

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Milica R. Prvulović

**UTICAJ REŽIMA SMANJENOG UNOSA  
HRANE RAZLIČITOG TRAJANJA NA  
PONAŠANJE I mTOR SIGNALNI PUT U KORI  
VELIKOG MOZGA I HIPOKAMPUSU  
MUŽJAKA I ŽENKI *WISTAR* PACOVA TOKOM  
STARENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Milica R. Prvulović

**THE EFFECT OF A RESTRICTED FEEDING  
REGIMEN OF DIFFERENT DURATION ON  
BEHAVIOR AND THE mTOR SIGNALING  
PATHWAY IN THE CORTEX AND  
HIPPOCAMPUS OF AGING MALE AND  
FEMALE *WISTAR* RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

## **MENTOR**

**dr Aleksandra Mladenović**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja, „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

## **KOMISIJA**

**dr Jelena Đorđević**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**dr Desanka Milanović**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Insitut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Smilja Pračer**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Insitut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije” (broj 173056) i projekata 451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007, 451-03-66/2024-03/200007 i 451-03-136/2025-03/200007 finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, odnosno Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.

## ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem dr Selmi Kanazir jer me je primila u svoju laboratoriju i dozvolila mi da učim, rastem kroz naučni rad, ali prvenstveno jer sam sa njom spoznala da mladost duha i hrabrost da se radi ono što se voli nekako uvek doteraju stvari na svoje.

Mom mentoru, dr Aleksandri Mladenović, dugujem zahvalnost najpre za prijateljsku naklonjenost zbog koje sam od prvog dana osećala pripadnost Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju i ponašanje. *Aleksandra, hvala ti što nikad nisi odustala od ideje da me naučiš da verujem u sebe i svoj rad i što si me naučila samostalnosti iako si uvek bila tu za savet kako poslovni tako i privatni.*

Profesorki dr Jeleni Đorđević zahvaljujem na nesebičnom deljenju znanja i izlaženju u susret, kao i na pažnji i posvećenosti koju je uložila i zahvaljujući kojoj se ova teza nalazi u sadašnjoj formi. *Profesorka, hvala na izdvojenom vremenu, naročito u danima kada je vreme bilo dragoceno.*

Mojoj cimi, dr Smilji Praćer, moram prvo da zahvalim na vedrini kojom mi je ulepšavala dane tokom izrade teze. To naravno ne umanjuje znanje koje je sa mnom delila svakodnevno i pomoć koju je pružala kada god bi mi zatrebalo. *Smi, tvoj smeh i otvorenost za sva moja pitanja, eksperimentalna i životna, su ulepšali ovo putovanje.*

Dragoj dr Desi Milanović posebno hvala što me je uvek upućivala u aktuelne naučne tokove, davala kreativne pristupe u predstavljanju i tumačenju rezultata i što je u moru saznanja uvek uspevala da izdvoji one baš meni važne i da ih sa mnom nesebično podeli. *Deso, nadam se da ćeš i ubuduće entuzijastično deliti svoja znanja.*

Mom Miciju hvala na svim terapeutskim kafama, bodrenju, brizi i istinskom prijateljstvu koje mi je pokazala. *Mici, hvala ti što si kročila u laboratoriju 32 baš kada i ja, bez tebe možda nikad ne bih uvidela koliko je filantropski stav lepši u dvoje.*

Hvala Anđi na svim dubokoumnim razgovorima, skuvanim kafama i izlivima ljubavi.

Hvala Mileni, koju sam upoznala kao čoveka a sad je vidim kao diva, što je tu, baš takva kakva jeste.

Valentini želim da zahvalim što me je uvek motivisala svojom istrajnošću i sposobnošću. *Vale, ti si dokaz da čovek može odlučno stremiti ka svojim ciljevima a ipak imati empatije i ljubavi da se nađe svakom kome je pomoć potrebna.*

Olgi bih želela da zahvalim na genijalnosti njenog bića jer dok pišem ove redove ne znam da li bih radije istakla sve informacije iz psihologije koje je sa mnom podelila u okviru naših „rad na sebi“ seansi, sve naučne informacije kojima me je svakodnevno obasipala ili na besprekorni humor kojim je ulepšavala svaki dan u laboratoriji.

Hvala Ireni i Nikoli na svim razgovorima, smehu i *glam* rubrici, a kolegama Srđanu i Željku što su sa mnom delili svoje znanje, ali i na svim prijateljskim trenucima.

Hvala dr Kosari Smiljanić koja me je uvela u naučni i laboratorijski rad. Koleginicama dr Vesni Pešić, dr Milki Perović, dr Jeleni Ćirić i dr Maji Srbovan, hvala na prijateljskoj kolegijalnosti, deljenju znanja, informacija i materijala.

Hvala Nikoli, na svim skuvanim jutarnjim kafama, ljubljenju u glavu i saniranju nervnih slomova.

Kada sam pisala zahvalnicu za master rad, zahvalila sam se mami i tati za sva odricanja i svu ljubav ovog sveta. Ne bih imala ništa pametnije da dodam. *Mama i tata, hvala vam što ste mi dali slobodu da odaberem ko ću biti.*

*Posvećeno svim ljudima koji su za bilo koji poduhvat u životu morali najpre da pobede sebe*

# Uticaj režima smanjenog unosa hrane različitog trajanja na ponašanje i mTOR signalni put u kori velikog mozga i hipokampusu mužjaka i ženki *Wistar* pacova tokom starenja

## Sažetak

Starenje je složen biološki proces praćen postepenim gubitkom fizioloških funkcija i promenama u strukturi i funkciji svih sistema, pa i nervnog. Kao jedna od najefikasnijih intervencija u produženju životnog veka i odlaganju starosno zavisnih promena se pokazala dijetalna restrikcija (DR), definisana kao smanjenje kalorijskog unosa bez pothranjenosti. Međutim, o uticaju koji ima starost organizma i dužina trajanja DR na korisne efekte po kojima je DR poznata, se malo zna.

U ovoj studiji ispitan je uticaj 40% DR različitog trajanja i početka na promene telesne mase, preživljavanje, krhkost, ponašanje, ekspresiju dopaminskih receptora i mTOR signalizaciju kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova. Kod 18-mesečnih ženki, DR je smanjila smrtnost, poboljšala memoriju i smanjila anksiozno ponašanje, bez obzira na to da li je započeta u ranom ili kasnom periodu života, dok je kod starih ženki efekat zavisio od trenutka otpočinjanja DR. Kod mužjaka, DR je povećala preživljavanje i smanjila krhkost, ali nije poboljšala memoriju, dok je anksioznost bila povećana u svim grupama. Ekspresija proteina mTOR signalnog puta se menjala u zavisnosti od pola, starosti organizma i dužine trajanja DR. Rezultati ističu ključnu ulogu pola i vremena otpočinjanja DR. Iako rezultati potvrđuju da je DR moćna strategija za zdravo starenje negativni efekti kasno započete DR naglašavaju važnost definisanja optimalnog vremenskog okvira za uvođenje DR, ukazujući na potrebu za personalizovanim pristupom u u intervencijama za odlaganje starosnih promena.

**Ključne reči:** Dijetalna restrikcija, starenje, krhkost, ponašanje, anksioznost, memorija, mTOR, dopaminski receptori

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Neurobiologija, Animalna i humana fiziologija

# **The effect of a restricted feeding regimen of different duration on behavior and the mTOR signaling pathway in the cortex and hippocampus of aging male and female *Wistar* rats**

## **Abstract**

Aging is a complex biological process characterized by a gradual loss of physiological functions accompanied with changes in the structure and function of all systems, including the nervous system. Dietary restriction (DR), defined as a reduction in caloric intake without malnutrition, has proven to be one of the most effective interventions for extending lifespan and delaying age-related changes. However, data are lacking on how the onset and duration of DR, as well as sex, influence its beneficial effects.

This study examined the effects of 40% DR of various duration and onset on body weight, survival, frailty, behavior, dopamine receptor expression, and mTOR signaling in male and female *Wistar* rats. In 18-month-old females, DR reduced mortality, improved memory, and decreased anxiety-related behavior, regardless of whether it was initiated early or late in life, while the effect in older females depended on the timing of when DR was initiated. In males, DR increased survival and reduced frailty, but did not improve memory, whereas anxiety was heightened in all groups. The expression of proteins in the mTOR signaling pathway varied depending on sex, age, and the duration of DR.

The results highlight the critical roles of sex and the timing of DR initiation. Although the findings confirm that DR is a powerful strategy for healthy aging, the negative effects of late-started DR emphasize the importance of defining an optimal timeframe for implementing DR, indicating the need for a personalized approach in interventions aimed at delaying age-related changes.

**Key words:** Dietary restriction, aging, frailty, behavior, anxiety, memory, mTOR, dopamine receptors

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Neurobiology, Animal and human physiology

## LISTA SKRAĆENICA

4E-BP (engl. *eIF4E binding protein*) - eIF4E vezujući protein

AB - Alchajmerova bolest

ADF (engl. *alternate-day fasting*) - režim gladovanja svaki drugi dan

AL (lat. *ad libitum*)- slobodno, po volji

AMP (engl. *adenosine monophosphate*) - adenzin monofosfat

AMPA (engl. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) - α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase*) - AMP aktivirana protein kinaza

APP (engl. *Amyloid precursor protein*) - prekursor amiloidnog proteina

APS (engl. *Ammonium persulfate*) - amonijum persulfat

ARC (engl. *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*)

ATG (engl. *autophagy related*) - (geni) uključeni u proces autofagije

ATP (engl. *adenosine triphosphate*) - adenzim trifosfat

BCA (engl. *bicinchoninic acid*) - bicinhoninska kiselina

BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) - neurotrofinski faktor mozga

BMI (engl. *body mass index*) - indeks telesne mase

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

CALERIE studija (engl. *Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*) – studija sveobuhvatne procene dugoročnih efekata smanjenja unosa energije

CaMKII (engl. *calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II*) - kalcijum/kalmodulin zavisna protein kinaza II

cAMP (engl. *cyclic adenosine monophosphate*) - ciklični adenzin monofosfat

CBG (engl. *Corticosteroid-Binding Globulin*) - kortikosteron-vezujući globulin

CR (engl. *calorie restriction*) - kalorijska restrikcija

CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*)

D1R (engl. *Dopamine receptor D1*) - dopaminski receptor D1

D2R (engl. *Dopamine receptor D2*) - dopaminski receptor D2

DASH (engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) - Dijetalni režim za hipertenziju

ddH<sub>2</sub>O - dejonizovana i demineralizovana voda

DEPC (engl. *diethyl pyrocarbonate*) - dietil-polikarbonat

DEPTOR (engl. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*)



DI (engl. *discrimination index*) - indeks diskriminacije

DMSO (engl. *Dimethyl sulfoxide*) - dimetil sulfoksid

DR (engl. *dietary restriction*) - dijetalna restrikcija

E2 - 17 $\beta$ -estradiol

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - etilen diamin tetra-sirćetna kiselina

Egr-1 (engl. *early growth response 1*) - protein odgovora na rani faktor rasta

EGTA – (engl. *ethylene glycol tetraacetic acid*) - Etilen Glikol- tetrasirćetna kiselina

eIF4E (engl. *Eukaryotic translation initiation factor*) - faktor inicijacije translacije eukariota

ER (engl. *exploration ratio*) - odnos istraživanja

ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) - ekstracelularnim signalom regulisana kinaza

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

FoXO (engl. *foxhead box O, FoXO*)

GABA (engl. *Gamma-aminobutyric acid*) - gama-aminobuterna kiselina

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

GATOR1 (engl. *GTPase-activating protein (GAP) activity toward Rag 1*)

GPx (engl. *glutathione peroxidase*) - glutation peroksidaza

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

HHA osovina (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*) - hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina

IF (engl: *intermittent fasting*) - intermitentno gladovanje

IGF-1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*) - insulinu sličan faktor rasta

IGF-1R - receptor IGF-1

IL-18 - interleukin18

IL-1 $\beta$  - interleukin-1beta

IL-6 - interleukin-6

iRNK (engl. *Messenger RNA, mRNA*) - informaciona RNK

*IRS-1* (engl. *insulin receptor substrate 1*) - supstrat insulinskog receptora

JNK - (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

KDM (engl. *Klemera–Doubal method*) - Klemera-Doubal metoda

kDNK (engl. *complementary DNA, cDNA*) - komplementarna DNK

KODR - kasno otpočeta dijetalna restrikcija

LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) - laki lanac 3 proteina 1 povezan sa mikrotubulama

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

LTD (engl. *long-term depression*) - dugotrajna depresija

LTP (engl. *long-term potentiation*) - dugotrajna potencijacija

MAP2 (engl. *microtubule-associated protein 2*) – protein 2 povezan sa mikrotubulama

MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) - kinaza mitogen aktivirajućeg proteina

mdDA (engl. *mesodiencephalic dopaminergic neurons*) - dopaminski neuroni srednjeg mozga

MIND (engl. *Mediterranean dietary approach to systolic hypertension diet intervention for neurodegenerative delay*) - mediteranski režim ishrane za tretman hipertenzije i odlaganje neurodegenerativnih oštećenja

mLST8 (engl. *mTOR Associated Protein, LST8 Homolog*)

Mn-SOD (engl. *manganese superoxide dismutase*) - mangan superoksid dismutaza

mTOR (engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) - meta rapamicina kod sisara/mehanička meta rapamicina

mTORC1 (engl. *mTOR complex 1*) - mTOR kompleks 1

mTORC2 (engl. *mTOR complex 2*) - mTOR kompleks 2

Nac (lat. *nucleus accumbens*) - akumbens

NAD<sup>+</sup> (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide*) – nikotinamid adenin dinukleotid

NCAM1 (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule 1*) - molekul adhezije neuronskih ćelija

NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)- nuklearni faktor kapa- pojačivač lakog lanca aktiviranih B ćelija

NGF (engl. *Nerve growth factor*) - faktor rasta nerava

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

NMDA (engl. *N-methyl-D-aspartate*) - N-metil-D-aspartat

Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2- related factor 2*)

p70 S6K (engl. *ribosomal protein S6 kinase beta-1*) - ribozomalna protein S6 kinaza

PB - Parkinsonova bolest

PDK1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) - protein kinaza-1 zavisna od PI3K

PGC-1 $\alpha$  (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*) – gama koaktivator 1-alfa receptora

PI3K (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*) – fosfatidilinozitol 3-kinaza

PIP2 (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) - fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat

PIP3 (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) - fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat

PKB/Akt - protein kinaza B

PKC $\alpha/\beta$  (engl. *Protein kinase C alpha/beta*) - protein kinaza C alfa/beta

PR - proteinska restrikcija

PRAS40 (engl. *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*)

PSD-95 (engl. *Postsynaptic density protein 95*)

qPCR (engl. *quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, (RT-PCR)*) - Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu

RAPTOR (engl. *regulatory-associated protein of mTOR*)

RCF (engl. *relative centrifugal force, RCF*) – relativna centrifugalna sila

Rheb (engl. *RAS homolog enriched in brain*) - Ras homolog obogaćen u mozgu

RICTOR (engl. *rapamycin-insensitive companion of mTOR*)

RIPA pufer (engl. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*)

RODR - rano otpočeta dijetalna restrikcija

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

SAB (engl. *Spontaneous alterations*) - spontane alteracije

SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) – Elektroforeza na Natrijum dodecil sulfat poliakrilamidnim gelovima

SGK1 (engl. *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*)

SIRT1 sirtuin 1

SIRT3 – sirtuin 3

SNC (lat. *substantia nigra pars compacta*) - crna supstanca srednjeg mozga

SOD2 – superoksid dismutaza 2

TBST - Tris-Tween 20 pufer

TEMED – (engl. *Tetramethylethylenediamine*) - tetrametiletilendiamin

TFEB (engl. *transcription factor EB*) - transkripcioni faktor EB

TLR (engl. *Toll-like receptor, TLR*) - tolični receptor

TNF- $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor-alpha*) - faktor nekroze tumora-alfa

TNO (engl. *Toxicology and Nutrition Institute*) - Institutu za toksikologiju i ishranu

TRF (engl. *time-restricted feeding*) konzumiranje hrane ograničeno na određeno vreme

TSC1/2 - (engl. *Tuberous sclerosis complex 1/2*)

ULK1 (engl: *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*)

VPS34 (engl: *vesicular protein sorting 34*)

VTA (engl. *ventral tegmental area*) - ventralni pokrov

WNPRC (engl. *Wisconsin National Primate Research Center*) - Nacionalni centar za istraživanje primata u Viskonsinu

$\alpha$ -Syn (engl.  *$\alpha$ -Synuclein*) - alfa-sinuklein

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Starenje.....	1
1.2. Starenje mozga.....	3
1.3. Promene u ponašanju tokom starenja.....	4
1.3.1. Promene u motoričkoj aktivnosti tokom starenja.....	4
1.3.2. Kognitivne promene tokom starenja.....	5
1.3.3. Promene u regulaciji emocija i raspoloženja tokom starenja.....	6
1.3.3.1. Anksioznost i ponašanje nalik anksioznom tokom starenja.....	6
1.4. Uloga ishrane u razvoju i odlaganju starosno zavisnih promena.....	7
1.4.1. Azijska dijeta.....	8
1.4.2. Okinava dijeta.....	8
1.4.3. Mediteranska dijeta.....	8
1.4.4. MIND dijeta.....	9
1.5. Dijetalna restrikcija.....	9
1.5.1. Efekat primene DR na nervni sistem.....	11
1.5.2. Studije primene DR kod primata.....	12
1.5.3. Studije primene DR u humanoj populaciji.....	13
1.5.4. Alternativne restriktivne nutritivne strategije.....	14
1.5.4.1. Proteinska restrikcija.....	14
1.5.4.2. Intermitentno gladovanje.....	14
1.6. Molekularni mehanizmi /signalni putevi u osnovi korisnih efekata DR.....	16
1.6.1. Insulin i IGF-1 signalni put.....	18
1.6.2. AMPK signalni put.....	18
1.6.3. Sirtuini.....	19
1.7. mTOR signalni put.....	19
1.7.1. Aktivacija i međusobna regulacija mTORC1 i mTORC2.....	21
1.8. Uloga mTOR signalnog puta u procesu starenja.....	22
1.9. Uloga mTOR signalnog puta u kognitivnim procesima.....	24
1.10. Uloga mTOR signalnog puta u regulaciji anksioznosti.....	25
1.11. Univerzalnost korisnih efekata DR.....	26
2. CILJEVI.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1. Eksperimentalne životinje.....	29
3.2. Testovi ponašanja.....	30
3.2.1. Test otvorenog polja.....	30
3.2.2. Test svetlo-tamne kutije.....	31
3.2.3. Test prepoznavanja novog predmeta.....	32
3.2.4. Y lavirint.....	34
3.3. Indeks krhkosti (FI).....	35
3.4. Određivanje relativne ekspresije gena metodom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (qPCR).....	41
3.4.1. Izolacija RNK.....	41
3.4.2. Reverzna transkripcija (sinteza kDNK).....	41
3.4.3. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (qPCR).....	41
3.5. Određivanje količine proteina metodom semikvantitativne analize imunoblotova – <i>Western blot</i> metoda.....	42

3.5.1. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva.....	42
3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina .....	42
3.5.3. Elektroforeza i elektrotransfer proteina .....	43
3.5.4. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima.....	44
3.5.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova .....	44
3.6. Statistička obrada rezultata .....	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. Promene fizioloških parametara mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	47
4.1.1. Promene u unosu hrane mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova tokom starenja .....	47
4.1.2. Promene telesne mase kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja ...	47
4.1.3. Preživljavanje mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	50
4.1.4. Klinički indeks krhkosti (FI) mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa .....	53
4.1.4.1. Mužjaci .....	54
4.1.4.2. Ženke.....	58
4.2. Ponašanje mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	62
4.2.1. Ponašanje ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja u testu otvorenog polja .....	62
4.2.2. Odgovor na stres izazvan novinom kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	65
4.2.2.1. Mužjaci .....	65
4.2.2.2. Ženke.....	66
4.2.3. Prepoznavanje novog predmeta kao odraz očuvane kratkotrajne i dugotrajne memorije kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	66
4.2.3.1. Mužjaci .....	67
4.2.3.2. Ženke.....	69
4.2.4. Ponašanje nalik anksioznom kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	71
4.2.4.1. Putanje u testu otvorenog polja kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	72
4.2.4.2. Ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom u testu otvorenog polja kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	75
4.2.4.2.1. Mužjaci.....	75
4.2.4.2.2. Ženke.....	77
4.2.4.3. Ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom u testu svetlo-tamne kutije kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	79
4.2.4.3.1. Mužjaci.....	79
4.2.4.3.2. Ženke.....	80
4.3. Molekularne promene u mozgu mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	83
4.3.1. Ekspresija gena za D1 i D2 receptore kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	83
4.3.1.1. Ekspresija gena za dopaminske D1 i D2 receptore na nivou iRNK kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	83
4.3.1.1.1. Mužjaci.....	83
4.3.1.1.2. Ženke.....	84
4.3.1.2. Ekspresija gena za dopaminske receptore D1 i D2 na nivou proteina kod mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja.....	87
4.3.1.2.1. Mužjaci.....	87

4.3.1.2.2. Ženke.....	89
4.3.2. Promene u ekspresiji i fosforilaciji određenih molekula mTOR signalnog puta u kori velikog mozga i hipokampusu mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova AL i DR grupa tokom starenja .....	92
4.3.2.1. Mužjaci .....	92
4.3.2.2. Ženke.....	101
5. DISKUSIJA .....	110
6. ZAKLJUČCI.....	126
7. LITERATURA.....	128

# 1. UVOD

## 1.1. Starenje

Tokom prethodnog veka prosečan životni vek ljudi produžio se za 15 godina u zemljama sa niskim prosečnim prihodima, a za 30 godina u razvijenim zemljama (Park i Reuter-Lorenz, 2009). Obilje hrane smanjilo je stopu mortaliteta i morbiditeta, kao i pothranjenosti što je, u kombinaciji sa napretkom sistema zdravstvene zaštite i nege, dovelo do produžetka života. Globalno se povećava zastupljenost starijih osoba u opštoj populaciji i smatra se da će populacija starijih od 65 godina činiti više od 28% ukupne populacije do 2050. godine ([ourworldindata.org](http://ourworldindata.org)). Međutim, sa produženjem životnog veka povećava se i broj hroničnih, starosno pridruženih bolesti, a potreba za razumevanjem mehanizama starenja i razvijanja odgovarajućih terapijskih pristupa sve je izraženija.

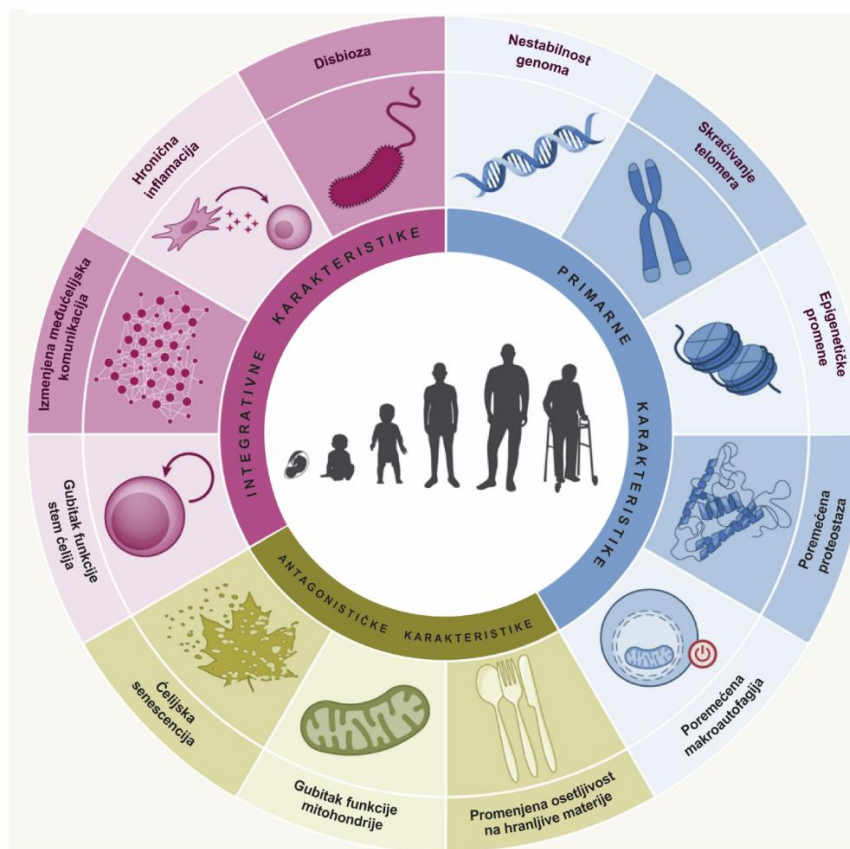
Starenje je kompleksan biološki proces koji pogađa sve organizme, a manifestuje se kao vremenski-zavistan, postepeni gubitak fizioloških funkcija neophodnih za preživljavanje (Pal i Tyler, 2016).

Smatra se da osnovu procesa starenja predstavlja nagomilavanje oštećenja na ćelijskom nivou tokom vremena (Kirkwood, 2005). U skladu sa time, Lopez-Otin i saradnici (Lopez-Otin i sar., 2013) predložili su 9 karakteristika procesa starenja. Iako je koncept sa 9 karakteristika starenja naširoko prihvaćen i citiran, u skladu sa novim saznanjima iz prethodne decenije ova lista je dopunjena, te je 2023. godine predloženo 11 karakteristika starenja (Slika 1.1) (López-Otín i sar., 2023):

1. **Nestabilnost genoma**, koja se ogleda u nagomilavanju oštećenja genetičkog materijala (jedarne i mitohondrijske DNK), kao i narušavanju jedarne arhitekture;
2. **Skraćivanje telomera**, usled odsustva telomeraze u somatskim ćelijama i sledstvenog gubitka sekvenci telomera na krajevima hromozoma tokom svake ćelijske deobe, koja vodi u replikativnu senescenciju (starenje ćelije) ili apoptozu (ćelijsku smrt);
3. **Epigenetičke promene**, uslovljene alternativnom acetilacijom ili metilacijom DNK, histona ili drugih proteina hromatina i remodelovanjem hromatina;
4. **Poremećaj proteostaze** slabljenjem mehanizama kontrole savijanja (engl. *protein folding*) proteina i degradacije nepravilno savijenih proteina koji dovode do agregacije nepravilnih proteinskih formi i sledstveno starosno zavisnih patoloških promena;
5. **Poremećaj makroautofagije** koji rezultuje smanjenom efikasnošću degradacije i/ili recikliranja ćelijskih makromolekula, organela i patogena;
6. **Promenjena osetljivost na hranljive materije** zbog deregulacije insulinskog signalnog puta koji se aktivira u odgovoru na prisustvo glukoze, mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin / mechanistic target of rapamycin*, mTOR) signalnog puta koji se aktivira u odgovoru na prisustvo amino kiselina, kao i energetske senzora AMPK (engl. *AMP (eng. adenosine monophosphate, AMP)-activated protein kinase, AMPK*) - detektora povećanja nivoa AMP i sirtuina - detektora povećanja nivoa NAD<sup>+</sup> u ćeliji (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD*);
7. **Gubitak funkcije mitohondrija** zbog smanjene efikasnosti respiratornog lanca, što vodi curenju elektrona i smanjenjem stvaranja ATP.
8. Intenzivno formiranje i nagomilavanje senescentnih ćelija, sa zaustavljenim ćelijskim ciklusom kao i smanjen stepen njihove eliminacije, zbog oslabljenog imunskog odgovora.
9. **Gubitak funkcije stem ćelija**, koji vodi smanjenju regenerativnog potencijala koje je u korelaciji sa akumulacijom oštećene DNK i prekomernom ekspresijom proteina inhibitora ćelijskog ciklusa.

10. **Izmenjena međućelijska komunikacija**, endokrina, neuroendokrina ili neuronska, koja paralelno sa slabljenjem imunskog odgovora i inflamacijom menja ćelijsko okruženje, a time i funkciju tkiva.
11. **Hronična inflamacija**, koja se povećava tokom starenja (engl. *inflammaging*) značajno doprinosi razvoju starosno zavisnih patologija više sistema organa.
12. **Disbioza**, odnosno poremećaj sastava crevne mikrobiote, kojom je pogađen ne samo proces varenja već i imunološka barijera i produkcija metabolita.

Za svaku od nabrojanih karakteristika je specifično da se manifestuje tokom starenja. Eksperimentalne manipulacije sa datim karakteristikama ubrzavaju starenje, ili ga usporavaju dovodeći time do produžetka životnog veka (López-Otín i sar., 2023).



**Slika 1.1. Karakteristike starenja.** Preuzeto i izmenjeno iz (López-Otín i sar., 2023)

Takođe, obeležja starenja svrstana su u 3 kategorije (López-Otín i sar., 2023):

- Primarne karakteristike, koje su uvek isključivo negativne
- antagonističke karakteristike, koje mogu biti i pozitivne i negativne u zavisnosti od stepena ispoljavanja,
- integrativne karakteristike koje pogađaju homeostazu i funkciju tkiva



## 1.2. Starenje mozga

Promene koje prate starenje narušavaju strukturu i funkciju svih organa i organskih sistema, pa tako i nervnog. Razvoj *neuroimaging* alata u poslednjih 25 godina je znatno doprineo razumevanju starosno zavisnih promena u ponašanju i kogniciji i omogućio detaljno praćenje promena strukture i funkcije mozga tokom starenja.

Promene koje se dešavaju u mozgu tokom starenja obuhvataju promene mase i zapremine mozga, kao i njegove vaskularizacije. Iako je starenje praćeno odumiranjem neurona, ono ne doprinosi u značajnoj meri smanjenju moždane zapremine. Međutim, mikroskopske promene samih neurona, smanjenje njihove veličine, dendritske arborizacije i broja sinapsi, doprinose smanjenju volumena mozga (Park i Reuter-Lorenz, 2009).

Smanjenje mase i zapremine mozga počinje nakon 35. godine života i iznosi 0,2% godišnje, pri čemu se taj procenat postepeno povećava, te nakon 60. godine iznosi 0,5% (Hedman i sar., 2012). Smanjenje zapremine i mase ne zahvata sve regione mozga podjednako, već se dominantno dešava u hipokampusu, strijatumu i prečeonom reznju kore velikog mozga, struktura odgovornih za više kognitivne funkcije i motoriku (Park i Reuter-Lorenz, 2009). Tokom starenja promene zahvataju i belu masu, pri čemu, pored smanjenja mase i zapremine, dolazi i do narušavanja integriteta bele mase (Park i Reuter-Lorenz, 2009).

Tokom starenja dolazi i do smanjenja nivoa neurotransmitera, što se održava na ponašanje, i dovodi do gubitka kognitivnih i motoričkih sposobnosti (Rieckmann i Nyberg, 2020). Pokazano je da se najviše smanjuje nivo dopamina, serotonina, acetilholina i noradrenalina (Backman i sar., 2006; Collier i sar., 1987; Meltzer i sar., 1998; Schliebs i Arendt, 2011). Smanjenje nivoa dopamina je najizraženije u strijatumu, i doprinosi slabljenju kognitivnih i motoričkih funkcija, kao i promenama u motivaciji i raspoloženju (Backman i sar., 2006). Gubitak kognitivne funkcije posredovan je i smanjenjem nivoa preostala tri navedena neurotransmitera, dok je razlog promene raspoloženja, koje se najčešće manifestuju kao poremećaj spavanja i podložnost depresiji, smanjenje dopamina i serotonina (Meltzer i sar., 1998).

Proces starenja mozga je praćen i promenama u genskoj ekspresiji (Berchtold i sar., 2008; Dillman i sar., 2017). Oštećenja DNK koja se nagomilavaju tokom života mogu dovesti do smanjene ekspresije gena u starosti, kao i do sinteze izmenjenih proteina (Cribbs i sar., 2012). Nakon 40. godine života dolazi do smanjenja ekspresije gena povezanih sa sinaptičkom funkcijom i antioksidativnom odbranom, dok se povećava ekspresija gena povezanih sa proinformativnim odgovorom i stresom (Mohan i sar., 2016).

Starenjem se smanjuje ekspresija gena čiji proteinski produkti učestvuju u različitim aspektima sinaptičke strukture i funkcije (Mohan i sar., 2016). Navedene starosno zavisne promene ekspresije gena dovode do diskretnih promena sinaptičke strukture i funkcije (Morrison i Baxter, 2012) i sledstvenih kognitivnih promena čak i kada nisu praćeni smanjenjem broja sinapsi ili neurona (Mohan i sar., 2016). Tokom starenja je detektovano smanjenje ekspresije sinaptičkih proteina GAP43 (engl. *Growth-Associated Protein 43*, GAP43), sinaptofizina (engl. *Synaptophysin*) i  $\alpha$ -sinukleina (engl.  *$\alpha$ -Synuclein*,  $\alpha$ -Syn), proteina ključnih za očuvanje neuronske plastičnosti (Mladenovic Djordjevic i sar., 2010). Takođe se uočava starosno zavisno smanjenje ekspresije gena kako za receptore ekscitatornog neurotransmitera glutamata: AMPA (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA), NMDA (engl. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA) i kainatnih receptora, tako i za receptore inhibitornog neurotransmitera GABA (engl. *Gamma-aminobutyric acid*, GABA) (Dillman i sar., 2017). Tokom starenja dolazi i do smanjenja nivoa NCAM1 (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule 1*, NCAM1), adhezionog proteina koji doprinosi plastičnosti i reparaciji neurona (Dillman i sar., 2017).

Neurotrofinski faktor mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) i faktor rasta nerava (engl. *Nerve growth factor*, NGF) su važni medijatori neuronske plastičnosti, uključeni u preživljavanje, rast i diferencijaciju neurona (Mattson i sar., 2004; Perovic i sar., 2013). Tokom starenja dolazi do smanjenja ekspresije BDNF, neophodnog za učenje i pamćenje, što dovodi do slabljenja kognitivne funkcije (Calabrese i sar., 2013) kao i NGF, što doprinosi razvoju neurodegenerativnih patologija (Alkurd i sar., 2024; Perovic i sar., 2013; Schliebs i Arendt, 2011).

Tokom starenja se menja i ekspresija gena čiji su proteinski produkti ključni u procesu inflamacije. Neuroinflamacija je izražena karakteristika starenja mozga. TLR (engl. *Toll-like receptor*, TLR), je inicijacioni faktor u produkciji proinflamatornih medijatora: citokina, hemokina i reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Mohan i sar., 2016). Tokom starenja uočena je povišena ekspresija TLR, Kaspaze 1 i proinflamatornih citokina: faktora nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6) i interleukina-18 (IL-18) (Mohan i sar., 2016; Xie i sar., 2020).

Promene u ekspresiji navedenih gena doprinose progresivnom smanjenju kognitivnih funkcija tokom starenja jedinke, kao i povećanju rizika za razvoj neurodegenerativnih bolesti.

### 1.3. Promene u ponašanju tokom starenja

Složeni proces starenja menja motoričke, kognitivne i emotivne funkcije dovodeći do promena u ponašanju. Međutim, starosno zavisne promene mozga su individualne i ne manifestuju se na isti način kod svih ljudi. Kod nekih osoba kognitivne funkcije ostaju relativno očuvane, dok drugi imaju značajne probleme sa učenjem, memorijom i rešavanjem problema, koordinacijom pokreta, brzinom reakcija i finom motorikom (Kenyon, 2010; Park i Reuter-Lorenz, 2009). Brojne studije ponašanja, kako na animalnim modelima tako i na humanim subjektima, dale su uvid u mehanizme koji dovode do starosno zavisnih promena u ponašanju.

#### 1.3.1. Promene u motoričkoj aktivnosti tokom starenja

Starosno zavisne promene motoričkih funkcija manifestuju se smanjenom snagom i brzinom kontrakcije mišića, kao i povećanim zamorom (Hunter i Pereira, 2016). Ove promene su posledica narušene funkcije centralnog i perifernog nervnog sistema, i neuromišićnih veza (Seidler i sar., 2010). Starenje dovodi do strukturnih i funkcionalnih promena u motornim regionima kore velikog mozga, cerebeluma i dorzalnog strijatopalidnog kompleksa koji su ključni za centralnu regulaciju motorike (Inoue i Nishimune, 2023; Seidler i sar., 2010), kao i do smanjenja količine neurotransmitera, naročito dopamina (Clark i Taylor, 2011). Da bi se nadoknadila smanjena efikasnost motoričkih funkcija, tokom starenja dolazi do pojačane aktivacije na nivou senzorno-motornog korteksa, ali i do uključivanja dodatnih regiona poput prečeonog režnja kore velikog mozga. Samim tim, kontrola motorike kod starijih osoba sve više zavisi od kognitivnih mehanizama. Međutim, paradoksalno, upravo su strukture mozga odgovorne za kognitivne funkcije posebno osetljive na starosno zavisne promene, te je mogućnost kompenzovanja lošije motorike tokom starenja ograničena (Seidler i sar., 2010). Smanjena fizička aktivnost i motivacija za istom koje se javljaju tokom starenja su deo fenotipa krhkosti (engl. *frailty*), prisutnog u humanoju i animalnim populacijama. Kod ljudi se krhkost manifestuje kao usporen hod, slabost, i smanjen obim fizičke aktivnosti uz nevoljni gubitak telesne mase (Fried i sar., 2001), dok stare životinje u testovima ponašanja pokazuju smanjeno istraživačko ponašanje i niži nivo spontane lokomotorne aktivnosti (Parks i sar., 2012; Whitehead i sar., 2014). Ovakva slika se delom pripisuje i promenama u regionima mozga koji se aktiviraju u odgovoru na nagrađujuće stimulse, a koji motivišu kretanje i istraživanje u mlađoj dobi (Lauretani i sar., 2022).

### 1.3.2. Kognitivne promene tokom starenja

Neurokognitivna slabost predstavlja najveću pretnju uspešnom starenju u modernom društvu. Opadanje kognitivnih funkcija je često progresivnije od gubitka lokomotornih i drugih fizičkih funkcija, dok su terapijske mogućnosti za odlaganje i ublažavanje nastalih promena manje efikasne u odnosu na one koje ciljaju fizičke funkcije. Gubitak samostalnosti i sposobnosti komunikacije i donošenja odluka narušava kvalitet života i socijalne odnose pojedinca, dok na drugom kraju otvara potrebu za kontinuiranim nadzorom i negom.

Kognitivne sposobnosti poput brzine obrade informacija, formiranja i skladištenja memorije, dostižu maksimalnu efikasnost u ranom adultnom dobu, i opadaju tokom starenja. Podeljena pažnja odnosno sposobnost obavljanja više zadataka istovremeno takođe slabi tokom starenja (Park i Reuter-Lorenz, 2009). Kliničke studije su pokazale da starosno zavisni kognitivni pad nije neizbežan, i da neke jedinke zadržavaju prilično očuvane kognitivne funkcije sve do duboke starosti (Park i Reuter-Lorenz, 2009). Ova pojava se najčešće označava kao „uspešno starenje“ i tipična je za osobe koje su genetički otpornije na promene koje prate proces starenja (Park i Reuter-Lorenz, 2009), ali može nastati i sredinskim intervencijama, praktikovanjem redovne fizičke aktivnosti kao i mentalno stimulativnih aktivnosti, poput učenja jezika ili rešavanja „mozgalica“ (Foster, 2006).

Na osnovu studija sprovedenih tokom prethodnih decenija ustanovljeno je da su mehanizmi koji dovode do starosno zavisnih promena kognitivnih funkcija visoko konzervirani među vrstama. Studije na glodarima pokazale su da životinje prolaze kroz slične obrasce kognitivnih promena kakvi su uočeni u humanoj populaciji: stariji glodari pokazuju lošije rezultate u testovima za procenu prostorne memorije koji su bazirani na snalaženju u lavirintu, što ukazuje na starosno zavisne promene hipokampusa (Brito i sar., 2023; Small i sar., 2011).

Prema postojanosti, memorija može biti radna, kratkotrajna i dugotrajna. Kod ljudi, kratkotrajna memorija se odnosi na memoriju koja je neophodna za obavljanje zadataka u vremenskom rasponu od nekoliko minuta, dok se radna memorija odnosi na sposobnost manipulacije informacijama uskladištenim u kratkotrajnoj memoriji. Kod glodara je ova klasifikacija donekle drugačija jer se radna memorija odnosi na privremeno formiranu memoriju koja omogućava obavljanje zadataka u vremenskom intervalu od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, dok se kratkotrajna memorija odnosi na skladištenje informacija, i traje od nekoliko minuta do nekoliko sati (Brito i sar., 2023). Za konsolidaciju dugotrajne memorije neophodna je aktivnost različitih regiona mozga tokom dužeg vremenskog perioda, što je čini najosetljivijom na proces starenja kako kod ljudi tako i kod životinja (Brito i sar., 2023).

Karakteristično je da tokom fiziološkog starenja dugoročna sećanja formirana pre nekoliko godina ili decenija ostaju očuvana, dok je sposobnost prisećanja na nedavne događaje koji pripadaju dugotrajnoj memoriji, značajno oslabljena. Ova pojava sugerise da je u procesu starenja više narušena funkcija konsolidacije dugotrajne memorije, dok su mehanizmi odgovorni za samo prisećanje relativno očuvani (Brito i sar., 2023).

Studije na animalnim modelima značajno su doprinele praćenju i razumevanju kognitivnih promena koje prate starenje. Veliki broj testova za procenu starosno zavisnih promena kod glodara dizajniran je tako da procenjuje funkciju hipokampusa, cerebeluma i kore cerebruma (Kennard i Woodruff-Pak, 2011), moždanih struktura na nivou kojih se u najvećoj meri dešavaju promene odgovorne za izmenjen ponašajni odgovor tokom starenja. Budući da navedene moždane strukture ne podležu starosno zavisnim promenama istom brzinom, pojedini testovi merenja parametara ponašanja okarakterisani su kao „osetljiviji“ na starosno zavisne promene od drugih (Kennard i Woodruff-Pak, 2011). Ipak, važno je istaći da je za procenu kognitivnih sposobnosti kod starih životinja neretko potrebno prilagođavanje uslova već uspostavljenih protokola testova merenja parametara ponašanja (Kennard i Woodruff-Pak, 2011).

Testovi za procenu kognitivnih sposobnosti, odnosno učenja i memorije, u animalnim modelima uključuju upotrebu različitih vrsta lavirinata, pomoću kojih se vrši procena sposobnosti formiranja prostorne memorije i strategija navigacije. Ovi pristupi u testiranju procenjuju kognitivne funkcije u fiziološkom ali i patološkom stanju (Mohseni i sar., 2020). Verovatno najkorišćeniji među testovima za procenu ponašanja laboratorijskih životinja je test otvorenog polja, koji služi za procenu neasocijativne prostorne memorije i najjednostavnije forme učenja-habituacije (Leussis i Bolivar, 2006). Testovi poput Y ili T lavirinta, Morisovog vodenog lavirinta, Barnsovog lavirinta i radijalnog lavirinta, takođe služe za procenu prostorne memorije, i mogu se sprovoditi tako da procenjuju alocentrične i egocentrične strategije učenja, a samim tim vrše i procenu funkcije različitih moždanih struktura (Gardner i sar., 2020; Korol i sar., 2019). Egocentrične strategije oslanjaju se na percepciju same životinje u određivanju pravca kojim se kreće kako bi pronašla cilj. Alocentrične strategije oslanjaju se na spoljašnje reference i prostorni raspored objekata u okruženju: životinja koristi orijentire poput specifičnih predmeta ili karakteristike prostora da bi se pozicionirala i odredila pravac kretanja ka cilju.

