktivnosti neurona može ukazati na poremećaje u adaptaciji na promene u spoljašnjoj i unutrašnjoj sredini i doprineti promenjenoj aktivnosti HHA ose kod starih životinja. Pokazano je da korteks starih životinja ima smanjenu sposobnost da kontroliše aktivnost HHA ose tokom stresa (Garrido i saradnici, 2012b). Poznato je i da transkripcioni regulator AP-1, u čijem sastavu se može nalaziti c-fos, pokazuje smanjenu aktivnost u korteksu starih životinja (Asanuma i saradnici, 1995). U korteksu životinja koje su izložene obogaćenoj sredini raste ekspresija c-fos-a u ćelijama koje eksprimiraju markere nezrelih neurona, i smatra se da taj proces igra ključnu ulogu u razvoju neurona. Eksperimentalne studije pokazuju da vezivanje transkripcionog regulatora AP-1, dimera c-fos-a sa drugim ranim genom c-jun, aktivira gensku transkripciju i ubrzava proliferaciju i diferencijaciju ćelija (Hess i saradnici, 2004). Povećana ekspresija c-fos-a koja se održava i 20 dana nakon izlaganja obogaćenoj sredini ukazuje da ovaj gen ima ulogu u sazrevanju neurona i integraciji neuronalnih kola (Ohira i saradnici, 2010; Fan i saradnici, 2014). Takođe, c-fos aktivacija se povezuje sa procesima učenja i pamćenja (Aggleton i Brown, 2005). Naši rezultati pokazuju da se u korteksu starih životinja pod uticajem dugotrajne restrikcije hrane povećava ekspresija c-fos gena, što ukazuje da ovaj tretman deluje u pravcu održavanja reaktivnosti kortikalnih neurona, i da može uticati na kognitivne procese koji zavise od pravilnog funkcionisanja korteksa. Međutim, za definitivnu potvrdu ovakvog efekta potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja sastava AP-1 kompleksa i vezivanja ovog transkripcionog regulatora za DNK pod uticajem smanjenog unosa hrane tokom starenja.

Ispitivanja su pokazala i da tretman restrikcijom hrane može dovesti do reprogramiranja genske ekspresije proinflammatoryh gena koji se menjaju sa starenjem (Weindruch and Prolla, 2002; Morgan i saradnici, 2007). Aktivaciju i proliferaciju mikroglije i astrocita koja se javlja sa starenjem kod glodara i ljudi prati povećana ekspresija GFAP-a (Kohama et al. 1995, Nichols et al. 1995). Poznato je da hronična restrikcija hrane tokom adultnog životnog doba sprečava povećanje u nivou iRNK za GFAP (Nichols et al. 1995). Literaturni podaci pokazuju da je smanjenje u nivou GFAP-a *in vivo* posredovano glukokortikoidima preko aktivacije GR-a (Nichols i saradnici, 1990). Takođe je pokazano da se nivo GFAP-a povećava nakon

adrenalektomije u korteksu i hipokampusu (O'Callaghan i saradnici, 1991). Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o smanjenju u ekspresiji GFAP-a životinja podvrgnutih restrikciji hrane i nasuprot tome porastom u nivou GFAP-a kod starih AL životinja (Krekoski i saradnici, 1996; Morgan i saradnici, 1999; Yoshida i saradnici, 1996). Ovaj antiinflamatorni efekat restrikcije hrane se uočava u obe ispitane strukture, i odvija se na isti način u korteksu i hipokampusu, bez obzira na razlike koje se uočavaju u nivou pGR-a u ove dve strukture. Aktivacija HHA ose i povećanje nivoa glukokortikoida uobičajeno se povezuju sa antiinflamatornim odgovorima, koji se odvijaju preko inhibicije NFκB signalnog puta (Shin i saradnici, 2004; Kishore i saradnici, 2003). Međutim, postoje i podaci o tome da stres može povećati efekte NFκB transkripcionog regulatora i time povećati inflamatorni odgovor (Munhoz i saradnici, 2006; LaPlant i saradnici, 2009; Madrigal i saradnici, 2001). U centralnom nervnom sistemu transkripcioni regulator NFκB ima ulogu i u važnim fiziološkim procesima poput neurogeneze (Koo i saradnici, 2010), izrastanja neurita (Rolls i saradnici, 2007), sinaptičke plastičnosti i učenja i pamćenja (Levenson i saradnici, 2004; Ahn i saradnici, 2008; O'Riordan i saradnici, 2006). Literaturni podaci ukazuju da poremećaji u regulaciji aktivnosti ovog transkripcionog regulatora mogu učestvovati u razvoju neurodegenerativnih poremećaja u mozgu pacijenata obolelih od Parkinsonove (Ghosh i saradnici, 2007; Hunot i saradnici, 1997) i Alchajmerove bolesti (Kaltschmidt i saradnici, 1997). Naši rezultati su pokazali da tokom starenja u korteksu pacova dolazi do porasta nivoa NFκB-a u jedru, gde kao transkripcioni regulator ostvaruje svoje dejstvo. Tretman restrikcijom hrane sprečava ovaj efekat, i smanjenjem nivoa NFκB-a može inhibirati delovanje proinflamatornih citokina poput IL-6 (interleukin 6) i TNF-α (eng. *tumor necrosis factor α*). Takođe, blokiranjem efekata NFκB-a i u ćelijama imunskog sistema i u mozgu ostvaruju se antiinflamatorni efekti koji mogu ublažiti posledice stresa (Koo i saradnici, 2010). Pokazano je da se preko aktivacije ili inhibicije transkripcionog regulatora NFκB u hipotalamusu kod miša može ubrzati ili usporiti proces starenja, i time produžiti ili skratiti životni vek (Zhang et al. 2013). Jedan od načina na koji dugotrajna restrikcija hrane može sprečiti aktivaciju NFκB do koje dolazi sa starenjem podrazumeva smanjenje nivoa štetnih molekula i podizanje protektivnih ćelijskih signalnih puteva (Martin i saradnici, 2008; Rangaraju i saradnici, 2009). Restrikcija hrane može povećati ekspresiju SIRT1

(Chen i saradnici, 2005a; Chen i saradnici, 2005b), evolutivno očuvanog enzima koji je najpoznatiji član familije Sirtuina kod sisara (Blander i Guarente 2004; Guarente, 2006; Michan i Sinclair, 2007). Sirtuini su važni regulatori ćelijskog metabolizma i funkcionalno su povezani sa starenjem i poremećajima koji se javljaju sa starenjem (Haigis i Guarente, 2006; Guarente, 2006; Longo i Kennedy, 2006; Michan i Sinclair, 2007). SIRT1 reguliše i metaboličke promene koje se javljaju kao posledica izlaganja restrikciji hrane (Bordone i Guarente, 2005; Guarente, 2006; Chen i Guarente, 2007). Aktivacija sirtuina može objasniti otpornost na inflamaciju do koje dovodi smanjeni unos hrane (Hollooszy i Fontana, 2007; Morgan i saradnici, 2007), jer je pokazano da se SIRT1 fizički vezuje za NFκB komplekse i inhibira njihovu transkripcionu aktivnost (Yeung i saradnici, 2004). Literaturni podaci potvrđuju ulogu SIRT1 u inhibiranju inflamacije (Chen i saradnici, 2005a; Chen i saradnici, 2005b; Nayagam i saradnici, 2006; Yang i saradnici, 2007), a mehanizmi koji povezuju SIRT1 i NFκB mogu objasniti protektivne efekte restrikcije hrane na inflamatorne procese koji se u mozgu javljaju sa starenjem. Smatra se da akumulacija oštećenja u ćeliji, uključujući i oštećenja DNK, doprinosi pojavi patologija u starenju. NFκB je transkripcioni regulator koji se aktivira u slučaju ćelijskih oštećenja i stresa, i pokazuje povećanu aktivnost sa starenjem i u hroničnim bolestima koje su povezane sa starenjem (Hayden i Ghosh, 2008, Tilstra i saradnici, 2011). Genetička ili farmakološka inhibicija aktivacije NFκB odlaže pojavu mnogih simptoma koji se javljaju sa starenjem (Tilstra i saradnici, 2012), što ukazuje da je efekat smanjenja aktivacije NFκB koji restrikcija hrane pokazuje u našem modelu mogući mehanizam kojim se usporava proces starenja u korteksu.