Pomenuti test otvorenog polja koristi se i za procenu ponašanja nalik anksioznom, kao i posebno dizajnirani test uzdignutog krstastog lavirinta i test svetlo-tamne kutije (Lovick i Zangrossi, 2021). Testovi prepoznavanja predmeta, odnosno njihovih svojstava i lokacije takođe služe za procenu sposobnosti pamćenja, a u zavisnosti od postavke mogu se koristiti i za procenu ponašanja nalik anksioznom (Gardner i sar., 2020; Korol i sar., 2019).

### 1.3.3. Promene u regulaciji emocija i raspoloženja tokom starenja

Promene u raspoloženju i regulaciji emocija koje se dešavaju tokom starenja takođe dovode do promena u ponašanju, ali tok tih promena u humanoj populaciji može ići u dva pravca. Naime, kod jednog dela populacije se tokom starenja razvija emotivna stabilnost i bolja kontrola negativnih emocija (Carstensen i sar., 1999). Kod drugog dela populacije tokom starenja raste incidenca poremećaja raspoloženja, prvenstveno anksioznosti i depresije (Santini i sar., 2020).

Biološka osnova ovih promena je detaljnije ispitivana u animalnim studijama. Promene nivoa neurotransmitera tokom starenja, prvenstveno dopamina i serotonina, praćene su ispoljavanjem ponašanja nalik anksioznom i simptomima nalik depresiji (Snyder i sar., 2014). Sredinske intervencije poput fizičkih vežbi ili izlaganja novoj sredini ublažavaju negativne emotivne promene kod životinja, što ukazuje na potencijalne terapijske pristupe za ljude koji pate od starosno zavisnih promena raspoloženja (Hendriksen i sar., 2010).

#### 1.3.3.1. Anksioznost i ponašanje nalik anksioznom tokom starenja

Učestalost poremećaja raspoloženja poput anksioznosti i depresije je zdravstveni problem koji zahvata veliki deo populacije, naročito starije. Podaci svetske zdravstvene organizacije ukazuju da se procenat anksioznih ljudi u populaciji starijoj od 60 godina kreće između 1,2 i 14% u opštoj populaciji dok je sudeći prema podacima kliničkih studija ovaj procenat od 1 do 28% (Andreescu i Lee, 2020).

Anksioznost je složeni ponašajni fenomen uslovljen promenama u funkcionisanju više neurotransmiterskih mreža, naročito serotoniniskog, dopaminskog i GABA sistema (Ayano, 2016; Berry i sar., 2019; Volkow i sar., 2011; Zarrindast i Khakpai, 2015). Emotivno procesuiranje osećaja anksioznosti dešava se u bazolateralnim bademastim jedrima, prečeonom reznju kore velikog mozga i hipotalamusu, struktura koje su pod regulacijom ventralnog hipokampusu (Loh i sar., 2017; Wang i sar., 2019).

Nivo dopamina se menja tokom starenja, pri čemu je najveće sniženje zabeleženo u hipokampusu, moždanom stablu i strijatumu (Portero-Tresserra i sar., 2020). Srednji mozak sadrži

najveći udeo dopaminskih neurona mozga (engl: *mesodiencephalic dopaminergic neurons* mdDA). Ovi neuroni su ključni za kontrolu voljnih pokreta, stvaranje asocijacija sa nagrađujućim stimulusima, održavanje radne memorije i regulaciju emocija. mdDA neuroni ventralnog pokrova (engl. *ventral tegmental area*, VTA) inervišu limbičke strukture i prečioni režanj kore velikog mozga čineći mezolimbčki i mezokortikalni put. Mezolimbčki dopaminski put je uključen u regulaciju sistema za obrađivanje nagrađujućih stimulusa, motivaciju i obradu emocija dok mezokortikalni dopaminski put reguliše uzbuđenje, kognitivne i izvršne funkcije poput pažnje i donošenja odluka. Druga populacija mdDA neurona nalazi se u kompaktnom delu crne supstance srednjeg mozga (engl. *substantia nigra pars compacta*, SNc), čiji se nastavci projektuju na dorzalni strijatum formirajući nigrostrijatumski put, ključan za kontrolu voljnih pokreta (DeGroot i sar., 2020; Nikolaus i sar., 2010). Strijatum igra ključnu ulogu u modulaciji motoričkih funkcija, proceduralnog učenja i donošenja odluka, pri čemu dopamin deluje kao regulator ovih funkcija (Gerfen i Surmeier, 2011).

Sve ove regije i putevi su uključeni u kontrolu anksioznog ponašanja kod ljudi, odnosno ponašanja nalik anksioznom kod eksperimentalnih životinja (DeGroot i sar., 2020; Nikolaus i sar., 2010) i bogati su dopaminskim D1 i D2 receptorima koji su važni u kontroli anksioznosti (Carr, 2002; Kenneth D. Carr, 2007; Carr i sar., 2003; Gallardo i sar., 2014). Kako je određivanje nivoa dopamina u moždanom tkivu izazovno, indirektni pristup za procenu dopaminske aktivnosti jeste merenje ekspresije dopaminskih receptora. Dopamin deluje preko dve klase dopaminskih receptora: D1 tip i D2 tip, pri čemu oba tipa receptora pripadaju klasi receptora spregnutih sa proteinom G. D1 tip receptora, koji uključuje D1 i D5 receptore, spregnut je sa proteinom G sa alfa stimulatornom subjedinicom i dovodi do aktivacije adenil ciklaze i povećanja nivoa cikličnog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). D1 i D5 receptori se najzastupljeniji u strijatumu, akumbensu (lat. *nucleus accumbens*, Nac) i crnoj supstanci srednjeg mozga gde imaju važnu ulogu u sistemu nagrađivanja, motoričkoj aktivnosti, memoriji i učenju (Bhatia i sar., 2024). D2 tip receptora uključuje D2, D3 i D4 dopaminske receptore, za razliku od prethodnog tipa spregnute sa proteinom G sa alfa inhibitornom subjedinicom, kojom inhibiraju aktivnost adenil ciklaze, a takođe otvaraju kanale za kalijum i dovode do hiperpolarizacije (Bhatia i sar., 2024). D2, D3 i D4 receptori eksprimiraju se dominantno u strijatumu, ali i Nac, hipokampusu, bazolateralnim bademastim jedrima i kori velikog mozga, a važni su za razvoj i preživljavanje dopaminskih neurona (Mishra i sar., 2018; Vekshina i sar., 2017).

#### **1.4. Uloga ishrane u razvoju i odlaganju starosno zavisnih promena**

Proces starenja određuje dužinu života. Iako je slabljenje fizioloških funkcija neizbežno, brzina kojom se ono dešava je promenljiva i pod uticajem sredinskih faktora. Nutritivni aspekt je izuzetno bitan za proces starenja, jer prekomerni unos hrane može ubrzati ovaj proces, dok unos adekvatnih namirnica i restrikcija unosa hrane mogu produžiti život ne samo gojaznih jedinki već i jedinki sa normalnom telesnom masom.

Uravnotežena ishrana ima važnu ulogu u promovisanju zdravog starenja i poboljšanju kvaliteta života. Pokazano je da osobe koje praktikuju uravnoteženu ishranu, koja obiluje biljnim namirnicama, antioksidansima, zdravim mastima i vlaknima, imaju manju incidencu kardiovaskularnih bolesti i stanja praćenih inflamacijom (Garcia-Montero i sar., 2021). Takođe, adekvatan unos proteina tokom starenja je ključan za sprečavanje gubitka mišićne mase, dok mikronutrienti kao što su vitamini D i B12, omega-3 masne kiseline i polifenoli podržavaju zdravlje mozga i imunsku funkciju (Garcia-Montero i sar., 2021).

Mnoštvo studija se bavilo vezom između određenog načina ishrane i starenja, ukazujući na odlučujuću ulogu koju specifični nutritivni pristupi mogu imati u odlaganju starosno zavisnih promena.

#### 1.4.1. Azijska dijeta

Azijska dijeta koja obuhvata tradicionalne navike u ishrani zastupljene u zemljama istočne Azije, prevashodno u Japanu, Kini i Koreji, je široko prepoznata po svojim značajnim zdravstvenim benefitima, koji doprinose produženju životnog veka i zdravog perioda života. Azijska dijeta se zasniva na izbalansiranom unosu pirinča, povrća, ribe i proizvoda od soje kao što su tofu i miso. Ključni element azijske dijeta jeste upravo soja, koja doprinosi raznolikosti sastava crevnih bakterija (Tamura i sar., 2019). Soja sadrži polifenole koji svojim antioksidativnim svojstvima pružaju brojne zdravstvene benefite, uključujući prevenciju kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, a poseduje i antiinflamatorne i antitumorske efekte (Di Meo i sar., 2019; Liggins i sar., 2000).

#### 1.4.2. Okinava dijeta

Stanovnici Japanskog ostrva Okinava smatraju se najdugovečnijim ljudima, budući da ova populacija broji petostruko više stogodišnjaka u odnosu na druge razvijene nacije (Le Couteur i sar., 2016). Osnovu njihove dugovečnosti čine blaga kalorijska restrikcija, kvalitetna hrana koju konzumiraju, genetika i fizička aktivnost. U Okinava dijeti 85% energetskog unosa potiče od ugljenih hidrata dok svega 9% potiče od masti. Više od polovine dnevnog unosa kalorija dolazi iz batata, koji je bogat fitohemikalijama i antioksidansima. Okinava dijeta obiluje i proizvodima od soje i lisnatim zelenim povrćem sa malo ili bez masti (Le Couteur i sar., 2016).

#### 1.4.3. Mediteranska dijeta

Mediteranska dijeta je najpopularniji i najopsežnije istraživani tip ishrane u zemljama Zapadne Evrope i zemljama koje okružuju mediteransku regiju. Karakteristična je za podneblje mediteranske obale, zbog čega ne postoji jedan univerzalni režim ovog tipa ishrane, već on varira među zemljama Mediterana. Pretežno se bazira na svakodnevnoj konzumaciji voća, povrća, mahunarki i celih žitarica, kao i smanjenom unosu mesa, ribe i mlečnih proizvoda, dok se kao primarni izvor masti koristi maslinovo ulje. U mediteranskoj dijeti je unos mononezasićenih masti visok, dok je unos zasićenih masti nizak. Mediteranska ishrana obiluje i bioaktivnim sastojcima koji imaju antioksidativna svojstva poput polifenola, fitosterola i flavonoida (Garcia-Montero i sar., 2021).

Mediteranska dijeta se smatra jednim od najzdravijih vidova ishrane i često se povezuje sa odloženim početkom hroničnih bolesti koje prate starenje (Sanchez-Morate i sar., 2020), najčešće kardiovaskularnih bolesti, kancera, dijabetesa, kao i opadanja kognitivnih funkcija i pojave neurodegenerativnih bolesti (Bojang i Manchana, 2023). Namirnice koje su zastupljene u mediteranskoj ishrani bogate su vitaminima A i D, koji imaju važne uloge u funkcionisanju imunskog sistema i regulaciji crevne homeostaze, zatim vitaminom C, E i  $\alpha$ -tokoferolom, koji imaju značajan antioksidativni potencijal i vitaminima grupe B sa širokim spektrom uloga, od kofaktora enzimskih reakcija do antiinflamatornih, antioksidativnih i antikancerskih svojstava (Garcia-Montero i sar., 2021). Minerali su takođe visoko zastupljeni u mediteranskoj ishrani. Prisustvo cinka obezbeđuje optimalni imunski odgovor, gvožđe reguliše rast komensalnih crevnih bakterija, dok je selen odgovoran za otpornost na virusne infekcije (Garcia-Montero i sar., 2021).

Nutritivni pristupi bazirani na mediteranskoj ishrani su rezultirali značajnim poboljšanjem lipidnog statusa, zaštitom od oksidativnog stresa, smanjenjem inflamacije, modulacijom nivoa hormona i faktora rasta uključenih u razvoj kancera, kao i modulacijom mikrobioma doprinoseći boljem funkcionisanju organizma domaćina (Garcia-Mantrana i sar., 2018).

#### 1.4.4. MIND dijeta

MIND dijeta (engl. *Mediterranean dietary approach to systolic hypertension diet intervention for neurodegenerative delay*, MIND) je kombinacija mediteranske i tzv. DASH dijete (engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*, DASH), a bazira se na hrani i hranljivim materijama koje promovišu zdravlje mozga i preveniraju/odlažu pojavu neurodegenerativnih poremećaja (Morris i sar., 2015). Ova dijeta se bazira na konzumaciji povrća, posebno lisnatog zelenog povrća, pasulja, bobičastog voća, celih žitarica, badema, morskih plodova, piletine, maslinovog ulja i vina, dok ograničava unos hrane životinjskog porekla i obroka sa visokim sadržajem zasićenih masti, kao i nezdravih namirnica koje sadrže visok nivo holesterola i transmasnih kiselina poput crvenog mesa, margarina, sira, peciva i brze hrane (Bojang i Manchana, 2023). Istovremeno, MIND dijeta potencira unos hrane bogate kalijumom, kalcijumom i magnezijumom, dok ograničava unos natrijuma (Goyal i sar., 2021).

Implementacija MIND dijete može poboljšati kognitivnu funkciju kod starijih i pokazala se uspešnijom od drugih dijeta baziranih na biljnoj ishrani koje se primenjuju u cilju poboljšanja kognicije i neuropsihološkog statusa starijih osoba (Kheirouri i Alizadeh, 2022).

### 1.5. Dijetalna restrikcija

Danas je poznato da unos viška kalorija uzrokuje hroničnu hiperglikemiju i hiperlipidemiju, dovodeći do oštećenja ćelija. Glikotoksičnost i lipotoksičnost same po sebi povećavaju rizik od raznih bolesti, uključujući neuropatiju, nefropatiju, retinopatiju, insulinsku rezistenciju, metabolički sindrom, kardiovaskularne bolesti, nealkoholnu masnu bolest jetre, pankreatitis i sarkopeniju (Liu i Li, 2015). Nizak nivo fizičke aktivnosti je često spregnut sa unosom viška kalorija, čime se znatno povećava procenat masnog tkiva u organizmu, a smanjuje procenat mišićne mase, snaga i kondicija. Sve zajedno utiče na podložnost bolestima, posebno kod starijih osoba (Myers i sar., 2019).

Nasuprot unosu viška kalorija, stoji dijetalna restrikcija (DR, engl. *dietary restriction*, DR)), kao jedan od najzdravijih životnih pristupa i jedna od najispitivanijih eksperimentalnih paradigmi u odlaganju starosno asociranih promena. Osim nevoljnog gladovanja kroz koje su ljudi često prolazili tokom istorije, postoji i voljno suzdržavanje od hrane (post), koje se i danas praktikuje u mnogim kulturama iz verskih, tradicionalnih i medicinskih uverenja (Mattson i sar., 2017; Trepanowski i Bloomer, 2010). Na taj način je dijetalna restrikcija već dugi niz godina široko prisutna u humanoj populaciji.

Postoji nekoliko definicija dijetalne restrikcije, u zavisnosti od oblasti i aspekta sa kojeg se o njoj govori. Sa naučne tačke gledišta, dijetalna restrikcija se definiše kao smanjeni unos hranljivih materija koji ne dovodi do pothranjenosti (Lopez-Lluch i Navas, 2016). Primena DR kao intervencije za odlaganje starosno zavisnih promena zahteva da, iako je unos energije ograničen, ishrana obezbeđuje dovoljno energije za metaboličku homeostazu i bude visokog kvaliteta, tj. da zadovoljava potrebe za mikronutrijentima i vlaknima (Flanagan i sar., 2020).

Dijetalna restrikcija se u literaturi često označava i kao kalorijska restrikcija, jer je zasnovana na smanjenju ukupnog dnevnog unosa kalorija (Heilbronn i sar., 2006; Holben i Marshall, 2017; Kraus i sar., 2019; Longo i sar., 2021; Most i sar., 2017; Patterson i Sears, 2017). Međutim, izjednačavanje dijetalne i kalorijske restrikcije nije opravdano, jer termin „dijetalna restrikcija“ govori da je umanjen unos svih sastojaka hrane, a ne samo kalorijski unos (Masoro, 2009).

Ideja da dijetalna restrikcija može uticati na process starenja datira iz ranih eksperimenata sprovedenih tokom 20. veka (Osborne i sar., 1917). Tridesetih godina prošlog veka, u studiji koja će postati prekretnica u izučavanju efekata DR, Mekkej i saradnici su pokazali da redukcija unosa hrane od 40% značajno produžava životni vek pacova (McCay i sar., 1935). Ova studija pokrenula je

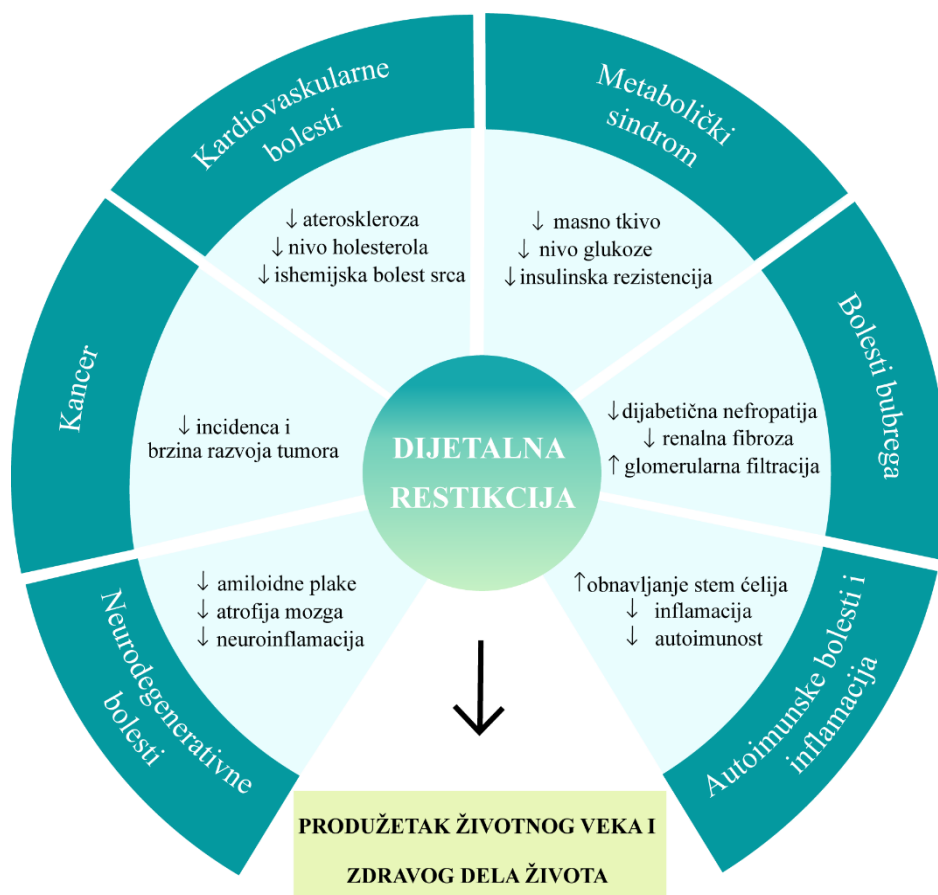
decenije istraživanja o odnosu između unosa hrane i dugovečnosti. Nakon ovog rada, DR se pokazala kao efikasna metoda za produžavanje životnog veka kod različitih vrsta, uključujući kvasce, nematode, vinske mušice, ribe, glodare i pse (Speakman i Mitchell, 2011). Ipak, uprkos značajnom doprinosu razumevanja mehanizama delovanja DR, koji su dale studije na model sistemima poput vinske mušice i nematoda, prvenstveno zahvaljujući jednostavnoj građi i kratkom životnom ciklusu, glodari su se pokazali kao znatno pouzdaniji model za ispitivanje efekata DR zbog svoje sličnosti sa ljudima (Masoro, 2009).

Pored značajnih pozitivnih efekata na celokupan status organizma poput produženja životnog veka i zdravog starenja, primena DR utiče na specifične organske sisteme uključujući kardiovaskularni, mišićni, endokrini, imunski i nervni sistem (Speakman i Mitchell, 2011; Most i sar., 2017) (Slika 1.2). DR može značajno da smanji masu subkutanog i visceralnog masnog tkiva čak i kod zdravih jedinki sa normalnim indeksom telesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI) što doprinosi kardiovaskularnom i metaboličkom zdravlju (Most i sar., 2018). DR ima povoljne efekte na krvni pritisak, nivo holesterola i funkciju endotela, poboljšavajući time elastičnost krvnih sudova i smanjujući rizik od arteroskleroze, koronarne bolesti srca i nastanka infarkta miokarda tokom starenja (Katewa i Kapahi, 2010) (Slika 1.2). Poboljšanje metabolizma ugljenih hidrata pod dejstvom DR, ogleda se u poboljšanju funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa, serumskih vrednosti glukoze i insulina, smanjenju insulinske rezistencije i posledične hiperinsulinemije i dislipidemije, redukcije depoa visceralnih masti i smanjenog rizika za razvoj metaboličkog sindroma (Flanagan i sar., 2020; Speakman i Mitchell, 2011). Pored nivoa insulina, DR menja i nivo tiroidnih, glukokortikoidnih i polnih hormona koji imaju uticaj na dužinu životnog veka (Dakic i sar., 2022) (Slika 1.2).

Studije ukazuju da DR ima protektivno dejstvo i kada su u pitanju tumori. Ovaj protektivni efekat ogleda se u smanjenoj incidenci kao i brzini razvoja tumora različitih tkiva i organa, konkretno, jetre, hipofize, kože, mlečnih žlezda i limfnog sistema. Smanjena incidenca kancera, kao i autoimunskih bolesti u korelaciji su sa boljom funkcijom imunskog sistema koji je uočen u slučaju primene režima DR (Speakman i Mitchell, 2011) (Slika 1.2).

Protektivna svojstva DR na nivou različitih tkiva i organa zasnovana su na regulaciji biohemijskih i ćelijskih procesa, uključujući oksidativni stres, funkciju mitohondrija, inflamaciju, apoptozu i autofagiju (Speakman i Mitchell, 2011), procesa koji su ključni i za proces starenja.





**Slika 1.2. Efekti primene dijetalne restrikcije.** Preuzeto i modifikovano iz (Green i sar., 2022).

### 1.5.1. Efekat primene DR na nervni sistem

DR ima značajan uticaj na nervni sistem, naročito kada su u pitanju neurodegenerativne bolesti, poput Alchajmerove bolesti (AB) i Parkinsonove bolesti (PB). Zajednička karakteristika neurodegenerativnih oboljenja jeste akumulacija proteinskih agregata, usled slabljenje sistema kontrole savijanja i degradacije neispravno savijenih formi proteina (Bové i sar., 2011; Laplante i Sabatini, 2012). Mehanizmi kojima DR sprečava ili odlaže razvoj neurodegenerativnih patologija podrazumevaju stimulaciju procesa autofagije (Bové i sar., 2011; Laplante i Sabatini, 2012), regulaciju inflamacije (Morgan i sar., 2007), smanjenje oksidativnog oštećenja (Dringen, 2000) i regulaciju insulinskog signalnog puta (de la Monte i Wands, 2008).

Pozitivan efekat na održavanje kognitivnih funkcija tokom starenja, DR ostvaruje prevashodno na nivou neuronske plastičnosti, sposobnosti formiranja i reorganizovanja sinapsi, kao i na nivou ekspresije proteina odgovornih za sinaptičku transmisiju (Adams i sar., 2008). DR povećava gustinu dendritskih trnova i ekspresiju subjedinica NMDA receptora čime ostaju očuvane funkcije učenja i pamćenja, koje su naročito osetljive na proces starenja (Xie i sar., 2020). Dodatno, DR povećava i nivo BDNF, čime dodatno poboljšava sinaptičku funkciju i preživljavanje neurona i doprinosi većoj plastičnosti mozga. Povećana ekspresija BDNF tokom starenja pored poboljšanja sposobnosti učenja i memorije doprinosi i smanjenju rizika razvoja neurodegenerativnih bolesti (Alkurd i sar., 2024; Buchman i sar., 2016; Duan i sar., 2001; Lee i sar., 2000).

U mozgu koji stari, DR utiče na strukturna i kognitivna oštećenja, ublažavajući negativne posledice oksidativnog stresa, gubitka funkcije mitohondrija i neuroinflamacije (Mohan i sar., 2016).

Hronična inflamacija niskog stepena koja prati starenje značajno doprinosi slabljenju kognitivnih funkcija i razvoju neurodegenerativnih bolesti. DR smanjuje aktivnost mikrogljijskih ćelija i nivo proinflamatornih citokina, kao što su IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , (Xie i sar., 2020). Takođe, DR ispoljava značajan potencijal u suprimiranju oksidativnog stresa. Naime, akumulacija ROS i smanjenje kapaciteta za njihovu neutralizaciju dovode do gubitka neuronske funkcije i strukture. Aktivirajući SIRT3 (sirtuin 3), mitohondrijsku deacetilazu koja stimuliše antioksidativnu aktivnost superoksid dismutaze 2 (SOD2), DR smanjuje nivo ROS (Qiu i sar., 2010).

Uvođenje režima DR doprinosi ravnoteži neurotransmitera u mozgu, koji su od suštinskog značaja za pamćenje, učenje, emocionalnu regulaciju i motivaciju (Halloran i sar., 2012; Zhen i sar., 2006). Pokazano je da dugotrajna DR može ublažiti starosno zavisni pad monoamina u pojedinim moždanim strukturama (Portero-Tresserra i sar., 2020). Paralelno sa efektom na monoamine, u istoj studiji je uočeno i poboljšanje metaboličke regulacije, što je autore navelo na pretpostavku da DR-posredovana regulacija insulina i leptina doprinosi obnavljanju nivoa monoamina u mozgu tokom starenja. (Portero-Tresserra i sar., 2020).

Veliki broj studija je ukazao da različiti dijetalni pristupi poput mediteranske ishrane, ishrane bogate voćem i povrćem i kalorijske restrikcije (engl. *calorie restriction*, CR), kao i primena mimetika kalorijske restrikcije, imaju uticaja na simptome depresije i anksioznosti u animalnim modelima i humanim populacijama (Firth i sar., 2019; Halloran i sar., 2012; Parikh i sar., 2016), predlažući ih kao ne-farmakološku alternativu za ublažavanje emotivnog distresa. Zna se da je dopaminski sistem tesno povezan sa energetsom homeostazom i da ga je moguće modulirati redukcijom unosa hrane, odnosno kalorija (Kenneth D. Carr, 2007; Zhen i sar., 2006), dok istovremeno posreduje u metaboličkim benefitima koje restrikcija hrane izaziva (de Leeuw van Weenen i sar., 2011). Takođe je poznato da ograničenje unosa hrane dovodi do smanjenja nivoa dopamina u hipotalamusu, hipokampusu i dorzalnem strijatumu, kao i do hiperaktivnosti životinja, a da hiperaktivnost zatim posledično dovodi do povećanja nivoa dopamina u hipotalamusu (Kontis i Theochari, 2012). Pored nivoa dopamina, u odgovoru na smanjeni unos hrane menja se i ekspresija dopaminskih receptora D1 i D2 (Carr, 2002; Kenneth D. Carr, 2007; Carr i sar., 2003; Gallardo i sar., 2014).

### 1.5.2. Studije primene DR kod primata

Dve longitudinalne studije na nečovekolikim primatima, koje su trajale više od dve decenije dale su oprečne rezultate o doprinosu DR zdravom starenju kod dugovečnih vrsta srodnih ljudima.

U populaciji rezus makakija *Macaca mulatta* gajenih u Nacionalnom centru za istraživanje primata u Viskonsinu (engl. *Wisconsin National Primate Research Center*, WNPRC), umerena DR (70% slobodnog unosa hrane) uvedena u adultnom dobu smanjila je stopu smrtnosti do koje dolazi usled starosti. Procenat preživljavanja bio je 50% kod životinja sa slobodnim pristupom hrani dok je kod životinja na režimu DR preživljavanje iznosilo 80%. Takođe, DR je odložila početak i smanjila učestalost patologija povezanih sa starenjem, konkretno, dijabetesa, raka, kardiovaskularnih bolesti i atrofije mozga, pokazavši nedvosmisleno da DR usporava starenje kod primata (Colman i sar., 2009).

Druga longitudinalna studija na rezus makakijima koja se bavila efektima DR sprovedena je u Nacionalnom institutu za starenje (engl. *National Institute on Aging*, NIA). Iako je u ovoj studiji uočen poboljšani metabolički profil i manja incidenca kancera, DR nije smanjila incidencu kardiovaskularnih bolesti niti je poboljšala preživljavanje u odnosu na kontrolnu grupu sa slobodnim pristupom hrani (Mattison i sar., 2012). Važno je istaći da je stepen umanjavanja unosa hrane kao i starost u trenutku uvođenja DR bila ista kao i u prethodno pomenutoj studiji. Diskrepanca u rezultatima ove dve studije sugerise da su efekti DR kod dugovečnih životinja složeni i verovatno

zavise od različitih faktora sredine. Poznato je da se u navedenim studijama značajno razlikovao sastav korišćene hrane i način suplementacije životinja, kao i da su u NIA studiji životinje bile genetički raznovrsnije od životinja u WNPRC studiji. Rezultati NIA studije skrenuli su pažnju na izuzetno važnu činjenicu, da efekat DR nije univerzalno pozitivan, i da zavisi od sastava hrane i režima unosa hrane, kao i genetičkih predispozicija jedinki (Vaughan i sar., 2017).

### 1.5.3. Studije primene DR u humanoj populaciji

Devedesetih godina prošlog veka, na Institutu za toksikologiju i ishranu u Holandiji (engl. Toxicology and Nutrition Institute, TNO) sprovedena je studija u trajanju od 10 nedelja, u kojoj je 16 ispitanika muškog pola, starosti od 35 do 50 godina konzumiralo 20% manje hrane. Kod ispitanika je uočeno smanjenje telesne mase pretežno na račun telesnih masti, niži krvni pritisak i povišen nivo HDL holesterola u poređenju sa ispitanicima koji su imali slobodan pristup hrani (Velthuis-te Wierik i sar., 1994).

U Oraklu, Arizona je sprovedena znatno duža studija pod nazivom Biosfera 2 (engl. *Biosphere 2*), u vidu ekološkog i naučnog eksperimenta osmišljenog kao zatvoren ekološki sistem koji imitira samoodrživo okruženje slično ekosistemima na zemlji. Jedan od najzanimljivijih aspekata studije bilo je istraživanje ljudskog zdravlja i dugovečnosti. Tokom eksperimenta, zbog ograničene proizvodnje hrane unutar sistema, osmoro stanovnika Biosfere 2 (4 muškarca i 4 žene) unosilo je ograničen broj kalorija ali iz nutritivno bogate hrane. Ishrana učesnika u Biosferi 2 uglavnom je bila vegetarijanska, bogata integralnim žitaricama, mahunarkama, voćem i povrćem, uz minimalnu upotrebu prerađene hrane. Tokom trajanja studije kod učesnika je zabeležen snižen indeks telesne mase, kao i glikemija; poboljšana osetljivost ćelija na insulin, a bili su sniženi i markeri kardiovaskularnog zdravlja trigliceridi, holesterol i krvni pritisak. Rezultati prikupljeni tokom ove studije su u skladu sa nalazima iz studija na animalnim modelima, što ukazuje da DR svoje dejstvo ostvaruje preko evolutivno konzerviranih mehanizama. Takođe, rezultati Biosfere 2 ukazuju da čak i ozbiljnije ograničenje unosa hrane kod ljudi ima blagotvorne posledice po zdravstveno stanje, sve dok su drugi aspekti ishrane adekvatni (Walford i sar., 2002). Roj Valdorf, jedan od stanovnika i ispitanika Biosfere 2 osnovao je „društvo kalorijske restrikcije“ (engl. CR Society International), koje sačinjava grupa volontera koji praktikuju režim DR u trajanju od 3 do 15 godina. Kalorijski unos redukovan je u proseku za 30% dok mikro- i makronutrijenti zadovoljavaju 100% neophodnog unosa. U poređenju sa ispitanicima sa standardnim unosom hrane u Americi, članovi ovog društva prijavljuju manji indeks telesne mase, manji udeo telesnih masti, bolje vrednosti parametara kardiometaboličkog zdravlja i sistemske inflamacije, kao i povišenu ekspresiju gena uključenih u proces autofagije (Flanagan, Most et al. 2020).

Najveći značaj u razumevanju efekata DR na ljudski organizam imala je CALERIE studija (engl. *Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*, CALERIE). Studija CALERIE 1 trajala je od 2002. do 2006. godine, a bila je fokusirana na efekte smanjenja unosa kalorija za 20–25% u trajanju od 6 meseci ili 12 meseci kod nekojazznih odraslih osoba. Kod ispitanika je uočeno poboljšanje kardiovaskularnih tegoba, osetljivosti ćelija na insulin i smanjenje nivoa F2 izoprostana, specifičnog markera oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije, čime je potvrđena bezbednost implementacije umerene restrikcije unosa hrane kod zdravih subjekata (Flanagan i sar., 2020; Stewart i Martin, 2022).

Studija CALERIE 2 je trajala od 2007. do 2012. godine i imala je u fokusu efekte dugotrajne DR od 25% kod 218 učesnika oba pola starosti između 21. i 51. godine. CALERIE 2 studija je pokazala da DR može značajno smanjiti nivo subkutanog i visceralnog masnog tkiva čak i kod zdravih jedinki sa normalnim indeksom telesne mase, što doprinosi kardiovaskularnom i metaboličkom zdravlju (Most i sar., 2018). Dugotrajna DR dovela je do sniženja vrednosti LDL holesterola (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) i triglicerida, povećanja vrednosti HDL holesterola (engl. *high-density lipoprotein*, HDL) u krvi i smanjenog odnosa HDL/ukupni holesterol, uz niže

vrednosti krvnog pritiska. Poboljšanje metabolizma ugljenih hidrata pod dejstvom DR, ogledalo se u poboljšanju funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa, boljoj toleranciji na glukozu, i nižim vrednostima insulina u serumu. Gubitak telesnih masti bio je približno isti kod oba pola, dok je gubitak bezmasne telesne mase bio je značajniji kod muškaraca u odnosu na žene (Das i sar., 2017).

Iako dizajn studije nije bio namenjen praćenju efekta DR na dužinu životnog veka podaci koji su prikupljeni tokom CALERIE studije korišćeni su za procenu biološkog starenja. Za razliku od hronološkog starenja koje se odvija istom brzinom za sve, biološko starenje je moguće usporiti ili ubrzati delovanjem faktora sredine (Belsky i sar., 2017). Na osnovu baze podataka CALERIE studije i Klemera-Doubal metode (engl. *Klemera–Doubal method*, KDM) procenjena je biološka starost učesnika na osnovu izmerenih vrednosti albumina, alkalne fosfataze, C-reaktivnog proteina, ukupnog holesterola, kreatinina, glikozilovanog hemoglobina, sistolnog krvnog pritiska, uree, mokraćne kiseline i broja leukocita (Belsky i sar., 2017; Levine, 2013). Ovi parametri su posmatrani kao svojevrsni biomarkeri procesa starenja, a njihovom analizom je zaključeno da primena DR ima potencijal da poboljša zdravstveni status i samim tim doprinese produženju životnog veka, kao i zdravog dela života kod ljudi, te da ispitanici podvrgavani DR pokazuju znake sporijeg biološkog starenjeu odnosu na ispitanike sa slobodnim pristupom hrani (Belsky i sar., 2017).

#### 1.5.4. Alternativne restriktivne nutritivne strategije

##### 1.5.4.1. Proteinska restrikcija

Određeni eksperimentalni dokazi ukazuju da bi neki od nekih od benefita DR mogli biti posredovani smanjenim unosom proteina, kao i da proteinska restrikcija (PR) kao samostalna intervencija može produžiti životni vek organizama (Le Couteur i sar., 2016; Mirzaei i sar., 2014).

Jedna od najuticajnijih ranih studija na ovu temu uporedila je 40% DR sa 40% PR kod pacova sa slobodnim pristupom hrani. Pacovi sa ograničenim unosom kalorija živeli su 75% duže od kontrolne grupe, dok su pacovi sa ograničenim unosom proteina imali produžen životni vek od 15% (Yu i sar., 1985). Brojne animalne studije su potvrdile da PR značajno doprinosi nekim od benefita koje ima DR, kao što je dužina životnog veka (Barrows i Kokkonen, 1975; Goodrick, 1978; Horakova i sar., 1988; Simpson i Raubenheimer, 2009). U svojoj studiji, autori Ayala i saradnici istakli su značaj ishrane bazirane na proteinskoj restrikciji na produkciju ROS od strane mitohondrija i stepen oksidativnog oštećenja DNK i proteina (Ayala i sar., 2007).

Mehanizmi koji povezuju ishranu sa niskim unosom proteina i LPHC ishranu (engl. *low protein high carbohydrate*, ishrana sa niskim unosom proteina a visokim unosom ugljenih hidrata) sa starenjem se i dalje otkrivaju, a trenutni rezultati sugerišu da mogu delovati istim mehanizmima kao i DR, prvenstveno preko signalnih puteva posredovanih insulinom/insulinu sličnim faktorom rasta (engl. *Insulin-like growth factor 1*, IGF-1) i mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR) (Le Couteur i sar., 2016).

##### 1.5.4.2. Intermitentno gladovanje

Zbog nedoslednosti u održavanju kontinuirane DR u humanoj populaciji (Moreira i sar., 2011), razvile su se alternativne nutritivne strategije, sa ciljem da reprodukuju ekvivalentne zdravstvene benefite. Najpoznatiji pristup je takozvano intermitentno gladovanje (engl. *intermittent fasting*, IF) širok pojam koji se koristi za opisivanje specifičnog obrasca unosa hrane u određenim vremenskim okvirima, koji mogu biti sati ili dani, bez nužno uvođenja kalorijske restrikcije (Longo i sar., 2021; Patterson i Sears, 2017). Drugim rečima, hrana se konzumira tokom ograničenog vremenskog perioda kako bi se produžilo vreme provedeno u gladovanju. Period tokom kog se hrana

ne unosi je promenljiv, ali obično se kreće od 18 sati do nekoliko dana, dok se ishrana tokom dodeljenog vremenskog perioda obično odvija bez ograničenja količine, odnosno *ad libitum* (AL) (Anton i sar., 2018).

Postoji nekoliko oblika intermitentnog gladovanja, koji se definišu prema trajanju i stepenu restrikcije: konzumiranje hrane ograničeno na određeno vreme (engl. *time-restricted feeding*, TRF), gladovanje svaki drugi dan (engl. *alternate-day fasting*, ADF) i modifikovani ADF (Varady i sar., 2013).

TRF je vrsta intermitentnog gladovanja u kojem se kalorije konzumiraju uvek u istom, ograničenom, vremenskom intervalu, koji obično traje od 6 do 12 sati dok period gladovanja traje 12–18 sati (Varady i sar., 2013). Ovakav tip ishrane usklađuje metaboličke procese sa cirkadijalnim ritmovima (Chaix i sar., 2019). Hronični poremećaji cirkadijalnih ritmova, poput onog koji se javlja u slučaju rada u smenama, promovišu starenje i samim tim rizik od hroničnih bolesti povezanih sa starenjem a TRF, zajedno sa regulisanim životnim navikama, može ublažiti ove rizike (Chaix i sar., 2019). Intervencija TRF kod pred-dijabetičnih osoba poboljšala je funkciju  $\beta$ -ćelija pankreasa, osetljivost ćelija na insulin i dovela do smanjenja krvnog pritiska i oksidativnog stresa, nezavisno od gubitka težine (Sutton i sar., 2018). Ovi podaci ukazuju na potencijal da TRF rezultuje istim korisnim efektima kao i kontinuirana primena DR. Međutim, za razliku od DR, TRF suzbija apetit, što doprinosi boljem pridržavanju režimu ishrane (Sutton i sar., 2018). TRF takođe čuva mišićnu masu uprkos gubitku masnog tkiva (Moro i sar., 2016), što je velika prednost za primenu restrikcije hrane kod starije populacije.

ADF je oblik povremenog gladovanja u kojem se hrana konzumira AL svakog drugog dana, a u danima između se gladije. Gladovanje obično počinje nakon poslednjeg obroka u danu kada je hrana dozvoljena. U zavisnosti od vremena konzumiranja narednog obroka vremenski okvir gladovanja iznosi između 24 i 36 sati. Ukoliko se gladovanje prekida nakon 24 sata, vremenski okvir za konzumiranje hrane iznosi 24 sata. Ukoliko se gladovanje produži na 36 sati, odnosno prekida se prvim obrokom narednog dana, vremenski okvir za konzumiranje hrane iznosi 12 sati. Suprotno uvreženom mišljenju, ADF ne rezultira prekomernim unosom hrane tokom dana kada je hrana dozvoljena. U humanoj pilot studiji autori Catenacci i saradnici uporedili su efekat ADF sa efektom standardne, kontinuirane DR. Iako je u slučaju ADF režima energetski deficit bio značajno veći, nakon 8 nedelja primene, ova dva režima rezultovala su približno istim gubitkom telesne mase, i smanjenjem nivoa serumskih lipida. Ovakvi rezultati potvrdili su da je ADF efikasna i bezbedna alternativna strategija za regulaciju telesne mase. (Catenacci i sar., 2016).

Ljudima atraktivniji pristup ADF je modifikovani ADF, u kojem je dozvoljen unos malog procenta kalorija (tj. ~25% preračunatih dnevnih kalorijskih potreba, u proseku 500 kcal) tokom dana gladovanja, dok se alternativnim danima ishrana odvija po AL principu. Randomizovano kontrolisano ispitivanje autora Trepanowski i saradnika uporedilo je efekte modifikovanog ADF režima (25% kalorijskih potreba tokom dana gladovanja i 125% kalorijskih potreba tokom dana unosa hrane) i kontinuirane DR (75% preračunatih dnevnih kalorijskih potreba svakodnevno), tokom godinu dana (Trepanowski i sar., 2017). Nakon 6 meseci sprovođenja režima ishrane, modifikovani ADF nije pokazao značajno drugačije rezultate u u gubitku mase ili promenama u telesnom sastavu, krvnom pritisku, srčanom ritmu, trigliceridima, glukozu i insulinu u odnosu na kontinuiranu DR. U poređenju sa DR, modifikovana ADF dijeta je povećala nivo HDL, ali je imala lošiji rezultat u smislu broja ispitanika koji su se pridržavali predviđenog načina ishrane (Trepanowski i sar., 2017). Dosadašnji rezultati ukazuju da modifikovana ADF dijeta donosi slične benefite kao DR u pogledu starenja. Nasuprot studiji autora Catenacci i saradnika, gde je u slučaju ADF režima veći broj ispitanika nastavio da praktikuje ovaj režim ishrane i nakon završetka studije, u studiji Trepanowski i saradnika je znatno veći broj ispitanika iz ADF grupe odustao od studije u odnosu na ispitanike iz grupe kontinuirane DR. Navedeni rezultati govore da je izbor adekvatnog režima ishrane shodno navikama pojedinca od velikog značaja za uspešnost njegove implementacije u stil života. Iako ADF

režim može zvučati kao lakše izvodljiv, njegova dugoročna primena može postati teže primenjiva od kontinuirane DR kod pojedinih ispitanika (Trepanowski i sar., 2017).

Prekliničke studije sugerišu da režimi povremenog gladovanja stimulišu odbrambene ćelijske mehanizme koji su prisutni i kod primene DR, kao što su autofagija, smanjena proizvodnja ROS i smanjenje nivoa proinflamatornih citokina (Anton i Leeuwenburgh, 2013). Ove molekulske i ćelijske aklimatizacije na povremeno gladovanje započinju tokom faze gladovanja, a kod glodara su posredovane smanjenjem IGF-1 za 50%, koje je drastičnije i brže u poređenju sa kontinuiranom DR (Anton i sar., 2018). Tokom produženog perioda gladovanja, dolazi do prelaska sa sinteze lipida i skladištenja masti na mobilizaciju slobodnih masnih kiselina i ketona dobijenih iz masnih kiselina. Prelazak na potrošnju energije iz masnih kiselina i ketona dobijenih iz masnih kiselina, poznat kao metabolički preokret, može biti odgovoran za mnoge osnovne zdravstvene aklimatizacije na povremeno gladovanje (Flanagan i sar., 2020).

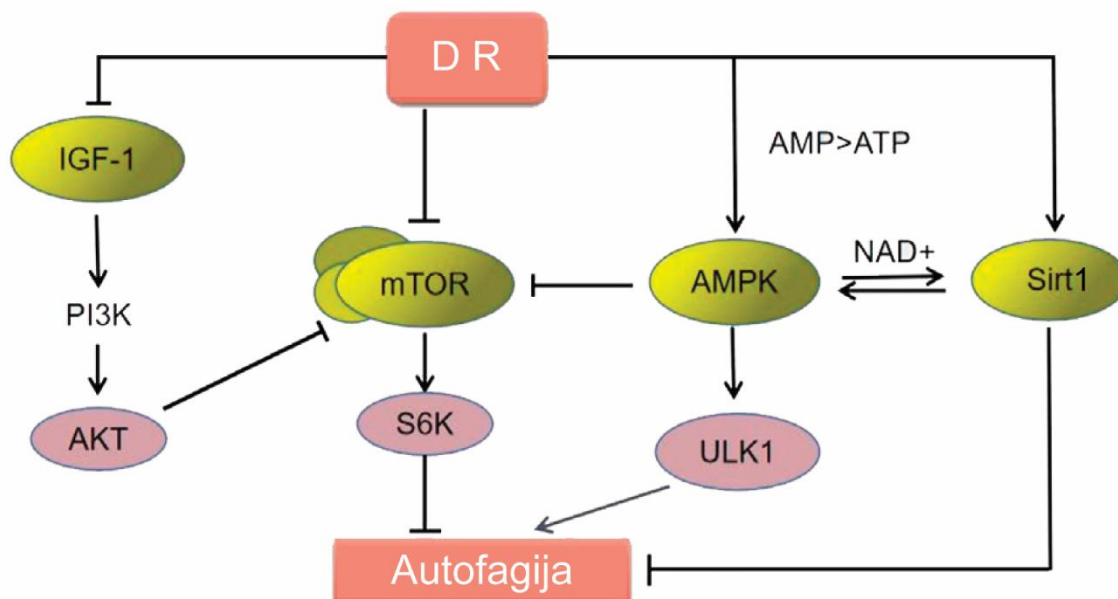
Poznato je da su i intermitentno gladovanje i kontinuirana DR efikasni u odlaganju starosno zavisnih promena, uključujući kardiometaboličke poremećaje, pojavu tumora i kognitivni pad (Holben i Marshall, 2017; Longo i sar., 2021; Most i sar., 2017; Patterson i Sears, 2017). Oba režima ishrane regulišu metabolizam glukoze i lipida (Antoni i sar., 2018; Fontana i sar., 2010), promovišu autofagiju (Abdulsada i sar., 2021; Bagherniya i sar., 2018), povećavaju produkciju važnih neurotrofina poput BDNF (Bagherniya i sar., 2018), što sve vodi smanjenju inflamacije i oksidativnog stresa (Mohr i sar., 2021).

## **1.6. Molekularni mehanizmi /signalni putevi u osnovi korisnih efekata DR**

Objavljivanje rada Mekkeja i saradnika (McCay i sar., 1935) otvorilo je potrebu za otkrivanjem mehanizama kojima DR ispoljava svoje protektivno dejstvo na starosno zavisne promene. Jedno od predloženih objašnjenja jeste da DR ostvaruje svoje efekte putem hormeze, fenomena koji implicira da se organizam reagujući na stresor manjeg inteziteta priprema na bržu i adekvatniju reakciju na stresor jačeg inteziteta (Calabrese i Baldwin, 2003). U skladu sa time se može posmatrati i mogući mehanizam dejstva dijetalne restrikcije, a koji ima i evolutivnu osnovu. Naime, smatra se da su organizmi koji su se tokom evolucije sretali sa deficitom nutrijenata bili prinuđeni da dostupne energetske zalihe preusmere sa rasta i reprodukcije na reparaciju i eliminaciju već nastalih oštećenja strukture i funkcije ćelije i održavanje osnovnih bioloških procesa, što je dovelo do sporijeg starenja (Martel i sar., 2021). U tom kontekstu bi se DR posmatrala kao blagi stresor koji je pripremio organizam na borbu protiv starenja, koje bi se u tom slučaju posmatrala kao jači stresor. U skladu sa datom teorijom hormeze, Martel i saradnici su u svojoj studiji predložili da DR, kao blagi stresor, menja energetske status i ekspresiju molekula signalnih puteva odgovornih za detekciju nutrijenata i odgovor ćelije na stres: AMPK, mTOR, Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2), sirtuin-1 (SIRT1), FoXO (engl. *foxhead box O*, FoXO) i PGC-1 alfa (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*, PGC-1 $\alpha$ ). Smatra se da modulacija navedenih evolutivno konzerviranih signalnih puteva koji produžavaju životni vek (engl. *pro-longevity signaling pathways*) dovodi do aktivacije ćelijskih procesa poput autofagije i reparacije oštećenja DNK i doprinosi otpornosti ćelije na promene koje prate starenje (Martel i sar., 2021). Delujući kao stresor niskog inteziteta koji aktivira odbrambene i reparativne mehanizme organizma, DR promovise preživljavanje (Kouda i Iki, 2010).

Poznato je da je jedan od mehanizama kojim DR ostvaruje svoje korisne efekte i smanjenje produkcije senescentnih ćelija favorizovanjem procesa autofagije (Zhai i sar., 2022). Autofagija je visoko regulisan i evolutivno konzerviran katabolički proces u kojem ćelije razgrađuju i recikliraju sopstvene oštećene ili nepotrebne proteine i organele, kako bi održale homeostazu i funkciju. Iako je autofagija važan proces u regulaciji rasta i diferencijacije ćelije, najčešći okidač autofagije je deficit nutrijenata (Khandia i sar., 2019). U negativne regulatore autofagije svrstavaju se signalni molekuli:

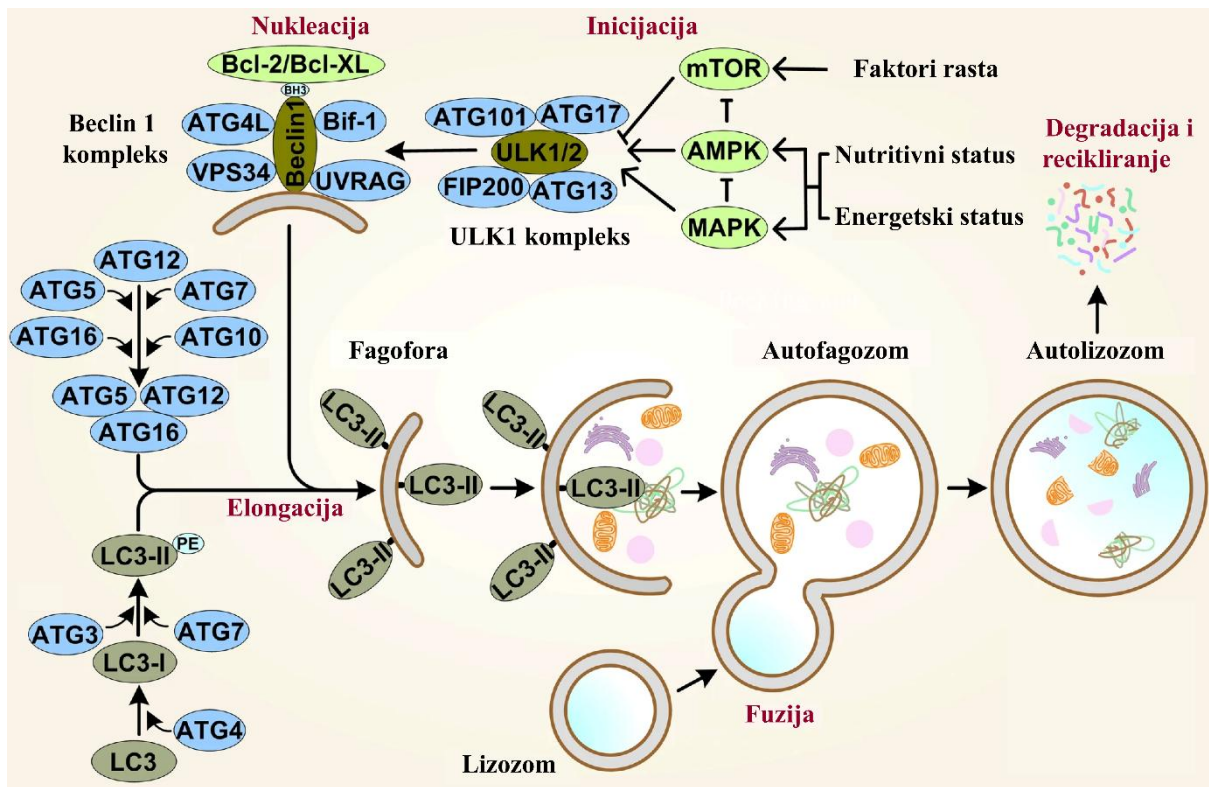
mTOR, ribozomalna protein S6 kinaza (engl. *ribosomal protein S6 kinase beta-1*, p70 S6K), serin-treonin protein kinaza B (PKB/Akt), kao i insulin/IGF-1, a u pozitivne regulatore AMPK i SIRT1 (Revuelta i Matheu, 2017) (Slika 1.3).



**Slika 1.3. Signalni putevi u osnovi efekata dijetalne restrikcije.** Preuzeto i modifikovano iz (Zhai i sar., 2022)

Autofagija je izuzetno složen samoregulišući proces (Liu i sar., 2023) (Slika 1.4) koji se pojednostavljeno može opisati sledećim ključnim koracima:

1. Regulacija otpočinjanja procesa autofagije: AMPK inhibira formiranje mTOR kompleksa 1 (engl. *mTOR complex 1*, mTORC1), čime se smanjuje inhibitorski efekat mTORC1 na formiranje ULK1 kompleksa (engl: *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*, ULK1) i time podstiče formiranje dvomembranske fagofore.
2. kompleks Beclin-1/VPS34 (engl: *vesicular protein sorting 34*) podstiče elongaciju fagofore i formiranje autofagozomske vezikule, ispunjene zahvaćenim supstratom iz citoplazme. Naime, aktivirana kinaza JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) razgrađuje komplekse koje formira Beclin 1, čime dolazi do oslobađanja Beclin1 proteina koji zatim aktivira VPS34 sa kojom uz dodatne proteine formira kompleks što sve zajedno podstiče elongaciju autofagozomskih vezikula.
3. Polimerni kompleks ATG5-ATG12-ATG16L (engl. *autophagy related*, ATG) se spaja sa autofagozomskim vezikulama.
4. LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) se ubacuje u autofagozome kroz niz reakcija
5. Autofagozomi i lizozomi se spajaju kako bi formirali autolizozome. Unutar autolizozoma hidrolaze razgrađuju obuhvaćeni sadržaj, pri čemu se produkti razgradnje recikliraju, odnosno vraćaju nazad u citoplazmu i ponovo koriste u procesima biosinteze.



Slika 1.4. Faze procesa autofagije. Preuzeto i modifikovano iz (Chang i Zou, 2020).

### 1.6.1. Insulin i IGF-1 signalni put

Insulinski/IGF-1 signalni put (IIS) reguliše rast, diferencijaciju i metabolizam ćelije u odgovoru na dostupnost hranljivih materija. U studijama na model sistemima od nematoda do čoveka pokazano je da je ovaj signalni put evolutivno konzerviran i da ima značajnu ulogu u starenju, te predstavlja metu delovanja potencijalnih terapeutika za odlaganje starosno zavisnih promena (Bartke, 2008). U skladu sa time je na primer, pokazano da DR kod ljudi smanjuje nivo cirkulišućeg IGF-1, insulina i glukoze (Zhai i sar., 2022).

IGF-1 je negativni regulator autofagije, a tu ulogu ispunjava vezujući se za receptor sa tirozin kinaznom aktivnošću i uzrokujući aktivaciju PI3K (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) i Akt. Aktivirana Akt zatim fosforiliše FoXO transkripcione faktore, čime dovodi do njihove inhibicije i posledično smanjenja ekspresije LC3 i Beclin 1, gena uključenih u proces autofagije (Geffken i sar., 2022; Sengupta i sar., 2009). Takođe, IIS signalnom kaskadom dolazi do aktivacije mTORC1 koji inhibira autofagiju inhibicijom ULK1 proteinskog kompleksa. ULK1 je odgovoran za formiranje fagofore, dvomembranske strukture koja će tokom procesa elongacije i zatvaranja postati autofagozom. (Zhai i sar., 2022). Literaturni podaci pokazuju da je nizak nivo IGF-1 u mozgu miševa spregnut sa povećanom dužinom životnog veka i smanjenjem starosno uzrokovane smrtnosti (Kappeler i sar., 2008).

### 1.6.2. AMPK signalni put

AMPK je jedan od centralnih regulatora metabolizma, koji vrši detekciju energetskeg statusa ćelije na osnovu odnosa AMP/ATP (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) i održava aktivnost ćelije u fiziološkom opsegu (Hardie i sar., 2012). Studije na model sistemima ukazale su da regulacija AMPK signalnog puta može da utiče na proces starenja (Hardie i sar., 2012). Ukoliko DR dovede do pothranjenosti, smanjuje se sinteza ATP, a povećava nivo AMP. Sniženi odnos ATP:AMP aktivira



AMPK koji dalje inhibira mTORC1, čime će ukida inhibitorno dejstvo mTORC1 na ULK1 i posredno omogućava započinjanje procesa autofagije. Pored toga, AMPK pokreće proces autofagije i direktno, fosforilacijom ULK1 na poziciji Ser317 (Kim i sar., 2011).

### 1.6.3. Sirtuini

Proteini iz porodice Sirtuina su NAD<sup>+</sup> zavisne histon-deacetilaze. Kod sisara, sirtuini interaguju sa brojnim proteinima ključnim u regulaciju metabolizma, apoptoze i autofagije (Zhai i sar., 2022). U uslovima niskog energetskeg statusa, fosforilacija AMPK povećava nivo NAD<sup>+</sup> koji će dovesti do aktivacije SIRT1, koji posledično povećava ekspresiju ATG, proteinskih kompleksa uključenih u proces autofagije. (Zullo i sar., 2018). Sa druge strane, SIRT1 može pozitivno regulisati autofagiju, fosforilacijom AMPK i aktivacijom AMPK signalnog puta, čime dolazi do inhibicije mTORC1 i aktivacije ULK1 (Wang i sar., 2023). Dodatni mehanizam kojim SIRT1 može promovisati autofagiju jeste i deacetilacija FoXO i Beclin1 proteina, i posledična aktivacija nishodnih efektoru koji aktiviraju autofagiju. Dodatno, SIRT1 promoviše nuklearnu translokaciju i deacetilaciju transkripcionog faktora EB (engl. *transcription factor EB*, TFEB), aktivirajući time p53 koji je pozitivni regulator ATG gena i PI3K/Akt signalnog puta koji promoviše autofagiju (Wang i sar., 2023).

U odgovoru na DR dolazi do povećanja nivoa NAD<sup>+</sup>, te posledično aktivirani SIRT1 posreduje u efektima DR (Cantó i Auwerx, 2009). Takođe, pokazano je da DR povećava nivo SIRT1 u mozgu miševa sa Mačado-Džozefovom bolešću (engl. *Machado-Joseph disease*, MJD), čime aktivira autofagiju, značajno smanjuje neuroinflamaciju doprinoseći poboljšanju neuropatološkog stanja (Cunha-Santos i sar., 2016).

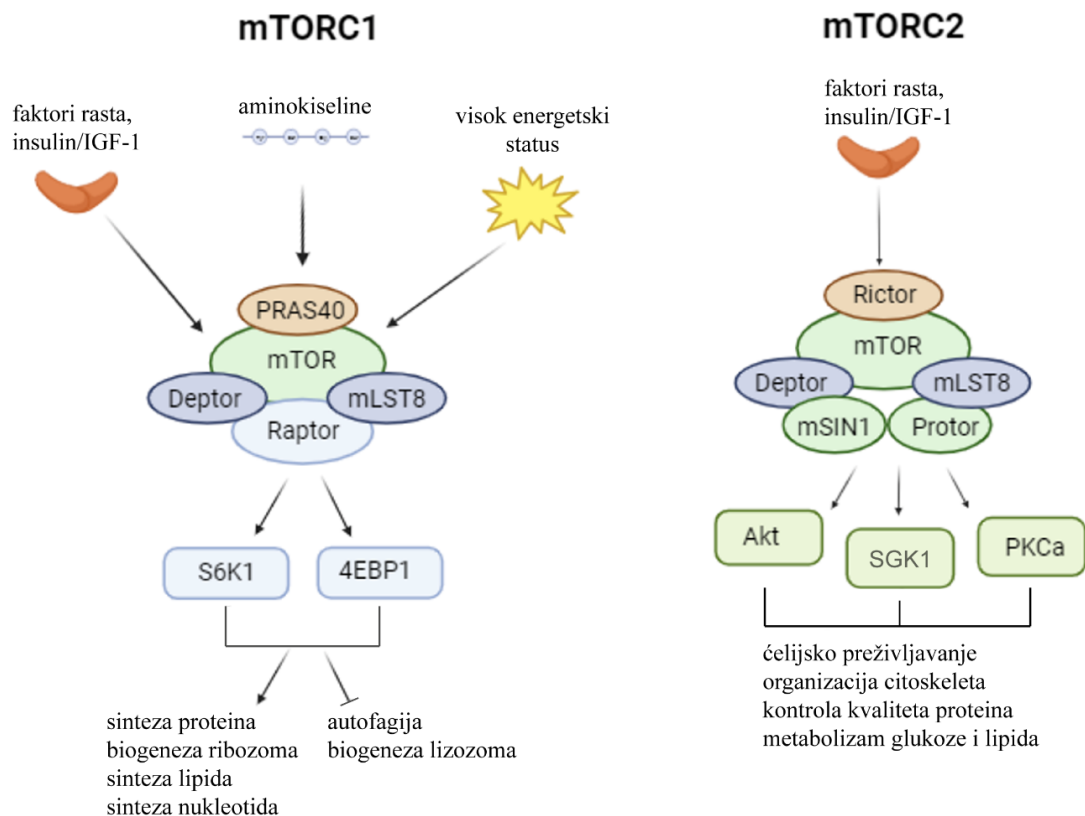
Poseban značaj dat je mTOR signalnom putu, kao putu od interesa u ovoj tezi, zbog čega će biti opisan u zasebnom poglavlju.

## 1.7. mTOR signalni put

mTOR je evolutivno konzervirana serin/treonin kinaza čiji su homolozi pronađeni kod kvasaca, valjkastih crva, biljaka i sisara (Takahara i Maeda, 2013). Otkriven je kao protein koji je direktno inhibiran delovanjem rapamicina, preparata koji inhibira progresiju ćelijskog ciklusa (Brown i sar., 1994) interferirajući sa aktivacijom p70 S6K (Fok i sar., 2013). Kod višećelijskih eukariota, uključujući sisare, mTOR je kodiran jednim genom a njegov proteinski produkt je komponenta dva različita proteinska kompleksa: mTORC1 i mTORC2 (engl. *mTOR complex 2*) (Saxton i Sabatini, 2017) koji se razlikuju funkcionalno i strukturno (Hara i sar., 2002; Kim i sar., 2002; Sarbassov i sar., 2004). mTORC1 funkcioniše kao senzor nutrijenata i energije, regulišući sintezu proteina i proteostazu, dok mTORC2 učestvuje u signalizaciji faktora rasta, regulaciji citoskeleta i metaboličkih procesa, kao i aktivaciju PKB/Akt (Bai i Jiang, 2010).

U sastav oba mTOR proteinska kompleksa pored mTOR ulaze proteini mLST8 (engl. *mTOR Associated Protein, LST8 Homolog*) i DEPTOR (engl. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*). Proteini RAPTOR (engl. *regulatory-associated protein of mTOR*) i PRAS40 (engl. *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) specifični su za mTORC1, dok RICTOR (engl. *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (engl. *stress-activated map kinase-interacting protein 1*) i Protor 1/2 ulaze u sastav mTORC2 kompleksa (slika 1.5).

mTOR ima nekoliko mesta fosforilacije van katalitičkog domena, koja služe za njegovu dodatnu aktivaciju i koja su visoko konzervirana kod svih kičmenjaka. mTORC1 sadrži mTOR fosforilisan na poziciji Ser2448, dok mTORC2 sadrži pretežno mTOR fosforilisan na poziciji Ser2481 (Copp i sar., 2009).



**Slika 1.5. mTOR kompleks 1 i mTOR kompleks 2.** U izgradnji oba kompleksa pored mTOR učestvuju proteini mLST8 i DEPTOR. U sastav kompleksa 1 ulaze proteini PRAS40 i RAPTOR dok u sastav kompleksa 2 ulaze RICTOR, mSIN1 i Protor. Preuzeto i izmenjeno sa <https://www.assaygenie.com/blog/understanding-the-mtor-signaling-pathway>.

mTORC1 je uključen u odgovor ćelije na različite vanćelijske stimulse i signale međućelijske komunikacije, poput amino kiselina, hormona, faktora rasta, i kiseonika, koji pokreću mTOR-zavisne anaboličke procese kao što su sinteza nukleotida, lipida i proteina, uz istovremenu inhibiciju autofagije, što rezultuje stimulacijom ćelijskog rasta i proliferacije (Saxton i Sabatini, 2017) (Roux i Topisirovic, 2018). mTORC1 je ključni signalni molekul koji reguliše proces autofagije. Kada je mTORC1 signalni put aktiviran, proces autofagije je inhibiran, dok inhibicija mTORC1 signalnog puta ima suprotne efekte, odnosno promoviše autofagiju (Saxton i Sabatini, 2017).

Regulatori ćelijskog metabolizma poput insulina i IGF-1, koji pokreću PI3K/PDK1/Akt (PDK1, engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) signalnu transdukciju aktiviraju mTORC1. Vezivanjem insulina ili IGF-1 za IGF-1 receptor sa tirozin kinaznom aktivnošću (IGF-1R) dolazi do autofosforilacije IGF-1R i supstrata insulinskog receptora (engl. *insulin receptor substrate 1*, IRS-1). Za fosfo-tirozinske ostatke IRS-1 vezuje se PI3K koji fosforiliše PIP2 (engl: *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) i nastaje PIP3 (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*, PIP3), koji regrutuje PDK1 do membrane, gde PDK1 dalje aktivira Akt, fosforilacijom na poziciji Thr308. Dalje Akt promoviše aktivnost mTORC1 dvojako:

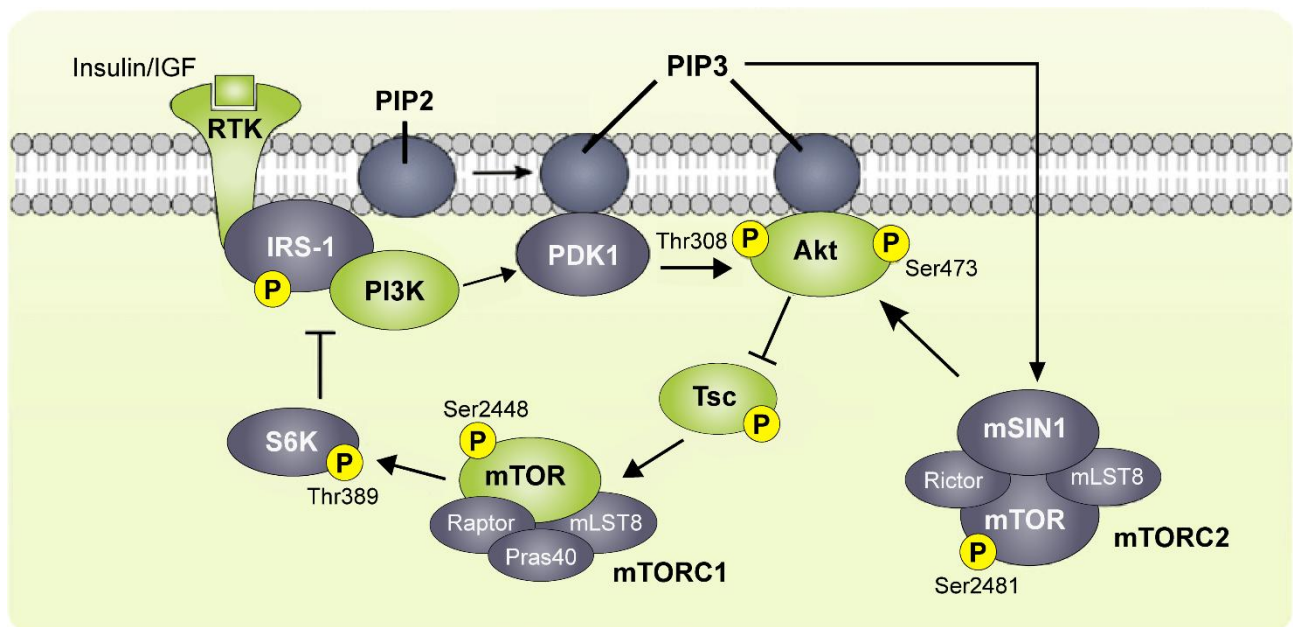
1. Direktno, fosforilacijom proteina PRAS40 na poziciji Thr246 (Bai i Jiang, 2010), koji je u nefosforilisanom obliku vezan za mTORC1 i inhibira njegovu aktivnost.
2. Indirektno, inhibitornom fosforilacijom GTPaznog aktivatora TSC2, koji se nalazi u sklopu TSC1/2 kompleksa (engl. *Tuberous sclerosis complex*, TSC1/2), na pozicijama Ser939, Ser981 i

Thr1462, što dovodi do aktivacije malog proteina G - Rheb (engl. RAS homolog enriched in brain, Rheb) ushodnog regulatora mTORC1 (Inoki i sar., 2002).

Uklanjanje navedenih inhibitornih interakcija dovodi do aktivacije mTORC1. Dodatna aktivacija mTORC1 nastaje fosforilacijom samog mTOR na poziciji Ser2448 od strane Akt. Aktivirani mTORC1 fosforiliše p70 S6K na poziciji Thr389 i protein 4E-BP1 na pozicijama Thr37, Thr46, Ser65, Thr70 i Ser83, čime inhibira 4E-BP1 i omogućava inicijaciju translacije (Bai i Jiang, 2010) (Slika 1.6).

mTORC2 takođe ima brojne funkcije u ćeliji. Uključen je u kontrolu savijanja proteina i degradaciju nepravilno savijenih proteina i kontroliše transport jona (Papadopoli i sar., 2019). mTORC2 reguliše organizaciju citoskeleta i aktivnost serin/treonin kinaza AGC familije, u koju se ubrajaju i Akt i SGK1 kinaze (engl. *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*, SGK1), te na taj način igra ulogu i u regulaciji apoptoze (Oh i Jacinto, 2011). mTORC2 je uključen i u regulaciju metabolizma glukoze i lipida preko Akt-zavisnih i Akt-nezavisnih signalnih puteva (Papadopoli i sar., 2019).

Aktivnost mTORC2 je kao i aktivnost mTORC1 regulisana od strane insulina, IGF-1 i leptina posredstvom PI3K proteina (Kennedy i Lamming, 2016; Park i Ahima, 2014). Na način gore opisan PDK1 posreduje u fosforilaciji Akt aktivacione petlje na poziciji Thr308, pri čemu dolazi do delimične aktivacije Akt kinazne aktivnosti. Takođe, PI3K prevođenjem PIP2 u PIP3 omogućava formiraju mesta za ukotvljavanje Akt, PDK1 i mTORC2 i dalju interakciju PIP3 sa mSIN1 proteinom. Data interakcija dovodi do konformacione promene i uklanjanja inhibitorne interakcije mSIN1 sa mTORC2 (Liu i sar., 2015; Smith i Collins, 2020) i pozicioniranja mTORC2 bliže membrani. Po pozicioniranju mTORC2 do membrane dolazi do autofosforilacije mTOR na poziciji Ser2481, što se smatra markerom njene aktivnosti. Tako aktivirani mTORC2 će fosforilisati hidrofobni motiv Akt na poziciji Ser473. Na taj način, sa ove dve fosforilacije Akt (Thr308 i Ser473) se postiže puna aktivacija Akt (Panwar i sar., 2023). Potpuno aktivirana Akt fosforiliše nishodne supstrate poput FoXO1/3A i SGK1 (Smith i Collins, 2020) (slika 1.6).



**Slika 1.6. Aktivacija mTORC1 i mTORC2.** Preuzeto i izmenjeno iz (Thobe i sar., 2017).

### 1.7.1. Aktivacija i međusobna regulacija mTORC1 i mTORC2

Fosforilacija Akt se može dešavati na nekoliko pozicija, ali je za njenu aktivaciju bitna gore pomenuta fosforilacija na dve pozicije: u katalitičkom domenu, odnosno aktivacionoj petlji na

treoninu 308. mesta (Akt Thr308) i u homologom domenu na serinu 473. mesta (Akt Ser473) (Mahajan i Mahajan, 2012). Dok je za fosforilaciju Akt Thr308 odgovorna PDK1 (Alessi i sar., 1997), fosforilacija Akt Ser473 je regulisana sa 10ak različitih kinaza, među kojima je i mTORC2 (Sarbasov i sar., 2005). Za aktivaciju mTORC1 u insulinskom signalnom putu neophodna je fosforilacija Akt na poziciji Thr308, dok pozicija Ser473 ne mora biti fosforilisana. Međutim, za potpunu aktivnost Akt neophodno je da oba mesta budu fosforilisana (Guertin i sar., 2006) Na ovaj način mTORC2 doprinosi aktivaciji mTORC1 (Szwed i sar., 2021). Aktivacija mTORC1 nishodno fosforiliše i aktivira p70 S6K, koja će fosforilisati negativna regulatorna mesta na IRS-1. Fosforilacija IRS-1 na tim mestima favorizovaće njegovu ubikvitinaciju i degradaciju, čime se smanjuje količina dostupnog IRS-1 za prenos insulinskog signala i posledično fosforilacija PI3K. Kako aktivnost mTORC2 zavisi od PI3K/Akt signalizacije, smanjena fosforilacija PI3K dovešće do inhibicije mTORC2 (Szwed i sar., 2021). Međutim, u uslovima produžene inhibicije insulinske signalizacije, izostajanje fosforilacije Akt Ser473, će dovesti do inhibicije mTORC1 (Breuleux i sar., 2009; Guertin i sar., 2006; Ikenoue i sar., 2008).

Važno je napomenuti, da mTORC1 i mTORC2 imaju alternativne puteve aktivacije, kao što je odgovor na prisustvo amino kiselina. U uslovima niskog nivoa amino kiselina i glukoze mTORC1 aktivnost biva inhibirana od strane AMPK, direktno, fosforilacijom raptora i indirektno, preko TSC2 (Szwed i sar., 2021). mTORC2 takođe može biti osetljiv na nutritivni stres, ali se za razliku od mTORC1, usled smanjene dostupnosti amino kiselina (prvenstveno glutamina) i glukoze, dešava aktivacija mTORC2. Usled deficita glukoze, AMPK direktno aktivira mTORC2 putem fosforilacije proteina mTOR i verovatno Rictor, u prisustvu minimalne aktivacije PI3K signalnog puta (Szwed i sar., 2021). U uslovima niskog energetskeg statusa protein Sestrin2 interaguje sa mTORC2, a interakcija Sestrin2-mTORC2 praćena je inhibicijom mTORC1 aktivnosti. Naime, Sestrin2 stimuliše katalitičku aktivnost mTORC2 podstičići fosforilaciju Akt Ser473, preko Sestrin2/GATOR2 i GATOR2/mTORC2 interakcija. GATOR2 pozitivno reguliše mTORC1 inhibirajući GATOR1 (engl. *GTPase-activating protein (GAP) activity toward Rag 1*), proteinski kompleks koji negativno reguliše aktivnost mTORC1 (Muller i sar., 2024). Interakcijom Sestrin 2/GATOR 2, GATOR1 ostaje aktivan i inhibira mTORC1 aktivaciju u odsustvu glutamina. Iako pri normalnim nutritivnim uslovima Akt Ser473 podstiče aktivaciju mTORC1, u stanju deficita glutamina, negativni regulatori poput Sestrin2-GATOR2 i FoXO-TSC2 dominiraju, što održava mTORC1 u neaktivnom stanju uprkos visokoj katalitičkoj aktivnosti Akt (Szwed i sar., 2021).

Imajući u vidu prethodno navedeno može se reći da aktivacija mTORC1 i mTORC2 zavisi od ćelijskog energetskeg statusa, koji se odražava kroz nivo ATP, ADP i AMP. U energetskeg suficitu, Akt fosforiliše TSC2 i PRAS40, čime uklanja inhibiciju mTORC1. Kada se usled energetskeg zahtevnih procesa, aktiviranih od strane mTORC1, smanji ATP i poveća AMP, aktivira se AMPK, koja fosforiliše TSC2 i Raptor, čime inhibira mTORC1. Istovremeno, smanjena fosforilacija Akt (usled smanjenog PI3K signala) dodatno slabi aktivaciju mTORC1. Za razliku od mTORC1, mTORC2 pokazuje složeniji odgovor na energetskeg stres. Dok visok nivo ATP podržava njegovu aktivaciju kroz PI3K/Akt signalizaciju, energetskeg deficit može direktno stimulisati mTORC2. Ova regulacija mTORC2 u uslovima niskog nivoa ATP može služiti kao mehanizam preživljavanja ćelije u stresnim uslovima (Szwed i sar., 2021).

## 1.8. Uloga mTOR signalnog puta u procesu starenja

Na brojnim model organizmima je potvrđeno da je mTOR signalni put uključen u regulaciju procesa starenja a da tretman rapamicinom može produžiti životni vek (Kennedy i Lamming, 2016). Naime, poznato je da je rapamicin sposoban da izazove efekte slične efektima DR u pogledu

produžetka životnog veka i očuvanja fizioloških funkcija tokom starenja, među velikim brojem vrsta (Unnikrishnan, Kurup et al. 2020). Tu svoju ulogu rapamicin ostvaruje zahvaljujući ulozi koju mTOR ima u detekciji nutrijenata. Fok i saradnici bili su prva grupa autora koja je uporedila efekte DR i rapamicina, i pokazala da šestomesečni tretman rapamicinom i DR (60% od AL unosa) inhibiraju mTOR u jetri u istoj meri (Fok, Zhang et al. 2013).

Međutim, rezultati studija koje su ispitivale inhibiciju, odnosno aktivaciju mTORC1 signalnog puta tokom fiziološkog starenja su oprečni, obzirom da se u rezultatima pojedinih autora ističe da se mTORC1 signalizacija u tkivima glodara povećava tokom starenja (Sengupta i sar., 2010), dok su u drugim studijama autori došli do zaključka da je mTORC1 signalizacija tkivno specifična, tj. povišena u određenim tkivima tokom starenja, a smanjena u drugim (Baar i sar., 2016). Humane studije na ovu temu su oskudne, i iako neke sugerišu da postoji starosno zavisno smanjenje aktivacije mTORC1 signalnog puta (Harries i sar., 2012) kao i u slučaju model sistema rezultati su nekonzistentni (Francaux i sar., 2016; Sandri i sar., 2013). Svi ovi podaci ukazuju da ne postoji univerzalni obrazac mTORC1 promena tokom starenja. Međutim, na osnovu nivoa ekspresije mTORC1 puta u adultnom dobu i promenama koje se tokom starenja dešavaju, kao i efekata koje blokiranje mTORC1 od starne rapamicina ima na produžetak životnog veka, smatra se da postoji optimalni nivo mTORC1 signalizacije različit u različitim starosnim grupama u adultnom dobu, dok bi u starijem dobu taj nivo trebao da bude drugačiji. Naime, ono što se smatra fiziološkim nivoom mTORC1 signalizacije u adultnom dobu, odnosno u periodu reproduktivne zrelosti može biti previsoko da bi se omogućilo zdravo starenje u ćelijama i tkivima (Blagosklonny, 2009) (Blagosklonny, 2010) te otuda i inhibicija mTORC1 signalnog puta od strane rapamicina, dijetalne restrikcije ili genetičkih manipulacija, ima sposobnost da produži životni vek (Szwed i sar., 2021) i može suzbiti neke od karakteristika starenja poput poremećene regulacije detekcije nutrijenata, slabljenja funkcije mitohondrija, narušene proteostaze, i gubitka rezervi stem ćelija (Lopez-Otin i sar., 2013). Obzirom da se starenje zaista karakteriše intenzivnim metaboličkim promenama, i da mTOR ima centralnu ulogu u ćelijskom metabolizmu, to ga čini idealnom metom za delovanje tretmana i terapijama koji odlažu ili usporavaju proces starenja (Szwed i sar., 2021).

mTORC1 je i važan regulator oksidativnog stresa jer podstiče mitohondrijsku biogenezu i oksidativni metabolizam. Inhibicija mTORC1 smanjuje broj mitohondrija i sprečava pojavu senescencije u jetri starih miševa, te podstiče autofagiju, koja ima ključnu ulogu, naročito tokom starenja, u održavanju proteostaze i eliminaciji oštećenih proteina i organela. Smanjenje aktivnosti mTORC1 takođe za prevenira pad imunološke funkcije tokom starenja. Kod miševa rapamicin obnavlja hematopoezu hematopoetskih matičnih ćelija i povećava imuni odgovor na virusne i bakterijske patogene. Uzimajući u obzir sve literaturne podatke, može se zaključiti da inhibicija mTORC1 u različitim tkivima može da uspori starenje različitim mehanizmima, počev od inhibiranja senescencije, stimulanja autofagije, kao i očuvanjem rezervoara matičnih ćelija (Szwed i sar., 2021).

Otkriće da i mTORC2 signalizacija može biti narušena tretmanom rapamicinom otvorila je pitanje da li rapamicin ostvaruje efekat na dužinu životnog veka samo preko mTORC1. Poznato je da se mTOR kompleksi 1 i 2 razlikuju u pogledu osetljivosti na rapamicin. Dugi niz godina vladalo je mišljenje da je mTORC1 osetljiv na rapamicin dok mTORC2 nije, ali je ovakvo stanovište pobijeno eksperimentima koji su uključivali produženi tretman rapamicinom. Naime, u studiji koju su sprovedi Sarbassov i saradnici ustanovljeno je da je mTOR kompleks 1 osetljiv kako na akutni tako i na hronični tretman rapamicinom, dok je kompleks 2 osetljiv samo na produženi tretman (Sarbassov i sar., 2006).

Iako je ciljana inhibicija samo mTORC1 dovoljna da produži životni vek (Lamming i sar., 2013), moguće je da i mTORC2 ima ulogu u regulaciji životnog veka, ali među studijama na ovu temu ima oprečnih rezultata. Rezultati studija u kojima je pokazano da kalorijska restrikcija inhibira PI3K/Akt signalizaciju pokazuju da inhibicija mTORC2 signalizacije doprinosi dugovečnosti (Mercken i sar., 2013). Suprotno, studija koja je pokazala da izostanak ekspresije Rictora, ključnog proteina mTORC2 kompleksa, značajno skraćuje životni vek mužjaka, ali ne i ženki miševa ukazuje

da mTORC2 inhibicija ima negativan uticaj na životni vek i da je ovo dejstvo polno zavisno (Lamming i sar., 2014). U studiji sa mišjim modelom Rictor<sup>Nkx2.1-/-</sup> pokazano je da je izostanak ekspresije Rictora u neuronima hipotalamusa spregnuto sa smanjenjem lokomotorne aktivnosti, lošom tolerancijom na glukozu, razvojem insulinske rezistencije i povećanjem krhkosti, što skupa rezultuje kraćim životnim vekom (Chellappa i sar., 2019).

## 1.9. Uloga mTOR signalnog puta u kongitivnim procesima

Brojne studije takođe ukazuju da inhibicija mTORC1 i aktivacija autofagije leže u osnovi mehanizma kojim DR ispoljava svoja protektivna svojstva (Blagosklonny, 2010; Morselli i sar., 2010; Wu i sar., 2009), te da je sposobnost DR da spreči starosno zavisni pad u kongitivnim funkcijama posredovan regulacijom mTOR signalnog puta i procesom autofagije (Adams i sar., 2008; Dal-Pan i sar., 2011).

Uloga mTOR signalnog puta u razvoju patologije neurodegenerativnih bolesti je od ranije poznata (Maiese i sar., 2013; Troca-Marin i sar., 2011). U mnogim neurodegenerativnim bolestima uočena je povišena aktivacija mTORC1 (Maiese i sar., 2013; Troca-Marin i sar., 2011), dok je u studijama rapamicinom izazvane inhibicije mTORC1 signalizacije kod miševa pokazano usporavanje toka starosno zavisnih neurodegenerativnih bolesti (Harrison i sar., 2009). U tom kontekstu, pretpostavka je da su starenjem spregnuta viša aktivnost mTORC1 i posledična inhibicija autofagije odgovorne za početak starosno zavisnih neurodegenerativnih promena i pojava bolesti.

Interesantno je da nasuprot ove potencijalno negativne uloge koju mTOR igra u patogenezi neurodegenerativnih bolesti, postoje podaci koji ukazuju na ključnu ulogu mTOR proteina u morfogenezi dendrita, sinaptičkoj plastičnosti i konsolidaciji dugotrajne memorije (Urbanska i sar., 2012; Yang i sar., 2008). Naime, sinaptička plastičnost bazira se na sposobnosti sinapsi da tokom vremena menjaju svoju jačinu u odgovoru na aktivaciju, odnosno na procesima dugotrajne potencijacije (engl. *long-term potentiation*, LTP) i dugotrajne depresije (engl. *long-term depression*, LTD) koji igraju centralnu ulogu u učenju i memoriji (Brown i sar., 2022). Dok se u LTP sinaptička snaga između dva neurona povećava nakon što su ti neuroni aktivirani u kratkom vremenskom intervalu, LTD se odnosi na smanjenje efikasnosti sinaptičkog prenosa između neurona, što se događa kada neuroni imaju različite vremenske obrasce aktivacije. LTP je obično dugotrajan i može trajati od nekoliko minuta do nekoliko sati ili čak dana, a smatra se da je ključan za formiranje dugoročnih sećanja. LTD je pak proces u kojem su sinaptičke veze između neurona "oslabljene", što smanjuje efikasnost prenosa signala između njih. LTD takođe igra ključnu ulogu u učenju i memoriji, jer omogućava filtriranje informacija i prilagođavanje mreža neurona iskustvima i novim informacijama, čime se omogućava fleksibilnost u učenju (Brown i sar., 2022).