Proces starenja se ne odvija sinhrono u svim regionima mozga i odvija se na specifičan način za svaki region (Mora i saradnici, 2007). Stoga ne čudi što se efekti dugotrajne restrikcije hrane ostvaruju na drugačiji način u različitim regionima. Sve je veći broj podataka koji učvršćuju stanovište da je interakcija između regiona ključna za promene u različitim funkcijama tokom starenja, što se posebno odnosi na one regione koji učestvuju u koordinisanom odgovoru na stres. Promene u mozgu i ponašanju se teško mogu objasniti delovanjem jednog hormona i njegovih receptora, već je verovatnije da su navedene promene rezultat složenih interakcija između mnogih hormonskih sistema (Jankowska i saradnici, 2006; Cappola i saradnici, 2008). Poznato je da se nivo i funkcija mnogih hormona menjaju sa starenjem (Weinert i Timiras, 2003;

Conrad i Bimonte-Nelson, 2010). Interakcija velikog broja važnih molekula u svakom od regiona mozga je od značaja za razumevanje promena koje se dešavaju u mozgu tokom starenja (Mora i saradnici, 2007, Mora i saradnici, 2008, Segovia i Mora, 2001) i stoga je neophodno ispitivanje kombinovanih efekata više hormona koji zajednički ostvaruju svoj uticaj na mozak. Razumevanje ovih procesa i utvrđivanje efekata koje na njih ispoljava smanjeni unos hrane može ukazati na mehanizme kojima se može uticati na usporavanje procesa starenja mozga.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Tokom starenja dolazi do povećanja koncentracije kortikosterona u korteksu pacova, dok u hipokampusu nivo ovog hormona ostaje nepromenjen. Dugotrajna restrikcija hrane povećava nivo kortikosterona u obe ispitivane starosne grupe i u korteksu i u hipokampusu pacova.
2. Nivo ključnog enzima koji u moždanom tkivu reguliše dostupnost kortikosterona receptoru, 11β -HSD1, održava se nepromenjenim tokom starenja u korteksu pacova koji imaju neograničen pristup hrani, dok u hipokampusu raste samo kod najstarije ispitivane grupe. Tretman dugotrajnom restrikcijom hrane dovodi do povećanja nivoa 11β -HSD1 u korteksu.
3. Najizraženije promene na nivou glukokortikoidnog receptora tokom starenja se uočavaju u hipokampusu najstarije ispitivane grupe životinja sa slobodnim pristupom hrani. Detektovan je značajan pad nivoa receptora, praćen smanjenim nivoom fosforilisanog oblika receptora. Primena dugotrajne restrikcije hrane povećava nivo glukokortikoidnog receptora i u korteksu i u hipokampusu, dok uticaj na fosforilacioni status receptora ostvaruje samo u hipokampusu najstarije ispitivane grupe, gde se značajno povećava i jedarna lokalizacija receptora. Funkcionalna posledica aktivacije glukokortikoidnog receptora u hipokampusu životinja podvrgnutih dugotrajnoj restrikciji hrane se ogleda u povećanju ekspresije *sgk-1* gena.
4. Nivo CDK5 se ne menja tokom starenja u obe strukture, bez obzira na primenjeni režim ishrane. Smanjeni unos hrane utiče na obradu p35 aktivatorskog proteina za CDK5 kinazu u hipokampusu, čime može ostvariti efekat na aktivnost ove kinaze.

5. U korteksu ne dolazi do promena u ekspresiji mineralokortikoidnog receptora ni kod jedne od ispitivanih grupa životinja. Tretman dugotrajnom restrikcijom hrane povećava ekspresiju mineralokortikoidnog receptora u hipokampusu, i to u obe ispitivane starosne tačke.
6. Dugotrajna restrikcija hrane povećava ekspresiju c-fos gena u korteksu, što ukazuje da deluje u pravcu održavanja reaktivnosti kortikalnih neurona tokom starenja.
7. Nivo transkripcionog regulatora NFκB se značajno povećava u jedarnoj frakciji korteksa najstarije ispitivane grupe, što je praćeno smanjenjem njegovog nivoa u citoplazmatičnoj frakciji. Dugotrajna restrikcija hrane sprečava pojavu ovog starosno-zavisnog efekta u korteksu.

Rezultati doktorske disertacije pokazuju da tokom starenja dolazi do promena na nivou prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, kao i na nivou samog glukokortikoidnog receptora. Dugotrajna restrikcija hrane ostvaruje efekte na signalni put glukokortikoida na strukturno-specifičan način, pri čemu su promene u korteksu uočljivije na prereceptorskom nivou, i ogledaju se u povećanoj koncentraciji kortikosterona i povećanom nivou enzima 11β-HSD1. U hipokampusu je efekat restikcije hrane najizraženiji na nivou samog receptora, i ostvaruje se preko povećanja nivoa ukupnog receptora i njegove fosforilisane forme. U obe strukture koje su analizirane, efekti dugotrajne restrikcije hrane su bili izraženiji kod najstarije ispitivane grupe.

Rezultati dobijeni u okviru disertacije ukazuju na značaj signalnog puta glukokortikoida u ostvarivanju efekata dugotrajne restrikcije hrane, čime proširuju dosadašnje uvide u mehanizme neuroprotektivnog dejstva smanjenog unosa hrane. Imajući u vidu važnu ulogu signalnog puta glukokortikoida u procesima učenja i pamćenja, rezultati su značajni i sa aspekta potencijalnog korišćenja redukovane ishrane u očuvanju kognitivnih kapaciteta tokom starenja kod ljudi.

7. Literatura

- Abraham SM, Lawrence T, Kleiman A, Warden P, Medghalchi M, Tuckermann J, Saklatvala J, Clark AR (2006) Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* 203(8):1883–9.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85(2):523–569.
- Adams MM, Donohue HS, Linville MC, Iversen EA, Newton IG, Brunso-Bechtold JK (2010) Age-related synapse loss in hippocampal CA3 is not reversed by caloric restriction. *Neuroscience* 171, 373–382.
- Adams MM, Shi L, Linville MC, Forbes ME, Long AB, Bennett C, Newton IG, Carter CS, Sonntag WE, Riddle DR, Brunso-Bechtold JK (2008) Caloric Restriction and Age Affect Synaptic Proteins in Hippocampal CA3 and Spatial Learning Ability. *Exp Neurol.* 211(1): 141–149.
- Aggleton JP, Brown MW (2005) Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology B: Comparative and Physiological Psychology*, 58, 218–233.
- Ahima RS, Harlan RE (1990) Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39: 579–604.
- Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD (2008) c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn Mem* 15(7):539–49.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci.* 9(6):723–727.
- Akana SF, Chu A, Soriano L, Dallman MF (2001) Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotropic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol.* 13:625–637.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383–421.
- Algeri S, Biagini L, Manfredi A, Pitsikas N (1991) Age-related ability of rats kept on a life-long hypocaloric diet in a spatial memory test. Longitudinal observations. *Neurobiol Aging* 12:277–82.
- Almawi WY, Melemedjian OK (2002) Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28(2):69–78.
- Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM (2000) Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate *FASEB J.* 14, pp. 779–790.

- Almela M, Hidalgo V, van der Meij L, Pulopulos MM, Villada C, Salvador A (2014) A low cortisol response to acute stress is related to worse basal memory performance in older people. *Front. Aging Neurosci.* 6:157.
- Anacker C, Zunszain PA, Cattaneo A, Carvalho LA, Garabedian MJ, Thuret S, Price J, Pariante CM (2011) Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry.* 16:738–750.
- Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PncI govern lifespan extension by calorie restriction in *S. cerevisiae*. *Nature* 423, 181–185.
- Anderton B (2002) Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev* 123:811–17.
- Antoni FA (1986) Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor *Endocr. Rev.* 7, pp. 351–378
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1998) Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch. Gen. Psychiatry.* 55:362–369.
- Artero S, Tiemeier H, Prins N, Sabatier R, Breteler M, Ritchie K (2004) Neuroanatomical localisation and clinical correlates of white matter lesions in the elderly. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1304–8.
- Asanuma M, Kondo Y, Nishibayashi E, Iwata E, Nakanishi T, Ogawa N (1995) Age-related changes in composition of transcription factor, AP-1 complex, in the rat brain. *Neurosci Lett.* 201(2):127–130.
- Avenant C, Ronacher K, Stubbsrud E, Louw A, Hapgood JP (2010) Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 72–88.
- Azarbar A, McIntyre DC, Gilby KL (2010) Caloric restriction alters seizure disposition and behavioral profiles in seizure-prone (fast) versus seizure-resistant (slow) rats. *Behavioral Neuroscience* 124, 106–114.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 17:245–261.
- Banerjee A, Periyasamy S, Wolf IM, Hinds TDJ, Yong W, Shou W, Sanchez ER (2008) Control of glucocorticoid and progesterone receptor subcellular localization by the ligand-binding domain is mediated by distinct interactions with tetratricopeptide repeat proteins. *Biochemistry* 47:10471–10480.
- Barja G (2004) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production–DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79, 235–251.
- Barnes C (2003) Long-term potentiation and the ageing. *Philos Trans Royal Soc Lond B Biol Sci* 358:765–72.
- Barnes PJ (2010) Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120(2–3):76–85.
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F (2004) Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18(1):70–80.
- Bartzokis G, Cummings J, Sultzer D, Henderson VW, Nuechterlein KH, Mintz J (2003) White matter structural integrity in healthy ageing adults and patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:393–8.

- Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K (2009) Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 30(7):830–82.
- Beeri MS, Schmeidler J, Lesser GT, Maroukian M, West R, Leung S, Wysocki M, Perl DP, Purohit DP, Haroutunian V (2012) Corticosteroids, but not NSAIDs, are associated with less Alzheimer neuropathology. *Neurobiol Aging*. 33:1258–1264.
- Bell RD, Zlokovic BV (2009) Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol* 118:103–113.
- Bellush LL, Wright AM, Walker JP, Kopchick J, Colvin RA (1996) Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiology and Behavior* 60, 541–547.
- Berg BN, Simms HS (1960) Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake. *J. Nutr.* 71, 255–263.
- Bernal GM, Peterson DA (2004) Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair. *Aging Cell*. 3(6):345–351.
- Bhattacharyya S, Zhao Y, Kay TW, Muglia LJ (2011) Glucocorticoids target suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and type 1 interferons to regulate Toll-like receptor-induced STAT1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23):9554–9.
- Bizon JL, Helm KA, Han JS, Chun HJ, Pucilowska J, Lund PK, Gallagher M (2001) Hypothalamic–pituitary–adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats *Eur. J. Neurosci.*, 14 (10), pp. 1739–1751.
- Blander G, Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 417–435.
- Blind RD, Garabedian MJ (2008) Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109(1-2):150–7.
- Boguszewski P, Zagrodzka J, (2005) Expression of c-Fos in response to stressogenic stimuli in the amygdala of old vs. young rats—a preliminary study. *Acta Neurobiol. Exp.* 65, 191–194.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging*. 25(3):333–340.
- Bordone L, Guarente L (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 298–305.
- Brody H (1955) Organization of the cerebral cortex, III, A study of aging in the human cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology* 102:511-556.
- Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005) Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex.* 15:1714–1722.
- Brown WR, Thore CR (2011) Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:56–74.
- Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP (1999) Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Annals of Neurology* 45, 8–15.
- Brummelte S, Galea LA (2010) Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats *Neuroscience*, 168, pp. 680–690.

- Burke SN, Barnes CA (2010) Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics *Trends Neurosci.*, 14, pp. 153–161.
- Cabeza R (2004) Commentary: neuroscience frontiers of cognitive ageing: approaches to cognitive neuroscience of ageing. In: Dixon R, Backman L, Nilsson L, eds. *New frontiers in cognitive ageing*. Oxford: Oxford University Press, 2004:179–98.
- Cabeza R, Daselaar S, Dolcos F, Prince S, Budde M, Nyberg L (2004) Task-independent and task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. *Cerebral Cortex* 14:364–75.
- Calabrese EJ (2004) Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose–response model in risk assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 125–136.
- Calabrese EJ, McCarthy ME, Kenyon E (1987) The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys.* 52, 531–541.
- Cappola AR, Maggio M, Ferrucci L (2008) Is research on hormones and aging finished? No! Just started! *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 63 696–698.
- Carter RN, Paterson JM, Tworowska U, Stenvers DJ, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC (2009) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormalities in response to deletion of 11beta-HSD1 is strain-dependent. *J. Neuroendocrinol.* 21:879–887.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 67:259-284.
- Chen D, Guarente L (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol. Med.* 13, 64–71.
- Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L (2005a) Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* 310, 1641.
- Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L (2005b) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 40364–40374.
- Chen KC, Blalock EM, Curran-Rauhut MA, Kadish I, Blalock SJ, Brewer L, Porter NM, Landfield PW (2013) Glucocorticoid-Dependent Hippocampal Transcriptome in Male Rats: Pathway-Specific Alterations With Aging. *Endocrinology*, 154(8):2807-2820.
- Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z, Cavasotto CN, Hittelman AB, Rogatsky I, Logan SK, Garabedian MJ (2008) Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol. Endocrinol.* 22, 1754–1766.
- Chen W, Rogatsky I, Garabedian MJ (2006) MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 20:560–572.
- Chrousos GP, Kino T (2009) Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann NY Acad Sci.* 1179:153–166.
- Cintra A, Bhatnagar M, Chadi G, Tinner B, Lindberg J, Gustafsson JA, Agnati LF, Fuxe K (1994) Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann NY Acad Sci.* 746:42-61.
- Cizza G, Gold PW, Chrousos GP (1995) Aging is associated in the 344/N Fischer rat with decreased stress responsivity of central and peripheral catecholaminergic systems and impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann. NY Acad. Sci.* 771:491–511.

- Cobice DF, Mackay CL, Goodwin RJ, McBride A, Langridge-Smith PR, Webster SP, Walker BR, Andrew R (2013) Mass spectrometry imaging for dissecting steroid intracrinology within target tissues *Anal. Chem.* 85, pp. 11576–11584.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139, 1157–1169.
- Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys, *Nat. Commun.* 5, p. 3557
- Conrad CD (2008) Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci.* 19:395–411.
- Conrad CD, Bimonte-Nelson HA (2010) Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes on trajectory of age-related cognitive decline. *Prog. Brain Res.* 182 31–76.
- Croft AP, O'Callaghan MJ, Shaw SG, Connolly G, Jacquot C, Little HJ (2008) Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone *Brain Res.*, 1238, pp. 12–22.
- D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C (1997) A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7(6):803–12.
- D'Costa A, Breese CR, Boyd RL, Booze RM, Sonntag WE (1991) Attenuation of Fos-like immunoreactivity induced by a single electroconvulsive shock in brains of aging mice. *Brain Res.* 567:204–211.
- Dachir S, Kadar T, Robinzon B, Levy A (1993) Cognitive deficits induced in young rats by long-term corticosterone administration. *Behav Neural Biol* 60:103–109.
- Dallman MF, Levin N, Cascio CS, Akana SF, Jacobson L, Kuhn RW (1989) Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion by corticosteroids is mediated via type I corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology.* 124:2844–2850.
- David JP, Ghazali F, Fallettbianco C, Watzel A, Delaine S, Boniface B, Dimenza C, Delacourte C (1997) Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in the human brain *Neurosci. Lett.*, 235, pp. 53–56.
- Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P (2010) Old age as a privilege of the “selfish ones”. *Aging Dis.* 1(2): 139–146.
- Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT, Sial EA, Gkourtsa A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M (2008) Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol.* 22, 1331–1344.
- Davies TH, Ning YM, Sanchez ER (2002) A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 277:4597-4600.
- Davies TH, Ning YM, Sanchez ER (2005) Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry* 44:2030-2038.
- De Bosscher K, Beck IM, Haegeman G (2010) Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? *Brain Behav Immun* 24(7):1035–42.

- de Grey ADNJ (2007) Life Span Extension Research and Public Debate: Societal Considerations. *Studies in Ethics, Law, and Technology* 1 (1, Article 5).
- de Kloet ER (1991) Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control *Front Neuroendocrinol*, 12, pp. 95–164.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease *Nat. Rev. Neurosci.* 6, pp. 463–475.
- de Kloet ER, Karst H, Joels M (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol.* 29:268–272.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences* 22 422–426.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *EndocrRev* 19(3):269–301.
- Dekaban AS (1978) Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Annals of Neurology* 4:345-356.
- Del Roso A, Vittorini S, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Masini M, Pollera M, Bergamini E (2003) Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp. Gerontol.* 38, 519–527.
- Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK (2002) Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4113–4123.
- Desjardins S, Mayo W, Vallee M, Hancock D, Le Moal M, Simon H, Abrous DN (1997) Effect of aging on the basal expression of c-Fos, c-Jun, and Egr-1 proteins in the hippocampus. *Neurobiol. Aging.* 18:37–44.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci.* 13:3839-3847.
- Droste SK, Collins A, Lightman SL, Linthorst ACE, Reul JMHM (2009b) Distinct time-dependent effects of voluntary exercise on circadian and ultradian rhythms and stress responses of free corticosterone in the rat hippocampus *Endocrinology*, 150, pp. 4170–4179.
- Droste SK, de Groote L, Lightman SL, Reul JMHM, Linthorst ACE (2009a) The ultradian and circadian rhythms of free corticosterone in the brain are not affected by gender: an in vivo microdialysis study in Wistar rats *J. Neuroendocrinol*, 21, pp. 132–140.
- Duan W, Lee J, Guo Z, Mattson MP (2001) Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J. Mol. Neurosci.* 16, 1–12.
- Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS (1996) Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys* 333:189–97.
- Đorđević-Marković R, Radic O, Jelic V, Radojčić M, Rapić-Otrin V, Ruzdijić S, Krstić-Demonacos M, Kanazir S, Kanazir D (1999) Glucocorticoid receptors in ageing rats. *Exp Gerontol.* 34(8):971-82.
- 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(1–2):154–162.
- Fan C, Zhang M, Shang L, Cynthia NA, Li Z, Yang Z, Chen D, Huang J, Xiong K (2014) Short-term environmental enrichment exposure induces proliferation and maturation of doublecortin-positive cells in the prefrontal cortex. *Neural Regen Res* 9:318-28.