Pokazano je da akutna inhibicija mTORC1 asocira sa deficitom LTP (Tang i sar., 2002), ali da inhibicija mTOR takođe može blokirati i LTD (Huber i sar., 2001). Izmene u funkciji mehanizama koji drže mTORC1 u inhibiranom stanju rezultuju pojačanom aktivacijom mTOR signalnog puta, dovodeći do značajnih izmena u sinaptičkoj plastičnosti (LTP i LTD) i narušene funkcije memorije (Hoeffler i Klann, 2010). Ovakvi rezultati pokazuju da aktivacija i inhibicija mTORC1 zapravo funkcionišu kao reostat koji harmonizuje dugotrajne promene sinaptičke funkcije (Halloran i sar., 2012). Štaviše, povišena aktivacija mTOR u neuronskim progenitorima i neuronskim prekursorima tokom razvojnog perioda može rezultovati deficitima plastičnosti i memorije (Hoeffler i Klann, 2010) kao i izmenjenom ekscitabilnošću, sugerišući da adekvatna plastičnost zahteva mTOR aktivnost u okviru koje je moguća optimalna regulacija sinteze proteina u sinapsama. Prema podacima iz studije Halorana i saradnika, redukcija mTOR aktivnosti u mozgu za 30% tokom 16 nedelja, dovodi do poboljšanja performansi C57BL/6 miševa u kongitivnim zadacima koji uključuju dugotrajnu plastičnost i koji su zavisni od hipokampusa i/ili kore velikog mozga (Halloran i sar., 2012). U kombinaciji sa postojećom literaturom o mTOR funkciji (Hoeffler i Klann, 2010; Huber i sar., 2001;

Sarbassov i sar., 2005; Tang i sar., 2002), ovi rezultati sugerišu da iako akutna i potpuna inhibicija mTOR narušava plastičnost neophodnu za dugotrajnu memoriju (Hoeffler i Klann, 2010; Tang i sar., 2002), diskretna, hronično smanjena aktivnost mTOR (u ovom slučaju 30%) može poboljšati učenje kod mladih životinja i memoriju kod starih životinja.

U skladu sa ovim rezultatima smatra se da DR upravo preko inhibicije aktivnost mTOR (Dogan i sar., 2011) može poboljšati kognitivne funkcije kod eksperimentalnih životinja (Halloran i sar., 2012). U prilog ovoj hipotezi govori i studija sa C57BL/6J miševima, koji su hranjeni hranom obogaćenom rapamicinom tokom različitih perioda života. Haloran i saradnici su pokazali da je rapamicin poboljšao kognitivne funkcije kod mladih životinja i zaustavio starosno zavisni kognitivni pad kod starijih životinja (Halloran i sar., 2012). Slični rezultati uočeni su i u studiji sa transgenim miševima koji prekomerno ekspimiraju prekursor amiloidnog proteina (engl. *Amyloid precursor protein*, APP). Oralnom administracijom rapamicina postignuta je sistemska inhibicija mTOR signalnog puta, koja je rezultovala produžetkom životnog veka u pomenutom mišjem modelu AB, a životinje koje su dobijale hranu obogaćenu rapamicinom nisu razvijale simptome izmenjenog prostornog učenja i memorije koji su tipični za AB fenotip (Spilman i sar., 2010). Liao i saradnici pokazali su da u kortikalnim neuronima u kulturi, po stimulaciji BDNF-om dolazi do pozitivne regulacije transkripcije nekoliko stotina proteina, među kojima su neki pod kontrolom mTOR a kodiraju proteine koji utiču na neuronsku aktivnost ili oblik dendritskih trnova što objašnjava kako mTOR-regulisana lokalna translacija doprinosi sinaptičkoj i strukturnoj plastičnosti (Liao i sar., 2007). mTOR kontroliše i lokalno sintezu nekih proteina koji učestvuju u razviću neurona, polarizaciji, i autofagiji na postsinaptičkim membranama (Switon i sar., 2017) što sve zajedno sa gore navedenim još jednom ukazuje na ključnu ulogu mTOR u efektima koje DR ispoljava na nervni sistem.

### **1.10. Uloga mTOR signalnog puta u regulaciji anksioznosti**

Farmakološke manipulacije inhibitorima mTORC1 signalnog puta imale su i anksiozene i anksiolitičke efekte. Diskrepanca u odgovoru na farmakološku manipulaciju mTORC1 signalnog puta pomoću propisanih inhibitora rezultat je različitih doza, načina primene, starosti subjekata i korišćenog animalnog modela, kao i mogućih prethodno postojećih neurološkog oštećenja ili neuropsihijatrijskih predispozicija kod ljudi (Koehl i sar., 2021). Osim toga, pokazano je da izlaganje blagim stresorima inhibira mTORC1 signalizaciju u hipokampusu, dok istovremeno dovodi do ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom (Hebda-Bauer i sar., 2019). Takođe, brzo-delujući antidepressivi koji ispoljavaju i anksiolitičko dejstvo stimulišu aktivaciju mTORC1 signalnog puta u medijalnoj prečonoj kori velikog mozga (Guo i sar., 2016). Vežbanje koje stimuliše mTORC1 aktivnost u hipokampusu i kori velikog mozga takođe smanjuje incidencu anksioznosti (Koehl i sar., 2021). Tretman mužjaka miševa analogom rapamicina, everolimusom, doveo je do pogoršanja u ponašanju nalik anksioznom (Russo i sar., 2016), dok je hronični tretman rapamicinom imao anksiozni efekat kod mužjaka pacova, kao i kod miševa u modelu Fragilnog X sindroma, neurološkog poremećaja za koji je karakteristična pojačana aktivacija mTORC1 signalnog puta (Saré i sar., 2018).

Sa druge strane, u humanim studijama, tretman everolimusom je smanjio anksiozno i depresivno ponašanje pacijenata kod kojih je izvršena srčana transplantacija (Lang i sar., 2009).

Hadzamitski i saradnici pokazali su da kod pacova tretman rapamicinom pogoršava ponašanje nalik anksioznom ali ne utiče na nivo fosfo-p70 S6K (Hadamitzky i sar., 2018). Ovakav rezultat, naveo je autore na zaključak da pogoršanje u ponašanju nalik anksioznom uočeno nakon tretmana inhibitorima mTOR ne može direktno biti pripisano mTOR-zavisnim mehanizmima. Oprečno, u studija autora Koehl i saradnika u kojoj je direktno testirana uloga p70 S6K u regulaciji anksioznosti, pokazano je da odsustvo ekspresije ovog proteina kod eksperimentalnog mišjeg modela pogoršava

ponašanje nalik anksioznom i sugerira da povišena anksioznost može biti povezana sa inhibicijom mTORC1 puta (Koehl i sar., 2021).

Halloran i saradnici su u svojoj studiji pokazali da je tretman rapamicinom imao anksiolitičko i antidepressivno dejstvo kod miševa oba pola, u vremenskim tačkama koje predstavljaju ranu adultnu, adultnu, starije adultnu i staru životnu dob (Halloran i sar., 2012). U istoj studiji, kod životinja tretiranih rapamicinom detektovan je značajno viši nivo monoamina noradrenalina, dopamina i serotonina, i to naročito u srednjem mozgu. Kako je srednji mozak bogat dopaminskim neuronima naročito u regionima SNc i VTA, zbog projekcija dopaminskih puteva (nigrostrijaturnskog, mezokortikalnog i mezolimbickog) povećan nivo monoamina izmeren je i u strijatumu, kori velikog mozga, kao i akumbensu (Halloran i sar., 2012). Sve ovo implicira da se efekat rapamicina na kognitivne i nekognitivne ponašajne odgovore životinja ispoljava barem delimično i modulacijom monoaminskih puteva u mozgu (Halloran i sar., 2012).

Sveobuhvatno, trenutno dostupni podaci u literaturi ukazuju na potrebu za daljim istraživanjem promena u mTORC1 signalizaciji u kontekstu anksioznosti, u cilju sagledavanja uslova pod kojima dolazi do anksiolitičkog ili anksiogenog efekta.

### **1.11. Univerzalnost korisnih efekata DR**

Uvođenje DR nosi sa sobom određene rizike poput pravilnog „doziranja“ odnosno procene adekvatnog stepena restrikcije, smanjenog unosa makro- i mikronutrijenata, i smanjenja mišićne ili čak koštane mase koja se može desiti paralelno sa gubitkom masnog tkiva. Optimalno umanjeno kalorijskog unosa je protektivno u procesu starenja jer minimalizuje potencijalne štetne posledice na fizičku kondiciju i mentalno zdravlje (Flanagan i sar., 2020).

Iako su prekliničke studije na glodarima pokazale da restrikcija unosa hrane u opsegu 10–40% ostvaruje povoljne efekte na biomarkere starenja, životni vek i zdravi deo životnog veka, ključna studija o „poluizgladnjivanju“ koju su sprovedi Keys i saradnici (Keys i sar., 1950), često se spominje u kontekstu upitne primene DR kod ljudi. U navedenoj studiji, nakon kontrolnog perioda od 12 nedelja tokom kojih su dobijali adekvatnu ishranu, mladi muškarci podvrgnuti su režimu ishrane kojim su unosili u proseku 1570 kalorija dnevno, poreklom pretežno iz ugljenih hidrata, tokom 24 nedelje, što je predstavljalo redukciju unosa kalorija od 40%. Po završetku studije, ispitanici su imali prosečni gubitak telesne mase od 25% od čega su otprilike dve trećine bile telesne masti, a jedna trećina telesna masa bez masti. Ova studija naglašava da stepen restrikcije hrane kakav se primenjuje kod eksperimentalnih animalnih modela često može biti preteran kada se primeni na humanu populaciju. DR od 40% dovela je do ozbiljnih negativnih efekata, kako fizičkih (npr. hronična slabost, smanjen aerobni kapacitet i bolni edem donjih ekstremiteta) tako i psiholoških (npr. emocionalni stres, konfuzija, apatija, depresija, histerija, hipohondrija, suicidalne misli i gubitak seksualnog nagona), koji su se pojavili nakon 6 nedelja primene. Važna razlika između ishrane u ovoj studiji poluizgladnjivanja i drugih humanih studija DR (Flanagan i sar., 2020; Stewart i Martin, 2022; Walford i sar., 2002), je ta što ne samo da je unos energije bio smanjen, već je i kvalitet ishrane (raznovrsnost hrane, sadržaj makro- i mikronutrijenata, itd.) bio značajno lošiji. Odgovorno propisivanje DR zahteva adekvatan unos ugljenih hidrata, masti, proteina i mikronutrijenata kako bi se osigurao zadovoljavajući preporučeni dnevni unos, zbog čega se suplementi vitamina i minerala često uključuju u režime DR.

Gubitak mišićne mase i gubitak snage - sarkopenija, povezana je sa starenjem i doprinosi povećanoj smrtnosti (Arango-Lopera i sar., 2013). Tokom starenja, očuvana mišićna masa je u korelaciji sa boljom motoričkom funkcijom, a samim tim i smanjenim rizikom od nepokretljivosti. CALERIE 1 humana studija pokazala je da je DR dovela do gubitka mišićne mase u svim ispitivanim starosnim grupama, ali je samo u starijoj kohorti (50–60 godina) ovaj gubitak mišićne mase bio praćen srazmernim gubitkom snage (Weiss i sar., 2007), dok u mlađoj kohorti (25–50 godina) to nije



bio slučaj (Larson-Meyer i sar., 2010). CALERIE 2 studija je potvrdila zapažanja iz studije CALERIE 1, pokazavši značajno smanjenje mišićne mase i snage kod starijih ispitanika koji su bili izloženi DR tokom 2 godine (Das i sar., 2017). Ovakvi rezultati ističu rizik uvođenja DR u kasnijoj životnoj dobi, ali i važnost razvoja adekvatnih pratećih protokola za primenu DR kod starijih individua poput vežbanja i prilagođavanja unosa proteina.

Pozitivni aspekti DR u promociji dugovečnosti i zdravog starenja su isprepleteni sa dugoročnim uticajima koje je teško izmeriti. Kod mladih, zdravih pojedinaca, DR je bezbedna i dobro podnošljiva, te dovodi do niza korisnih efekata. Ipak, uočeno smanjenje mišićne i koštane mase zahteva dalja istraživanja i može ograničiti primenu i kliničku preporuku DR za određenu starosnu populaciju. Mnogo puta dokazane pozitivne promene do kojih dugotrajna DR dovodi kada su u pitanju zdravi, negojazni mladi i sredovečni ljudi mora se uzeti sa rezervom kada se radi o implementaciji kod zdravih i negojaznih starijih ljudi (65+), jer mogu narušiti korisnu masu masnog tkiva, mišićnu masu i snagu, kao i koštanu masu i kvalitet kostiju (Flanagan i sar., 2020).

Očuvanje bezmasne telesne mase primenom režima povremenog gladovanja moglo bi biti dragoceno za starije osobe koje su u riziku od sarkopenije. Nekoliko studija je predložilo zdravstvene koristi povremenog gladovanja koje prevazilaze one pokazane kod DR (Flanagan i sar., 2020). Ipak, u ovom trenutku potrebna su randomizovana kontrolisana ispitivanja koja uključuju različite nutritivne pristupe i populacije pre nego što se bilo koji oblik povremenog gladovanja može preporučiti kao terapijska intervencija za stariju populaciju.

Uvođenje DR po sopstvenom nahođenju bez konsultacije lekara, nutricioniste pa čak i psihologa, može biti rizično i zahteva oprez kada se radi o svim starijim individuama, a naročito onim koje imaju sniženi BMI, poremećaj raspoloženja ili su pod hroničnom farmakološkom terapijom i imaju potvrđene zdravstvene smetnje. U slučaju procene da benefiti uvođenja DR prevazilaze gorepomenute rizike, u obzir se mora uzeti stepen restrikcije i dužina trajanja predviđenog režima DR, kako bi se postigao adekvatan efekat.

## 2. CILJEVI

Osnovni cilj ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje i upoređivanje efekata režima dijetalne restrikcije različitog trajanja, započetih u različitim periodima života, na proces starenja mužjaka i ženki *Wistar* pacova. Efekti režima dijetalne restrikcije praćeni su na nivou opšteg stanja organizma, zatim procenom motoričkih i kognitivnih sposobnosti, ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom, kao i na molekulskom nivou, u cilju sagledavanja molekulske osnove osnove uočenih promena.

U skladu sa navedenim postavljeni su specifični ciljevi istraživanja, da se kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova ispita uticaj starenja i dijetalne restrikcije različitog početka i dužine trajanja na:

1. preživljavanje;
2. unos hrane i telesnu masu;
3. indeks krhkosti;
4. lokomotornu i istraživačku aktivnost, kao i proces habituacije;
5. sposobnost formiranja kratkotrajne i dugotrajne memorije;
6. promene u ponašanju nalik anksioznom;
7. ekspresiju dopaminskih receptora D1 i D2, na nivou iRNK i proteina, u kori velikog mozga, srednjem mozgu i strijatumu.
8. ekspresiju i stepen fosforilacije proteina mTOR signalnog puta (mTOR, Akt i p70 S6K) u kori velikog mozga i hipokampusu;

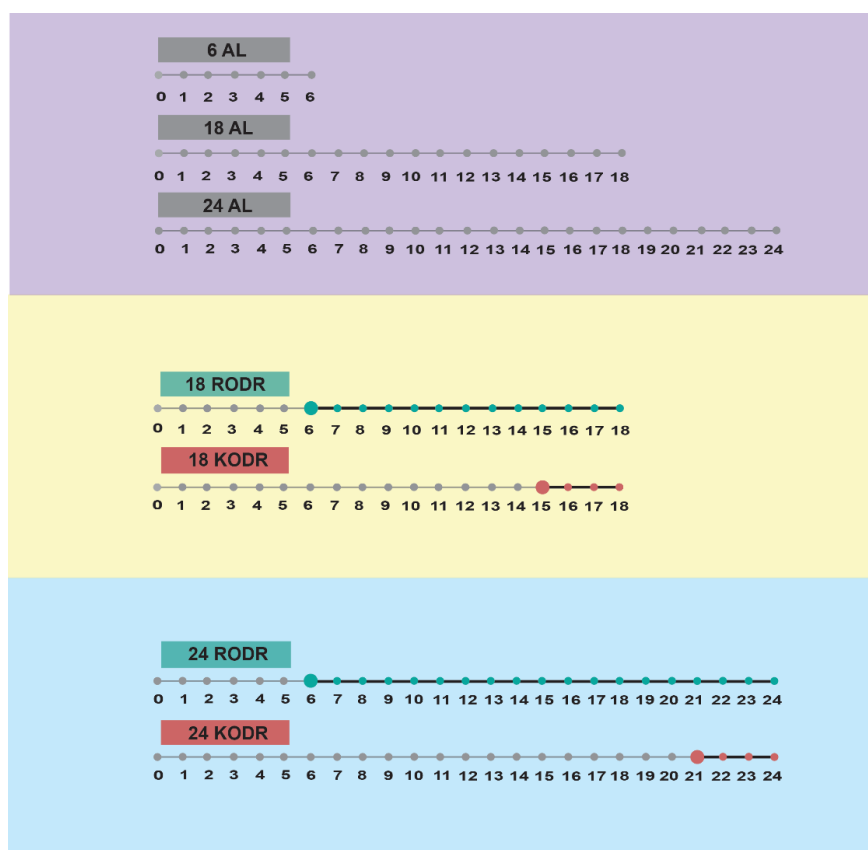
## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Eksperimentalne životinje

Za potrebe ove disertacije korišćeni su mužjaci i ženke pacova Wistar soja iz odgajališta eksperimentalnih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Životinje su gajene u polikarbonatnim kavezima sa žičanim poklopcima, u grupama od 2 do 3 životinje po kavezu, pri standardnim uslovima temperature i vlažnosti vazduha i svetlosnom režimu 12 časova svetlost/12 časova mrak. Životinjama su tokom čitavog eksperimenta imale slobodan pristup vodi i hrani (AL; standardna laboratorijska hrana, VZS Stočna hrana d.o.o, Subotica, Srbija) tokom prvih 6, odnosno 15 ili 21 mesec starosti. Sa navršениh 6 meseci života, životinje su podeljene u dve grupe: životinje sa slobodnim pristupom hrani tokom čitavog trajanja eksperimenta i životinje podvrgavane dijetalnoj restrikciji (DR), koje su u svakodnevno dobijale 60% od normalnog unosa. Ovakav režim ishrane je kod jedne grupe životinja otpočinjao sa 6 meseci starosti, trajao je do 18 ili do 24 meseca starosti i označen je kao rano otpočeta dijetalna restrikcija (RODR). Drugi ispitivani režim je tromesečni režim DR, koji je uveden životinjama starim 15 odnosno 21 mesec, te je trajao do navršениh 18 odnosno 24 meseca, a označen je kao kasno otpočeta dijetalna restrikcija (KODR). Shematski prikaz režima ishrane i eksperimentalnih grupa je dat na Slici 3.1.

Životinje su na smanjenu količinu hrane prilagođavane postepeno. Naime, pre otpočinjavanja DR režima, unos hrane je meren svakodnevno tokom nedelju dana, na osnovu čega je računata srednja dnevna potrošnja hrane po kavezu i po životinji. Zatim je porcija hrane bila smanjivana za po 10% svakog drugog dana onim životinjama za koje je bilo planirano da budu podvrgavane DR režimu. Na taj način se nakon nedelju dana postizalo da životinjama DR grupe unos hrane bude smanjen za 40%, odnosno da iznosi planiranih 60% od normalnog unosa. Životinje su hranjene u 15 časova svakoga dana, tokom svetle faze. Promene telesne mase su praćene svakodnevno u prvih nedelju dana, a zatim na nedeljnom nivou, dok su opšte stanje i dobrobit svih životinja praćeni tokom trajanja eksperimenta. Životinje AL grupe su služile kao kontrolne životinje u cilju procene efekata DR, dok su 6 meseci stare životinje AL grupe služile kao kontrolne za procenu efekata starenja. Sve eksperimentalne procedure bile su odobrene od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede - Uprave za veterinu (broj rešenja: 323-07-13536/2020-05 i 323-07-03065/2020-05).

Životinje su po dostizanju željenih starosti (6, 18 i 24 za AL i 18 i 24 meseca za DR eksperimentalne grupe) bile podvrgavane testovima ponašanja i proceni kliničkog indeksa krhkosti, nakon čega su žrtvovane uvođenjem u anesteziju bez oporavka (opšti anestetik Zoletil 100 u dozi 50mg/kg) praćenom transkardijalnom perfuzijom. Izolovane su zasebne strukture mozga: kora velikog mozga, hipokampus, strijatum i srednji mozak u cilju *Western blot* i qPCR analize.



**Slika 3.1. Shematski prikaz režima ishrane.** Sivom bojom označeni su meseci kada su životinje imale AL unos hrane a bojom zelenom odnosno crvenom bojom meseci kada su bile izložene dijetalnoj restrikciji. AL- *Ad libitum*, RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija

### 3.2. Testovi ponašanja

Testovi ponašanja izvođeni su specijalnoj zvučno i svetlosno izolovanoj prostoriji, sa uslovima temperature i vlažnosti vazduha nalik onima u odgajalištu eksperimentalnih životinja. Pre izvođenja bilo kog testa ponašanja životinje su boravile u prostoriji namenjenoj za merenje parametara ponašanja u cilju prilagođavanja. Tokom izvođenja testova ponašanja aparatura je čišćena nakon svake životinje 70% alkoholom.

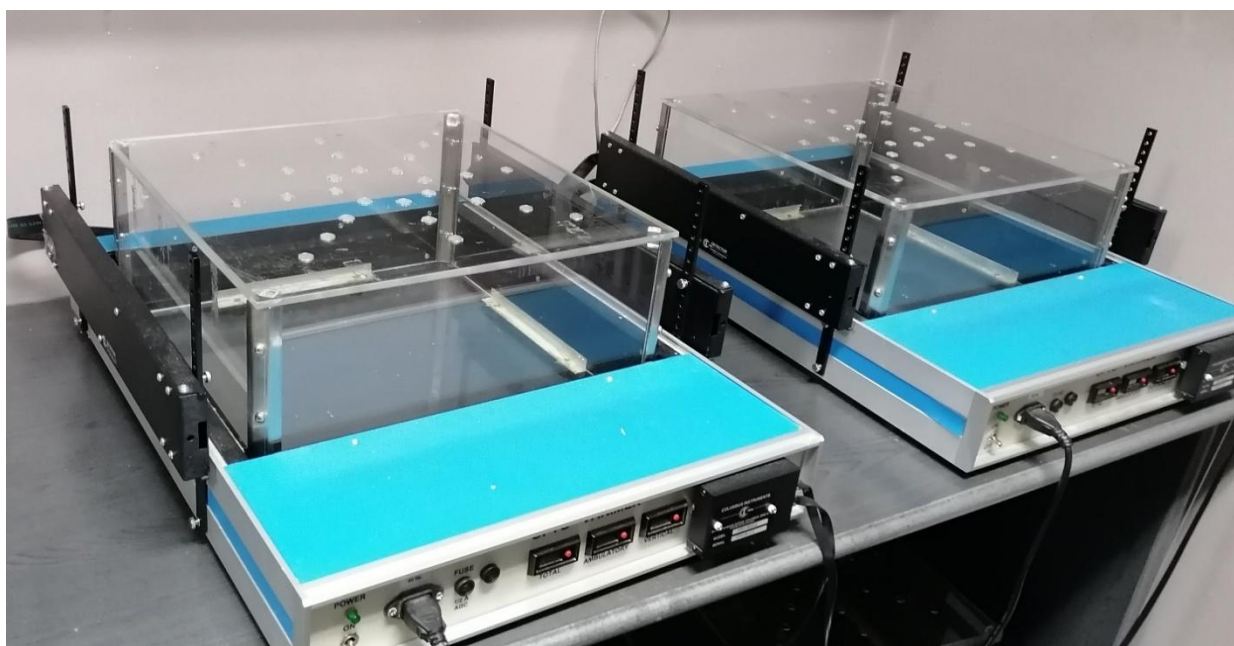
#### 3.2.1. Test otvorenog polja

Test otvorenog polja rađen je u Opto-Varimex kavezima (Columbus Instruments, SAD), dimenzija 44,2 x 43,2 x 20 cm, duž čijih ivica je postavljano 15 infracrvenih predajnika/prijemnika na visini od 3 cm od poda kaveza, namenjenih za detekciju kretanja životinja (slika 3.2.). Sa dve strane kaveza postavljani su i dodatni predajnici/prijemnici na visini od 8 cm od poda kaveza, za detekciju vertikalne aktivnosti odnosno propinjanja životinja na zadnje noge. Za analizu podataka korišćen je Auto-Track ATM3 4.51 softver (Columbus Instruments, SAD). Aktivnost je detektovana prekidanjem 3 infracrvena zraka u nizu, a vertikalna pri svakom prekidanju infracrvenog zraka predajnika/prijemnika. Opto-Varimex sistem je analizirao podatke na svaki deseti deo sekunde.

Test se oslanja na prirodnu sklonost pacova da istražuju novu sredinu kada se u njoj nađu (Leussis i Bolivar, 2006). Ova osobina korišćena je za procenu opšte lokomotorne aktivnosti životinja, koja se ogledala u ukupnom pređenom putu (vrednosti izražene u centimetrima), kao i u proceni njihovog

istraživačkog ponašanja, odnosno vertikalne aktivnosti (vrednosti izražene kao broj propinjanja/uspravljanja na zadnje noge). Uobičajno vreme izvođenja testa je 10-60 min (Altun i sar., 2007; Gage i sar., 1984). Za potrebe ove doktorske disertacije izabrano je vreme od 30 minuta. Životinje su testirane tokom 3 uzastopna dana tako što su ostavljane da slobodno istražuju arenu testa otvorenog polja. Izmerena je ukupna lokomotorna i vertikalna aktivnost tokom tog vremenskog perioda, da bi se procenile motoričke i kognitivne performanse životinja, i sposobnost habituacije. Praćenje defekacije, odnosno broja fekalnih bolusa koje su životinje ostavljale tokom sesija je takođe služilo kao mera sposobnosti životinje da habituiru.

Test otvorenog polja upotrebljen je i za procenu ponašanja nalik anksioznom. Ovaj koncept je zasnovan na konfliktu između prirodne potrebe glodara da istražuju novu sredinu i tendencije da se drže bliže zidova, ivica i uglova a izbegavaju otvoreni prostor (sredinu arene) (Lovick i Zangrossi, 2021). Zdravi, kontrolni pacovi su aktivniji, češće zalaze i provode više vremena u centru arene, dok pacovi koji ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom imaju manji obim aktivnosti i kreću su se dominantno uz ivice arene. Za potrebe ovih eksperimenata je uz pomoć Auto-Track softvera određen centar i periferija arene, tako što je površina arene podeljena na 16 jednakih kvadrata, pri čemu su 4 centralna kvadrata predstavljala centar dok su okolni kvadrati smatrani periferijom. Meren je broj ulazaka i vreme provedeno u centralnom delu arene tokom prvih 10 minuta boravka u areni, a kao dodatni parametar anksioznosti posmatran je i ukupni pređeni put tokom 10 minuta.



**Slika 3.2. Test otvorenog polja.** Opto-Varimex kavezi, Columbus Instruments, Soba za merenje parametara ponašanja Odeljenja za neurobiologiju IBISS

### 3.2.2. Test svetlo-tamne kutije

Test svetlo tamne kutije je još jedan test koji se koristi se za procenu ponašanja nalik anksioznom, a zasnovan je na unutrašnjem konfliktu između sklonosti glodara da istražuju nove prostore i potrebe da izbegavaju svetle, jarko osvetljene površine (Crawley i Goodwin, 1980; Crawley, 1985). Svetlo-tamna kutija napravljena je od neprovidnog pleksiglasa i sastoji se od dva nejednaka dela: svetlog dela napravljenog od belog pleksiglasa (dimenzija 31 x 31 x 36 cm) i tamnog dela sa poklopcem, napravljenog od crnog pleksiglasa (dimenzija 20 x 31 x 36 cm), koji su međusobno povezani prolazom na zidu koji razdvaja ova dva dela (dimezija 10 x 10 cm) (slika 3.3). Aktivnost životinje je detektovana kamerom postavljenom iznad kaveza, povezanom sa računarom. Životinje su prilikom

izvođenja testa spuštane u svetli deo, okrenute glavom suprotno od prolaza u tamni deo. Tokom 10 minuta trajanja testa beleženi su sledeći parametri: latenca, odnosno vreme do prvog ulaska životinje u tamni deo, broj izvirivanja iz tamnog dela, vreme zadržavanja/protezanja na vratima između svetlog i tamnog dela kutije (pri čemu je ubrojano svako zadržavanje duže od 2 sekunde), broj izlazaka u svetli deo (kada je životinja celim telom bila u svetlom delu kutije) i vreme provedeno u svetlom delu. Za pacove koji ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom karakteristično je da imaju kraće vreme latence, manji broj izvirivanja i izlazaka u svetli deo, kao i manje vreme zadržavanja na vratima i manje vreme provedeno u svetlom delu u odnosi na kontrolne pacove.



**Slika 3.3. Test svetlo-tamne kutije.** Soba za merenje parametara ponašanja Odeljenja za neurobiologiju IBISS.

### 3.2.3. Test prepoznavanja novog predmeta

Test prepoznavanja novog predmeta se koristi za procenu kratkotrajne i dugotrajne memorije i zasnovan je na prirodnoj radoznalosti glodara i tendenciji da ispituju nove predmete i okruženja (Taxier i sar., 2020).

Za potrebe ove disertacije test prepoznavanja novog predmeta rađen je prema metodologiji koju su dali autori Mathisen i DiCamilo (Mathiasen i DiCamillo, 2010). Životinje su najpre ostavljane da istražuju praznu arenu testa otvorenog polja tokom 10 minuta kako bi se upoznale sa prostorom. Zatim su na kratko vraćane u matični kavez, a u arenu su postavljana dva identična naspramno orijentisana predmeta i životinje su puštane da slobodno istražuju predmete tokom 10 minuta. Prilikom spuštanja životinje u kavez sa predmetima vodilo se računa o tome da glava životinje nikada ne bude orijentisana ka samim predmetima već u suprotnom smeru, kako bi sam prilazak predmetu bio odraz istraživačke nastrojenosti. Ova faza označena je kao faza familijarizacije, a predmeti korišćeni u ovoj

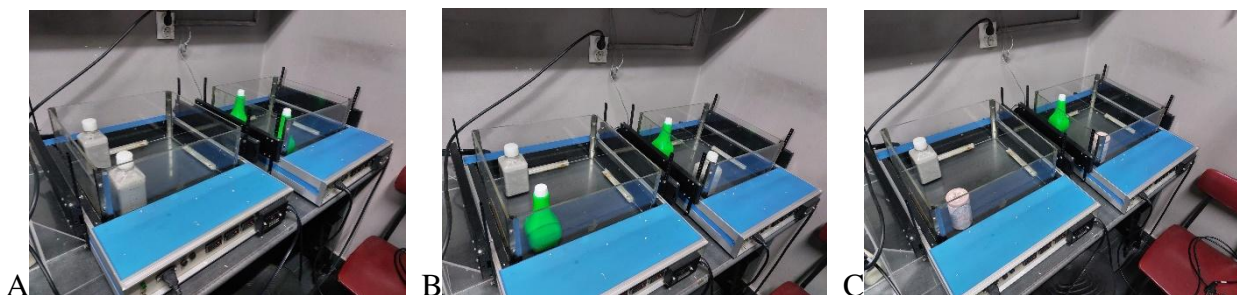
fazi obeleženi su kao predmeti „A“. Kako su eksperimenti rađeni u dva paralelna kaveza, različiti predmeti su korišćeni u levom i desnom kavezu kao „A“ predmeti (slika 3.4, A). Analizom faze familijarizacije određivana je preferenca za određenu stranu kaveza, kao i za određeni predmet kako bi se kasnije istraživanje predmeta moglo pripisati diskriminaciji predmeta, a ne preferenci jednog od objekata ili strane kaveza. Po završetku faze familijarizacije životinje su vraćane u matični kavez na sat vremena, nakon čega je sledila prva test faza, odnosno faza procene kratkotrajne memorije. Životinjama je nuđeno da tokom 10 minuta slobodno istražuju jedan poznati predmet (predmet „A“ iz faze familijarizacije) i jedan novi predmet (predmet „B“) (slika 3.4, B), a zatim su vraćane u kavez i u odgajalište. Druga faza testiranja usledila je 24 časa nakon prve, gde je životinjama, nakon 10 minuta habituacije u praznoj areni, ponovo nuđen prethodno poznati predmet (A) i jedan potpuno novi predmet (predmet „C“) za istraživanje tokom sesije od 10 minuta (slika 3.4, C). Životinje sa očuvanom memorijom (kratkotrajnom ili dugotrajnom) preferiraju novi u odnosu na poznati predmet, dok životinje sa narušenom memorijskom funkcijom provode podjednako vremena u istraživanju oba predmeta ili čak preferiraju poznati predmet.

Životinje su snimane kamerom postavljenom iznad kaveza, povezanom sa računarom, i mereno je vreme aktivnog istraživanja oba predmeta. Odnos istraživanja novog i starog predmeta računat je prema formulama za odnos istraživanja (engl. *exploration ratio*, ER) i indeks diskriminacije (engl. *discrimination index*, DI) (Denninger i sar., 2018):

$$ER = \frac{\text{vreme istraživanja novog predmeta}}{(\text{vreme istraživanja novog predmeta} + \text{vreme istraživanja starog predmeta})}$$

$$DI = \frac{(\text{vreme istraživanja novog predmeta} - \text{vreme istraživanja starog predmeta})}{(\text{vreme istraživanja novog predmeta} + \text{vreme istraživanja starog predmeta})}$$

Životinje koje nisu istraživale predmete minimum 20 sekundi tokom 10 minutnih sesija, kao i životinje koje tokom faze familijarizacije nisu istraživale predmete „A“ isključivane su iz eksperimenta. Smatralo se da kod tih životinja ne postoji osnova za razlikovanje novog (predmeta B ili C) od starog predmeta (A), s obzirom da se nisu adekvatno upoznale sa predmetom A.



**Slika 3.4. Test prepoznavanja novog predmeta.** Raspored predmeta u fazama familijarizacije (A), testiranja kratkotrajne memorije (B) i testiranja dugotrajne memorije (C). Soba za merenje parametara ponašanja Odeljenja za neurobiologiju IBISS.

### 3.2.4. Y lavirint

Y lavirint je test koji se koristi za procenu prostorne memorije. Aparat je napravljen je u obliku slova Y, sa 3 kraka, dimenzija 50 x 25 x 16 cm, međusobno postavljena pod uglom od 120°, i izrađena od pleksiglasa, pri čemu su dno i bočne stranice neprovidni dok je poklopac providan (slika 3.5). Životinje su po spuštanju na ulaz lavirinta najpre ostavljane da tokom 10 minuta slobodno istražuju dva otvorena kraka lavirinta, dok je treći („novi krak“) bio zatvoren, nakon čega su vraćane u matični kavez. Sat vremena kasnije i treći krak je otvaran a životinje puštane da slobodno istražuju sva tri kraka lavirinta tokom 10 minuta. Aktivnost životinja je detektovana kamerom postavljanom iznad kaveza, povezanom sa računarom, i beležen je ukupan broj ulazaka u sva tri kraka lavirinta, broj ulazaka u treći, novi krak, vreme provedeno u trećem kraku, kao i redosled ulazaka u krakove. Iz poslednjeg parametra računata su spontane alteracije (engl. *Spontaneous alterations*, SAB) koje predstavljaju tendenciju životinja da menjaju krakove u koje ulaze i ispituju ih, a označene su kao spontane jer tokom izvođenja testa nisu korišćeni mamac ili nagrada, ni u jednom od krakova. „Uspešnom“ alteracijom smatrao se svaki triplet bez ponavljanja kraka. Spontane alteracije računaju se prema formuli koju je dao Hughes (Hughes, 2004). Životinje sa očuvanom prostornom memorijom imaju veći broj uspešnih SAB, veći broj ulazaka i duže vreme provedeno u trećem kraku u odnosu na životinje sa narušenom funkcijom prostorne memorije.

$$SAB = \frac{\text{broj uspešnih alteracija}}{(\text{ukupan broj ulazaka u krake} - 1)}$$

Primenom t-testa za jedan uzorak (engl. *One sampe t-test*) identifikovane su grupe koje imaju vrednosti uspešnih alteracija iznad nivoa slučajnog istraživanja, za koje je uzeta teoretska vrednost od 50% za datu grupu.



**Slika 3.5. Y lavirint.** Soba za merenje parametara ponašanja Odeljenja za neurobiologiju IBISS



### 3.3. Indeks krhkosti (FI)

Krhkost (engl: *Frailty*) se karakteriše kao starosno zavisno slabljenje funkcije svih fizioloških sistema koje rezultuje slabošću, odnosno osetljivošću jedinke (Xue, 2011). Sa razvojem pristupa za procenu krhkosti rasla je i potreba da se objasni kako i zbog čega pojedini ljudi razvijaju sindrom krhkosti. Ovo pitanje pokrenulo je upotrebu animalnih modela za procenu krhkosti, prvenstveno glodara, zbog njihovog kratkog životnog veka u odnosu na ljudski. Procena indeksa krhkosti (engl. *frailty index*, FI) umesto fenotipa krhkosti u mišjem modelu predložena je 2012. godine od strane Parks i saradnika (Parks i sar., 2012). Ovakom konstruisan FI obuhvatao je 31 parametar iz 4 kategorije (aktivnost, hemodinamički parametri, udeo telesnih masti i bezmasne telesne mase i metabolički status). Uprkos prednosti zbog mogućnosti rada sa malim uzorkom ovakav princip je vremenski zahtevan, invazivan, zahteva opremu i nema kognitivnu komponentu.

Pojednostavljeno, neinvazivno rešenje za procenu FI uveo je Whitehead sa saradnicima 2014. godine u vidu kliničkog FI (Whitehead i sar., 2014). Klinički FI uzima u obzir stanje integumenta, skeletno-mišićnog, digestivnog, urogenitalnog i respiratornog sistema, čula sluha/ravnoteže, čula vida i mirisa, ukazatelje telesne nelagodnosti i telesnu masu. Ovakav dizajn omogućio je longitudinalne studije procene krhkosti, poređenje među kohortama i studijama, ali ono što je najvažnije podložan je izmenama i dopunama. Tako je nezavisna istraživačka grupa (Sukoff Rizzo i sar., 2018) modifikovala FI predlažući 27 parametara za evaluaciju. Takođe, FI je prilagođen za primenu kod pacova, gde je grupa autora takođe predložila 27 parametara za procenu (Yorke i sar., 2017). U ovoj studiji, među ispitivane parametre su uvršteni kognitivni parametri, formirajući jedinstveni fizičko-kognitivni FI.

Indeks krhkosti je određivan u skladu sa postojećom literaturom (Kane i sar., 2018; Whitehead i sar., 2014; Yorke i sar., 2017). Analizirano je ukupno 23 parametara: 21 parametar kojima se procenjuje stanje različitih sistema organa i dva kognitivna parametra (DI iz testa prepoznavanja novog predmeta i SAB iz Y lavirinta). Parametri i kriterijumi ocenjivanja dati su u Tabeli 1. Za svaki od ispitivanih parametara dodeljivana je ocena prema sledećoj skali: 0 za normalno stanje, 0,5 za blagi deficit/smetnju i 1 za uznapredovali deficit/smetnju. U svrhu što objektivnije procene svaka životinja podvrgavana je pregledu od strane tri nezavisna istraživača. Obzirom da se vrednost DI u testovima kratkotrajne i dugotrajne memorije obično kreće između 0,2 i 0,5, ocene ovog parametra u svrhu izračunavanja FI formirane su na sledeći način: životinjama sa vrednostima DI 0,5-1, koje ukazuju na jasnu preferencu novog u odnosu na poznati predmet, dodeljivana je ocena 0, životinjama sa vrednostima DI od 0,2 do 0,5, koje donekle pokazuju preferencu novog predmeta, dodeljivana je ocena 0,5, dok su životinje sa vrednostima DI manjim od 0,2 ocenjivane sa 1 (Vogel-Ciernia i Wood, 2014), jer se smatralo da ne razlikuju novi od starog predmeta. Za spontane alteracije, životinje čije su SAB vrednosti bile iznad nivoa slučajnog istraživanja (50% teoretske vrednosti grupe prema t-testu za jedan uzorak), ocenjivane su sa 0, životinje sa vrednostima SAB manjim od vrednosti koju predstavlja 50% teoretske vrednosti grupe dobijale su ocenu 0,5, dok su životinje koje su imale manje od 9 ukupnih ulazaka u krakove ocenjivane ocenom 1. Vrednosti svih parametara su sabirane i deljene sa brojem parametara koji su korišćeni (u ovom slučaju 23) čime je dobijena vrednost FI između 0 i 1 za svaku životinju.

Kako je gubitak telesne mase očekivani ishod DR, ovaj parametar je isključivan iz računanja FI, iako se standardno koristi pri proceni stanja krhkosti.