- Ferguson D, Sapolsky R (2007) Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory *J. Neurosci.*, 27 (30), pp. 8046–8052.
- Ferrari E, Magri F, Dori D, Migliorati G, Nescis T, Molla G, Fioravanti M, Solerte SB (1995) Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans *Neuroendocrinology*, 61, pp. 464–470
- Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP (2003) The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci.* 18:2357- 2364.
- Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience.* 64:619-628.
- Flammer JR, Rogatsky I (2011) Minireview: glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol Endocrinol* 25(7):1075–86.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy lifespan— from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.
- Foundas AL, Zipin D, Browning CA (1998) Age-related changes of the insular cortex and lateral ventricles: conventional MRI volumetric measures. *Journal of Neuroimaging* 8:216- 221
- Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G (2000) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35: 879–896.
- Gallagher-Beckley AJ, Cidlowski JA (2009) Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61, 979–986.
- Gallagher-Beckley AJ, Williams JG, Collins JB, Cidlowski JA (2008) Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7309–7322.
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F (1994) Gonadal hormones as promoter of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms *Prog. Neurobiol.*, 44, pp. 279–307.
- Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F (2012a) Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat *Neurobiol. Aging*, 33, pp. 375–382.
- Garrido P, De Blas M, Gine E, Santos A, Mora F (2012b) Aging impairs the control of prefrontal cortex on the release of corticosterone in response to stress and on memory consolidation *Neurobiology Aging*, 33 (4) 827 e821–829.
- Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE (1995) Hippocampal markers of aged-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives *Prog. Neurobiol.*, 45, pp. 223–252.
- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K (2007) Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47):18754–9.
- Gottfried-Blackmore A, Sierra A, McEwen BS, Ge R, Bulloch K (2010) Microglia express functional 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Glia* 58(10):1257–66.
- Gourley SL, Wu FJ, Taylor JR (2008) Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model *Ann N Y Acad Sci*, 1148, pp. 509–514.

- Goyns MH, Charlton MA, Dunford JE, Lavery WL, Merry BJ, Salehi M, de CM Simoes D (1998) Differential display analysis of gene expression indicated that age-related changes are restricted to a small cohort of genes *Mech. Ageing Dev.*, 101, pp. 73–90.
- Green MW, Elliman NA, Rogers PJ (1995) Lack of effect of short-term fasting on cognitive function. *Journal of Psychiatric Research* 29, 245–253.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350(2):299–309.
- Guarente L (2006) Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 444, 868–874.
- Guidotti G, Calabrese F, Anacker C, Racagni G, Pariante CM, Riva MA (2013) Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 38, 616–627.
- Guo Z, Mitchell-Raymundo F, Yang H, Ikeno Y, Nelson J, Diaz V, Richardson A, Reddick R (2002) Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E deficient mice. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1121–1131
- Guo ZH, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP (2000) Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *Journal of Neurochemistry* 75, 314–320.
- Haigis, MC, Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 20, 2913–2921.
- Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 β -HSD-1 plays a key role in regulation of the HPA axis: analysis of 11 β -HSD-1 deficient mice. *Endocrinology* 142, 114–120.
- Hasher L, Zacks RT (1988) Working memory, comprehension, and aging: a review and a new view. In: Bower, GH., editor. *The Psychology of Learning and Motivation*. New York: Academic; p. 193–225.
- Hassan AH, Patchev VK, von Rosenstiel P, Holsboer F, Almeida OF (1999) Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat *FASEB J.*, 13, pp. 115–122.
- Haug H. The aging human cerebral cortex: Morphometry of areal differences and their functional meaning. In: Dani SU, Hori A, Walter GF, eds. *Principles of neural aging*. Amsterdam: Elsevier Science; 1997:247-261.
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195–2224.
- Hayflick L (2000) The future of ageing. *Nature* 408, 267–269.
- Head D, Buckner R, Shimony J, Williams L, Akbudak E, Conturo T, McAvoy M, Morris J, Snyder A (2004) Differential vulnerability of anterior white matter in nondemented ageing with minimal acceleration in dementia of the Alzheimer type: evidence from diffusion tensor imaging. *Cereb Cortex* 14:410–23.
- Henley DE, Lightman SL (2011) New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience* 180:1–8.
- Herlitz A, Yonker J (2004) Hormonal effects on cognition in adults. In: Dixon R, Backman L, Nilsson L, eds. *New frontiers in cognitive ageing*. Oxford: Oxford University Press, 2004:253–78.
- Herman JP (2013) Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci.* 7:61.

- Herman JP, Cullinan WE, Morano MI, Akil H, Watson SJ (1995) Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *J Neuroendocrinol.* 7:475-482.
- Herman JP, Cullinan WE, Young EA, Akil H, Watson SJ (1992) Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Res.* 592:228-238.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29:1201-1213.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117: 5965–5973.
- Ho KC, Roessmann U, Straumfjord JV, Monroe G (1980) Analysis of brain weight. I. Adult brain weight in relation to sex, race, and age. *Archives of pathology and laboratory medicine* 104:635-639.
- Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all ‘fos-ed out’? *Journal of Neuroendocrinology* 14 (4), 259–268.
- Holliday R (1992) The ancient origins and causes of ageing. *News Physiol. Sci.* 7:38-40.
- Holliday R (2000) Ageing research in the next century. *Biogerontology* 1, 97–101.
- Holloszy JO, Fontana L (2007) Caloric restriction in humans. *Exp. Gerontol.* 42, 709–712.
- Holmes MC, Carter RN, Noble J, Chitnis S, Dutia A, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR, Yau JL (2010) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression is increased in the aged mouse hippocampus and parietal cortex and causes memory impairments. *J. Neurosci.* 30, 6916–6920.
- Holmstrom SR, Chupreta S, So AY, Iniguez-Lluhi JA (2008) SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol. Endocrinol.* 22, 2061–2075.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477–501.
- Hori N, Hirotsu I, Davis PJ, Carpenter DO (1992) Long-term potentiation is lost in aged rats but preserved by calorie restriction. *Neuroreport.* 3(12):1085–1088.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196.
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7531–6.
- 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.
- Ismaili N, Blind R, Garabedian MJ (2005) Stabilization of the unliganded glucocorticoid receptor by TSG101. *J Biol Chem.* 280(12):11120–6.
- Ismaili N, Garabedian MJ (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann NY Acad Sci.* 1024:86–101.

- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci.* 10:3247–3254.
- Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM (2006) Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J. Exp. Med.* 203, 7–13.
- Itoh M, Adachi M, Yasui H, Takekawa M, Tanaka H, Imai K (2002) Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 16, 2382–2392.
- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006) Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J. Neurosci.* 26:5733–5738.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 12:118-134.
- Jankowska EA, Biel B, Majda J, Szklarska A, Lopuszanska M, Medras M, Anker SD, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Ponikowski P (2006) Anabolic deficiency in men with chronic heart failure: prevalence and detrimental impact on survival. *Circulation* 114 1829–1837.
- Jedema HP, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM (1999) Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain Res.* 830:211-217.
- Joels M (2006) Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:244–50.
- Ju H, Wang X, Liu Z, Liu P, Zhao Y, Xiong R, Zhou Y, Chen X (2009) Identification and tissue distribution of a novel rat glucocorticoid receptor splice variant. *Acta Biochim Pol.* 56(1):109-13.
- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease (2013) *Trends in pharmacological sciences.* 34(9):518-530.
- Kalant N, Stewart J, Kaplan R (1988) Effect of diet restriction on glucose metabolism and insulin responsiveness in aging rats. *Mech. Ageing Dev.* 46, 89–104.
- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C (1997) Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2642–7.
- Kanazir D, Ribarac-Stepic N, Trajkovic D, Blečić G, Radojčić M, Metlas R, Stefanović D, Katan M, Perisic O, Popić S, Đorđević-Marković R (1979) The structure and regulatory function(s) of cortisol receptor--1: Extragenosomic effects dependent on the cortisol receptor activation. *J Steroid Biochem.* 11(1B):389-400.
- Kasckow J, Xiao C, Herman JP (2009) Glial glucocorticoid receptors in aged Fisher 344 (F344) and F344/Brown Norway rats. *Exp Gerontol.* 44:335–343.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 5:1-24.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* 18, 3206–3212.
- Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449–460.
- Kim JJ, Yoon KS (1998) "Stress: metaplastic effects in the hippocampus." *Trends in neurosciences* 21(12): 505-509.
- Kirkwood TBL (2002) Evolution of ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123,737–745.
- Kirkwood TBL, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408, 233–238.

- Kishore N, Sommers C, Mathialagan S, Guzova J, Yao M, Hauser S, Huynh K, Bonar S, Mielke C, Albee L, Weier R, Graneto M, Hanau C, Perry T, Tripp CS (2003) A selective IKK-2 inhibitor blocks NF- κ B-dependent gene expression in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts. *J Biol Chem.* 278:32861–32871.
- Kleiman A, Tuckermann JP (2007) Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 275(1–2):98–108.
- Knigge KM (1961) Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdala. *Proc Soc Exp Biol Med.* 108:18-21.
- Kohama SG, Goss JR, Finch CE, McNeill TH (1995) Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol. Aging* 16:59–67.
- Kolb B, Wishaw I (1998) Brain plasticity and behaviour. *Annu Rev Psychol* 49:43–64.
- Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS (2010) Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6):2669–74.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International* 33 (4), 287–297.
- Kovacs KJ, Foldes A, Sawchenko PE (2000) Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci.* 20:3843-3852.
- Kovacs KJ, Makara GB (1988) Corticosterone and dexamethasone act at different brain sites to inhibit adrenalectomy-induced adrenocorticotropin hypersecretion. *Brain Res.* 474:205-210.
- Kowald A, Kirkwood TB (1996) A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res* 316:209–236.
- Krekoski CA, Parhad IM, Fung TS, Clark AW (1996) Aging is associated with divergent effects on Nf-L and GFAP transcription in rat brain. *Neurobiol Aging* 17:833–41.
- Kremen WS1, O'Brien RC, Panizzon MS, Prom-Wormley E, Eaves LJ, Eisen SA, Eyster LT, Hauger RL, Fennema-Notestine C, Fischl B, Grant MD, Hellhammer DH, Jak AJ, Jacobson KC, Jernigan TL, Lupien SJ, Lyons MJ, Mendoza SP, Neale MC, Seidman LJ, Thermenos HW, Tsuang MT, Dale AM, Franz CE (2010) Salivary cortisol and prefrontal cortical thickness in middle-aged men: a twin study *NeuroImage*, 53, pp. 1093–1102.
- Kristan DM (2008) Caloric restriction and susceptibility to intact pathogens. *Age (Dordr.)* 30, 147–156.
- Krstic MD, Rogatsky I, Yamamoto KR, Garabedian MJ (1997) Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol.* 17:3947–3954.
- Krystal BS, Yu BP (1994) Aging and its modulation by dietary restriction. In: Yu, B.P. (Ed.), *Modulation of Aging Processes by Dietary Restriction*. CRC Press, London, pp. 1–36.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027–2033.
- Kumar R., Calhoun W. J. (2008) Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation *Biologics* 2, 845–854.
- Lai M, Horsburgh K, Bae SE, Carter RN, Stenvers DJ, Fowler JH, Yau JL, Gomez-Sanchez CE, Holmes MC, Kenyon CJ, Seckl JR, Macleod MR (2007) Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia *Eur. J. Neurosci.*, 25, pp. 1832–1842.

- Lakshminarasimhan H, Chattarji S (2012) Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala PLoS One, 7 (1), p. e30481
- Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA (2004) Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol. Microbiol.* 53, 1003–1009.
- Landfield PW, Baskin RK, Pitler TA (1981) Brain aging correlates: retardation by hormonal-pharmacological treatments. *Science* 214, 581–584.
- Landfield PW, Blalock EM, Chen KC, Porter NM (2007) A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 4:205–212.
- Landfield PW, Eldridge JC (1994) Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol Aging.* 15(4):579–88.
- Landfield PW, Waymire JC, Lynch G (1978) Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science.* 202:1098–1102.
- Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE (1994) Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors *Brain Pathol.*, 4, pp. 259–275.
- LaPlant Q, Chakravarty S, Vialou V, Mukherjee S, Koo JW, Kalahasti G, Bradbury KR, Taylor SV, Maze I, Kumar A, Graham A, Birnbaum SG, Krishnan V, Truong HT, Neve RL, Nestler EJ, Russo SJ (2009) Role of nuclear factor kappaB in ovarian hormone-mediated stress hypersensitivity in female mice. *Biol Psychiatry.* 65:874–880.
- Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D (2002) Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 143, 3482–3489.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice *Nat. Genet.*, 25, pp. 294–297.
- Lee EH, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC (2003) Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation *Eur. J. Neurosci.* 18, pp. 2842–2852.
- Lee J, Bruce-Keller AJ, Kruman Y, Chan SL, Mattson MP (1999) 2-deoxy-d-glucose protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: evidence for the involvement of stress proteins. *J. Neurosci. Res.* 57:48–61.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP (2000) Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* 15:99–108.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002a) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 82(6):1367–1375.
- Lee J, Herman JP, Mattson MP (2000) Dietary restriction selectively decreases glucocorticoid receptor expression in the hippocampus and cerebral cortex of rats. *Exp Neurol* 166:435–41.
- Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002b) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 80(3):539–547.
- Lee SY, Hwang YK, Yun HS, Han JS (2012) Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment *Brain Res.*, 1478, pp. 48–54.

- Lefrancois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M (1997) Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron–astrocyte co-cultures. *J Neurosci* 17:4121–8.
- Lemaire V, Koehl M, LeMoal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, pp. 11032–11037.
- Lengvari I, Liposits ZS (1977) Diurnal changes in endogenous corticosterone content of some brain regions of rats *Brain Res*, 124, pp. 571–575.
- Levenson JM, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC, Sweatt JD (2004) A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *J Neurosci* 24(16):3933–43.
- Leverenz JB, Wilkinson CW, Wamble M, Corbin S, Grabber JE, Raskind MA, Peskind ER (1999) Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged non-human primates. *J Neurosci* 19:2356–61.
- Little HJ, Croft AP, O'Callaghan MJ, Brooks SP, Wang G, Shaw SG (2008) Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol *Neuroscience*, 156, pp. 1017–1027.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 7(3):179–193.
- Longo VD, Fontana L (2010) Calorie restriction and cancer: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 89–98.
- Longo VD, Kennedy BK (2006) Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 126, 257–268.
- Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (1998) Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol. Psychiatry*. 43:547–573.
- Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW (2007) Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 13(4):158–63.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 1, 69–73.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10 434–445.
- Lustig C, Buckner R (2004) Preserved neural correlates of priming in old age and dementia. *Neuron* 42:865–75.
- Ma YL, Tsai MC, Hsu WL, Lee EH (2006) SGK protein kinase facilitates the expression of long-term potentiation in hippocampal neurons. *Learn. Mem.* 13, 114–118.
- Macleod MR, Johansson IM, Soderstrom I, Lai M, Gido G, Wieloch T, Seckl JR, Olsson T (2003) Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury *Eur. J. Neurosci.*, 17, pp. 1549–1555.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2001) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem.* 76:532–538.

- Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, Mattson MP (2006) Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J* 20:631–637.
- Martin B, Mattson MP, Maudsley S (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* 5:332–353.
- Masoro EJ (1992) Potential role of the modulation of fuel use in the antiaging action of dietary restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 403–411.
- Masoro EJ (1998) Influence of caloric intake on aging and on the response to stressors. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 1, 243–257.
- 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.
- Matsumae M, Kikinis R, Morocz IA, Lorenzo AV, Sandor T, Albert MS, Black PM, Jolesz FA (1996) Age-related changes in intracranial compartment volumes in normal adults assessed by magnetic resonance imaging. *Journal of Neurosurgery* 84:982-991.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert LR, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489, 318–321.
- Mattson M, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589–94.
- Mattson MP (2003) Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med.* 139(5 Pt 2):441–444.
- Mattson MP (2005) Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 237–260.
- Mattson MP, Chan SL, Duan W (2002a) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol. Rev.* 82, 637–672.
- Mattson MP, Duan W, Chan SL, Cheng A, Haughey N, Gary DS, Guo Z, Lee J, Furukawa K (2002b) Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol. Aging* 23, 695–705.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr.* 10:63–79.
- McCay CM, Maynard LA, Sperleng G, Barnes LL (1975) Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *Nutr. Rev.* 33, 241–243.
- McEwen BS (1992) Re-examination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging. *Prog Brain Res.* 93:365-381; discussion 382–363.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886:172-189.
- McEwen BS (2004) Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann. NY Acad. Sci.* 1032:1–7.
- McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* 153:2093-2101.

- McKay LI, Cidlowski JA (1999) Molecular control of immune/ inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrinol Rev* 20:435–59.
- McNally JG, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287(5456):1262–5.
- McReynolds JR, Donowho K, Abdi A, McGaugh JL, Roozendaal B, McIntyre CK (2010) Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiol Learn Mem.* 93:312–321.
- Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM (1988) Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science.* 239:766–768.
- Meaney MJ, Odonnell D, Rowe W, Tannenbaum B, Steverman A, Walker M, Nair N, Lupien S (1995) Individual-differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity in later life and hippocampal aging. *Exp. Gerontol.* 30, 229–251.
- Meijer OC, Topic B, Steenbergen G, Jocham G, Houston JP, Oitzl MS (2005) Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity *Endocrinology*, 146, pp. 1372–1381.
- Meijer OC, van der Laan S, Lachize S, Steenbergen PJ, de Kloet ER (2006) Steroid receptor coregulator diversity: what can it mean for the stressed brain? *Neuroscience*, 138, pp. 891–899.
- Melov S (2004) Modeling mitochondrial function in ageing neurons. *Trends Neurosci* 27:601–6.
- Merry BJ (2002) Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1340–1354.
- Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 404, 1–13.
- Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB (2007) Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int.* 7:3.
- Miller AL, Webb MS, Copik AJ, Wang J, Johnson BH, Kumar R, Thompson EB (2005) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol.* 19(6):1569–83.
- Miyata Y, Chambraud B, Radanyi C, Leclerc J, Lebeau MC, Renoir JM, Shirai R, Catelli MG,
- Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T (2009) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience.* 159:259–270.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T (2003) Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119:887–897.
- 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. *Neurochemistry international* 56(2): 250-255.
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res. Rev.* 55, pp. 78–88.
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2008) Glutamate–dopamine–GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res. Rev.* 58, pp. 340–353.

- Morgan TE, Rozovsky I, Goldsmith SK, Stone DJ, Yoshida T, Finch CE (1997) Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress *Free Radic. Biol. Med.*, 23, pp. 524–528.
- Morgan TE, Wong AM, Finch CE (2007) Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. *Interdiscip Top Gerontol.* 35:83–97.
- Morgan TE, Xie Z, Goldsmith S, Yoshida T, Lanzrein AS, Stone D, Rozovsky I, Perry G, Smith MA, Finch CE (1999) The mosaic of brain glial hyperactivity during normal aging and its attenuation by food restriction. *Neuroscience* 89: 687–99.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* 26:235–269.
- Moutsatsou P, Psarra AM, Tsiapara A, Paraskevaki H, Davaris P, Sekeris CE (2001) Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 386(1):69-78.
- Mukherjee J, Christian B, Dunigan K, Shi B, Narayanan T, Satter M, Mantil J (2002) Brain imaging of ¹⁸F-Fallypride in normal volunteers: blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to ageing effects on dopamine D-2/D-3 receptors. *Synapse* 46:170–88.
- Munck A, Guyre P, Holbrook N (1984) Physiological actions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endoc Rev.* 5:25-44.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C (2006) Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 26:3813–3820.
- Murphy BL, Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS, Roth RH (1996) Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 93:1325–1329.
- Murphy EK, Spencer RL, Sipe KJ, Herman JP (2002) Decrements in Nuclear Glucocorticoid Receptor (GR) Protein Levels and DNA Binding in Aged Rat Hippocampus *Endocrinology* 143(4):1362–1370.
- Nagahara AH, Handa RJ (1997) Age-related changes in c-fos mRNA induction after open-field exposure in the rat brain *Neurobiol. Aging*, 18, pp. 45–55.
- Nair SC, Rimerman RA, Toran EJ, Chen S, Prapapanich V, Butts RN, Smith DF (1997) Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol Cell Biol* 17:594-603.
- Nakamura N, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (1999) Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J. Neurosci. Res.* 56, 307–315.
- Nayagam VM, Wang X, Tan YC, Poulsen A, Goh KC, Ng T, Wang H, Song HY, Ni B, Entzeroth M, Stunkel W, (2006) SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents. *J. Biomol. Screen.* 11, 959–967.
- Newton IG, Forbes ME, Linville MC, Pang H, Tucker EW, Riddle DR, Brunso-Bechtold JK (2008) Effects of aging and caloric restriction on dentate gyrus synapses and glutamate receptor subunits *Neurobiol. Aging*, 29 (9), pp. 1308–1318.

- Nichols NR (1998) Glucocorticoids and aging, in: C.V. Mobbs, P.R. Hof (Eds.), *Functional Endocrinology of Aging, Interdisciplinary Topics in Gerontology*, Vol. 29, Karger, pp. 1–26.
- Nichols NR (1999) Glial responses to steroids as markers of brain aging *J. Neurobiol.*, 40, pp. 585–601.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain regions *Neurobiol. Aging*, 14, pp. 421–429.
- Nichols NR, Finch CE (1994) Gene products of corticosteroid action in hippocampus. *Ann NY Acad Sci.* 746:145-154; discussion 154–146.
- Nichols NR, Finch CE, Nelson JF (1995) Food restriction delays the age - related increase in GFAP mRNA in rat hypothalamus. *Neurobiol. Aging* 16:105–110.
- Nichols NR, Osterburg HH, Masters JN, Millar SL, Finch CE (1990) Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 7:1–7.
- Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75(1):1–12.
- Nyberg L, Backman L (2004) Cognitive ageing: a view from brain imaging. In: Dixon R, Backman L, Nilsson L, eds. *New frontiers in cognitive ageing*. Oxford: Oxford University Press, 2004:135–60.
- O’Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS (1991) Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem* 57:860–869.
- O’Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS (1989) Glucocorticoids regulate the concentration of glial fibrillary acidic protein throughout the brain. *Brain Res.* 494:159–161.
- O’Riordan KJ, Huang IC, Pizzi M, Spano P, Boroni F, Egli R, Desai P, Fitch O, Malone L, Ahn HJ, Liou HC, Sweatt JD, Levenson JM (2006) Regulation of nuclear factor kappaB in the hippocampus by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 26(18):4870–9.
- Oakley RH, Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286(5):3177–84.
- Oakley RH, Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132(5):1033–44.
- Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S (2010) Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci.* 13:173–179.
- Oitzl MS, De Kloet ER, Joels M, Schmid W, Cole TJ (1997) Spatial learning deficits in mice with a targeted glucocorticoid receptor gene disruption. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2284–2296.
- Okada M, Nakanishi H, Amamoto T, Urae R, Ando S, Yazawa K, Fujiwara M (2003) How does prolonged caloric restriction ameliorate age-related impairment of long-term potentiation in the hippocampus? *Brain Res Mol Brain Res.* 111(1–2):175–181.
- Okamoto K, Tanaka H, Ogawa H, Makino Y, Eguchi H, Hayashi S, Yoshikawa N, Poellinger L, Umesono K, Makino I (1999) Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 274:10363–71.
- Otto C, Reichardt HM, Schütz G (1997) Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J Biol Chem.* 272(42):26665-8.

- Pakkenberg B, Pelvig D, Marner L, Bundgaard MJ, Gundersen HJG, Nyengaard JR (2003) Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol* 38, 95–99.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments *Trends Neurosci*, 31, pp. 464–468.
- Parkin A (1997) *Memory and amnesia*. Oxford: Blackwell.
- Patel NV, Finch CE (2002) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiol. Aging*. 23:707–717.
- Pavlidis C, Watanabe Y, McEwen BS (1993) Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 3:183–192.
- Pitsikas N, Algeri S (1992) Deterioration of spatial and nonspatial reference and working memory in aged rats: protective effect of life-long calorie restriction. *Neurobiol Aging*. 13(3):369–373.
- Pitsikas N, Carli M, Fidecka S, Algeri S (1990) Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiol Aging*. 11(4):417–423.
- Porter NM, Landfield PW (1998) Stress hormones and brain aging: adding injury to insult? *Nat Neurosci*. 1:3–4.
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones *Endocr. Rev.*, 18, pp. 306–360.
- Raison CL, Miller AH (2003) When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders *Am J Psychiatry* 160:1554-1565.
- Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM (1992) Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol Endocrinol*. 6:1451–1457.
- Rangaraju S, Hankins D, Madorsky I, Madorsky E, Lee WH, Carter CS, Leeuwenburgh C, Notterpek L (2009) Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging. *Aging Cell* 8:178–191.
- Rapp PR, Gallagher M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9926–30.
- Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J, West MJ (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging* 17:143–7.
- Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, de Kloet ER (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*. 50:117-123.
- Rattan SI (2004) Aging, anti-aging, and hormesis. *Mech. Ageing Dev.* 125, 285–289.
- Rattan SIS (2000a) Biogerontology: the next step. *Annal. NY Acad. Sci.* 908, 282–290.
- Rattan SIS (2000b) Ageing, gerontogenes, and hormesis. *Ind. J. Exp. Biol.* 38, 1–5.
- Rattan SIS (2003) Biology of aging and possibilities of gerontomodulation. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* B69, 157–164.
- Raz N (2004) The ageing brain: structural changes and their implications for cognitive ageing. In: Dixon R, Backman L, Nilsson L, eds. *New frontiers in cognitive ageing*. Oxford: Oxford University Press, 2004:115–34.
- Raz N, Briggs SD, Marks W, Acker JD (1999) Age-related deficits in generation and manipulation of mental images: II. The role of dorsolateral prefrontal cortex. *Psychology and Aging* 14:436-444.
- Reber AS (1995) *Dictionary of psychology*. London: Penguin.

- Reed MJ, Penn PE, Li Y, Birnbaum R, Vernon RB, Johnson TS, Pendergrass WR, Sage EH, Abrass IB, Wolf NS (1996) Enhanced cell proliferation and biosynthesis mediate impaired wound repair in refed, caloric-restricted mice. *Mech. Ageing Dev.* 89, 21–43.
- Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I (2006) The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J* 25(1):108–17.
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117:2505-2511.
- Reul JM, de Kloet ER (1986) Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem.* 24:269-272.
- Revollo JR, Oakley RH, Lu NZ, Kadmiel M, Gandhavadi M, Cidlowski JA (2013) HES1 is a master regulator of glucocorticoid receptor-dependent gene expression. *Sci Signal* 6(304): ra103.
- Reynolds PD, Ruan Y, Smith DF, Scammell JG (1999) Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *J Clin Endocrinol Metab* 84:663-669.
- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J. Neurosci.* 25, 6243–6250.
- Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D, Smith DF (2003) The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J.* 22, 1158–1167.
- Rigter H, Veldhuis H, de Kloet ER (1984) Spatial learning and the hippocampal corticosterone receptor system of old rats: effect of the ACTH4-9 analogue ORG 2766. *Brain Res.* 309:393–398.
- Rogatsky I, Waase CL, Garabedian MJ (1998) Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J Biol Chem.* 273:14315–14321.
- Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9(9):1081–8.
- Roosendaal B (2000) Glucocorticoid and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25:213–238.
- Rousse I, Beaulieu S, Rowe W, Meaney MJ, Barden N, Rochford J (1997) Spatial memory in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Neuroreport*, 8, 841–845.
- Rubin RT, Mandell AJ, Crandall PH (1966) Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites. *Science.* 153:767-768.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW (1991) Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J. Gerontol.* 46:171–179.
- Sai S, Esteves CL, Kelly V, Michailidou Z, Anderson K, Coll AP, Nakagawa Y, Ohzeki T, Seckl JR, Chapman KE (2008) Glucocorticoid regulation of the promoter of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Mol. Endocrinol.* 22: 2049–2060.
- Salchner P, Lubec G, Singewald N, (2004) Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav. Brain Res.* 151, 1–8.

- Sandi C (1998) The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast.* 6, 41–52.
- Sapolsky R (1992) *Stress, the Aging Brain and the Mechanisms of Neuron Death*. MIT Press, Cambridge 429 pp.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983) The adreno cortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp. Gerontol.* 18:55–64.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:6174–6177.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 7:284–301.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21:55–89
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates *J. Neurosci.* 10, pp. 2897–2902.
- Sapolsky RM, Zola-Morgan S, Squire LR (1991) Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *J Neurosci.* 11:3695–3704.
- Sawchenko PE (1987) Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 403:213–223.
- Scahill R, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal ageing using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol.* 60:989–94.
- Seckl JR, Meaney MJ (2004) Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci.* 1032:63–84.
- Segar TM, Kosckow JV, Welge JA, Herman JP (2009) Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains *Physiol. Behav.* 96, pp. 6–11.
- Segovia G, Mora F (2001) Involvement of NMDA and AMPA/kainate receptors in the effects of endogenous glutamate on extracellular concentrations of dopamine and GABA in the nucleus accumbens of the awake rat. *Brain Res. Bull.* 54, pp. 153–157.
- Shansky RM, Rubinow K, Brennan A, Arnsten AF (2006) The effects of sex and hormonal status on restraint-stress-induced working memory impairment. *Behav. Brain Funct.* 2:8.
- 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.* 206, 70–79.
- Shimokawa I, Higami Y, Hubbard GB, McMahan CA, Masoro EJ, Yu BP (1993) Diet and the suitability of the male Fischer 344 rat as a model for aging research. *J. Gerontol.* 48, B27–B32
- Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR, Kim Y (2004) Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett.* 571:50–54.
- Shoji H, Mizoguchi K (2010) Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats *Behav. Brain Res.* 211, pp. 169–177.

- Smiljanic K, Pesic V, Mladenovic Djordjevic A, Pavkovic Z, Brkic M, Ruzdijic S, Kanazir S (2015) Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. *Biogerontology* 16(1):71-83.
- Smiljanic K, Vanmierlo T, Mladenovic Djordjevic A, Perovic M, Ivkovic S, Lütjohann D, Kanazir S. (2014) Cholesterol metabolism changes under long-term dietary restrictions while the cholesterol homeostasis remains unaffected in the cortex and hippocampus of aging rats. *Age (Dordr)*. 36(3):9654.
- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR (2000) Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats *J. Neurosci.* 20, pp. 6587–6593.
- Sohal RS, Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59–63.
- Sooy K, Webster SP, Noble J, Binnie M, Walker BR, Seckl JR, Yau JLW (2010) Partial deficiency or short-term inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves cognitive function in ageing mice. *J. Neurosci.* 30,13867–13872.
- Speakman JR, Talbot DA, Selman C, Snart S, McLaren JS, Redman P, Krol E, Jackson DM, Johnson MS, Brand MD (2004) Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87–95.
- Speakman JR, van Acker A, Harper EJ (2003) Age-related changes in the metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy. *Aging Cell* 2, 265–275.
- Stahn C, Buttgerit F (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 4(10):525–33.
- Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgerit F (2007) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1–2):71–8.
- Strehl C, Gaber T, Löwenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, Hahne M, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester G, Buttgerit F (2011) Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum.* 63(12):3779–88.
- Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145(2):224–41.
- Svennerholm L, Bostrom K, Jungbjer B (1997) Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol. (Berl)* 94:345–352.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 4:141–194.
- Sytze van Dam P, Aleman A (2004) Insulin – like growth factor-I, cognition and brain ageing. *Eur J Pharmacol.* 490:87–95.
- Tan Z, Seshadri S, Beiser A, Zhang Y, Felson D, Hannan T, Au R, Wolf P, Kiel D (2005) Bone mineral density and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 62:107–11.
- Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S (2007) Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci.* 32(1):38-46.

- Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y (2010) Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology* 151(7):3204–13.
- Tavernarakis N, Driscoll M (2002) Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover? *Mech. Ageing Dev.* 123, 215–229.
- Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA (2002) Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem. J.* 367, 907–911.
- Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD (2011) NF- κ B in aging and disease. *Aging Dis.* 2(6):449–465.
- Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, Nasto LA, St Croix CM, Usas A, Vo N, Huard J, Clemens PR, Stolz DB, Guttridge DC, Watkins SC, Garinis GA, Wang Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD (2012) NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *The Journal of clinical investigation.* 122.7: 2601.
- Tirard M, Almeida OF, Hutzler P, Melchior F, Michaelidis TM (2007) Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor *Mol. Cell. Endocrinol.*, 268, pp. 20–29.
- Toescu E, Verkhratsky A, Landfield P (2004) Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain ageing. *Trends Neurosci.* 27:614–620.
- Trollor J, Valenzuela M (2001) Brain ageing in the new millennium. *Austr N Z J Psychiatry* 35:788–805.
- Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL, Lee EHY (2002) *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:3990–3995.
- Tullberg M, Fletcher E, DeCarli C, Mungas D, Reed BR, Harvey DJ, Weiner MW, Chui HC, Jagust WJ (2004) White matter lesions impair frontal lobe function regardless of their location. *Neurology* 63:246–53.
- van Eekelen JAM, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER (1992) The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the Brown Norway rat. *Neurobiol. Aging.* 13:159–170.
- Vernocchi S, Battello N, Schmitz S, Revets D, Billing A, Turner J, Muller C (2013) Membrane Glucocorticoid Receptor Activation Induces Proteomic Changes Aligning with Classical Glucocorticoid Effects. *Mol Cell Proteomics* 12, 1764–1779.
- Volchegorskii I, Shemyakov S, Turygin V, Malinovskaya N (2004) The age dynamics of monoamine oxidase activity and levels of lipid peroxidation products in the human brain. *Neurosci Behav Physiol.* 34:303–5.
- Voss TC, Schiltz RL, Sung MH, Yen PM, Stamatoyannopoulos JA, Biddie SC, Johnson TA, Miranda TB, John S, Hager GL (2011) Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 146(4):544–54.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 22(15):6810–6818.
- Wallace AD, Cidlowski JA (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276, 42714–42721.
- Wan R, Camandola S, Mattson MP (2003) Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats *J. Nutr.* 133, pp. 1921–1929

- Wang Q, Van Heerikhuize J, Aronica E, Kawata M, Seress L, Joels M, Swaab DF, Lucassen PJ (2013) Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age *Neurobiol. Aging*. 34 (6), pp. 1662–1673.
- Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ (2002) Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol.* 26:109-130.
- Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA (1997) Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem.* 272(14):9287–93.
- Webster JI, Carlstedt-Duke J (2002) Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82:277–288.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993) Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol. Cell. Biol.* 13:2031–2040.
- Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS (2002) Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 9–17.
- Wei Q, Hebda-Bauer EK, Pletsch A, Luo J, Hoversten MT, Osetek AJ, Evans SJ, Watson SJ, Seasholtz AF, Akil H (2007) Overexpressing the glucocorticoid receptor in forebrain causes an aging-like neuroendocrine phenotype and mild cognitive dysfunction. *J Neurosci.* 27:8836–8844.
- Weindruch R, Prolla TA (2002) Gene expression profile of the aging brain. *Arch. Neurol.* 59, 1712–1714.
- Weindruch R, 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, Walford RL (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL.
- Weinert BT, Timiras PS (2003) Invited review: theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 95 1706–1716.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal aging and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769–72.
- Whitnall MH (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system *Prog. Neurobiol.* 40, pp. 573–629.
- Wilkinson CW, Petrie EC, Murray SR, Colasurdo EA, Raskind MA, Peskind ER (2001) Human glucocorticoid feedback inhibition is reduced in older individuals: evening study *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, pp. 545–550.
- Winocur G (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Neurobiol. Aging*, 19, 589–597.
- Wolf IM, Periyasamy S, Hinds T, Yong W, Shou W, Sanchez ER (2009) Targeted ablation reveals a novel role of FKBP52 in gene-specific regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113(1–2):36–45.
- Woolley CS, Gould E, McEwen BS (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 1990:225–231.

- Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR (2011) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol* 32(3):265–86.
- Xing GQ, Russell S, Webster MJ, Post RM (2004) Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7:143–153.
- Xu Z, Zhang Y, Hou B, Gao Y, Wu Y, Zhang C (2010) Chronic corticosterone administration from adolescence through early adulthood attenuates depression-like behaviors in mice. *J. Affect. Disord.* 131:128–135.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I (2007) Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF- κ B in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292, L567–L576.
- Yau JL, Morris RG, Seckl JR (1994) Hippocampal corticosteroid receptor mRNA expression and spatial learning in the aged Wistar rat *Brain Res.* 657, pp. 59–64.
- Yau JL, Noble J, Kenyon CJ, Hibberd C, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR (2001) Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:4716–21.
- Yau JL, Noble J, Seckl JR (2011) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control *J. Neurosci.*, 31, pp. 4188–4193.
- Yau JL, Olsson T, Morris RG, Meaney MJ, Seckl JR (1995) Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66, 571–581.
- Yau JL, Wheelan N, Noble J, Walker BR, Webster SP, Kenyon CJ, Ludwig M, Seckl JR (2015a) Intrahippocampal glucocorticoids generated by 11 β -HSD1 affect memory in aged mice. *Neurobiol. Aging.* 36, 334–343.
- Yau JLW, Noble J, Kenyon CJ, Ludwig M, Seckl JR (2015b) Diurnal and stress-induced intra-hippocampal corticosterone rise attenuated in 11 β -HSD1-deficient mice: a microdialysis study in young and aged mice. *The European Journal of Neuroscience.* 41(6):787-792.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23, 2369–2380.
- Yoshida T, Goldsmith SK, Morgan TE, Stone DJ, Finch CE (1996) Transcription supports age-related increases of GFAP gene expression in the male rat brain. *Neurosci. Lett.* 215, pp. 107–110.
- Yoshida T, Goldsmith SK, Morgan TE, Stone DJ, Finch CE (1996) Transcription supports age-related increases of GFAP gene expression in the male rat brain. *Neurosci Lett.* 215:107–10.
- Young EA, Abelson J, Lightman SL (2004) Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health, *Front. Neuroendocrinol.* 25 69–76.
- Yudt MR, Cidlowski JA (2001) Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 15(7):1093-103.
- Zeier Z, Madorsky I, Xu Y, Ogle WO, Notterpek L, Foster TC (2011) Gene expression in the hippocampus: regionally specific effects of aging and caloric restriction *Mech. Ageing Dev.* 15 (1–2), pp. 8–19.

- Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D. (2013) Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* 497:211–216.
- Zhang Y, Leung DY, Nordeen SK, Goleva E (2009) Estrogen Inhibits Glucocorticoid Action via Protein Phosphatase 5 (PP5)-mediated Glucocorticoid Receptor Dephosphorylation *J. Biol. Chem.* 284, 24542–24552.
- Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y (2006) MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 203(1):131–40.
- Zhen XC, Cai GP, Uryu K, Johnson GP, Friedman E (1999) Age associated impairment in brain MAPK signal pathways and effect of caloric restriction in Fischer 244 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 54:B539–B548.
- Zoli M, Ferraguti F, Gustafsson JA, Toffano G, Fuxe K, Agnati LF (1991) Selective reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal formation and central amygdaloid nucleus of the aged rat. *Brain Res.* 545:199–207.

BIOGRAFIJA

Vesna Tešić je rođena 23.11.1978. godine u Valjevu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek Molekularna biologija i fiziologija, smer Genetičko inženjerstvo i biotehnologija završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,34. Diplomski rad pod naslovom: „Efekat starenja i kalorijske restrikcije na ekspresiju CYP46 i APOE proteina u hipokampusu pacova” uradila je u Laboratoriji za Molekularnu Neurobiologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod mentorstvom dr Selme Kanazir i odbranila ga 27.09.2007. godine sa ocenom 10. Iste godine je započela doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota. Zvanje istraživač saradnik stiče 2010. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za Molekularnu Neurobiologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Milke Perović, a u okviru projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije” (#ON173056, rukovodilac dr Selma Kanazir), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Vesna Tešić je do danas objavila 6 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 15 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Весна Тешић
број индекса M3010/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај дуготрајне рестрикције хране на експресију глукокортикоидног рецептора
у предњем мозгу пацова током старења

- 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, 15.09.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Весна Тешић _____

Број индекса _____ М3010/2007 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада _____ Утицај дуготрајне рестрикције хране на експресију _____

_____ глукостероидног рецептора у предњем мозгу пацова током старења _____

Ментор _____ др Милка Перовић и др Гордана Матић _____

Потписани/а _____ Весна Тешић _____


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, 15.09.2015. _____

 _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај дуготрајне рестрикције хране на експресију глукокортикоидног рецептора у предњем мозгу пацова током старења

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, 15.07.2015.



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.