Tabela 1. parametri i kriterijumi za formiranje ocene za klinički FI

<b>Sistem organa/ parametar</b>	<b>Klinička procena deficita</b>	<b>Rezultat</b>
<b>Promene na koži</b>		
Alopecija	Prisustvo i stepen gubitka krzna	0 = normalna gustina krzna 0,5 = manje od 25% izgubljenog krzna 1 = više od 25% izgubljenog krzna
Dermatitis	Prisustvo i stepen lezija na koži	0 = nema lezija 0,5 = fokalne lezije (npr na vratu, boku, ispod vilice) 1 = široko rasprostranjene ili multifokalne lezije
Stanje krzna	Stepen održavanja i stanja krzna	0 = glatko, sjajno krzno 0,5 = krzno je blago razbarušeno 1 = razbarušeno i neuredno krzno
<b>Fizičke /promene skeletno-mišićnog sistema</b>		
Tumori	Očuvanost simetrije tela, prisustvo vidljivih i palpabilnih tumora	0 = nema tumora 0,5 = tumor manji od 1 cm 1 = tumori veći od 1 cm ili više manjih tumora
Prošireni abdomen	Prisustvo nakupina tečnosti u vidu ispupčenja ispod rebara	0 = nema ispupčenja 0,5 = blago ispupčenje 1 = jasno ispupčenje abdomena
Tremor	Prisustvo tremora tokom mirovanja, slobodnog kretanja i uspinjanja na zadnje noge	0 = nema tremora 0.5 = blagi tremor

		1 = izraženi tremor, životinja ne može da se uspinje
Opšte stanje tela	Stanje mišićnog i masnog tkiva karlične regije	0 = kosti su opipljive ali se ne ističu 0,5 = kosti se ističu ili su jedva opipljive 1 = kosti se veoma ističu ili ih nije moguće pipati zbog gojaznosti
Pogrbljeni položaj tela, zakrivljenost kičmenog stuba, kifoza	Spuštena glava u mirovanju i spojeni ekstremiteti usled prisustva bola ili bolesti	0 = nije pogrbljen položaj 0,5 = blago pogrbljen položaj 1 = izrazito pogrbljen položaj
<b>promene čula sluha</b>		
Gubitak sluha	Očuvanost reakcije na iznenadni, glasni zvučni stimulus	0 = uvek reaguje (3/3 puta) 0,5 = reaguje 1/3 ili 2/3 puta 1 = ne reaguje (0/3 puta)
<b>Promene na očima</b>		
Katarakta	Prisustvo i stepen замуćenja u sredini oka	0 = katarakta nije prisutna 0,5 = Prisustvo blagog замуćenja 1 = Vidno замуćeno sočivo

Mikroftalmija	Prisustvo smanjenja ili uvučenosti očne jabučice na jednom ili oba oka	<p>0 = oči normalne veličine</p> <p>0,5 = jedno ili oba oka diskretno manja ili uvučena</p> <p>1 = jedno ili oba oka znatno smanjena ili uvučena</p>
Egzoftalmija	Prisustvo uvećanja ili iskolačenosti očne jabučice na jednom ili oba oka	<p>0 = oči normalne veličine</p> <p>0,5 = jedno ili oba oka diskretno veća ili iskolačena</p> <p>1 = jedno ili oba oka znatno veća ili iskolačena</p>
<b>Neurološke promene</b>		
Naginjanje glave	Naginjanje glave u stranu tokom slobodnog kretanja, gubitak ravnoteže i prevrtanje	<p>0 = nema naginjanja glave</p> <p>0,5 = blago naginjanje glave u jednu stranu</p> <p>1 = izraženo naginjanje glave, gubitak ravnoteže i prevrtanje</p>
<b>Promene digestivnog/urogenitalnog sistema</b>		
Rektalni prolaps	Prisustvo i stepen rektalnog prolapsa	<p>0 = nema prolapsa</p> <p>0,5 = rektum je slabo vidljiv ispod repa</p> <p>1 = rektum jasno vidljiv ispod repa</p>
Vaginalni/penisni prolaps	Prisustvo i stepen vaginalnog/penisnog prolapsa	<p>0 = nema prolapsa</p> <p>0,5 = vidljiva mala količina prolapsnog tkiva</p>

		1 = jasno vidljivo prolapsno tkivo
Dijareja	Prisustvo tragova dijareje na perianalnoj regiji i šapama životinje, ili piljevini u kavezu	0 = nema tragova dijareje 0,5 = diskretni ostaci fecesa ili piljevine u perianalnoj regiji 1 = prisustvo piljevine, fecesa i/ili krvi u perianalnoj regiji, zaprljana piljevina u kavezu
Žutica	Prisustvo žute prebojenosti šapa, nosa, repa i/ili ušiju	0 = nema žute prebojenosti 0,5 = žuta prebojenost u tragovima 1 = veoma zastupljena žuta prebojenost
<b>Promene respiratornog sistema</b>		
Brzina i dubina disanja	Izmene brzine i dubine disanja ili dahtanje	0 = normalno disanje 0,5 = blage promene u brzini i dubini udaha 1 = značajno izmenjena brzina i dubina udaha i/ili dahtanje
Netipični zvuci	Prisustvo, stepen i učestalost zvukova koji prate disanje, a koji predstavljaju simptome narušene funkcije gornjih i/ili donjih disajnih puteva	0 = bez neobičnih zvukova 0,5 = povremeno je disanje praćeno zvukom

		1 = disanje je konstantno ili učestalo praćeno zvukom
<b>Ostale promene</b>		
Porfirinske „crvene suze“	Prisustvo i stepen porfirinskih tragova oko oćiju i njuške	0 = nema tragova porfirina 0,5 = porfirin u tragovima 1 = intenzivna porfirinska prebojenost
Malokluzija	Prerasli sekutići koji ometaju normalan zagrižaj	0 = sekutići nisu prerasli 0,5 = sekutići diskretno prerasli 1 = izrazito prerasli sekutići
Indeks diskriminacije	Vrednosti: $DI = \frac{t_{\text{novog-t poznatog}}}{t_{\text{novog}} + t_{\text{poznatog}}}$ iz testa prepoznavanja novog predmeta	0 = vrednost indeksa diskriminacije 0,5-1 0,5 = vrednost indeksa diskriminacije 0,2-0,5 1 = vrednost indeksa diskriminacije $\leq 0,2$
Spontane alteracije	Vrednosti SAB iz Y lavirinta	0 = više od 9 ukupnih ulazaka u krakove i vrednosti alteracija iznad nivoa slučajnog istraživanja 0,5 = životinje nemaju spontane alteracije iznad nivoa slučajnog istraživanja 1 = manje od 9 ukupnih ulazaka u krakove

### 3.4. Određivanje relativne ekspresije gena metodom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (qPCR)

#### 3.4.1. Izolacija RNK

Za analizu ekspresije gena korišćeno je po 5 životinja iz grupe. Ukupna RNK je izolovana iz sledećih moždanih struktura: kore velikog mozga, strijatuma i srednjeg mozga, pri čemu je korišćeno po 10 mg tkiva. Tkivo je homogenizovano u tubicama od 2 ml, u Trizol reagensu u zapremini 10x većoj od mase tkiva (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Homogenizacija tkiva vršena je pomoću štapića za homogenizaciju koji naleže na dno tubice, uz nekoliko snažnih rotirajućih pokreta, na ledu, nakon čega je tkivo ostavljano u trizolu još 5 minuta. U sledećem koraku u tubicu je dodavan hloroform (Elixir Zorka, Srbija) 5 zapremina mase tkiva. Uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12 000 RCF (engl. *relative centrifugal force*, RCF) na +4 °C. Izdvojeni supernatant prenošen je u čistu, sterilnu tubicu u koju je zatim dodavana ista zapremina izopropanola (Fisher Scientific, Loughborough, UK) i uzorci su ostavljani 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim ponovo centrifugirani (10 minuta/12 000 RCF/+4 °C). Dobijeni talog je prečišćavan dvostrukim centrifugiranjem od po 5 minuta na 7500 RCF i temperaturi +4 °C u 75% rastvoru etanola u dietil-polikarbonatom (DEPC) tretiranoj vodi (0,0001% DEPC u dejonizovanoj/demineralizovanoj vodi – ddH<sub>2</sub>O). Nakon centrifugiranja talog je sušen na vazduhu, a zatim rastvaran u UltraPure vodi (30ul) (Invitrogen, MA, SAD). Koncentracija i čistoća izolovane RNK određivana je fotometrijski na aparatu NanoFotometer™ N60 (N60 Micro-Volume UV-VIS Spectrophotometer, Implen, München, Nemačka). Čistoća izolovane RNK određivana je merenjem i odnosom apsorbanci na talasnim dužinama od 260 nm i 280 nm, a odnos apsorbanci kretao se u vrednostima od 1,8 do 2 što je RNK činilo pogodnom za dalju analizu eksprimiranja gena.

#### 3.4.2. Reverzna transkripcija (sinteza kDNK)

Za sintezu komplementarne DNK (kDNK, engl. *complementary DNA*, cDNA), metodom reverzne transkripcije lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) korišćen je komplet High-capacity cDNA RT-kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD) prema protokolu proizvođača. Ukratko, 10 µl uzorka (1 µg RNK), je dodavano 10 µl Master Mix smeše za reverznu transkripciju (sastav dat u Tabeli 2). Proces RT-PCR vršen je aparatom ProFlex (PCR System, Applied Biosystem, MA, SAD) pri sledećim uslovima: 25 °C tokom 10 minuta, 37 °C tokom 2 sata i 85 °C tokom 5 minuta.

#### 3.4.3. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (qPCR)

Analiza ekspresije gena PCR reakcijom u realnom vremenu (engl. *Real time PCR*) vršena je TaqMan tehnologijom. PCR reakcija pripremana je mešanjem 2 µl kDNK (10 ng kDNK) jednog uzorka sa 8 µl reakcione smeše za PCR u realnom vremenu (sastav dat u Tabeli 3). PCR reakcija vršena je pri sledećim uslovima: 50 °C tokom 2 minuta, 95 °C tokom 10 minuta i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C tokom 15 sekundi, a potom 60 °C tokom 1 minuta, upotrebom aparata QuantStudio3 (Applied Biosystems, MA, SAD).

Relativni stepen promene genske ekspresije određivan je metodom  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , odnosno predstavlja razliku  $C_t$  vrednosti gena od interesa i  $C_t$  vrednosti endogene kontrole (spisak korišćenih TaqMan proba naveden je u Tabeli 4). Kao endogena kontrola (engl. *Housekeeping gene*) korišćen je aktin (*Actb*) koji se nije razlikovao među grupama. Stepenn promene relativne ekspresije gena u svakom od uzoraka izražen je kao relativna vrednost u odnosu na kontrolu koja je služila kao kalibrator (100%).

Tabela 2. Master Mix smeša za reverznu transkripciju

Reagensi	Zapremine
Pufer za RT	2 $\mu$ l
25xdNTP 100mM	0,8 $\mu$ l
10xRT nasumična smeša prajmera	2 $\mu$ l
MultiScribe reverzna transkriptaza	1 $\mu$ l
Inhibitori RNKaza	1 $\mu$ l
Voda prečišćena od nukleaza	3,2 $\mu$ l

Tabela 3. Sastav reakcione smeše za PCR u realnom vremenu

Reagensi	Zapremine
TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem, MA, SAD)	5 $\mu$ l
TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD)	0,5 $\mu$ l
Voda prečišćena od nukleaza	2,5 $\mu$ l

Tabela 4. Spisak proba korišćenih za PCR

Gen	Kataloški broj	Proizvođač
Aktin	Actb Assay ID Rn00667869_m1	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD
dopaminski receptor 1	(D1R Assay ID Rn03062203_s1)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD
dopaminski receptor 2	(D2R Assay ID Rn00561126_m1)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD

### 3.5. Određivanje količine proteina metodom semikvantitativne analize imunoblotova – *Western blot* metoda

#### 3.5.1. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva

Za analizu promene koncentracije proteina korišćeno je po 5 životinja iz svake eksperimentalne grupe, a ukupni proteini su izolovani iz relevantnih moždanih struktura: kore velikog mozga, hipokampus, strijatum i srednjeg mozga. U tkivo mase 20 mg dodavan je RIPA pufer (engl. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*, RIPA) za liziranje u zapremini 10 puta većoj od mase tkiva (Tabela 5). Homogenizacija uzoraka vršena je u plastičnim tubicama sa poklopcem zapremine 2 ml, uz pomoć plastičnih štapića za homogenizaciju čiji vrhovi naležu na dno tubice. Nakon ručne homogenizacije koja podrazumeva nekoliko rotirajućih pokreta štapićem, uzorci su sonifikovani na frekvenciji od 40 kHz, 5 sekundi, u 2 ciklusa. Čitav postupak izolacije proteina rađen je na ledu. Sonifikovani uzorci centrifugirani su na 20800 RCF, 30 minuta na +4 °C. Supernatant sa proteinima sakupljan je za dalje analize.

#### 3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je metodom po Pierce-u, pomoću komercijalnog kompleta (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) po uputstvu proizvođača, u ploči sa 96 bunarića zapremine 400  $\mu$ l. Esej kombinuje redukciju  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$  od



strane proteina u baznoj sredini, sa visoko senzitivnom i selektivnom kolorimetrijskom detekcijom  $\text{Cu}^+$  od strane bicinoninske kiseline (BCA). Kompleks BCA i bakra je rastvorljiv u vodi i pokazuje linearni porast apsorbance na 562 nm sa porastom koncentracije proteina. Za standardnu krivu korišćen je goveđi albumin serum iz kompleta (engl. Bovine Serum Albumin, BSA) koncentracije 2 mg/ml, od kog je napravljena serija razblaženja od 0,32 mg/ml do 0,005 mg/ml pri čemu je svako naredno razblaženje duplo manje koncentracije od prethodnog (A do G), te je nalivanjem po 125  $\mu\text{l}$  po bunariću dobijena serija razblaženja od 40 do 0,625  $\mu\text{g}$ /bunariću. 10  $\mu\text{l}$  10 puta razblaženih uzoraka (5  $\mu\text{l}$  originalnog uzorka i 45  $\mu\text{l}$  vode) dodavano je u bunariće sa već nalivenih 115  $\mu\text{l}$  vode. Kao blank za krivu korišćeni su bunarići u koje je nalivano po 125  $\mu\text{l}$  vode, dok se kao blank za uzorke koristio RIPA pufer iz štoka korišćenog za izolaciju proteina, razblažen na isti način kao uzorci (115  $\mu\text{l}$  vode + 10  $\mu\text{l}$  10 puta razblaženog RIPA pufera). U sve bunariće je zatim dodavano po 125  $\mu\text{l}$  boje iz kompleta, čime je dobijena finalna zapremina po bunariću od 250  $\mu\text{l}$ . Ploča je inkubirana 2h na 37 °C, nakon čega je izvršeno očitavanje apsorbanci na Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer čitaču (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) na 562 nm. Na osnovu dobijenih apsorbanci pomoću GraphPad Prism 8 softvera (GraphPad Software, Boston) preračunata je koncentracija dobijenih uzoraka XY analizom sa interpolacijom standardne krive.

### 3.5.3. Elektroforeza i elektrotransfer proteina

Proteini su razdvajani prema molekulskoj masi na denaturišćim poliakrilamidnim gelovima (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Za izradu gelova i elektroforetsko razdvajanje proteina korišćena je aparatura Hoefer™ SE 260 (Hoefer Inc, SAD). Debljina gelova iznosila je 75 mm. U sistem je najpre nalivan gel za razdvajanje proteina. Finalna koncentracija gela je bila 8% ili 10%, u zavisnosti od molekulskih masa proteina od interesa. Nakon polimerizacije gela u trajanju od 45 min na sobnoj temperaturi, preko gela za razdvajanje proteina je nalivan gel za koncentrovanje proteina u koji su odmah po nalivanju uronjeni češljevi za formiranje bunarića. Korišćeni su češljevi od 15 bunarića. Gelovi su izrađivani prema recepturama datim u Tabeli 5.

Količina proteina za nalivanje u bunariće je optimizovana prema preporučenim razblaženjima primarnih antitela koje je dao proizvođač i na osnovu krive koncentracije (10, 15, 20 i 30  $\mu\text{g}$  proteina po bunariću). Kao adekvatna količina proteina uzimana je ona vrednost koja je dala najoptimalniji signal za kvantifikaciju u odnosu na pozadinski šum. Za proteine mTOR signalnog puta nalivano je 15  $\mu\text{g}$  proteina po bunariću, dok je za dopaminske receptore nalivano po 20  $\mu\text{g}$  u finalnoj zapremini od 10  $\mu\text{l}$  po bunariću, od čega je 5  $\mu\text{l}$  bio 2xLaemmli pufer sa denaturišućim agansom (Tabela 5), a preostalih 5  $\mu\text{l}$  sačinjavao je uzorak pomešan sa ddH<sub>2</sub>O. Uzorci su pre nalivanja u bunariće dodatno denaturisani toplotom, kuvanjem 5 minuta na temperaturi od 95 °C, osim u slučaju kada su bili namenjeni za detekciju fosforilisanih formi mTOR, Akt i p70 S6K, kada se ovaj korak nije primenjivao. Za praćenje toka elektroforeze i određivanje molekulskih masa proteina korišćen je proteinski marker opsega 10-250 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder #26619, Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) koji je nalivan u bunarić u zapremini od 2  $\mu\text{l}$ . Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišćen je pufer za razdvajanje čiji je sastav dat u Tabeli 5, pri konstantnoj voltaži od 120 V za gel za koncentrisanje i 150 V za gel za razdvajanje.

Transfer proteina vršen je polusuvom metodom pomoću Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistema (Bio-Rad Laboratories, SAD). Za transfer proteina korišćene su nitrocelulozne membrane promera pore 0,45  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare, SAD), koje su nakon aktivacije u dejonizovanoj i demineralizovanoj vodi (ddH<sub>2</sub>O) ostavljane 10 minuta u puferu za transfer. U istom puferu su ekvilibrisani i poliakrilamidni gelovi nakon elektroforeze, kao i vatman papiri. U kadice za transfer su sve neophodne komponente slagane sledećim redosledom: 3 vatman papira, membrana, gel, 3 vatman papira, pri čemu je nakon svakog sloja blagim pritiskom rolerom istiskivan eventualni višak vazduha. Elektrotransfer proteina vršen je 35 minuta pri uslovima konstantne voltaže od 25 V. Membrane su

nakon transfera sušene na sobnoj temperaturi. Za detekciju proteina membrane su bojene pomoću Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for Nitrocellulose Membranes (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) po prokoku proizvođača, a zatim skenirane za dalju kvantifikaciju proteina.

#### 3.5.4. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima

Radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja antitela, membrane su najpre inkubirane u 3% rastvoru BSA u TBST-u (Tabela 5) (Serva, Nemačka), sat vremena, na sobnoj temperaturi, na klackalici pri maloj brzini. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u rastvorima primarnih antitela preko noći na temperaturi od +4 °C. Primarna antitela su razblaživana u 1,5% BSA i prema razblaženjima datim u Tabeli 6. Po završetku inkubacije sa primarnim antitelom membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u, a zatim inkubirane 1 sat u rastvorima sekundarnih antitela u TBST-u, prema razblaženjima datim u Tabeli 7, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubiranja sa sekundarnim antitelima membrane su ponovo ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u pre izlaganja hemiluminiscentnom supstratu koji sadrži luminol (Tabela 5). Detekcija hemiluminiscentnog signala vršena je pomoću uređaja iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD). Sa uređaja, detektovani signali na membranama eksportovani su u formatu \*.tif za dalju obradu.

#### 3.5.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Za procenu intenziteta signala korišćen je program Image Quant 5.2 (GE Healthcare, SAD) za densitometrijsku kvantitativnu analizu. Dobijene vrednosti za svaki zasebni uzorak normalizovane su najpre na ukupnu količinu proteina u tom uzorku (*Pierce stain*) čime su dobijene relativne vrednosti količine proteina. Zatim su vrednosti dodatno normalizovane na vrednosti interne kontrole da bi se omogućilo praćenje stepena uspešnosti transfera i poređenje među membranama na kojima se nalaze različiti setovi uzoraka. Kao interna kontrola služio je uzorak proteina dobijen izolacijom iz čitavog pacovskog mozga, obrađen i nalivan na svaku membranu u istoj koncentraciji kao i uzorci od interesa. Kada su u pitanju proteini kojima su praćene fosforilisane i ukupne forme, korišćen je uvek par membrana dobijan transferom sa seta gelova iz iste elektroforeze, zbog čega je na gelove uvek nalivan set kuvanih uzorka na jedan gel i set istih nekuvanih uzoraka na drugi gel za jednu elektroforezu. Takođe, kada je reč o fosforilisanim formama proteina, vrednosti dobijene na opisani način normalizovane su uvek na vrednosti ukupnog proteina.

Tabela 5. Sastav rastvora korišćenih u *Western blot* metodi

Rastvori	sastav
RIPA pufer	50mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1% NP-40 0,5% Triton-X 0,1% SDS 1mM EDTA 1mM EGTA Inhibitori proteaza (Roche, Nemačka) Inhibitori fosfataza (Roche, Nemačka)

8% i 10% gel za razdvajanje proteina	8% ili 10% akrilamid/bisakrilamid 375 mM Tris-HCl (štok 1,5M Tris-HCl pH 8.8) 0,1% SDS 0,1% APS 0,07 % tetrametiletilen diamin (TEMED)
Gel za koncentrisanje proteina	4% akrilamid / bisakrilamid 124 mM Tris-HCl (štok 0,5M Tris-HCL pH 6.8) 0,1 % SDS 0,1 % amonijum persulfat 0,07% TEMED
2xLaemmli pufer	31,25 mM Tris pH 6.8 10% glicerol 1% SDS 5% 2-merkaptoetanol 0,025% bromfenol plavo
Pufer za elektroforektsko razdvajanje proteina (engl. <i>Running buffer</i> )	192 mM glicin 25 mM Tris 0,1% SDS
Pufer za elektrotransfer proteina (engl. <i>Transfer buffer</i> )	20% metanol 192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3
Tris-Tween 20 pufer (TBST)	20 mM Tris pH 7.6 137 mM NaCl 0,05% Tween 20
Hemiluminiscentni supstrat sa luminolom	2,5 mM luminol (štok 250mM u DMSO) 0,396mM p-kumarinska kiselina (štok 90mM u DMSO) 0,1M Tris-HCl (štok 1M Tris-HCl, pH 8.5)

Tabela 6. Spisak korišćenih primarnih antitela

Specifičnost	Poreklo i tip	proizvođač	Kataloški broj	razblaženje
mTOR	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-517464	1:2000
p-mTOR Ser2448	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-293133	1:500
p-mTOR Ser2481	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-293132	1:500
Akt	zečje, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-8312	1:2000
p-Akt Thr308	zečje, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-16646-r	1:6000
p-Akt Ser473	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-293125	1:500

p70 S6K	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-8418	1:1000
p-p70 S6K	mišje, monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-8416	1:1000
D1R	kozje, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-31478	1:500
D2R	zečje, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-9113	1:1000

Tabela 7. Spisak korišćenih sekundarnih antitela

Specifičnost	Poreklo i tip	proizvođač	Kataloški broj	razblaženje
anti-zečje	goveđe, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-2370	1:5000
anti-kozje	magareće, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Inc, SAD	sc-2020	1:5000
Anti-mišje	zečje, poliklonsko	DAKO, SAD	P0260	1:3000

### 3.6. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka urađena je pomoću GraphPad Prism 8 softvera (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). Pre odabira specifičnog statističkog testa za poređenje između uzoraka urađen je D'Agostino Pearson omnibus test za procenu normalne raspodele. U slučaju grupa kod kojih vrednosti nisu pokazivale normalnu raspodelu, rađen je najpre test kojim se identifikuju odstupajuće vrednosti (engl. *outliers*). Ukoliko ne bi postojala normalna raspodela ni nakon uklanjanja odstupajućih vrednosti, rađen je odgovarajući neparametrijski test za datu analizu.

Za analizu međusesijske habituacije iz testa otvorenog polja koršćena je jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena Dunnnett-ovim *post hoc* testom za grupe sa normalnom raspodelom, dok je za grupe koje nisu pokazivale normalnu raspodelu korišćen Friedman-ov test praćen Dunn-ovim *post hoc* testom. Za analizu unutarsetsijske habituacije korišćen je parni t-test za grupe sa normalnom raspodelom i Wilcoxon-ov test za grupe koje nisu imale normalnu raspodelu.

Za statističku analizu rezultata indeksa krhkosti, parametara anksioznosti iz testa svetlo-tamne kutije i testa otvorenog polja, rezultata testa istraživanja novog predmeta i rezultata *Western blot* analize korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena Dunnnett-ovim *post hoc* testom u slučaju normalne raspodele, i Kruskal-Wallis test praćen Dunn-ovim *post hoc* testom u slučaju kada vrednosti nisu pokazivale normalnu raspodelu.

Rezultati svih navedenih testova prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (engl. *Standard Error of Mean*, SEM), a statistički značajnim razlikama smatrane su one sa vrednostima  $p < 0,05$ .

RT-PCR rezultati analizirani su pomoću RQ Study Add ON softvera sa intervalom poverenja od 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Promene fizioloških parametara mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

#### 4.1.1. Promene u unosu hrane mužjaka i ženki *Wistar* pacova tokom starenja

U cilju preračunavanja količine hrane potrebne za životinje koje će biti podvrgnute dijetalnoj restrikciji merena je prosečna potrošnja hrane kod kontrolnih životinja odgovarajućih starosnih grupa i dobijeni podaci su prikazani u Tabelama 8 i 9. Uočeno je da je unos hrane kod mužjaka bio smanjen za 6% između 6. i 18. meseca, ali da se nakon početnog trenda smanjenja unos hrane povećao za 30% u 24. mesecu u odnosu na 6 meseci starosti (Tabela 4.1.1).

Nasuprot mužjacima, kod ženki *Wistar* pacova je uočeno blago i postepeno smanjenje unosa hrane tokom starenja. Ženke stare 18 meseci su u proseku unosile 7% manje hrane u poređenju sa 6 meseci starim, dok je u dobi od 24 meseca smanjenje unosa hrane iznosilo 10% (Tabela 4.1.2).

Tabela 8. Unos hrane tokom starenja kod mužjaka *Wistar* pacova

Starost mužjaka (mesec)	Prosečan unos hrane po životinji (gram)	Prosečan kalorijski unos po životinji (Cal)
6	19	52,2
15	18,5	50,9
18	18	49,5
21	24	66
24	25	68,8

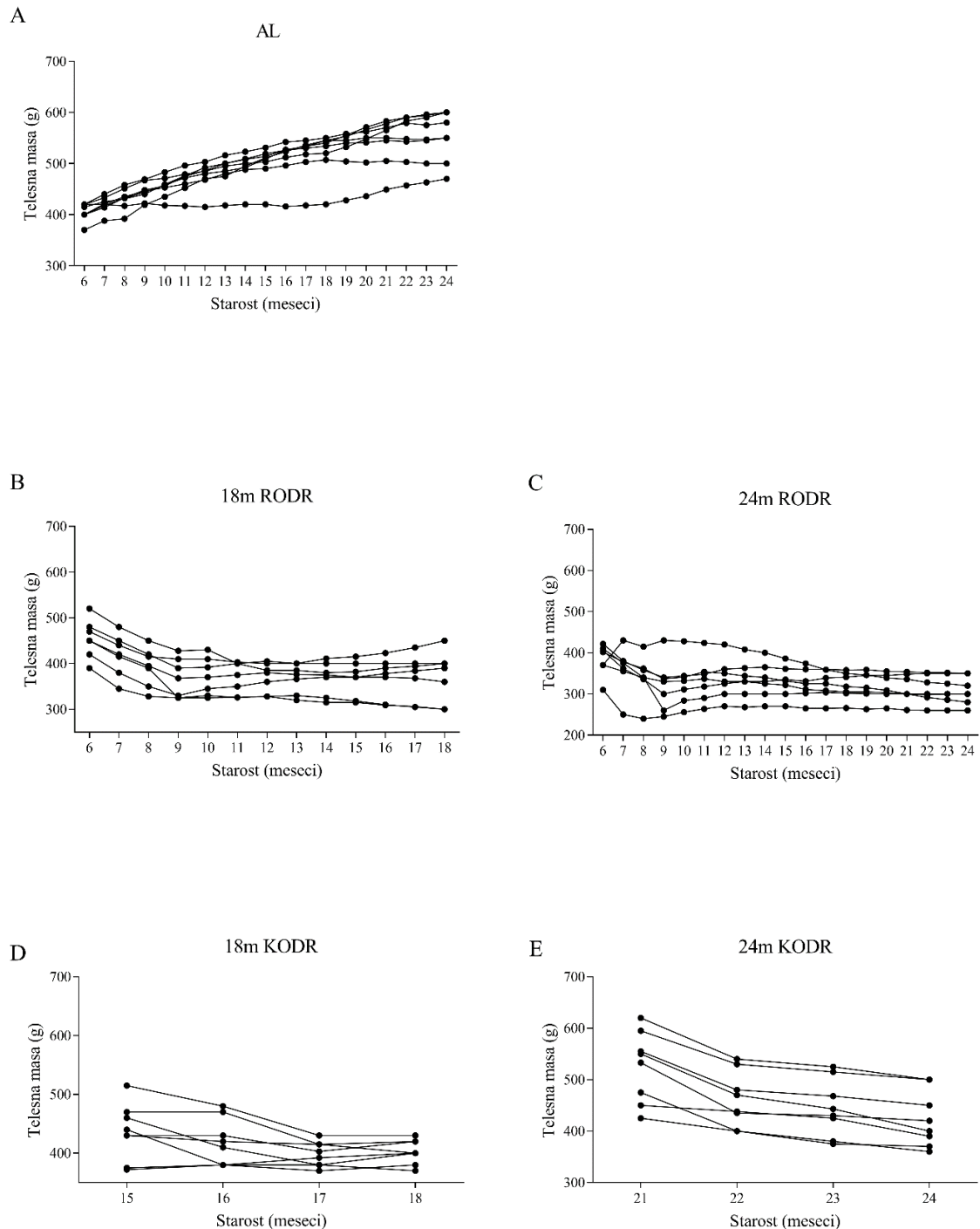
Tabela 9. Unos hrane tokom starenja kod ženki *Wistar* pacova

Starost ženki (mesec)	Prosečan unos hrane po životinji (gram)	Prosečan kalorijski unos po životinji (Cal)
6	15	41,2
15	14,5	39,8
18	14	38,5
21	13,5	37,1
24	13,5	37,1

#### 4.1.2. Promene telesne mase kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Uočeno je da prirast telesne mase kod životinja AL grupe prati povećanje unosa hrane. Telesna masa mužjaka koji su imali slobodan pristup hrani tokom celog života se progresivno povećavala kod svih ispitivanih jedinki (Slika 4.1). Kod životinja kojima je DR rano otpočeta (RODR) sa navršениh 6 meseci života, gubitak telesne mase dešavao se u prva tri meseca nakon čega je usledila plato faza, odnosno telesna masa je bila stabilna sve do navršениh 18 odnosno 24 meseca života. Kada je reč o

kasno otpočetoj DR (KODR), obrazac promena koje su usledile po njegovom uvođenju se razlikovao u zavisnosti od trenutka uvođenja. Kod 15 meseci starih životinja nakon inicijalnog blagog pada u prvom mesecu, uočljivije smanjenje telesne mase izmereno je u drugom mesecu DR, nakon čega nije dolazilo do promene. Kod 21 mesec starih životinja najdrastičnije smanjenje telesne mase uočava se u prvom mesecu DR, nakon čega se trend nastavlja do navršenih 24 meseca.



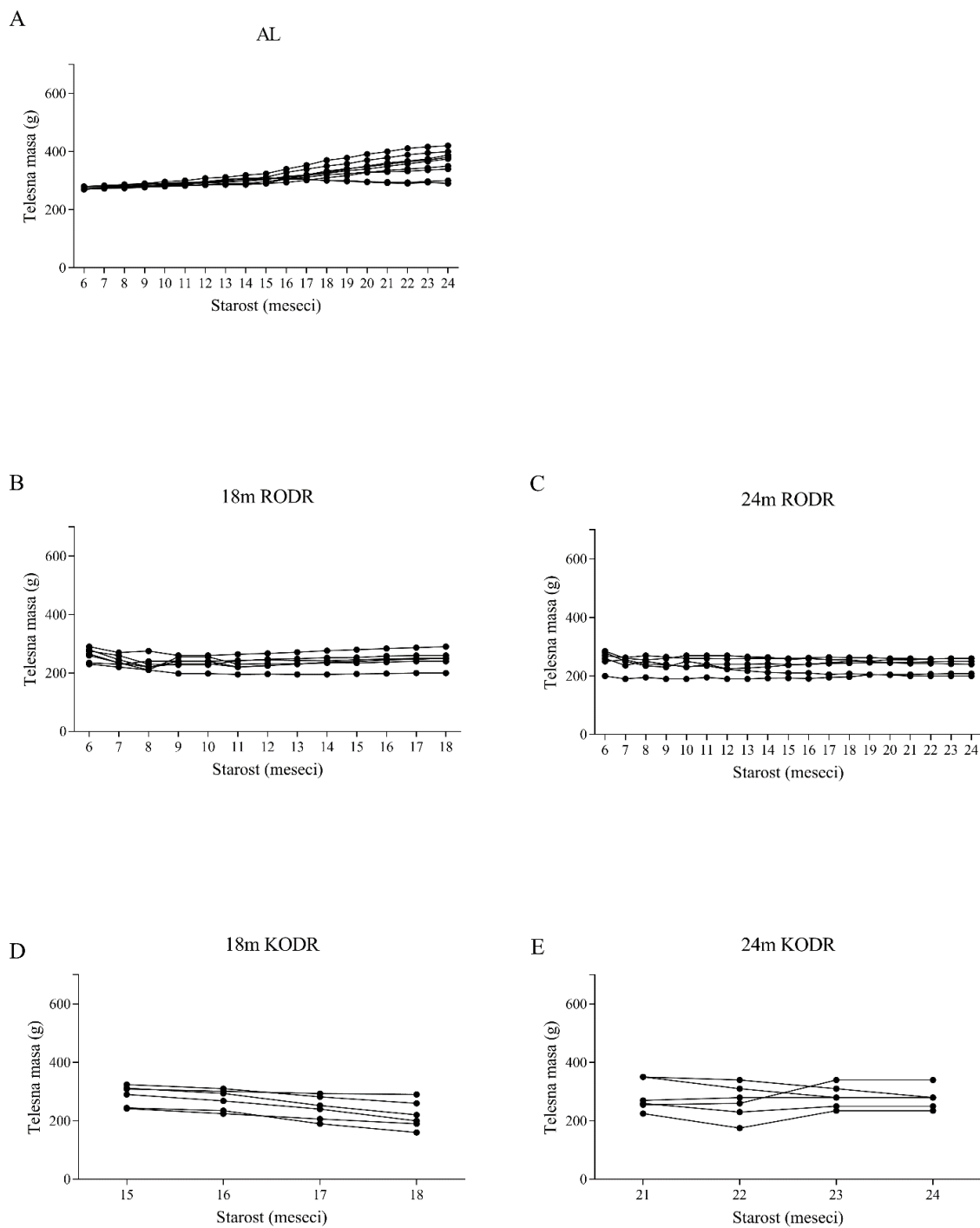
**Slika 4.1** Pojedinačne vrednosti telesne mase mužjaka pacova AL grupe (A), 18 meseci starih mužjaka RODR (B) i KODR (D) grupa i 24 meseca starih mužjaka RODR (C) i KODR (E) grupa.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

Kada je reč o ženama, variranje telesne mase se kretalo u manjem rasponu u odnosu na mužjake u svim posmatranim starosnim tačkama (Slika 4.2). Kod ženki koje su imale slobodan pristup hrani, uprkos spontanom smanjenju unosa hrane tokom života, zabeleženo je povećanje telesne mase, ali značajno manjeg stepena nego kod mužjaka. Štaviše, uočeni porast telesne mase otpočinjao je tek od 15. meseca života.

U slučaju ženki izloženih RODR, najdrastičnije smanjenje telesne mase zabeleženo je u prvom mesecu po uvođenju DR, ali manje izraženo nego kod mužjaka. Nakon inicijalnog smanjenja, masa je bila relativno stabilna do 15. meseca, kada je usledilo blago povećanje sve do 18. meseca života. Kod ženki 24m RODR grupe, u periodu od 18. do 24. meseca života nije uočeno značajno variranje telesne mase.

KODR je dovela do drastičnijeg smanjenja telesne mase kada je uvedena kod 15-mesečnih ženki, koje je bilo izraženije u drugom i trećem u odnosu na prvi mesec, dok uvođenje ovog režima ishrane u starosti od 21 mesec nije dovelo do dramatičnog gubitka telesne mase. Iako je, kao i kod dvogodišnjih mužjaka KODR grupe, kod ženki najveći gubitak telesne mase uočen odmah po uvođenju DR, nakon toga nije dolazilo do daljeg gubitka telesne mase. Ovo je ujedno i rezultat koji se ključno razlikovao kod mužjaka i ženki, i koji ide u prilog izmerenim vrednostima unosa hrane.



**Slika 4.2** Pojedinačne vrednosti telesne mase ženki pacova AL grupe (A), 18 meseci starih ženki RODR (B) i KODR (D) grupa i 24 meseca starih ženki RODR (C) i KODR (E) grupa.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.1.3. Preživljavanje mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Tokom trajanja eksperimenta praćena je smrtnost životinja (Tabele 4.2.1 i 4.2.2), odnosno vreme i uzrok umiranja pojedinačnih životinja u okviru svih eksperimentalnih grupa. Stopa smrtnosti životinja oba pola koje su imale slobodan pristup hrani rasla je sa starenjem, ali je kod mužjaka bila



znatno veća nego kod ženki u starosnoj grupi od 24 meseca. U datoj starosnoj grupi je procenat preživljavanja ženki na AL režimu ishrane iznosio 60%, dok je kod mužjaka bio 40%. Ova razlika u smrtnosti između mužjaka i ženki je najvećim delom uslovljena većim brojem vidljivih tumora kod 24 meseca starih mužjaka, a koji su zbog toga i eutanazirani.

Uvođenje RODR rezultovalo je većim procentom preživljavanja u odnosu na životinje AL grupa iste starosti, kod oba pola i u obe ispitivane starosne tačke (18 i 24 meseca starih životinja) (Tabele 10 i 11). KODR uvedena u 15. mesecu života pokazala se podjednako efikasnom kod mužjaka i kod ženki, rezultujući preživljavanjem od 100% u trenutku kada su životinje dostigle željenu starost od 18 meseci. Međutim, bitna razlika između polova uočena je u slučaju restrikcije hrane uvedene u kasnijem periodu života, koja je kod ženki imala negativan efekat na preživljavanje, dok je kod mužjaka imala savim suprotan efekat, odnosno poboljšavala je preživljavanje. Naime, KODR uvedena u 21. mesecu života je rezultovala preživljavanjem od 80% kod mužjaka starih 24 meseci grupe i svega 50%, kod ženki (Tabele 10 i 11).

Tabela 10. Ukupan broj mužjaka pacova na početku i na kraju eksperimenta i procenat preživljavanja mužjaka AL i DR grupa

<b>MUŽJACI</b>			
<b>Starost/Režim</b>	<b>% Preživljavanja</b>	<b>Broj životinja na početku eksperimenta</b>	<b>Broj životinja na kraju eksperimenta</b>
6m AL	100%	10	10
18m AL	70%	10	7
24m AL	40%	31	13
18m RODR	80%	9	7
18m KODR	100%	8	8
24m RODR	90%	9	8
24m KODR	80%	10	8

AL-*Ad libitum*, RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija

Tabela 11. Ukupan broj ženki pacova na početku i na kraju eksperimenta i procenat preživljavanja ženki AL I DR grupa

<b>ŽENKE</b>			
<b>Starost/Režim</b>	<b>% Preživljavanja</b>	<b>Broj životinja na početku eksperimenta</b>	<b>Broj životinja na kraju eksperimenta</b>
6m AL	100%	9	9
18m AL	70%	10	7
24m AL	60%	15	9
18m RODR	80%	9	7
18m KODR	100%	6	6
24m RODR	90%	7	6
24m KODR	50%	13	6

AL-*Ad libitum*, RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija

U tabelama 12 i 13 je dat ukupan broj životinja koje su uginule ili eutanazirane tokom eksperimenta (do trenutka žrtvovanja), starost u trenutku smrti i uzrok smrti za svaku životinju. Životinje su eutanazirane u dogovoru sa rukovodiocem odgajališta kada je bilo procenjivano da su u bolovima i pate usled prisustva tumora ili infekcija unutrašnjeg uha. U slučaju uginuća životinja bez prethodne pojave bolesti, uzrok smrti je označen kao nepoznat.

Tabela 12. Vreme i uzrok smrti mužjaka pacova AL i DR grupa

MUŽJACI			
Starost/Režim	Vreme trajanja DR	Vreme smrti	Uzrok smrti
6m AL	x	x	x
18 AL	x	12 meseci	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
	x	17 meseci	Nepoznato
	x	16 meseci	Nepoznato
24m AL	x	22 meseca	Nepoznato
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	22 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	20 meseci	Eutanazija (tumor)
	x	20 meseci	Nepoznato
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	19 meseci	Eutanazija (tumor)
	x	22 meseca	Nepoznato
	x	19 meseci	Nepoznato
	x	21 mesec	Eutanazija (tumor)
	x	19 meseci	Eutanazija (tumor)
18m RODR	6-18 meseci	17 meseci	Nepoznato
	6-18 meseci	18 meseci	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
18m KODR	15-18 meseci	x	x
24m RODR	6-24 meseca	22 meseca	Nepoznato
	6-24 meseca	20 meseci	Nepoznato
24m KODR	21-24 meseca	22 meseca	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
	21-24 meseca	23 meseca	Eutanazija (tumor)

AL-*Ad libitum*, RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija

Tabela 13. Vreme i uzrok smrti ženki pacova AL i DR grupa

ŽENKE			
Starost/Režim	Vreme trajanja DR	Vreme smrti	Uzrok smrti
6m AL	x	x	x
18m AL	x	13 meseci	Eutanazija (tumor)
	x	10 meseci	Nepoznato
	x	12 meseci	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
24m AL	x	22 meseca	Nepoznato
	x	21 mesec	Nepoznato
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	23 meseca	Nepoznato
	x	24 meseca	Eutanazija (tumor)
	x	23 meseca	Eutanazija (tumor)
18m RODR	6-18 meseci	17 meseci	Nepoznato
	6-18 meseci	18 meseci	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
18m KODR	15-18 meseci	x	x
24m RODR	6-24 meseca	22 meseca	Nepoznato
24m KODR	21-24 meseca	22 meseca	Nepoznato
	21-24 meseca	21 mesec	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
	21-24 meseca	23 meseca	Nepoznato
	21-24 meseca	22 meseca	Nepoznato
	21-24 meseca	22 meseca	Nepoznato
	21-24 meseca	23 meseca	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)
	21-24 meseca	24 meseca	Eutanazija (upala unutrašnjeg uha)

AL-*Ad libitum*, RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.1.4. Klinički indeks krhkosti (FI) mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa

U cilju potpunijeg sagledavanja sveukupnog stanja mužjaka i ženki *Wistar* pacova tokom starenja i pod uticajem različitih obrazaca DR, određen je stepen krhkosti (engl. *Frailty index*, FI). Najpre je procenjivano stanje različitih organskih sistema zasebno, da bi kasnije, prema formuli navedenoj u materijalu i metodama, ovi parametri poslužili za izračunavanje indeksa krhkosti, koji je, kako odličan indikator opšteg zdravstvenog stanja jedinki, tako i pokazatelj efikasnosti određenog farmakološkog ili nefarmakološkog tretmana. U tabelama 14, 15,16 i 17 je dat prikaz svih

pojedinačnih parametara korišćenih u računanju indeksa krhkosti, kao i broj životinja ocenjivanih određenom vrednošću za svaki parametar.

#### 4.1.4.1. Mužjaci

Za procenu indeksa krhkosti, parametrima je dodeljivana ocena 0, 0,5 ili 1 u zavisnosti od toga da li je parametar od interesa procenjen da je bio bez deficita, sa blagim deficitom ili sa uznapređovalim deficitom. Na osnovu dodeljenih ocena može se zaključiti da tokom starenja pri slobodnom pristupu hrani među mužjacima najčešće dolazi do slabljenja kognitivnih sposobnosti, sudeći po DI, indeksu diskriminacije kojim se procenjuje pamćenje i SAB parametru procene prostorne memorije, nakon čega slede incidence tumora, rektalnog prolapsa i loše opšte stanja krzna, (kvalitet, sjaj i razbarušenost, kao mera održavanja krzna) (Tabela 14). Kod 18 meseci starih mužjaka, oba režima dijetalne restrikcije bila su efikasna u odlaganju starosno zavisnih promena, pa je tako manji broj mužjaka sa lošim stanjem krzna, rektalnim prolapsom i lošim ocenama kognitivnih parametara uočen u RODR KODR grupi u odnosu na mužjake 18 meseci AL grupe. Kod 24 meseca starih životinja učinkovitost DR je bila manja, te se pozitivni efekat smanjenog unosa hrane ogledao najviše u manjem broju životinja kod kojih su bili prisutni tumori, dok su kognitivni parametri bili loši kao i kod životinja AL grupe iste starosti (Tabela 15).

Tabela 14. Vrednosti individualnih parametara krhkosti korišćenih u izračunavanju kliničkog indeksa krhkosti kod mužjaka pacova AL grupa tokom starenja.

	Eksperimentalna grupa	6 meseci AL			18 meseci AL			24 meseca AL		
		Ocena	0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5
Parametri <sup>1</sup>	Alopecija	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Dermatitis	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Stanje krzna	10	1	0	4	6	0	8	6	0
	Tumori	11	0	0	10	0	0	7	1	6
	Tremor	11	0	0	9	1	0	14	0	0
	Prošireni abdomen	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Stanje mišićnog i masnog tkiva karlice	9	2	0	9	1	0	13	0	0
	Gubitak sluha	10	1	0	9	1	0	8	0	6
	Naginjanje glave	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Katarakta	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Egzoftalmus	11	0	0	9	0	1	11	1	2
	Mikroftalmus	11	0	0	9	0	1	14	0	0
	Dijareja	11	0	0	9	0	1	13	1	0
	Žutica	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Penilni prolaps	11	0	0	10	0	0	13	1	0
	Rektalni prolaps	10	1	0	6	1	3	10	2	2
	Brzina i dubina disanja	10	1	0	9	0	1	12	0	2
	Neuobičajeni zvuci	11	0	0	10	0	0	14	0	0
	Pogrbljeni položaj	11	0	0	10	0	0	13	1	0
	Porfirin (crvene suze)	9	0	2	9	0	1	12	0	2
Malokluzija	11	0	0	10	0	0	13	0	1	

	DI	6	5	0	3	3	4	5	7	2
	SAB	6	5	0	0	6	4	8	1	5

<sup>1</sup>Brojčane vrednosti u tabeli predstavljaju broj mužjaka pacova unutar grupe koji ima ocenu 0, 0,5 ili 1 za svaki od parametara korišćenih za računanje indeksa krhkosti (6m AL: n=11, 18m AL: n=10, 24m AL: n=14).

AL-*Ad libitum*, DI- indeks diskriminacije, SAB-spontane alteracije

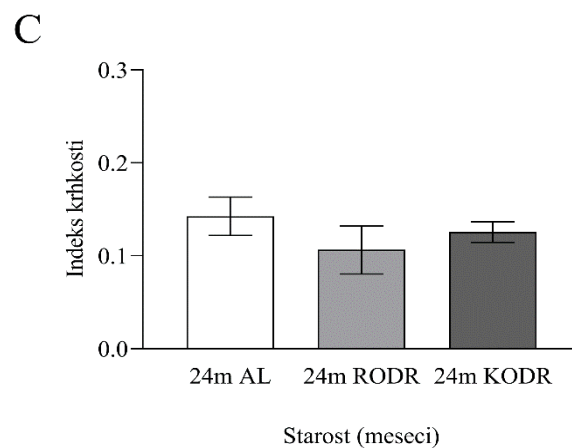
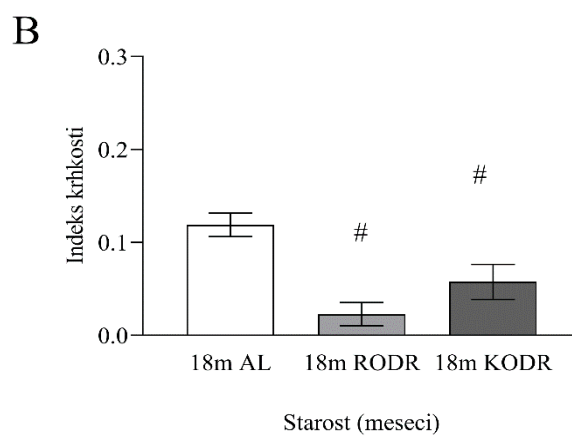
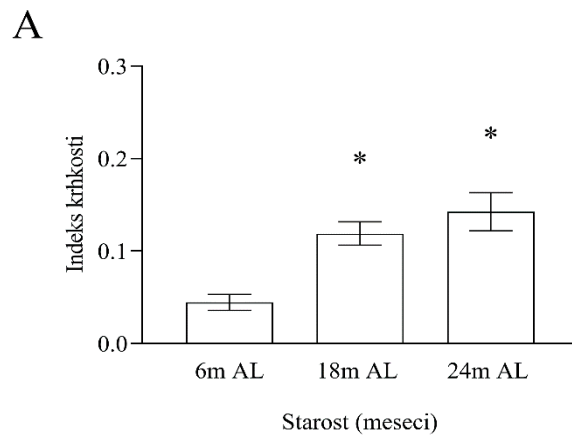
Tabela 15. Vrednosti individualnih parametara krhkosti korišćenih u izračunavanju kliničkog indeksa krhkosti kod mužjaka pacova RODR i KODR grupa.

	Eksperimental na grupa	18 meseci RODR			18 meseci KODR			24 meseci RODR			24 meseci KODR		
		0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5	1
<b>Parametri<sup>1</sup></b>	Alopecija	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Dermatitis	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Stanje krzna	6	2	1	6	2	0	5	3	0	6	3	0
	Tumori	7	0	2	7	1	0	4	0	4	8	1	0
	Tremor	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Prošireni abdomen	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Stanje mišićnog i masnog tkiva karlice	7	2	0	6	2	0	7	0	1	8	1	0
	Gubitak sluha	7	2	0	6	1	1	4	2	2	4	1	4
	Naginjanje glave	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Katarakta	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Egzoftalmus	9	0	0	7	1	0	8	0	0	8	1	0
	Mikroftalmus	9	0	0	8	0	0	7	0	1	9	0	0
	Dijareja	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Žutica	9	0	0	8	0	0	8	0	0	8	0	1
	Penilni prolaps	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Rektalni prolaps	8	1	0	6	2	0	6	2	0	6	3	0
	Brzina i dubina disanja	8	1	0	7	1	0	6	2	0	7	1	1
	Neuobičajeni zvuci	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	Pogrbljeni položaj	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0
	porfirin(crvene suze)	9	0	0	8	0	0	8	0	0	8	1	0
Malokluzija	9	0	0	8	0	0	8	0	0	9	0	0	
DI	1	5	3	2	3	3	0	2	6	2	3	4	
SAB	5	3	1	6	2	0	4	3	1	2	4	3	

<sup>1</sup> Brojčane vrednosti u tabeli predstavljaju broj mužjaka pacova unutar grupe koji ima ocenu 0, 0,5 ili 1 za svaki od parametara korišćenih za računanja indeksa krhkosti (18m RODR: n=9, 18m KODR: n=8, 24m RODR: n=8, 24m KODR: n=9)

RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija, DI- indeks diskriminacije, SAB-spontane alteracije

Na osnovu datih parametara izračunat je indeks krhkosti mužjaka svih eksperimentalnih grupa koji je očekivano rastao tokom starenja ( $F_{(2, 30)} = 11,23, p=0,0002$ ). Mužjaci stari 18 meseci imali su 2,5 puta veći indeks krhkosti (*post hoc*:  $p=0,0044$ ), dok su oni 24 meseca stari imali čak 3 puta veći indeks krhkosti u odnosu na 6 meseci stare mužjake (*post hoc*:  $p=0,0002$ ) (Slika 4.3, A). Mužjaci iz DR grupa starosti 18 meseci su imali značajno niži indeks krhkosti u odnosu na odgovarajuće starosne kontrole iz AL grupa ( $F_{(2, 22)} = 10,97, p=0,0005$ ). RODR je petostruko smanjila vrednosti indeksa krhkosti (*post hoc*:  $p=0,0003$ ) dok je KODR rezultovala dvostruko manjim vrednostima (*post hoc*:  $p=0,0123$ ) (Slika 4.3, B) u odnosu na osamnaestomesečne mužjake AL grupe. Kod 24 meseca starih mužjaka, uprkos postojanju blagog trenda smanjenja, nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima indeksa krhkosti među životinjama izloženim DR i AL režimima ishrane (Slika 4.3, C).



**Slika 4.3** Vrednosti indeksa krhkosti 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Grafički prikaz promene indeksa krhkosti tokom starenja (A), pod uticajem RODR i KODR u poređenju sa AL starosnom kontrolom u 18 meseci (B) i 24 meseca starosti (C). \* $p < 0,05$  za efekat starenja, #  $p < 0,05$  za efekat režima DR u odnosu na starosno odgovarajuću AL kontrolu.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.1.4.2. Ženke

Među ispitivanim parametrima kod ženki tokom starenja najprominentniji bili su incidenca tumora, gubitak sluha, stanje krzna, kao i kognitivni parametri DI i SAB (Tabela 16). U starosnoj tački od 18 meseci, RODR je prevenirala pojavu većine starosno zavisnih promena, osim stanja krzna i indeksa diskriminacije kojim se procenjuje pamćenje (Tabela 17). KODR je takođe pokazala izražen protektivni efekat na većinu parametara. Međutim, slično RODR, i ovde je izostao pozitivan efekat na stanje krzna i DI, kao i stanje mišićnog i masnog tkiva.

RODR je bila efikasna u odlaganju pojedinih starosno zavisnih promena, poput gubitka sluha, i u 24. mesecu života. Ipak, negativne posledice starenja nisu bile umanjene ili otklonjene kada je reč o stanju krzna, stanju mišićnog i masnog tkiva, naginjanju glave, iskolačenosti očiju i DI (Tabela 17). Kada je reč o KODR, u grupi ženki starih 24 meseca, ova dijeta je dovela do pogoršanja određenih parametara, odnosno veći broj ženki ove eksperimentalne grupe imao je simptome gubitka sluha i loših ocena DI i SAB u odnosu na ženke AL grupe iste starosti (Tabela 17).

Tabela 16. Vrednosti individualnih parametara krhkosti korišćenih u izračunavanju kliničkog indeksa krhkosti kod ženki pacova AL grupa tokom starenja.

	Eksperimentalna grupa	6 meseci AL			18 meseci AL			24 meseca AL		
		0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5	1
Parametri <sup>1</sup>	Ocena									
	Alopecija	7	2	0	5	0	2	9	0	0
	Dermatitis	9	0	0	6	0	1	9	0	0
	Stanje krzna	7	2	0	3	3	1	8	1	0
	Tumori	9	0	0	6	0	1	4	1	4
	Tremor	9	0	0	6	1	0	9	0	0
	Prošireni abdomen	9	0	0	6	1	0	8	0	1
	Stanje mišićnog i masnog tkiva karlice	9	0	0	6	0	1	8	1	0
	Gubitak sluha	9	0	0	3	1	3	4	0	5
	Naginjanje glave	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Katarakta	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Egzoftalmija	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Mikroftalmija	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Dijareja	9	0	0	7	0	0	7	1	1
	Žutica	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Vaginalni prolaps	9	0	0	4	3	0	9	0	0
	Rektalni prolaps	9	0	0	7	0	0	8	0	1
	Brzina i dubina disanja	9	0	0	6	0	1	9	0	0
	Neuobičajeni zvuci	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	Pogrljeni položaj	9	0	0	6	0	1	9	0	0
	Porfirin (crvene suze)	9	0	0	5	0	2	9	0	0
	Malokluzija	9	0	0	7	0	0	9	0	0
	DI	5	2	2	0	5	2	1	7	1
SAB	6	1	2	2	4	1	3	3	3	



<sup>1</sup> Brojčane vrednosti u tabeli predstavljaju broj ženki pacova unutar grupe koji ima ocenu 0, 0,5 ili 1 za svaki od parametara korišćenih za računanja indeksa krhkosti (6m AL: n=9, 18m AL: n=7, 24m AL: n=9).

AL-*Ad libitum*, DI- indeks diksriminacije, SAB-spontane alteracije

Tabela 17. Vrednosti individualnih parametara krhkosti korišćenih u izračunavanju kliničkog indeksa krhkosti kod ženki pacova RODR i KODR grupa.

	Eksperimental na grupa	18 meseci RODR			18 meseci KODR			24 meseci RODR			24 meseca KODR		
		0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5	1	0	0,5	1
Parametri <sup>1</sup>	Alopecija	7	0	0	5	1	0	6	0	0	5	0	1
	Dermatitis	7	0	0	6	0	0	6	0	0	5	0	1
	Stanje krzna	4	3	0	3	3	0	3	3	0	5	0	1
	Tumori	7	0	0	5	0	1	5	1	0	5	0	1
	Tremor	7	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0
	Prošireni abdomen	7	0	0	6	0	0	6	0	0	5	0	1
	Stanje mišićnog i masnog tkiva karlice	7	0	0	0	5	1	3	3	0	5	0	1
	Gubitak sluha	7	0	0	6	0	0	5	0	1	2	1	3
	Naginjanje glave	7	0	0	6	0	0	3	2	1	6	0	0
	Katarakta	7	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0
	Egzoftalmija	7	0	0	6	0	0	3	3	0	6	0	0
	Mikroftalmija	7	0	0	6	0	0	6	0	0	5	0	1
	Dijareja	7	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0
	Žutica	7	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0
	Vaginalni prolaps	2	3	2	6	0	0	6	0	0	5	0	1
	Rektalni prolaps	7	0	0	6	0	0	5	1	0	5	0	1
	Brzina i dubina disanja	7	0	0	6	0	0	5	0	1	5	1	0
	Neuobičajeni zvuci	7	0	0	6	0	0	5	0	1	6	0	0
	Pogrebljeni položaj	7	0	0	6	0	0	6	0	0	5	1	0
	Porfirin (crvene suze)	7	0	0	6	0	0	5	0	1	6	0	0
Malokluzija	7	0	0	5	0	1	6	0	0	6	0	0	
DI	4	2	1	3	3	0	1	4	1	0	3	3	
SAB	5	2	0	5	0	1	5	1	0	2	2	2	

<sup>1</sup> Brojčane vrednosti u tabeli predstavljaju broj ženki pacova unutar grupe koji ima ocenu 0, 0,5 ili 1 za svaki od parametara korišćenih za računanja indeksa krhkosti (18m RODR: n=7, 18m KODR: =6, 24m RODR: n=6, 24m KODR: n=6).

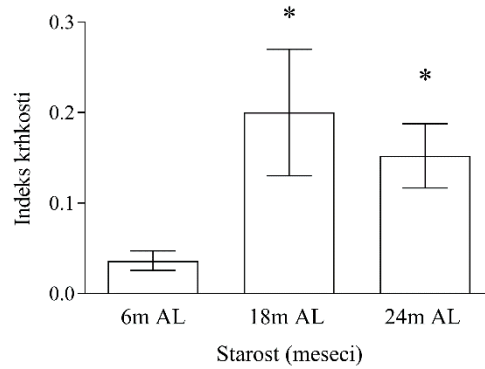
RODR- rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR- kasno otpočeta dijetalna restrikcija, DI- indeks diksriminacije, SAB-spontane alteracije

Negativne posledice starenja rezultovale su i višim vrednostima indeksa krhkosti kod 18 i 24 meseca starih ženki u odnosu na 6 meseci stare jedinke ( $p < 0,0001$ ). Indeks krhkosti *al libitum* hranjenih ženki starih 18 meseci bio je petostruko veći, a kod 24 meseca starih četverostruko veći u odnosu na indeks krhkosti šestomesečnih ženki, odnosno u okviru obe grupe starih ženki je detektovan veći udeo krhkih jedinki (*post hoc*:  $p=0,002$ ,  $p=0,006$ , redom) (Slika 4.4, A).

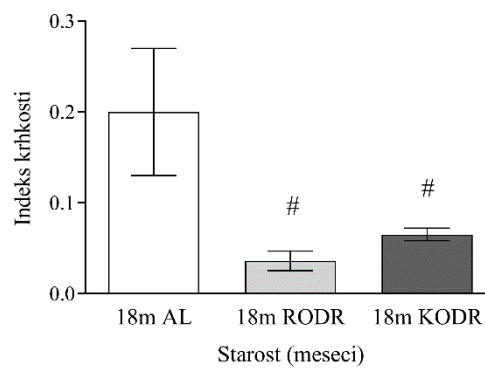
U vremenskoj tački od 18 meseci uočeni su pozitivni efekti DR, bez obzira na vreme otpočinjanja i dužinu trajanja dijete ( $F_{(2,13)}=5,107$ ;  $p=0,02$ ). Osamnaestomesečne ženke RODR grupe imale su 5,5 puta manju vrednost indeksa krhkosti (*Post hoc*:  $p=0,02$ ) a KODR grupe 3 puta manju vrednost u poređenju sa ženkama iste starosti AL grupe (*Post hoc*:  $p=0,03$ ) (Slika 4.4, B).

U dobi od 24 meseca samo je RODR imala pozitivan efekat na indeks krhkosti ( $p=0,05$ ), koji je bio dvostruko niži u odnosu na ženke AL grupe iste starosti (*post hoc*:  $p=0,05$ ). Nasuprot tome, KODR nije dovela do značajnih razlika u stepenu krhkosti (Slika 4.4, C).

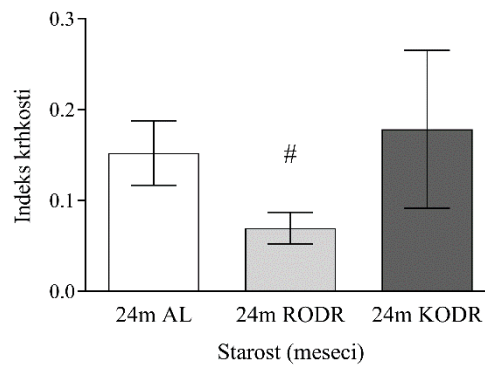
A



B



C



**Slika 4.4** Vrednosti indeksa krhkosti 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Grafički prikaz indeksa krhkosti tokom starenja (A), pod uticajem RODR i KODR u poređenju sa AL starosnom kontrolom u 18 meseci (B) i 24 meseca starosti (C). \* $p < 0,05$  za efekat starenja, #  $p < 0,05$  za efekat režima DR u odnosu na starosno odgovarajuću AL kontrolu.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

## 4.2. Ponašanje mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

### 4.2.1. Ponašanje ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja u testu otvorenog polja

Testom otvorenog polja praćena je ukupna aktivnost životinja, odnosno ukupni pređeni put kao odraz spontane lokomotorne aktivnosti i ukupna vertikalna aktivnost kao pokazatelj sklonosti životinja da istražuju prostor u kome se nalaze. Ponavljanje ovog testa tokom 3 uzastopna dana dalo je uvid u sposobnost životinje da habituiru, odnosno da se prilagođava na sredinu u kojoj se nalazi. Naime, istraživačko ponašanje životinje koja se našla u novom prostoru ima tendenciju smanjenja kroz vreme (Leussis i Bolivar, 2006). Prilikom prvog izlaganja novom prostoru, životinja istražuje i pamti informacije o istom, tako da pri ponovnom izlaganju, koje se dešava obično nakon 24 časa, prepoznajući prostor pokazuje manju zainteresovanost za istraživanje ukoliko je očuvana funkcija dugotrajne memorije. Ovakvo ponašanje smatra se najjednostavnijim oblikom učenja i naziva se habituacija. Pored pomenute međusesijske habituacije, koja ukazuje na očuvanu dugotrajnu memoriju, unutarsesijska habituacija služi za procenu kratkotrajne memorije i sposobnosti prilagođavanja. Poređenjem lokomotorne i vertikalne aktivnosti u prvih 5 i poslednjih 5 minuta sesije merena je unutarsesijska habituacija, dok je međusesijska habituacija merena poređenjem aktivnosti koja se desila za vreme trajanja sesije od 30 minuta, tokom 3 uzastopna dana.

Na osnovu ovih ispitivanih parametara dobijena je informacija o motoričkim i kognitivnim performansama životinja na AL i DR režimima ishrane. Promene u navedenim parametrima testa otvorenog polja pod uticajem dugotrajne i kratkotrajne DR kod mužjaka *Wistar* pacova istraživane su i publikovane kao deo doktorske disertacije dr Smilje Todorović, te će u ovom pasusu biti prezentovani samo rezultati dobijeni u eksperimentima na ženkama.

Poređenjem istraživačke aktivnosti životinja različitih grupa, uočeno je da se obim iste nije menjao tokom starenja kao ni pod dejstvom režima DR. Drugim rečima, jednofaktorska ANOVA statistička analiza nije pokazala da se pređeni put i vertikalna aktivnost statistički značajno razlikuju među eksperimentalnim grupama.

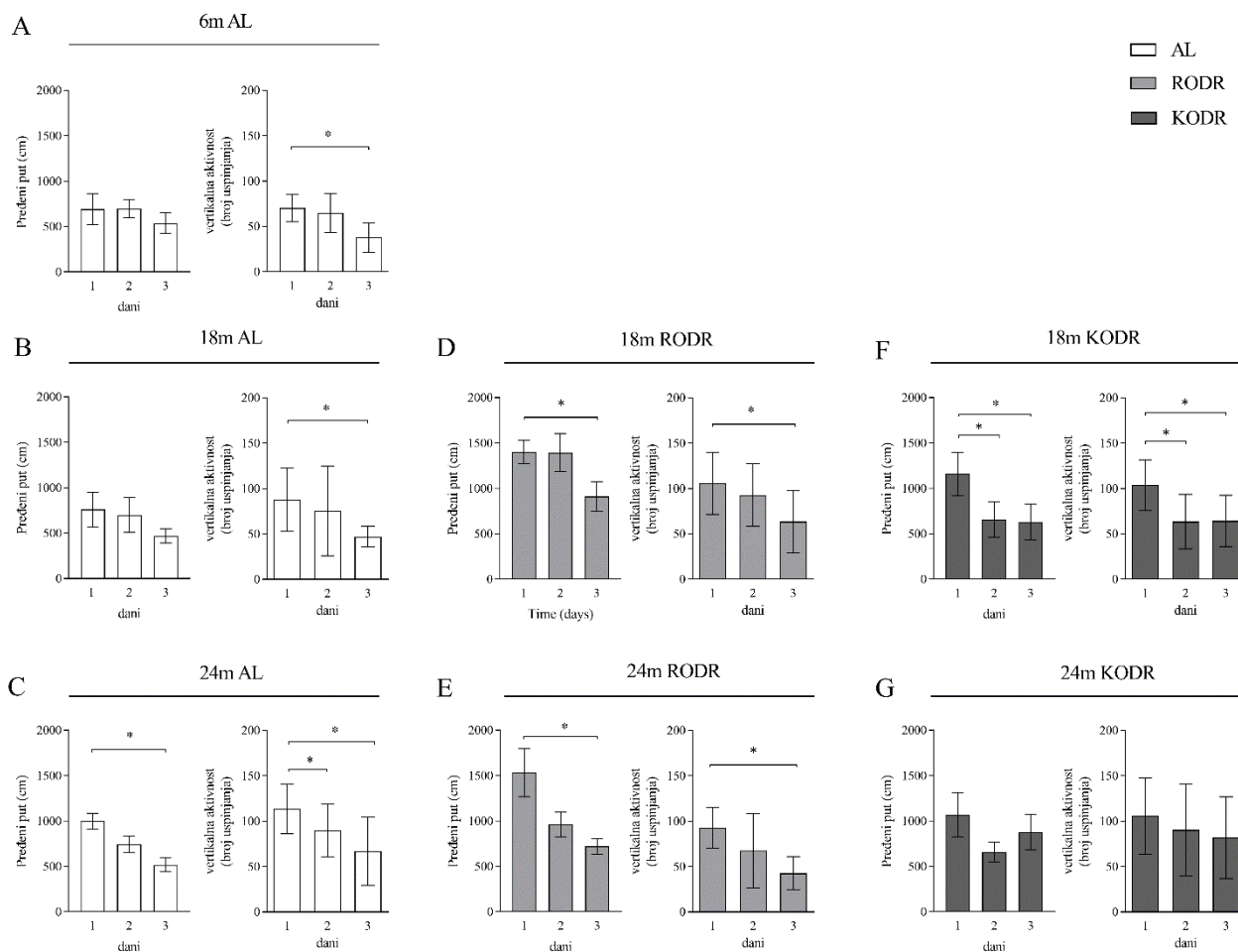
Uvidom u ispitivane parametre testa, dobijene tokom 3 uzastopna dana testiranja, uočeno je da postoji očuvana međusesijska habituacija kod ženki većine ispitivanih grupa (Slika 4.5). Iznenadjuće, izuzetak je predstavljala lokomotorna aktivnost šestomesečnih i osamnaestomesečnih ženki AL grupe (slika 4.5. A, C), dok kod ženki starih 24 meseca KODR grupe nije uočeno smanjenje ni lokomotorne ni vertikalne aktivnosti tokom testiranja (Slika 4.5.G).

Jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjem pokazala je da ženke stare 24 meseca AL grupe prelaze manju distancu trećeg dana testiranja u odnosu na prvi dan ( $F_{(1,814, 14,51)} = 11,10$ ,  $p=0,0015$ , *post hoc*:  $p=0,0057$ ) dok je kod šestomesečnih i osamnaestomesečnih ženki AL grupe uprkos postojanju istovetnog trenda, izostala statistička značajnost za ovaj parametar. Kada je reč o vertikalnoj aktivnosti, 6 i 18 meseci stare životinje AL grupe bile su značajno manje aktivne trećeg dana u odnosu na prvi dan (6m AL:  $F_{(1,998, 11,99)} = 6,988$ ,  $p=0,0097$ , *post hoc*:  $p=0,0242$ , 18m AL:  $F_{(1,197, 4,786)} = 4,438$ ,  $p=0,0492$ , *post hoc*:  $p=0,0421$ ) (Slika 4.5, A, B), dok su 24 meseca stare životinje AL grupe imale statistički značajno manju aktivnost i drugog i trećeg dana u odnosu na prvi dan ( $F_{(1,200, 9,603)} = 13,09$ ,  $p=0,0039$ , *post hoc*:  $p=0,0143$ ,  $p=0,0096$ , redom) (Slika 4.5, C).

Osamnaest meseci stare ženke RODR grupe imale su značajno manju lokomotornu ( $F_{(1,178, 5,890)} = 4,624$ ,  $p=0,0729$ , *post hoc*:  $p=0,0102$ ) i vertikalnu aktivnost ( $F_{(1,398, 6,991)} = 7,568$ ,  $p=0,0229$ , *post hoc*:  $p=0,0110$ ) trećeg dana testiranja u odnosu na prvi dan (Slika 4.5, D), dok je kod ženki KODR grupe iste starosti statistički značajan pad lokomotorne ( $F_{(1,166, 4,665)} = 18,07$ ,  $p=0,0086$ , *post hoc*:  $p=0,0129$ ,  $p=0,0260$ ) i vertikalne aktivnosti ( $F_{(1,298, 5,194)} = 15,65$ ,  $p=0,0084$ , *post hoc*:  $p=0,0282$ ,  $p=0,0199$ ) bio zabeležen i drugog i trećeg dana, u poređenju sa prvim danom (Slika 4.5, F).

Kada je reč o 24 meseca starim ženka RODR grupe, zabeležen je isti trend kao i kod 18 meseci starih ženki na ovom režimu ishrane. Drugim rečima, trećeg dana testiranja 24 meseca stare životinje RODR grupe su pokazale statistički značajan pad lokomotorne ( $p=0,0017$ , *post hoc*:  $p=0,0030$ ) i vertikalne aktivnosti ( $F_{(1,121, 4,483)} = 5,777$ ,  $p=0,0656$ , *post hoc*:  $p=0,0198$ ) u odnosu na prvi dan (Slika 4.5, E). Dvadeset četiri meseca stare ženke KODR grupe, sa druge strane, bile su jedina eksperimentalna grupa koja nije pokazala trend habituacije tokom trajanja ispitivanja oba parametra (Slika 4.5, G).

Očuvana habituacija kod životinja eksperimentalnih grupa izloženih dugotrajnoj DR sa ranim početkom je bila u skladu sa postojećim podacima o protektivnim svojstvima DR (Carter i sar., 2009; Ribeiro i sar., 2012), dok su efekti kraktotrajne DR dali dijametralno suprotne efekte u zavisnosti od vremena otpočinjanja dijetete.

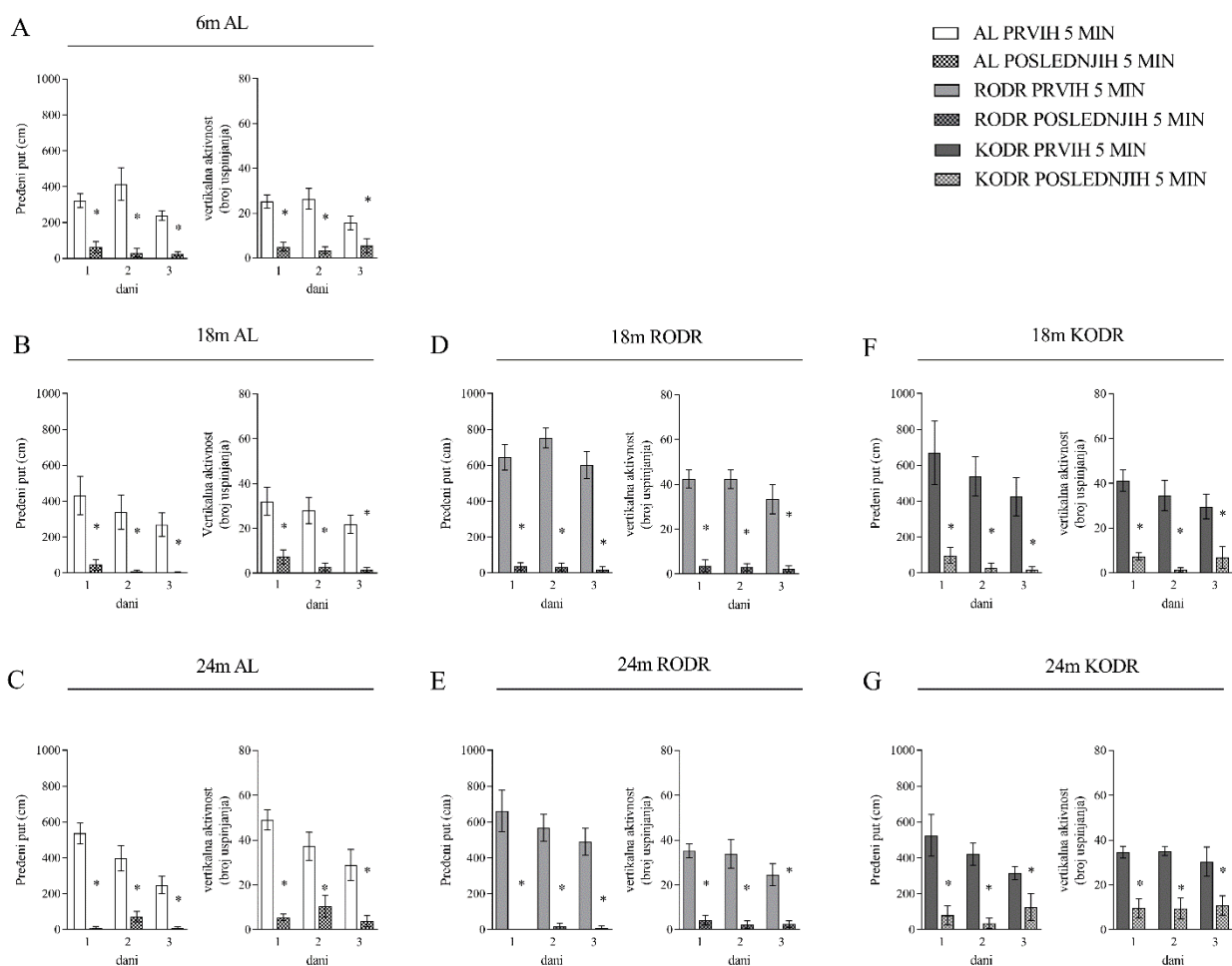


**Slika 4.5 Spontana lokomotorna aktivnost (pređeni put) i vertikalna aktivnost 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa (A, B, C) i 18 i 24 meseca starih ženki RODR (D, E) i KODR grupa (F, G) u 30-minutnim sesijama tokom tri uzastopna dana u testu otvorenog polja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  u odnosu na prvi dan testiranja**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

Detaljna analiza ponašanja ženki u toku jedne sesije pokazala je značajno smanjenje lokomotorne i vertikalne aktivnosti u poslednjih 5 minuta sesije u odnosu na prvih 5 minuta kod svih

grupa (Slika 4.6). Dati pad aktivnosti potvrđuje postojanje unutar sesijske habituacije koja ukazuje na očuvanost kratkotrajne memorije. Životinje svih ispitivanih eksperimentalnih grupa su se habituirale unutar sesije i to tokom svih dana izvođenja testa otvorenog polja, što pokazuje da je kratkotrajna memorija ženki *Wistar* pacova očuvana tokom starenja i da na nju nijedan od primenjenih režima ishrane nije imao uticaja (6m AL pređeni put: 1. dan  $p=0.0003$ , 2. dan  $p=0.0068$ , 3. dan  $p=0.0078$ , 6m AL vertikalna aktivnost: 1. dan  $p<0.0001$ , 2. dan  $p=0.0028$ , 3. dan  $p=0.0288$ ; 18m AL pređeni put: 1. dan  $p=0.0156$ , 2. dan  $p=0.0119$ , 3. dan  $p=0.0057$ , 18m AL vertikalna aktivnost 1. dan  $p=0.0156$ , 2. dan  $p=0.0119$ , 3. dan  $p=0.0057$ ; 24m AL pređeni put: 1. dan  $p<0.0001$ , 2. dan  $p=0.0039$ , 3. dan  $p=0.0011$ , 24m AL vertikalna aktivnost: 1. dan  $p<0.0001$ , 2. dan  $p=0.0156$ , 3. dan  $p=0.0078$ ; 18m RODR pređeni put: 1. dan  $p=0.0002$ , 2. dan  $p=0.0156$ , 3. dan  $p=0.0156$ ; 18m RODR vertikalna aktivnost: 1. dan  $p=0.0313$ , 2. dan  $p=0.0004$ , 3. dan  $p=0.0049$ ; 18m KODR pređeni put: 1. dan  $p=0.0257$ , 2. dan  $p=0.0054$ , 3. dan  $p=0.0072$ ; 18m KODR vertikalna aktivnost: 1. dan  $p=0.0007$ , 2. dan  $p=0.0040$ , 3. dan  $p=0.0081$ ; 24m RODR pređeni put: 1. dan  $p=0.0023$ , 2. dan  $p=0.0313$ , 3. dan  $p=0.0012$ ; 24m RODR vertikalna aktivnost: 1. dan  $p=0.0004$ , 2. dan  $p=0.0038$ , 3. dan  $p=0.0037$ ; 24m KODR pređeni put: 1. dan  $p=0.0087$ , 2. dan  $p=0.0013$ , 3. dan  $p=0.0455$ ; 24m KODR vertikalna aktivnost: 1. dan  $p=0.0036$ , 2. dan  $p=0.0003$ , 3. dan  $p=0.0402$ ).



**Slika 4.6 Spontana lokomotorna aktivnost (pređeni put) i vertikalna aktivnost 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa (A, B, C) i 18 i 24 meseca starih ženki RODR (D, E) i KODR grupa (F, G) tokom tri uzastopna dana u testu otvorenog polja. Unutar sesijske habituacija između prvih 5 i poslednjih 5 minuta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  poslednjih 5 u odnosu na prvih 5 minuta.**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

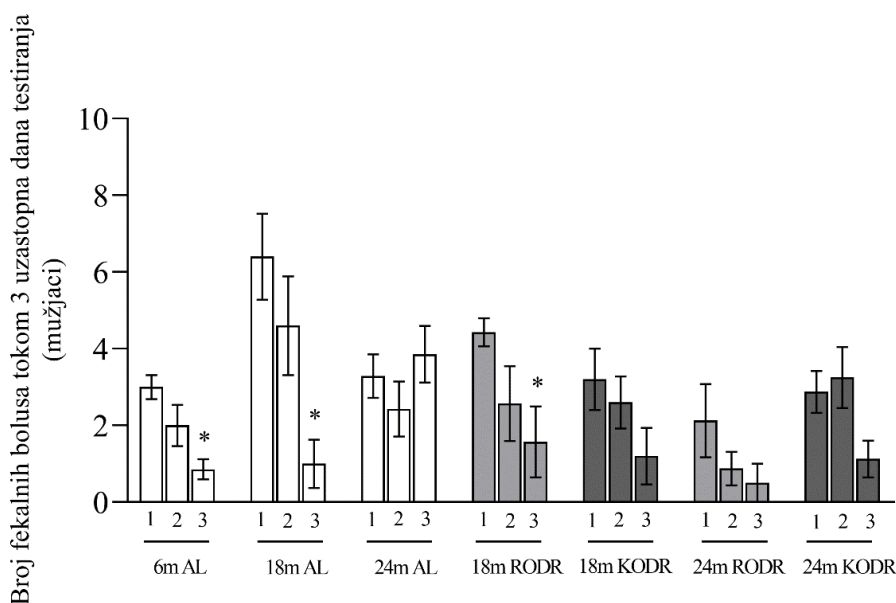
#### 4.2.2. Odgovor na stres izazvan novinom kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Izlaganje testu otvorenog polja za pacove predstavlja akutni stres, izazvan strahom od nepredvidivog i nepoznatog, koji se kosi sa njihovom prirodnom sklonošću da istražuju novi prostor, radoznalošću i snalažljivošću a u odgovor na ovaj stres je uključen i gastrointestinalni sistem. Jedna od metoda za procenu reakcije gastrointestinalnog sistema podrazumeva praćenje broja bolusa (van den Buuse i sar., 2001). Tokom 3 uzastopna dana testiranja u testu otvorenog polja praćeno je prisustvo i broj bolusa za svaku testiranu životinju, kako bi se procenio odgovor na stres i sposobnost habituacije tokom vremena.

##### 4.2.2.1. Mužjaci

Trend habituacije, odnosno privikavanja na novinu, analiziran je kroz broj ostavljenih bolusa u okviru svake ispitivane grupe. Kod životinja sa slobodnim pristupom hrani, statistička značajnost je izmerena kod šestomesečnih ( $F_{(1,471, 10,30)} = 11,40, p=0,0039$ ) i 18-mesečnih mužjaka AL grupe ( $F_{(1,767, 10,60)} = 6,454, p=0,0167, post\ hoc: p=0,0043, p=0,0173, redom$ ) (slika 4.7, prvi i drugi panel), ukazujući da su mužjaci iz ove dve grupe pokazivali smanjen nivo stresa pri ponovnom izlaganju novoj sredini.

Kada je reč o mužjacima koji su bili izloženi DR, uprkos postojanju opadajućeg trenda kod većine grupa, statistički značajno manji broj bolusa je zabeležen trećeg u odnosu na prvi dan samo kod 18-mesečnih mužjaka RODR grupe ( $F_{(1,550, 6,198)} = 6,196, p=0,0377, post\ hoc: p=0,05$ ) (slika 4.7, 4. panel) te se jedino kod ove grupe može govoriti o protektivnom dejstvu restriktivne dijetete.



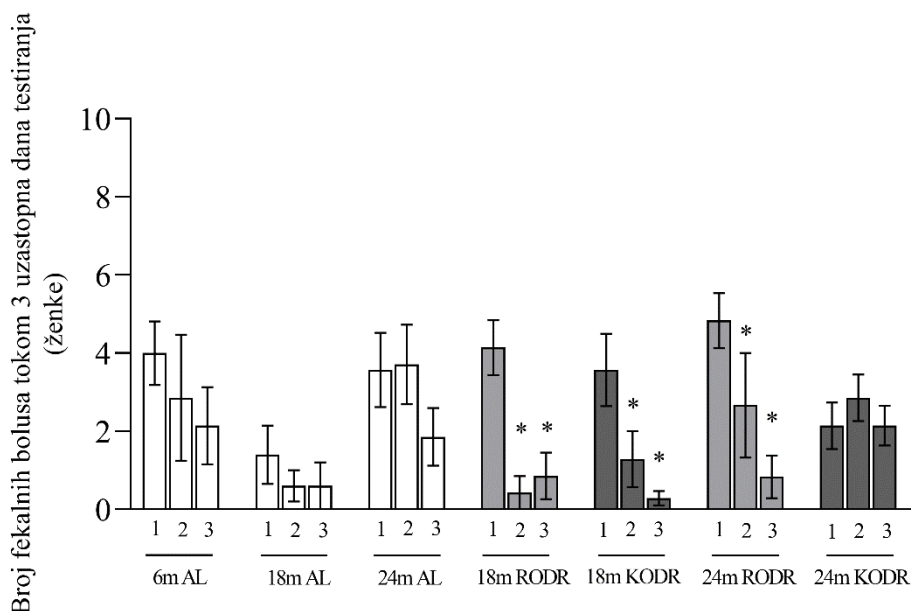
**Slika 4.7 Broj bolusa 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa, tokom tri uzastopna dana testiranja u testu otvorenog polja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za promene tokom tri uzastopna dana unutar iste grupe.**

#### 4.2.2.2. Ženke

Tokom tri uzastopna dana testiranja nije došlo do karakterističnog smanjenja broja bolusa kada su u pitanju ženke AL grupa.

Efekti režima smanjenog unosa hrane bili su naročito uočljivi u slučaju dugotrajne DR. Statistička analiza je pokazala da su osamnaestomesečne ženke RODR grupe ostavljale značajno manje bolusa drugog i trećeg dana testiranja u odnosu na prvi dan ( $p=0,0041$ , *post hoc*:  $p=0,0222$ ,  $p=0,0462$ , redom) (Slika 4.8, panel 4). Ista promena detektovana je kod ženki KODR grupe iste starosti koje su ostavljale značajno manje bolusa drugog i trećeg dana u poređenju sa prvim danom ( $F_{(1,792, 10,75)} = 10,09$ ,  $p=0,0040$ , *post hoc*:  $p=0,0186$ ,  $p=0,0179$ , redom) (Slika 4.8, panel 5).

RODR je uticala na odgovor na stres i u najstarijoj grupi ženki. Drugog i trećeg dana testiranja dvadesetčetvoromesečne ženke RODR grupe ostavljale su značajno manje bolusa u odnosu na prvi dan ( $F_{(1,188, 5,941)} = 16,53$ ,  $p=0,0058$ , *post hoc*:  $p=0,0472$ ,  $p=0,0002$ ) (Slika 4.8, panel 6). Kod ženki KODR grupe iste starosti izostao je statistički značajan trend smanjenja broja bolusa kroz dane, koji je zabeležen u svim ostalim eksperimentalnim grupama (Slika 4.8, panel 7).



**Slika 4.8 Broj bolusa 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa, tokom tri uzastopna dana testiranja u testu otvorenog polja.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za promene tokom tri uzastopna dana unutar iste grupe.

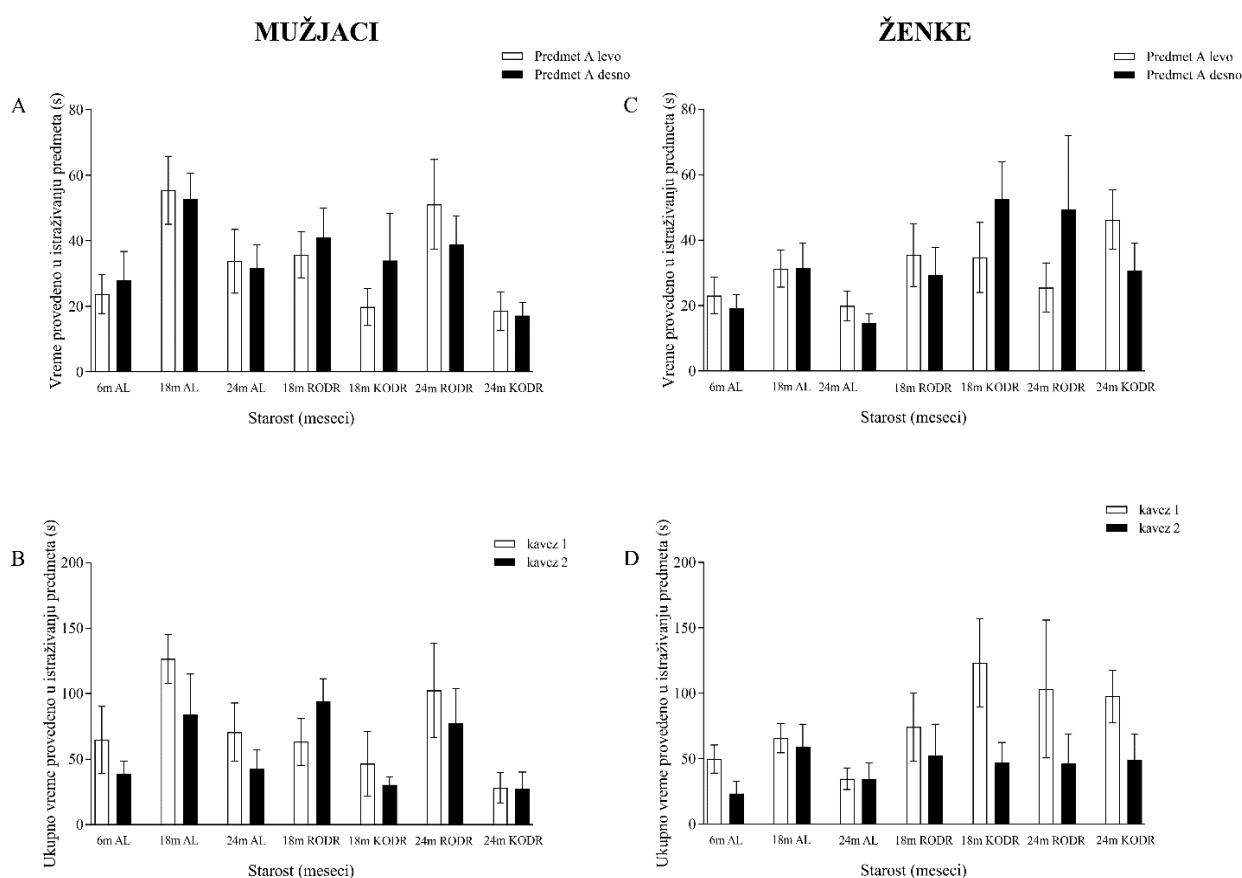
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.3. Prepoznavanje novog predmeta kao odraz očuvane kratkotrajne i dugotrajne memorije kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Test prepoznavanja novog predmeta je korišćen za procenu kratkotrajne i dugotrajne memorije mužjaka i ženki *Wistar* pacova, a zasniva se na urođenoj sklonosti glodara da istražuju novinu.



U sesiji familijarizacije, u kojoj je životinjama svih eksperimentalnih grupa nuđeno da istražuju dva identična predmeta smeštena na suprotne strane arene, rezultati t testa ukazali su da životinje nisu ispoljavale preferencu za određenu stranu arene (Slika 4.9, A, C). Takođe, obzirom da je eksperiment rađen paralelno u dva kaveza, i da se set od dva identična predmeta razlikovao u kavezima 1 i 2, t test je pokazao i da se ukupno vreme istraživanja predmeta nije razlikovalo među kavezima, odnosno ponuđeni predmeti izazivali su isto interesovanje životinja. (Slika 4.9, B, D). Dati rezultati ukazuju da je ponašanje životinja, evaluirano u sesijama prepoznavanja novog predmeta koje su sledile nakon familijarizacije životinja sa predmetima, odraz istraživačkog ponašanja vezanog za novinu a ne preference za određenu stranu arene ili veće/manje zainteresovanosti za predmet zbog preferiranja njegovih svojstava.



**Slika 4.9** Preference za stranu arene (A, C) i predmet (B, D) 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka i ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka i ženki RODR i KODR grupa tokom 30 minuta faze familijarizacije Testa prepoznavanja novog predmeta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.3.1. Mužjaci

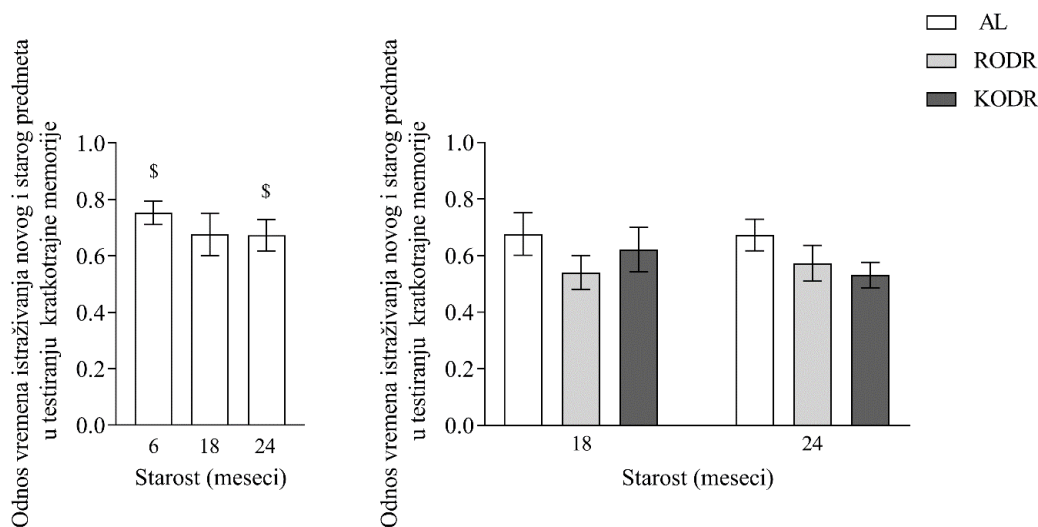
Po završetku faze familijarizacije, životinje su vraćane u matični kavez na sat vremena, nakon čega im je u areni ponuđen jedan poznati i jedan novi predmet, i mereno je vreme provedeno u istraživanju predmeta. Efekat starenja i DR na kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju procenjivan je

pomoću odgovarajuće formule koja u obzir uzima vreme istraživanja novog i starog predmeta tj. njihov odnos (ER, engl. *exploration ratio formula*). Pre poređenja između grupa životinja, za svaku eksperimentalnu grupu urađen je t-test za jedan uzorak, koji je dao informaciju da li je unutar grupe nivo diskriminacije novog predmeta statistički značajno viši od nivoa slučajnog istraživanja (za koji je uzeta teorijska vrednost od 50% za datu grupu) odnosno da li uopšte postoji prepoznavanje novog predmeta. Statistička značajnost uočena je kod šestomesečnih ( $p=0,0002$ ) i 24-mesečnih mužjaka AL grupe ( $p=0,0271$ ) u testovima procene kratkotrajne memorije (slika 4.10, A), dok je u testu procene dugotrajne memorije statistička značajnost uočena samo kod šestomesečnih mužjaka AL grupe ( $p=0,0121$ ), ukazujući da kod mužjaka ovih grupa postoji jasna preferenca ka novini koja ukazuje na očuvan memorijski odgovor.

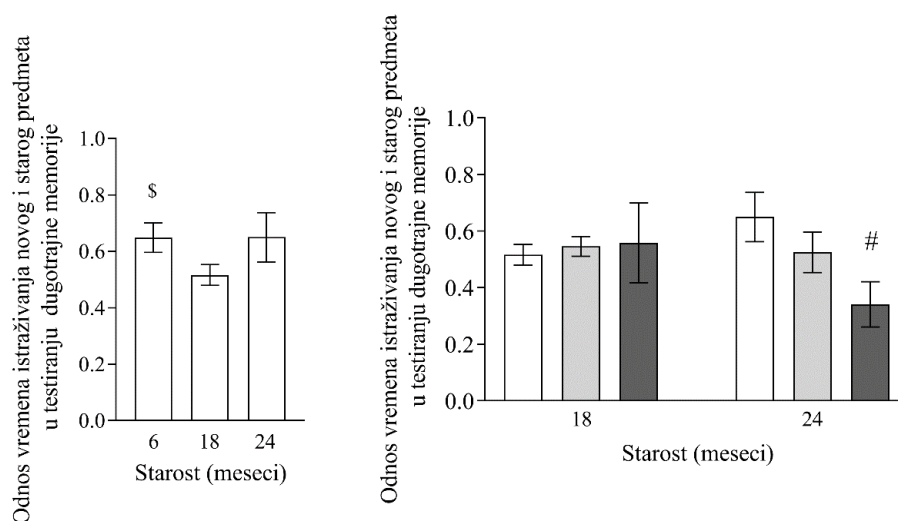
Rezultati testa prepoznavanja novog predmeta su pokazali da proces starenja i izloženost različitim dijetalnim režimima nisu imali uticaja na kratkotrajnu memoriju mužjaka tj. na zainteresovanost za istraživanje novog predmeta (Slika 4.10, A).

Dugotrajna memorija testirana je 24 sata nakon prvog testa, pri čemu je životinjama ponuđen jedan poznati i jedan novi predmet za istraživanje. Sličan obrazac promena uočen je i na nivou dugotrajne memorije, sa izuzetkom mužjaka najstarije KODR grupe ( $F_{(2, 16)} = 3,637$ ,  $p=0,0499$ ). Naime, 24-mesečni mužjaci KODR grupe imali su dvostruko niže ER vrednosti od mužjaka iste starosti sa slobodnim pristupom hrani, što ukazuje da je na njihovu dugotrajnu memoriju KODR imala negativan efekat (*post hoc*:  $p=0,0301$ ) (Slika 4.10, B, panel desno).

A



B



**Slika 4.10 Istraživanje novog predmeta 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa, tokom 10-minutnih sesija za procenu kratkotrajne (A) i dugotrajne memorije (B).** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, #  $p < 0,05$  za efekat režima DR u odnosu na starosno odgovarajuću AL kontrolu, \$ unutar grupe vrednost ER iznad nivoa slučajnog istraživanja (50% teorijske verovatnoće)

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.3.2. Ženke

Test prepoznavanja novog predmeta ukazao je na značajne razlike između mužjaka i ženki. Za početak, t-testom za jedan uzorak utvrđena je statistički značajno veća ER vrednost od vrednosti slučajnog istraživanja kod ženki 6 meseci AL grupe ( $p=0,0038$ ), 24 meseca AL grupe ( $p=0,0003$ ), 18 meseci RODR ( $p=0,0024$ ) i KODR grupe ( $p=0,0225$ ) i 24-mesečnih ženki RODR grupe ( $p=0,0156$ ),

za test procene kratkotrajne memorije, i 6-mesečnih ženki AL ( $p=0,0196$ ) i 18-mesečnih RODR grupe ( $p=0,0005$ ), za test procene dugotrajne memorije. Kod navedenih grupa, životinje su prepoznavale, odnosno preferirale novi predmet.

Starije ženke koje su imale slobodan pristup hrani su pokazivale značajno manje interesovanje za novi predmet u poređenju sa mladim ženkama, ukazujući na pogoršanje kratkotrajne memorije tokom starenja ( $F_{(2,16)} = 12,20$ ,  $p=0,0006$ ). Vrednosti ER kod 18-mesečnih i 24-mesečnih ženki AL grupe bile su 30% i 20% niže u odnosu na 6-mesečne ženke AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0003$ ,  $p=0,0104$ , redom) (Slika 4.11, A, beli stubići).

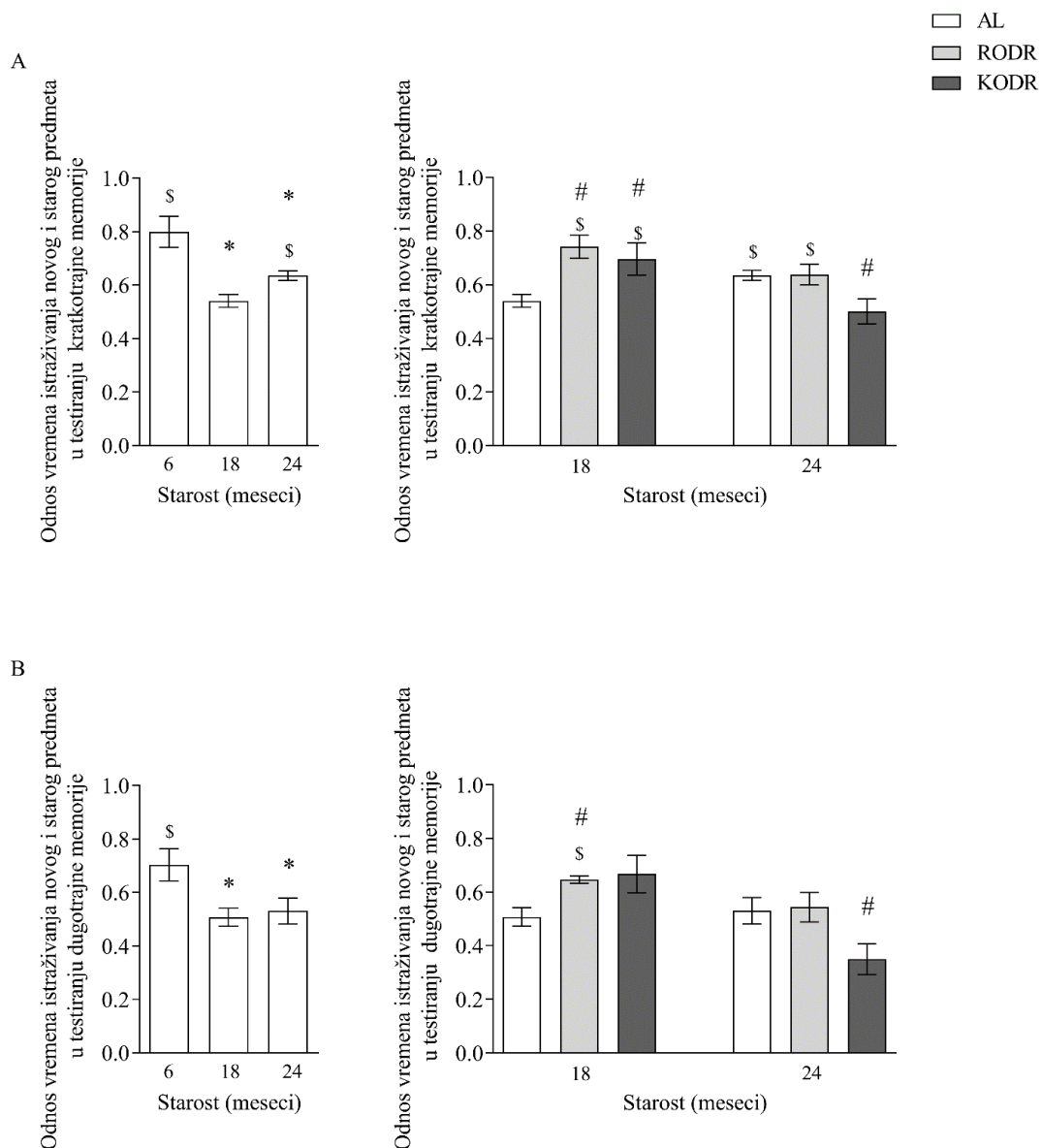
DR se pokazala efikasnom u očuvanju memorijskog odgovora kod 18 meseci starih životinja, bez obzira na početak i trajanje ( $F_{(2, 15)} = 5,565$ ,  $p=0,0156$ ). Naime, 18-mesečne ženke RODR i KODR grupe su 20% odnosno 15% više preferirale novi, u odnosu na poznati predmet, u poređenju sa ženkama iste starosti sa slobodnim pristupom hrani (*post hoc*:  $p=0,0115$ ,  $p=0,0490$ , redom) (Slika 4.11, A, srednji panel).

Međutim, uočeni protektivni efekat dugotrajne DR je nestao tokom starenja, te u dobi od 24 meseca nije bilo razlike između ženki AL i RODR grupe, dok je kod ženki izloženih kratkotrajnoj DR uočen negativni efekat restriktivnog režima ishrane ( $F_{(2, 15)} = 4,868$ ,  $p=0,0235$ ). Ženke KODR grupe stare 24 meseca su imale 15% manji ER u odnosu na ženke AL grupe iste starosti (*post hoc*:  $p=0,0265$ ) (Slika 4.11, A panel desno).

Negativan efekat starenja uočen je i kada je pitanju dugotrajna memorija, budući da je starenje dovelo do lošijeg raspoznavanja novog predmeta ( $F_{(2, 15)} = 4,549$ ,  $p=0,0325$ ). Vrednosti ER kod 18 i 24 meseca starih ženki bile su 20% i 15% niže u odnosu na 6 meseci stare (*post hoc*:  $p=0,0369$ ,  $p=0,0451$ , redom) (Slika 4.11, B, beli stubići).

Kod 18 meseci starih ženki protektivan efekat DR sa ranim početkom odražavao se i na očuvanje dugotrajne memorije, pa su 18-mesečne ženke RODR grupe imale 15% veće vrednosti ER u poređenju sa 18-mesečnim ženkama AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 6,668$ ,  $p=0,0167$ , *post hoc*:  $p=0,0486$ ) (Slika 4.11, B, grafik desno).

Dok je protektivan efekat RODR bio jasan u vremenskoj tački od 18 meseci, 24 meseca stare ženke RODR grupe se nisu razlikovale od ženki AL grupe iste starosti. Takođe, iako KODR nije imala efekta na dugotrajnu memoriju kod 18 meseci starih ženki, kod 24 meseca starih uočen je negativan uticaj DR. Vrednosti ER kod 24-mesečnih ženki KODR grupe su ukazivale na značajno manji stepen raspoznavanja novog od poznatog predmeta, u poređenju sa 24-mesečnim ženkama AL grupe (*post hoc*:  $p=0,05$ ) (Slika 4.11, B panel desno) ( $F_{(2, 14)} = 3,773$ ,  $p=0,0489$ ).



**Slika 4.11 Istraživanje novog predmeta 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa tokom 10-minutnih sesija za procenu kratkotrajne (A) i dugotrajne memorije (B).** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, #  $p < 0,05$  za efekat režima DR u odnosu na starosno odgovarajuću AL kontrolu, \$ unutar grupe vrednost ER iznad nivoa slučajnog istraživanja (50% teorijske verovatnoće)

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.4. Ponašanje nalik anksioznom kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Za procenu ponašanja nalik anksioznom korišćeni su test otvorenog polja i test svetlo-tamne kutije. Ova dva testa pripadaju grupi testova zasnovanih na paradigmi pristupanja i izbegavanja, u kom koncept okruženja može biti percipiran kao pretnja za životinju (Lezak i sar., 2017).

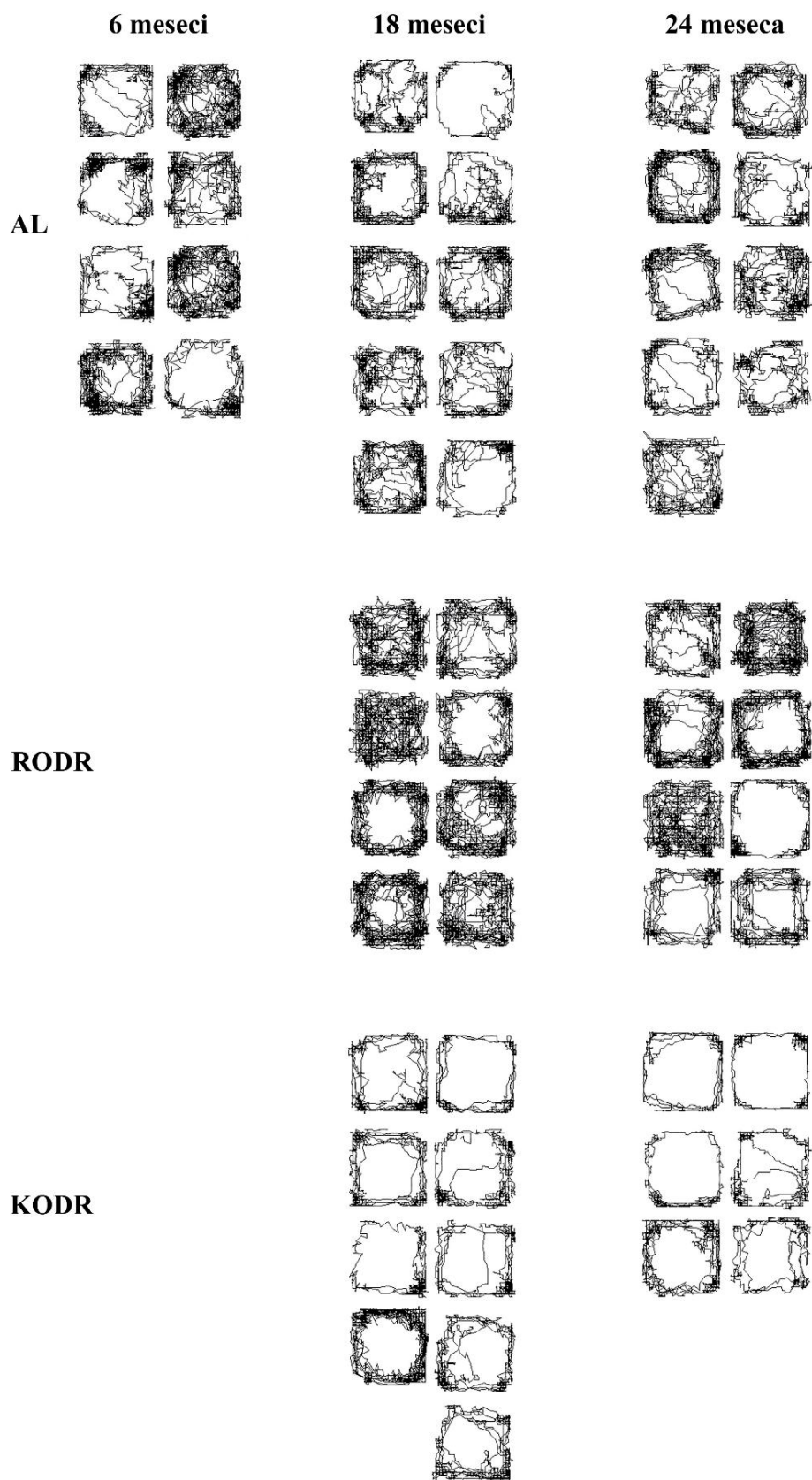
#### *4.2.4.1. Putanje u testu otvorenog polja kod mužjaka i ženki Wistar pacova AL i DR grupa tokom starenja*

U areni testa otvorenog polja životinje imaju specifične šablone kretanja koji ukazuju na nivo njihove anksioznosti. Što je životinja više uznemirena, odnosno anksiozna, to će više biti izražen takozvani tigmotaksis, odnosno sklonost da se kreće blizu zidova arene i obrnuto, što je životinja slobodnija i manje se oseća ugroženo, to će više istraživati i ulaziti u sredinu arene (Lynn i Brown, 2010).

Tokom procesa starenja nije došlo do značajne promene tipa i obima kretanja kako kod mužjaka, tako i kod ženki (Slika 4.12. i 4.13), iako je kod ženki primećen veći obim kretanja uz udaljavanje od zida arene, što je bilo naročito uočljivo između 6 i 24 meseca starih ženki sa slobodnim pristupom hrani.

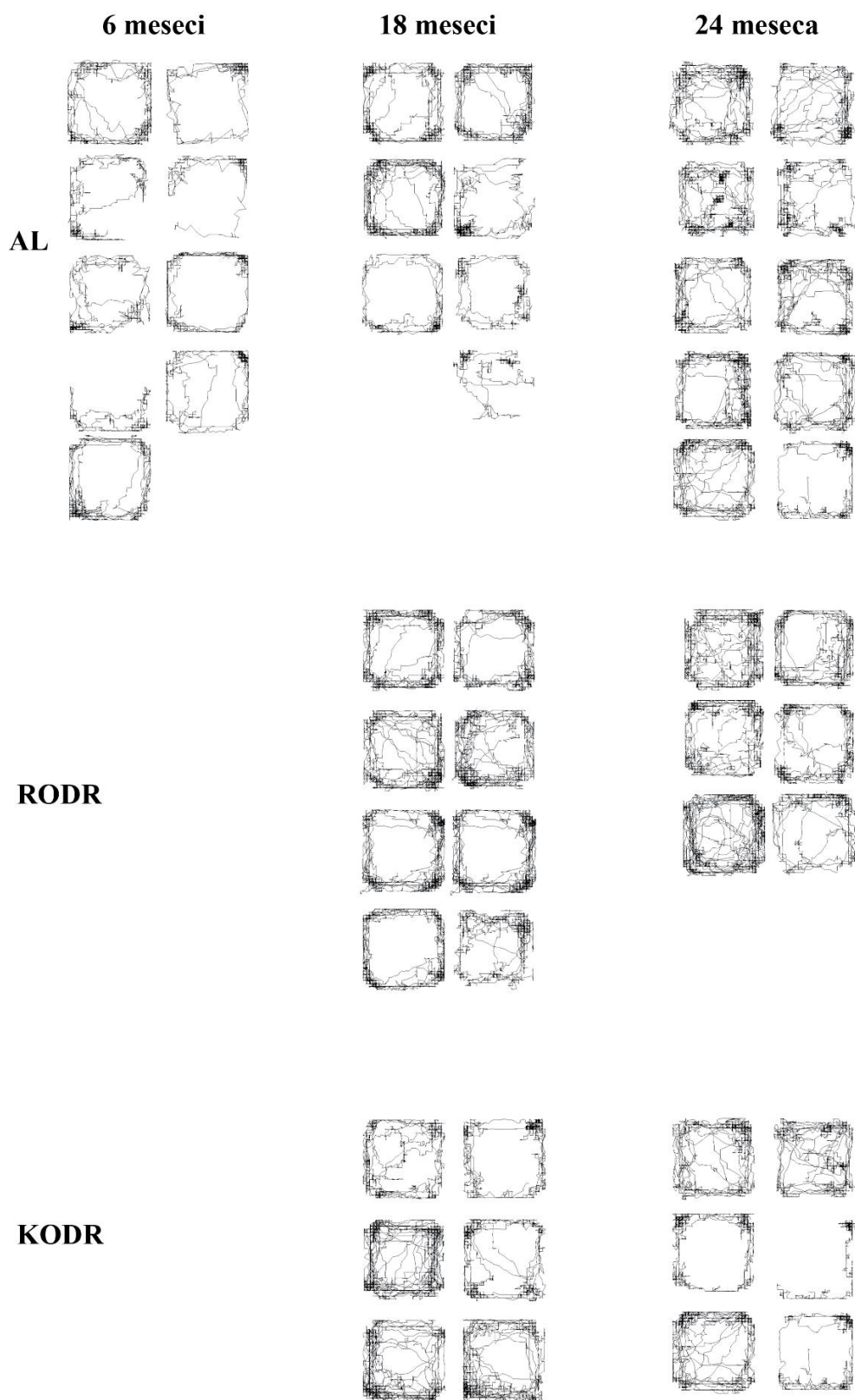
Efekat DR na obim i putanju kretanja se razlikovao u zavisnosti od vremena početka i dužine trajanja DR, kao i pola. Dok je pređena distanca bila znatno manja kod 18-mesečnih mužjaka KODR grupe u odnosu na 18-mesečne mužjake RODR grupe (Slika 4.12), kod ženki je obim kretanja u ove dve grupe bio približno isti (Slika 4.13).

Dvogodišnje životinje izložene kasno otpočetoj DR (KODR grupa) imale su vrlo karakterističan šablon kretanja, dominantno uz ivice arene i gotovo bez zalaženja u centralni deo, što u kombinaciji sa smanjenom ukupnom motoričkom aktivnošću u poređenju sa drugim grupama ukazuje na viši nivo anksioznosti u ovim grupama životinja oba pola (Slike 4.12 i 4.13).



**Slika 4.12 Putanje kretanja 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa u testu otvorenog polja**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija



**Slika 4.13 Putanje kretanja 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa u testu otvorenog polja**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija



#### 4.2.4.2. Ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom u testu otvorenog polja kod mužjaka i ženki

##### Wistar pacova AL i DR grupa tokom starenja

U cilju određivanja stepena anksioznosti analizirani su sledeći parametri iz testa otvorenog polja: ukupni pređeni put, broj ulazaka u centralni deo arene otvorenog polja i vreme provedeno u istom. Za razliku od testa procene motoričkih sposobnosti životinje u testu otvorenog polja gde je praćeno kretanje životinje tokom 30 minuta, u cilju procene ponašanja nalik anksioznom, aktivnost životinje merena je tokom prvih 10 minuta. Pređeni put u kombinaciji sa podacima o broju ulazaka i vremenu provedenom u centralnom delu arene testa otvorenog polja i trajektorijom kretanja životinje, dao je uvid u stepen anksioznosti ispitivanih grupa životinja.

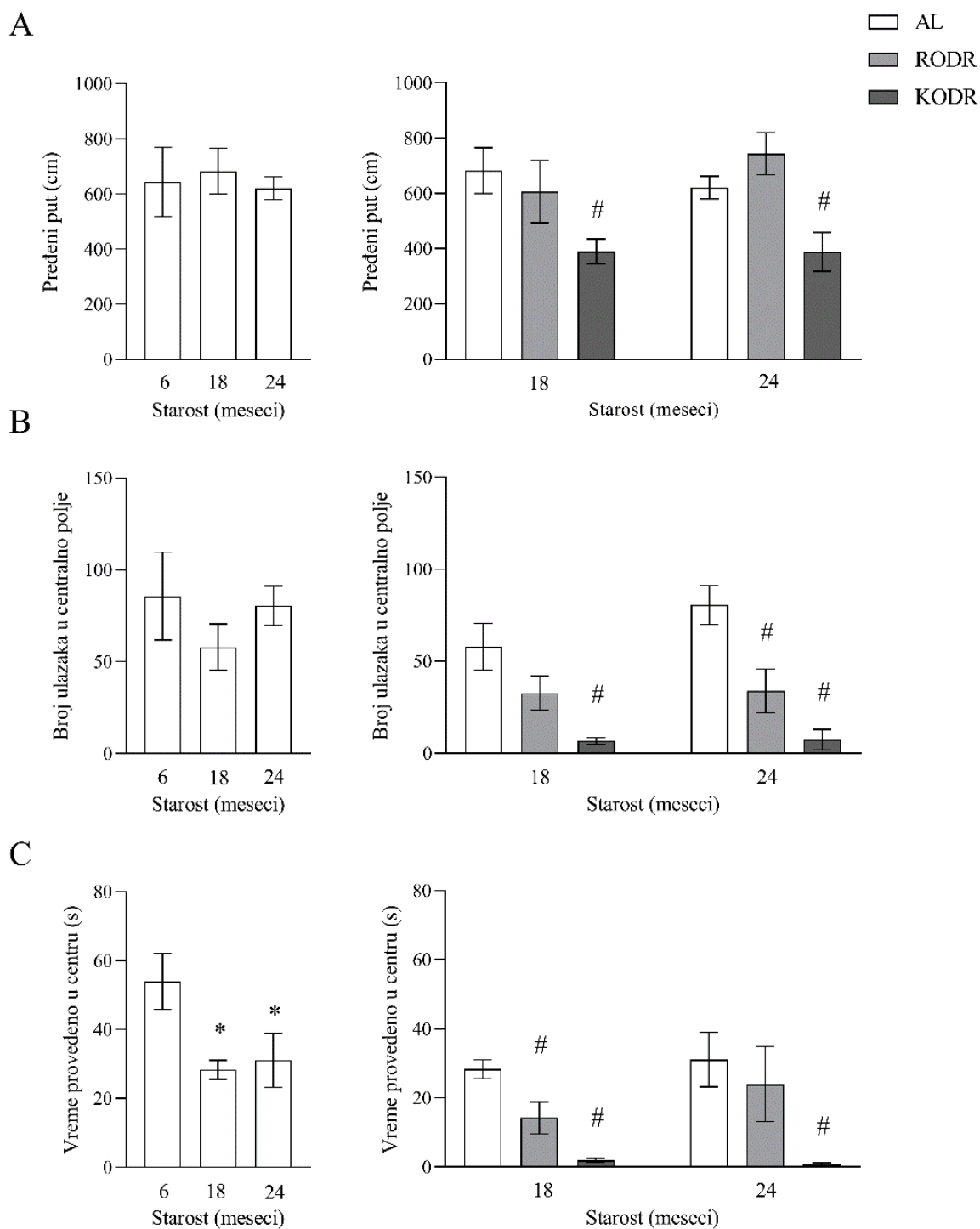
##### 4.2.4.2.1. Mužjaci

Dok se ukupni pređeni put tokom starenja nije značajno smanjivao (Slika 4.14, A, beli stubići) broj ulazaka u centralno polje, kao i vreme provedeno u centralnom polju pokazali su trend smanjivanja tokom starenja (Slika 4.14, B i C, beli stubići). Statistička analiza je pokazala da su 18, odnosno 24 meseca stari mužjaci AL grupe provodili statistički značajno manje vremena u centralnom delu arene u poređenju sa 6 meseci starim životinjama ( $F_{(2,24)} = 3,77$ ,  $p=0,0391$ , *post hoc*:  $p=0,0374$ ,  $p=0,0436$ , redom), ukazujući na porast anksioznosti sa starenjem (Slika 4.14 C, beli stubići).

Ispitivani parametri anksioznosti bili su podložni promenama pod uticajem ispitivanih režima DR, naročito kada je u pitanju KODR režim ishrane. U tački od 18 meseci starosti, oba režima ishrane dovela su do smanjenja u svakom od ispitivanih parametara u odnosu na životinje kontrolne AL grupe. Međutim, statistički značajne razlike kod 18-mesečnih mužjaka RODR grupe zabeležene su samo kada je u pitanju vreme provedeno u centru ( $F_{(2,25)} = 18,52$ ,  $p<0,0001$ ), te su ovi mužjaci provodili dvostruko manje vremena u centralnom delu u poređenju sa 18-mesečnim mužjacima AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0064$ ) (Slika 14, C, srednji panel). KODR je značajno smanjila ukupni pređeni put ( $p=0,05$ ), broj ulazaka u centralno polje ( $p=0,0033$ ) i vreme provedeno u centru u ovoj starosnoj grupi u odnosu na mužjake AL kontrolne grupe (*post hoc*:  $p<0,0001$ ) (Slika 4.14, A, B i C, srednji paneli).

Kada je reč o 24 meseca starim životinjama, efekti dugotrajne restrikcije hrane bili su uočljivi samo u jednom ispitivanom parametru, odnosno RODR je značajno smanjila samo broj ulazaka u centralno polje ( $F_{(2,20)} = 12,25$ ,  $p=0,0003$ , *post hoc*:  $p=0,0069$ ) (Slika 4.14, B, panel desno, svetlo sivi stubić). Efekti kratkotrajne DR bili su brojniji od efekata dugotrajne DR, slično situaciji uočenoj u tački od 18 meseci. Mužjaci stari 24 meseca KODR grupe imali su manju lokomotornu aktivnost ( $F_{(2,20)} = 7,426$ ,  $p=0,0039$ ), kraće vreme provedeno u centralnom delu ( $p=0,0014$ ) i manji broj ulazaka u centralni deo ( $F_{(2,20)} = 12,25$ ,  $p=0,0003$ ) u poređenju sa vršnjacima AL grupe. (Slika 4.14, A, B i C, paneli desno).

Sveobuhvatno gledano, KODR je smanjila vrednosti svih ispitivanih parametara anksioznosti iz testa otvorenog polja. Ovaj režim ishrane rezultovao je 40% manjom lokomotornom aktivnošću kod 18 i 24 meseca starih mužjaka u poređenju sa starosno odgovarajućim AL kontrolama (*post hoc*:  $p=0,0411$ ,  $p=0,0340$ , redom), smanjenjem broja ulazaka u centralni deo za 80% kod 18 meseci i 90% kod 24 meseca starih mužjaka (*post hoc*:  $p=0,0017$ ,  $p=0,0002$ , redom), kao i manjim vremenom provedenim u centralnom delu za 93% kod 18 meseci i 97% kod 24 meseca starih mužjaka (*post hoc*:  $p<0,0001$ ,  $p=0,0008$ ) implicirajući pogoršanje ponašanja nalik anksioznom kod mužjaka izloženih ovom režimu ishrane bez obzira na starost.



**Slika 4.14** Parametri anksioznosti iz testa otvorenog polja 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Spontana lokomotorna aktivnost (A), broj ulazaka u centralni deo arene testa otvorenog polja (B) i vreme provedeno u centralnom delu arene testa otvorenog polja (C) tokom 10 minuta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

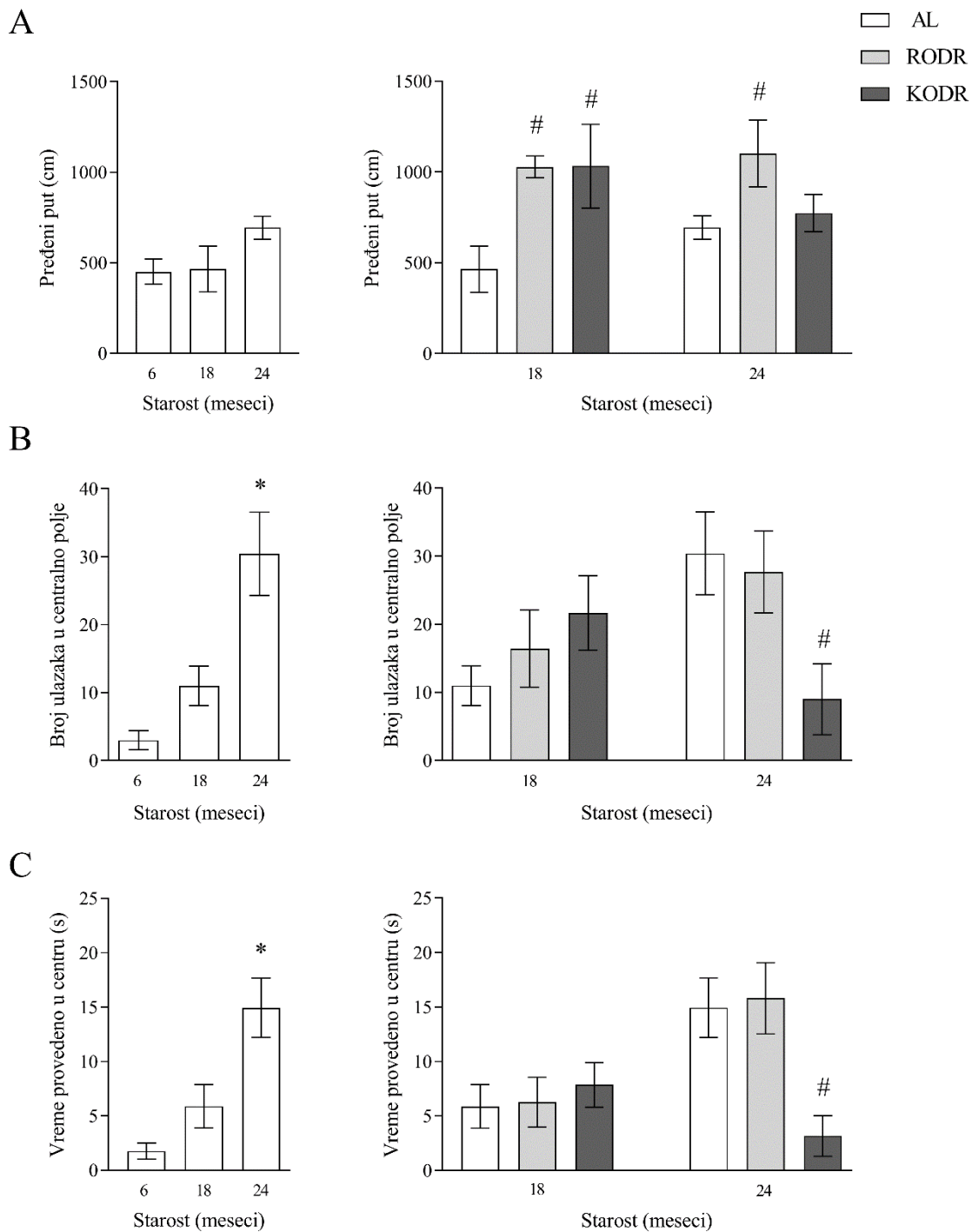
#### 4.2.4.2.2. Ženke

Analizom odgovarajućih parametara iz testa otvorenog polja uočeno je da ženke pokazuju drugačije promene tokom starenja i pod uticajem DR u odnosu na mužjake, što je naročito bilo izraženo kod najstarijih životinja. Naime, 24-mesečne ženke AL grupe imale su desetostruko veći broj ulazaka u centralni deo ( $p=0,0009$ , *post hoc*:  $p=0,0004$ ) i 8,5 puta duže vreme provedeno u istom u odnosu na 6-mesečne ženke AL grupe ( $F_{(2,21)} = 12,74$ ,  $p=0,0002$ , *post hoc*:  $p=0,0001$ ) (Slika 4.15, A, B, C, beli stubići).

Oba ispitivana DR režima su značajno povećala lokomotornu aktivnost kod 18 meseci starih ženki ( $F_{(2,15)} = 4,386$ ,  $p=0,0316$ ) (Slika 4.15, A, srednji panel) u odnosu na ženke kontrolne AL grupe iste starosti, te je za razliku od mužjaka, kod 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe došlo do povećanja lokomotorne aktivnosti za približno 120% (*post hoc*: RODR  $p=0,0401$ , KODR  $p=0,0385$ ). U preostala dva ispitivana parametra nije bilo statistički značajnih promena pod uticajem DR uprkos postojanju trenda porasta.

Ženke stare 24 meseca na RODR takođe su pokazivale povećanu lokomotornu aktivnost (Slika 4.15, A, desni panel) ( $F_{(2,17)} = 3,682$ ,  $p=0,0469$ ). KODR nije imala uticaja na lokomotornu aktivnost 24 meseca starih ženki, ali je rezultovala smanjenjem broja ulazaka ( $F_{(2,16)} = 3,907$ ,  $p=0,0415$ ) i vremena provedenog u centralnom delu u odnosu na ženke AL grupe iste starosti ( $F_{(2,17)} = 6,271$ ,  $p=0,0091$ ) (Slika 4.15, B i C, desni panel).

Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost postojanja hiperaktivnosti kod starih životinja. Kod ženki sa slobodnim pristupom hrani tokom starenja nije uočeno izraženije ponašanje nalik anksioznom, već je naprotiv uočeno da 24-mesečne ženke AL grupe imaju veći broj ulazaka i duže vreme provedeno u centru u odnosu na 6-mesečne ženke AL grupe. Primena KODR u ovoj starosnoj dobi dovela je do smanjenja broja ulazaka u centar za 70% (*post hoc*:  $p=0,0345$ ) i vremena provedenog u centru za 80% (*post hoc*:  $p=0,0124$ ), što ukazuje na viši nivo anksioznosti uzrokovan ovim režimom ishrane (Slika 4.15, B i C, desni panel).



**Slika 4.15 Parametri anksioznosti iz testa otvorenog polja 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Spontana lokomotorna aktivnost (A), broj ulazaka u centralni deo arene testa otvorenog polja (B) i vreme provedeno u centralnom delu arene testa otvorenog polja (C) tokom 10 minuta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.4.3. Ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom u testu svetlo-tamne kutije kod mužjaka i ženki

##### Wistar pacova AL i DR grupa tokom starenja

Test svetlo-tamne kutije zasnovan je na unutrašnjem konfliktu glodara koji nastaje usled urođene potrebe glodara da istražuju novi prostor i istovremene odbojnosti da borave u otvorenom, jarko osvetljenom prostoru. Kao takav, upotrebljen je za procenu ponašanja nalik anksioznom na osnovu 5 parametara: latenca, odnosno vreme kašnjenja do ulaska u tamni deo, broj izvirivanja u svetli deo, vreme zadržavanja na vratancima između svetlog i tamnog dela, broj izlazaka u svetli deo i vreme provedeno u svetlom delu.

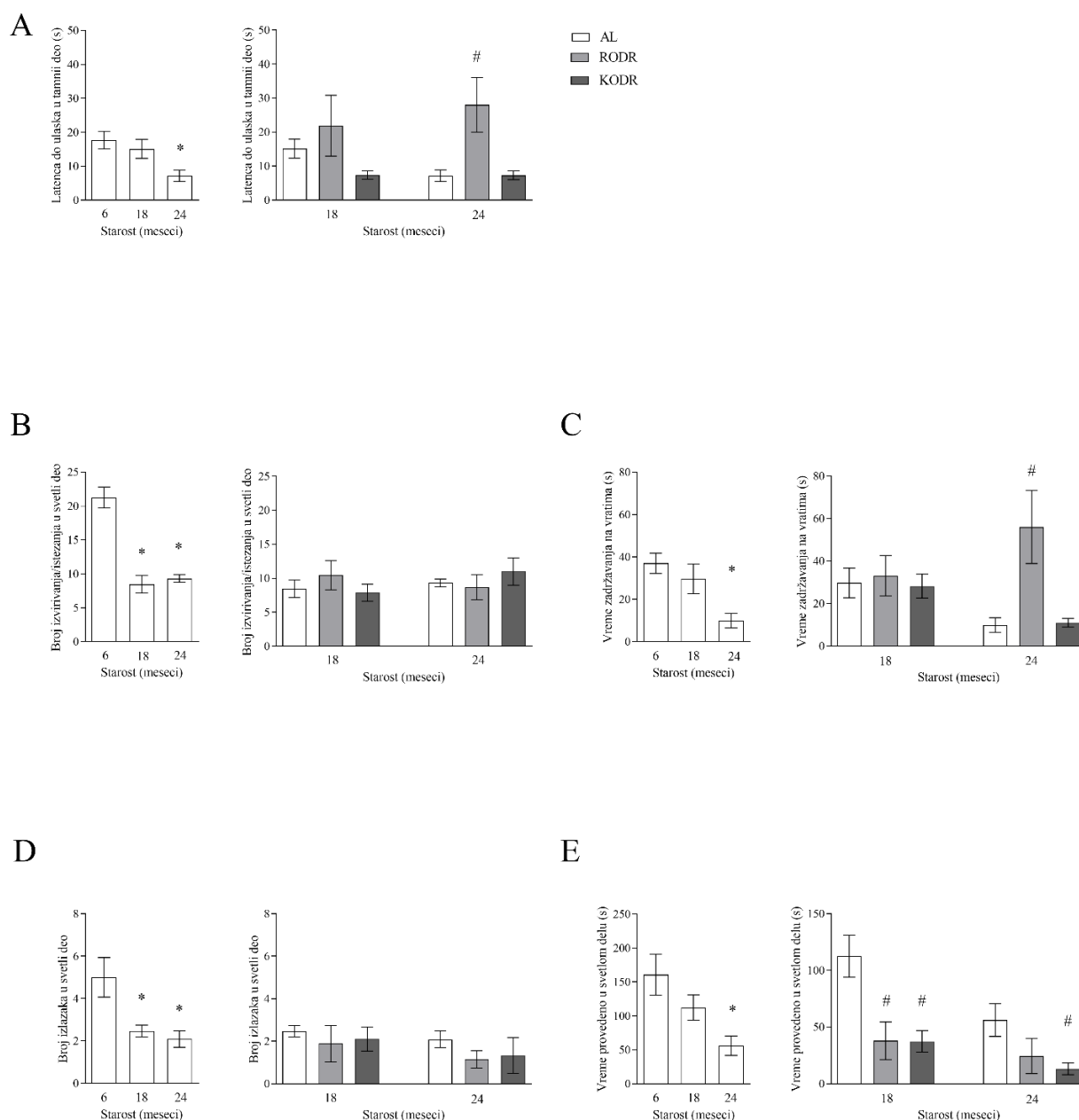
##### 4.2.4.3.1. Mužjaci

Kod mužjaka pacova koji su imali slobodni pristup hrani, starenje je dovelo do povećanja anksioznosti, što je zaključeno na osnovu razlika u svim ispitivanim parametrima između mužjaka različitih starosti AL grupa. Naime, dvostruko manji broj izvirivanja i izlazaka zabeležen je kod 18 meseci starih jedinki u odnosu na grupu 6 meseci starih mužjaka (*post hoc*:  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0421$ , redom). Još izraženije promene su detektovane u grupi 24 meseca starih mužjaka, koji su prelazili u tamni deo kutije znatno brže od 6 meseci starih ( $F_{(2, 24)} = 4,857$ ,  $p = 0,0152$ ), imali su dvostruko manji broj izvirivanja ( $F_{(2, 24)} = 32,04$ ,  $p < 0,0001$ ) i izlazaka u svetli deo ( $p = 0,0212$ ), provodili 70% manje vremena na vratima između tamnog i svetlog dela ( $F_{(2, 24)} = 7,500$ ,  $p = 0,0026$ ), i u samom svetlom delu ( $F_{(2, 24)} = 5,770$ ,  $p = 0,0090$ ) (Slika 4.16, A, B, C, D, E, beli stubići).

Analizom relevantnih parametara, moglo se zaključiti da dijetalna restrikcija nema značajnog uticaja u tački od 18 meseci. RODR je dovela do promene u samo jednom ispitivanom parametru, te su mužjaci stari 18 meseci RODR grupe provodili 65% manje vremena u svetlom delu ( $F_{(2, 24)} = 7,823$ ,  $p = 0,0023$ , *post hoc*:  $p = 0,0046$ ) u odnosu na mužjake iste starosti AL kontrolne grupe. Ovaj parametar je bio takođe i jedini koji se menjao pod uticajem KODR u 18 meseci starosti. Naime, KODR je smanjila vreme provedeno u svetlom delu kod 18 meseci starih životinja u gotovo identičnoj meri kao RODR (*post hoc*: 0,0043) (Slika 4.16, E, srednji panel).

Efekti RODR na ponašanje nalik anksioznom bili su uočljiviji kod 24 meseca starih mužjaka. Naime, 24-mesečni mužjaci RODR grupe imali su četverostruko duže vreme latence do prelaska u tamni deo ( $p = 0,0142$ , *post hoc*:  $p = 0,0124$ ) i petostruko duže vreme zadržavanja na vratima ( $p = 0,0035$ , *post hoc*:  $p = 0,0017$ ) (Slika 4.16, A i C, desni panel) u odnosu na 24-mesečne mužjake AL grupe. Kada je reč o KODR u ovoj starosnoj grupi, ona je, kao i u slučaju 18 meseci starih mužjaka, dovela do smanjenja vremena provedenog u svetlom delu u odnosu na 24-mesečne mužjake AL grupe, i to za 80% ( $p = 0,0244$ , *post hoc*:  $p = 0,0582$ ) (Slika 4.16, E, panel desno).

Uzevši u obzir parametre testa svetlo-tamne kutije, sposobnost RODR da smanji anksioznost tokom starenja bila je izražena samo kod 24 meseca starih mužjaka, dok je kod 18 meseci starih ovaj efekat izostao u većini analiziranih parametara. Nasuprot tome, smanjeno vreme boravka u svetlom delu koje je izmereno kod obe starosne grupe koje su bile izložene KODR ide u prilog podacima iz testa otvorenog polja, sugerišući povišen nivo anksioznosti kod ovih grupa životinja.



**Slika 4.16 Parametri anksioznosti iz testa svetlo-tamne kutije 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa: latenca do ulaska u svetli deo (A), broj izvirivanja/istezanja u svetli deo (B), vreme zadržavanja na vratima (C), broj izlazaka u svetli deo (D) i vreme provedeno u svetlom delu (E) tokom 10 minuta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.2.4.3.2. Ženke

Kod ženki je primenom testa svetlo-tamne kutije uočeno da se tokom starenja nivo anksioznosti menja u manjoj meri u odnosu na mužjake. Dok se u vremenskoj tački od 18 meseci nije videla značajna promena ni u jednom od ispitivanih parametara u odnosu na šestomesečne ženke kontrolne AL grupe, 24-mesečne ženke AL grupe provodile su tri puta manje vremena na vratima između

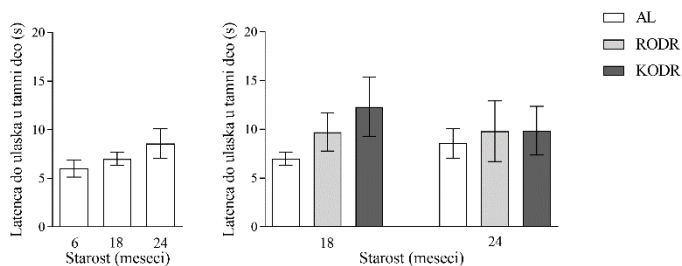
svetlog i tamnog dela ( $F_{(2,17)} = 6,201$ ,  $p=0,0095$ , *post hoc*:  $p=0,0120$ ), (Slika 4.17, C, beli stubići), iako su imale dvostruko veći broj izvirivanja ( $F_{(2,17)} = 7,440$ ,  $p=0,0048$ , *post hoc*:  $p=0,0049$ ) u poređenju sa 6-mesečnim ženka AL grupe (Slika 4.17, B, beli stubići).

Kod 18 meseci starih ženki koje su bile podvrgnute DR, značajne promene zabeležene su u vremenu zadržavanja na vratima ( $F_{(2,16)} = 5,408$ ,  $p=0,0161$ ), broju izlazaka u svetli deo ( $F_{(2,16)} = 4,234$ ,  $p=0,0334$ ) i vremenu provedenom u svetlom delu ( $F_{(2,16)} = 6,075$ ,  $p=0,0109$ ). Duga i kratka DR imale su gotovo identičan efekat kod 18 meseci starih ženki, odnosno udvostručile su vreme zadržavanja na vratima (*post hoc*:  $p=0,0117$ ,  $p=0,0464$ , redom) i broj izlazaka u svetli deo (*post hoc*:  $p=0,0346$ ,  $p=0,0305$ , redom), dok je samo KODR dvostruko produžila boravak u svetlom delu (*post hoc*:  $0,0094$ ) (Slika 4.17, C, D, E, srednji paneli).

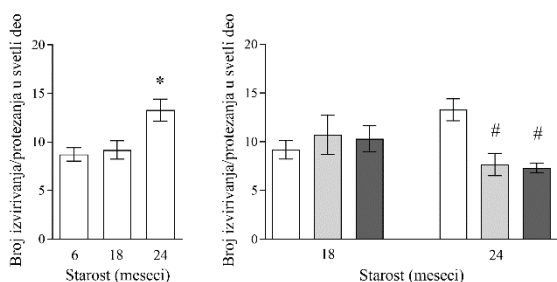
Veoma sličan efekat su izazvale duga i kratka DR i u starosnoj tački od 24 meseca, u broju izvirivanja u svetli deo ( $F_{(2,16)} = 11,85$ ,  $p=0,0007$ ) i vremenu zadržavanja na vratima ( $F_{(2,16)} = 4,460$ ,  $p=0,0289$ ). Ženke stare 24 meseca RODR i KODR grupe su se zadržavale 3,5 i 2,5 puta duže na vratima (*post hoc*:  $p=0,0205$ ,  $p=0,1035$ , redom) uprkos približno dvostruko manjem broju izvirivanja ( $p=0,0018$ ,  $p=0,0011$ , redom) u odnosu na kontrolu iste starosti (Slika 4.17, B i C, desni paneli). RODR je uticala i na broj izlazaka u svetli deo i vreme provedeno u svetlom delu kutije ( $p=0,0075$ ,  $p=0,0022$ , redom). Naime, 24 meseca stare ženke na ovom režimu DR imale su 20 puta više izlazaka u svetli deo (*post hoc*:  $p=0,0073$ ) i duže vreme provedeno u svetlom delu kutije (*post hoc*:  $p=0,0027$ ) (Slika 4.17, D, E, desni paneli).

Iako su u starosnoj tački od 18 meseci oba DR režima dovela do poboljšanja u parametrima ponašanja nalik anksioznom, kod 24 meseca starih ženki ovakav efekat uočen je samo u slučaju RODR, ukazujući na važnost trenutka otpočinjanja DR. Prema ispitivanim parametrima, ženke 18 meseci starosti uočljivije su reagovala na primenjene režime ishrane i pokazivale bolje rezultate u odnosu na ženke iste starosti AL kontrolnih grupa, dok u 24 meseca starosti primena KODR nije dovela do promene u većini ispitivanih parametara, slično situaciji detektovanoj kod mužjaka.

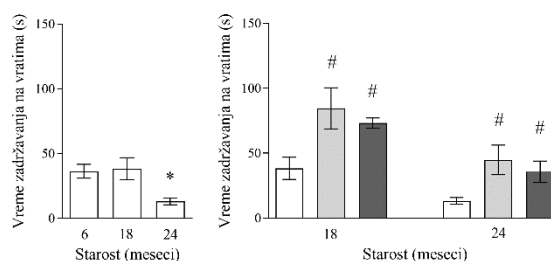
A



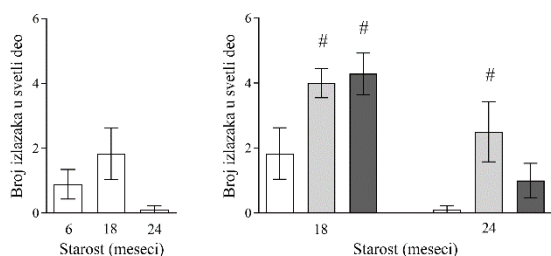
B



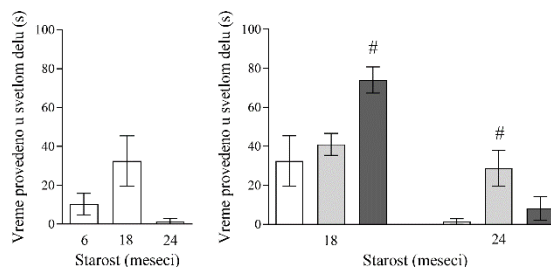
C



D



E



**Slika 4.17 Parametri anksioznosti iz testa svetlo-tamne kutije 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa: latencija do ulaska u svetli deo (A), broj izvirivanja/istezanja u svetli deo (B), vreme zadržavanja na vratima (C), broj izlazaka u svetli deo (D) i vreme provedeno u svetlom delu (E) tokom 10 minuta. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija



### **4.3. Molekularne promene u mozgu mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja**

#### 4.3.1. Ekspresija gena za D1 i D2 receptore kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

Kako je dopaminski sistem jedan od najvažnijih neurotransmiterskih sistema u regulaciji ponašanja nalik anksioznom, ispitana je ekspresija D1 (D1R) i D2 (D2R) dopaminskog receptora na translacionom i transkripcionom nivou u kori velikog mozga, strijatumu i srednjem mozgu, strukturama koje su bogate ovim receptorima i istovremeno uključene u regulaciju motorike i anksioznosti (Carr, 2002; Kenneth D. Carr, 2007; Gallardo i sar., 2014).

##### *4.3.1.1. Ekspresija gena za dopaminske D1 i D2 receptore na nivou iRNK kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja*

###### 4.3.1.1.1. Mužjaci

Fiziološko starenje dovelo je do regionalno-specifičnog odgovora u ekspresiji iRNK za dopaminske receptore. Naime, dok se u kori velikog mozga nivo iRNK za D1R trostruko uvećao kod 24 meseca starih u odnosu na 6 meseci stare mužjake (Slika 4.18, A, beli stubići) u strijatumu i srednjem mozgu nije došlo do promena tokom starenja (Slika 4.18, B i C, beli stubići).

Nasuprot tome, povećan nivo iRNK za D2R bio je detektovan u obe posmatrane starosne tačke (18 i 24 meseca) u kori velikog mozga i srednjem mozgu (Slika 4.18, D i F, beli stubići), dok je u strijatumu povećanje zabeleženo samo u 24 meseca staroj grupi (Slika 4.18, E, beli stubići).

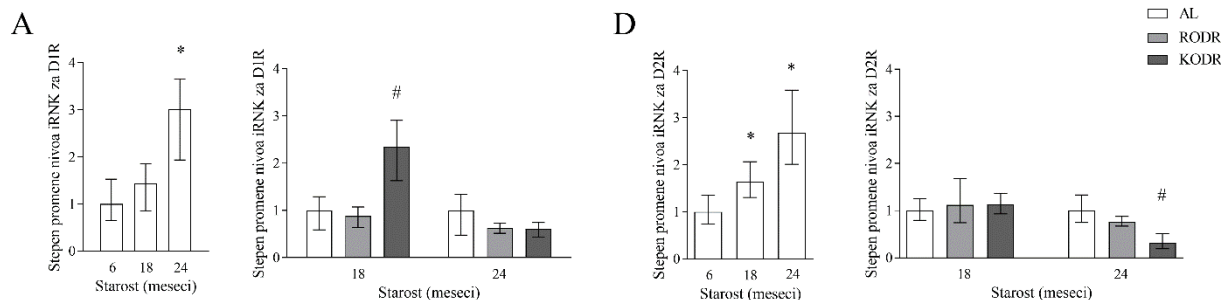
Jedini efekat RODR bilo je smanjenje nivoa iRNK za D1R i D2R u srednjem mozgu 18 meseci starih mužjaka za 70% i 50%, redom (Slika 4.18, C i F, srednji paneli). Sa druge strane, u ovoj starosnoj grupi, KODR je dovela do trenda povećanja ekspresije iRNK za D1R u svim ispitivanim strukturama, iako je statistički značajno povećanje zabeleženo jedino u kori velikog mozga za 130% i srednjem mozgu za 60% kod 18 meseci starih mužjaka (Slika 4.18, A, C, srednji paneli).

Do promena u ekspresiji iRNK za D1R nije došlo ni u jednoj od ispitivanih moždanih struktura kada su u pitanju 24 meseca stari mužjaci koji su bili izloženi režimima DR.

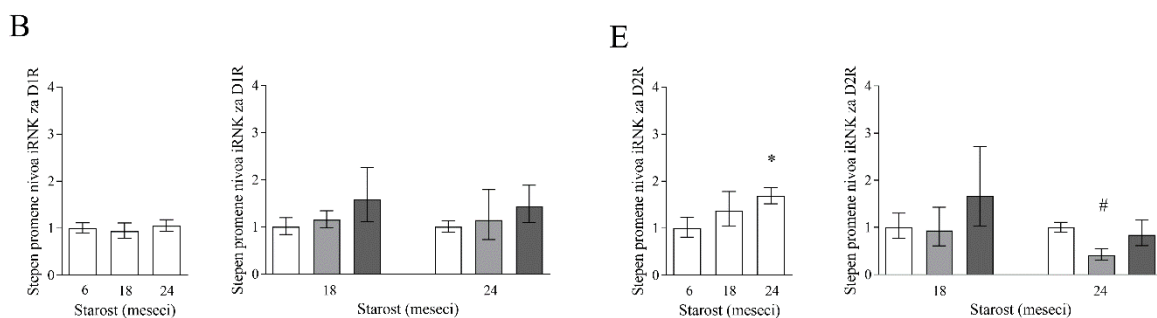
Kada je reč o D2R, RODR je generalno dovodila do smanjenja nivoa iRNK u poređenju sa 24 meseca starim mužjacima AL grupe, ali je statistički značajna promena uočena samo u strijatumu mužjaka iste starosti RODR grupe, gde je izmeren dvostruko manji nivo iRNK za D2R u odnosu na mužjake 24m AL grupe (Slika 4.18, E, panel desno).

KODR je dovela do statistički značajnih promena samo u kori velikog mozga 24 meseca starih mužjaka, kod kojih je nivo iRNK za D2R bio trostruko manji u odnosu na mužjake 24m AL grupe (Slika 4.18, D, grafik desno).

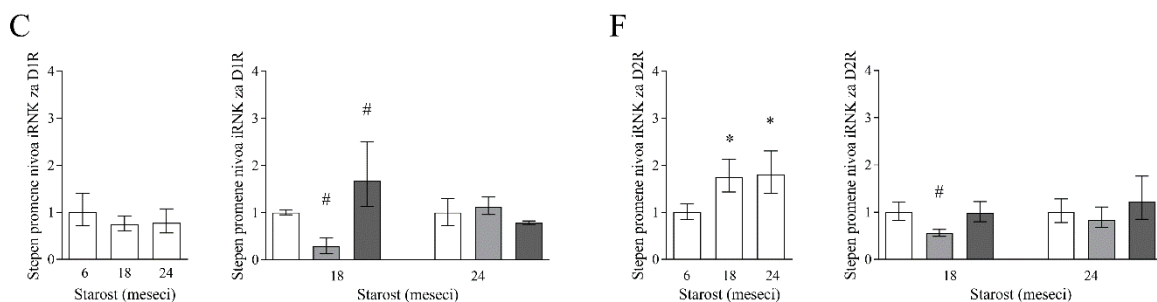
## KORA VELIKOG MOZGA



## STRIJATUM



## SREDNJI MOZAK



**Slika 4.18** Nivo iRNAK za D1R i D2R u kori velikog mozga (A, D), strijatumu (B, E) i srednjem mozgu (C, F) 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

### 4.3.1.1.2. Ženke

Iako je tokom starenja kod ženki sa slobodnim pristupom hrani uočen drugačiji trend promena u nivou ekspresije iRNAK za D1 i D2 receptore u odnosu na mužjake, promene do kojih je dovođila DR bile su donekle slične, naročito kod 18 meseci starih mužjaka i ženki izloženih KODR. U tački od 24 meseca starosti, DR je pak izazivala znatno veći broj promena kod ženki, no kod mužjaka.

Tokom fiziološkog starenja došlo je do smanjenja nivoa iRNK za D1R u kori velikog mozga i srednjem mozgu. Ženke stare 18 i 24 meseca AL grupe imale su smanjen nivo iRNK za D1R za 20% i 30%, redom, u kori velikog mozga i 45% i 30%, redom, u srednjem mozgu u odnosu na šestomesečne ženke AL grupe (Slika 4.19, A, C, beli stubići). U strijatumu je pak došlo do povećanja ekspresije tokom starenja, te je kod 18-mesečnih ženki AL grupe u ovoj strukturi izmereno povećanje ekspresije gena za D1R na nivou iRNK od 40% u odnosu na 6-mesečne ženke AL grupe (Slika 4.19, B, beli stubići). Slična promena u strijatumu je detektovana i kada je u pitanju iRNK za D2R, gde je nakon povećanja od 30% izmerenog u 18. mesecu, u 24. mesecu detektovano smanjenje od 20% u odnosu na ženke stare 6 meseci AL grupe (Slika 4.19, E, beli stubići). Povišen nivo iRNK za D2R tokom starenja detektovan je i u srednjem mozgu, gde je kod 18 i 24 meseca starih ženki izmereno povećanje od 10% i 30%, redom (Slika 4.19, F, beli stubići).

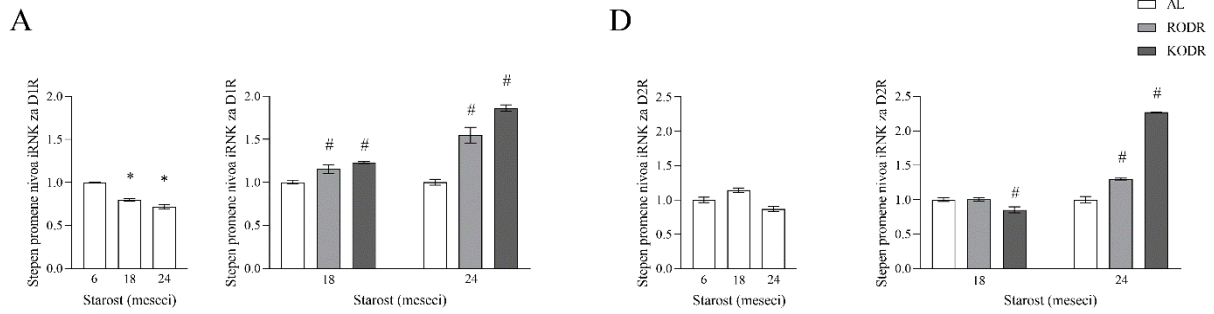
Kod 18 meseci starih ženki nivo iRNK za D1R bio je izmenjen pod uticajem RODR i KODR u kori velikog mozga, strijatumu i srednjem mozgu (Slika 4.19, A, B, C, srednji paneli). Dok je u kori velikog mozga ženki 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe nivo ekspresije iRNK za D1R bio povišen za 15% i 20%, redom, u odnosu na vršnjakinje AL grupe, u preostale dve strukture povišen nivo je zabeležen samo kod ženki KODR grupe. Naime, u strijatumu 18-mesečnih ženki KODR grupe nivo ekspresije iRNK za D1R bio je 12% veći, a u srednjem mozgu 35% veći u odnosu na ženke AL kontrolne grupe iste starosti, dok je u strijatumu RODR indukovala smanjenje iRNK za D1R u odnosu na 18-mesečne ženke AL grupe.

Nivo iRNK za D2R bio je smanjen u kori velikog mozga 18-mesečnih ženki KODR grupe, dok je u srednjem mozgu izmeren porast od 20% pod uticajem oba primenjena režima ishrane (Slika 4.19, D, F, srednji paneli).

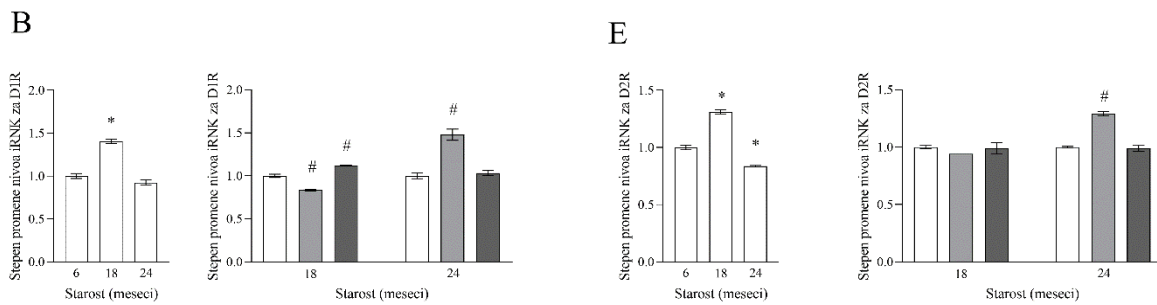
Kod 24 meseca starih jedinki nivo iRNK za D1 receptor je bio izmenjen pod uticajem DR u kori velikog mozga, strijatumu i srednjem mozgu (Slika 4.19, A, B, C, paneli desno). Oba režima DR su povećavala ekspresiju iRNK za D1R u kori velikog mozga, dok je u strijatumu ovaj efekat postignut samo pod uticajem RODR. U srednjem mozgu su KODR i RODR imale suprotne efekte, odnosno RODR je dovela do povećanja ekspresije iRNK za D1R za 30%, slično efektu koji je imala u ostalim strukturama, dok je KODR smanjila nivo iRNK za ovaj receptor za oko 15%.

Nivo iRNK za D2 receptor je bio povećan u svim ispitivanim strukturama 24 meseca starih ženki pod uticajem DR (Slika 4.19, D, E, F, paneli desno). U kori velikog mozga i srednjem mozgu oba DR režima su dovela do povećanja, dok je u strijatumu efekat bio prisutan samo u slučaju RODR. U poređenju sa 24-mesečnim ženkama AL grupe, vršnjakinje RODR grupe imale su oko 30% veću ekspresiju iRNK za D2R u sve tri ispitivane moždane strukture, dok je KODR rezultovala povećanjem od 130% u kori velikog mozga, i svega 6% u srednjem mozgu.

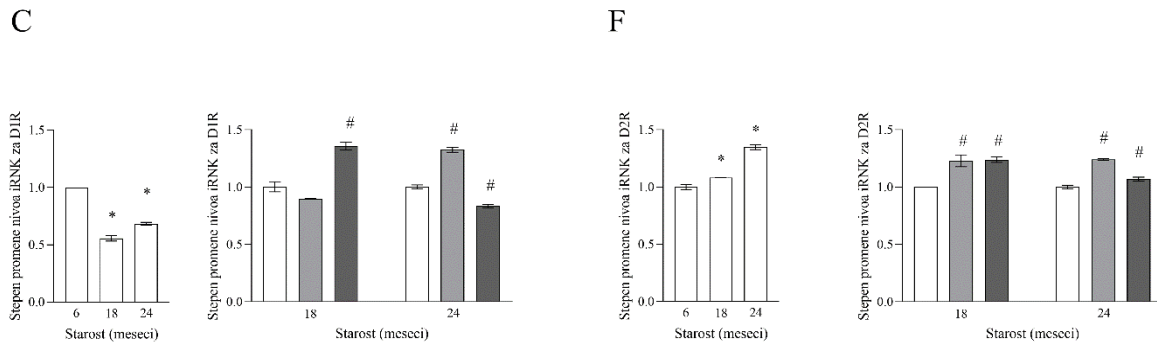
## KORA VELIKOG MOZGA



## STRIJATUM



## SREDNJI MOZAK



**Slika 4.19** Nivo iRNK za D1R i D2R u kori velikog mozga (A, D), strijatumu (B, E) i srednjem mozgu (C, F) 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.3.1.2. Ekspresija gena za dopaminske receptore D1 i D2 na nivou proteina kod mužjaka i ženki Wistar pacova AL i DR grupa tokom starenja

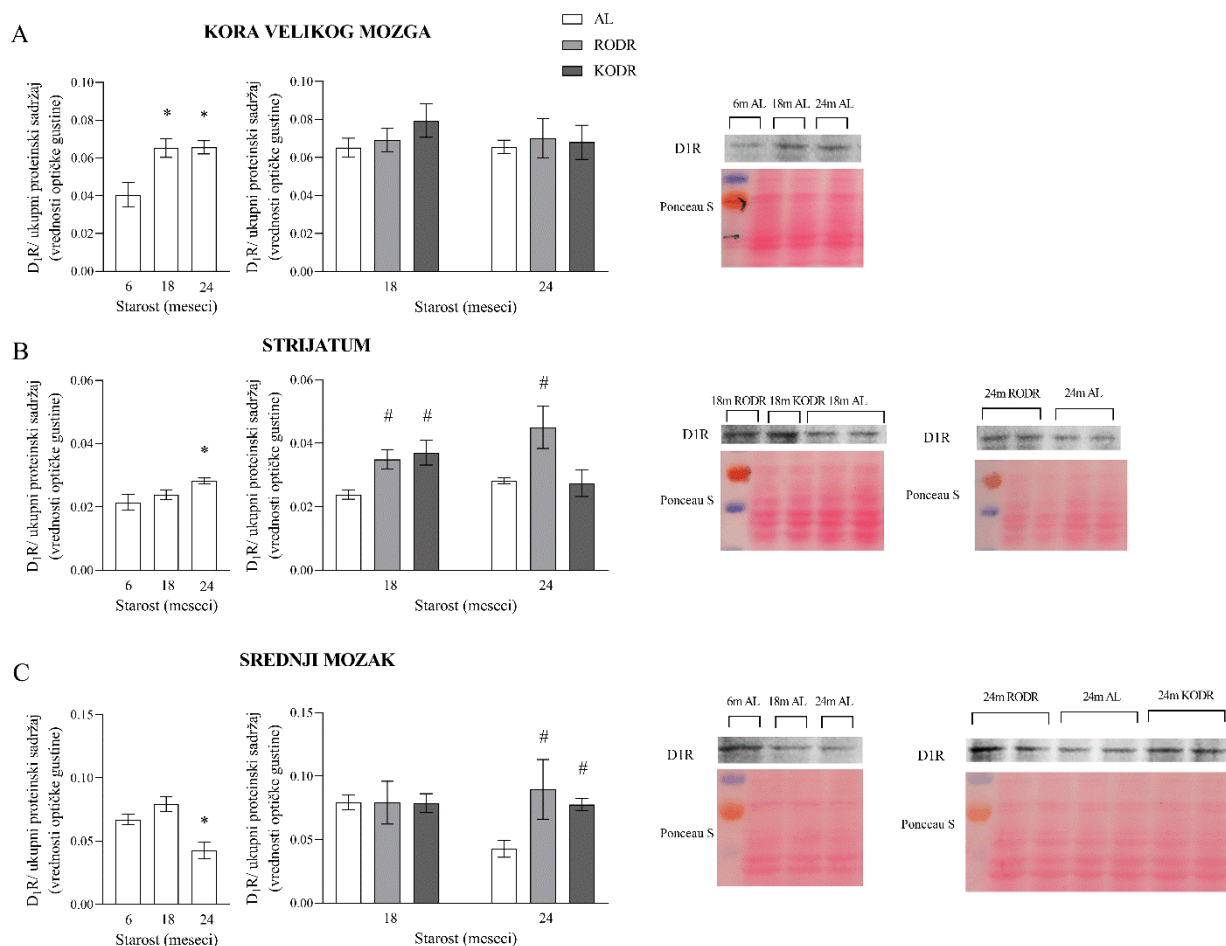
##### 4.3.1.2.1. Mužjaci

Povišen nivo iRNK za D1 i D2 receptore, detektovan u kori velikog mozga mužjaka AL grupa tokom starenja, pratila je i povećana proteinska ekspresija ovih receptora.

U odnosu na 24-mesečne mužjake AL grupe, nivo D1R bio je povišen za 50% u kori velikog mozga 18-mesečnih i 24-mesečnih mužjaka AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 7,863$ ,  $p=0,0106$ , *post hoc*:  $p=0,0143$ ,  $p=0,0130$ , redom) (Slika 4.20, A, beli stubići). Sličan trend je detektovan i u strijatumu tokom starenja, međutim, statistički značajno povećanje proteinske ekspresije D1R potvrđeno je samo kod 24 meseca starih mužjaka AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 10,69$ ,  $p=0,0002$ , *post hoc*:  $p=0,0012$  (Slika 4.20, B, beli stubići). Nasuprot promenama u ove dve moždane strukture, u srednjem mozgu detektovan je pad nivoa ekspresije D1R od 40% kod 24 meseca starih mužjaka AL grupe u odnosu na slobodno hranjene šestomesečne mužjake ( $F_{(2, 12)} = 13,65$ ,  $p=0,0008$ , *post hoc*:  $p=0,004$ ). (Slika 4.20, C, beli stubići).

Kod 18 meseci starih mužjaka, nivo proteinske ekspresije D1R u kori velikog mozga i srednjem mozgu nije se značajno menjao sa promenom dijetalnog režima, dok su u strijatumu RODR i KODR dovele do gotovo identičnih promena. Naime, u strijatumu 18-mesečnih mužjaka RODR i KODR grupe izmereno je povećanje proteinske ekspresije D1R od 50% u odnosu na vrednosti kontrolne AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 5,517$ ,  $p=0,0135$ , *post hoc*:  $p=0,0209$ ,  $p=0,0180$ , redom) (Slika 4.20, B, srednji panel).

U odnosu na 24-mesečne mužjake AL grupe, njihovi vršnjaci RODR grupe imali su 60% veći nivo ekspresije D1R u strijatumu ( $p=0,0395$ , *post hoc*:  $p=0,0480$ ) i 100% veći nivo ekspresije u srednjem mozgu ( $p=0,0143$ , *post hoc*:  $p=0,0497$ ), (Slika 4.20, B, C, paneli desno). Povećanje ekspresije D1R detektovano je i u srednjem mozgu 24-mesečnih mužjaka KODR grupe, gde je izmeren 80% viši nivo ekspresije u odnosu na mužjake odgovarajuće AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0316$ ) (Slika 4.20, C, panel desno). Ekspresija D1R se nije značajno menjala u kori velikog mozga mužjaka DR grupa (Slika 4.20, A).



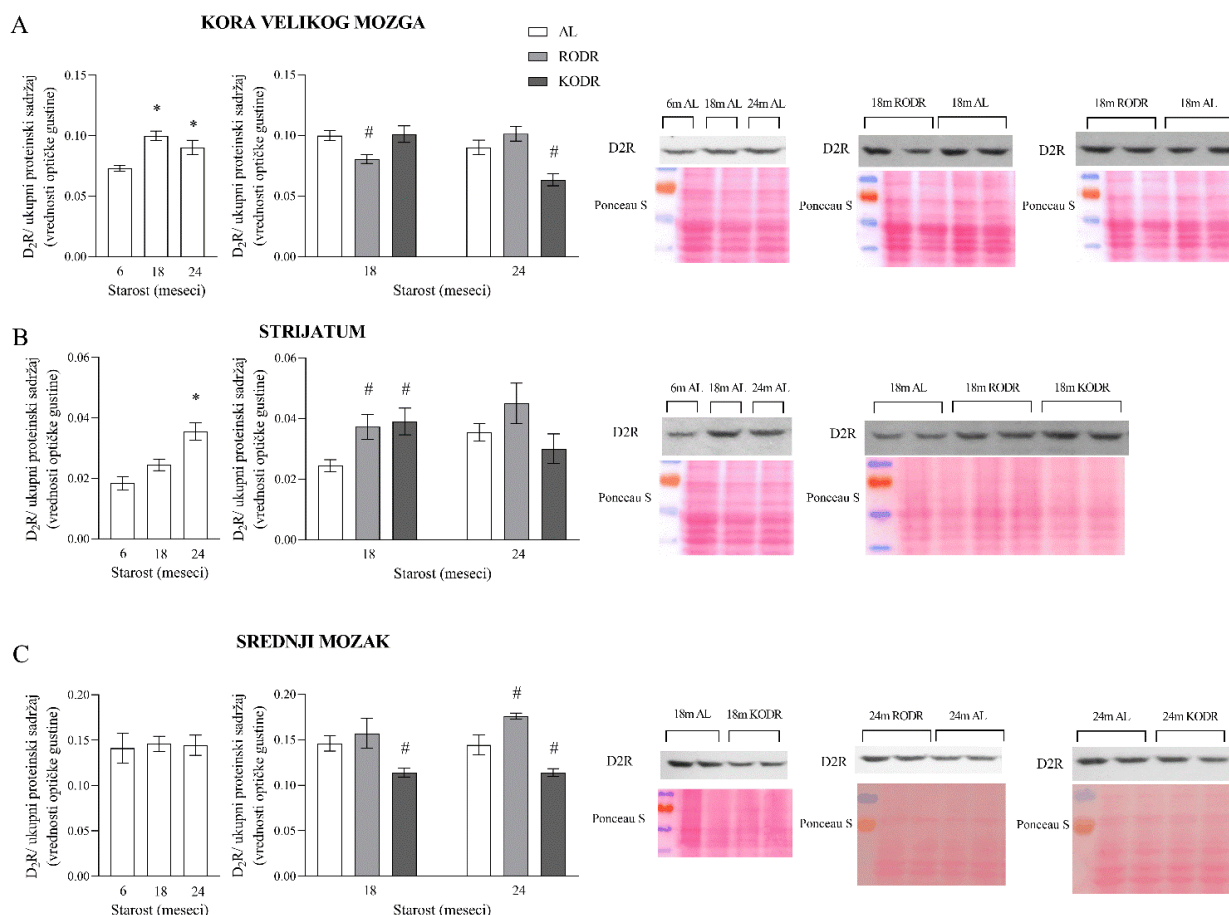
**Slika 4.20** Ekspresija gena za D1R na nivou proteina u kori velikog mozga (A), strijatumu (B) i srednjem mozgu (C) 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

Ekspresija D2R je u kori velikog mozga 18-mesečnih i 24-mesečnih mužjaka AL grupe bila povišena za približno 40% ( $F_{(2, 12)} = 9,802$ ,  $p = 0,0055$ , *post hoc*:  $p = 0,0033$ ,  $p = 0,0364$ , redom) (Slika 4.21, A, beli stubići). U strijatumu je, kao i u slučaju D1R statistički značajno povećanje uočeno samo kod 24 meseca starih mužjaka AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 10,71$ ,  $p = 0,0018$ , *post hoc*:  $p = 0,0009$ ), (Slika 4.21, B, beli stubići), dok u srednjem mozgu nije došlo do promene ekspresije D2R tokom starenja (Slika 4.21, C, beli stubići).

Ekspresija D2R u strijatumu 18 meseci starih mužjaka pod uticajem RODR i KODR se menjala na isti način kao i D1R, odnosno kod ovih grupa su izmerene 50% veće vrednosti od kontrolnih ( $F_{(2, 12)} = 4,475$ ,  $p = 0,0353$ , *post hoc*:  $p = 0,0459$ ,  $p = 0,0409$ , redom) (Slika 4.21, B, srednji panel). U slučaju D2 receptora, a za razliku od D1, značajne promene u ekspresiji su detektovane i u kori velikog mozga kod 18-mesečnih mužjaka RODR grupe, ( $F_{(2, 12)} = 6,109$ ,  $p = 0,0211$ , *post hoc*:  $p = 0,0313$ ), i u srednjem mozgu mužjaka iste starosti KODR grupe ( $p = 0,0135$ , *post hoc*:  $p = 0,0313$ ). U oba slučaja smanjenje ekspresije je iznosilo oko 20% (Slika 4.21, A, C, srednji paneli).

Nasuprot odsustvu značajnih promena ekspresije D1R u kori velikog mozga 24 meseca starih mužjaka, ekspresija D2R je značajno varirala u ovom regionu pod uticajem smanjenog unosa hrane. 30% niži nivo ekspresije D2R je izmeren kod mužjaka KODR grupe u odnosu na mužjake AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 12,14$ ,  $p=0,0028$ , *post hoc*:  $p=0,0145$ ) (Slika 4.21, A, panel desno). U srednjem mozgu 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR su postigle suprotne efekte: RODR je povećavala za 20%, a KODR smanjivala za 20% ekspresiju D2R ( $F_{(2, 10)} = 21,70$ ,  $p=0,0002$ , *post hoc*:  $p=0,0177$ ,  $p=0,0165$ , redom) (Slika 4.21, C, panel desno). U strijatumu 24 meseca starih mužjaka DR grupa, nisu detektovane značajne promene na nivou D2R (Slika 4.21, B, panel desno).



**Slika 4.21 Ekspresija gena za D2R na nivou proteina u kori velikog mozga (A), strijatumu (B) i srednjem mozgu (C) 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

#### 4.3.1.2.2. Ženke

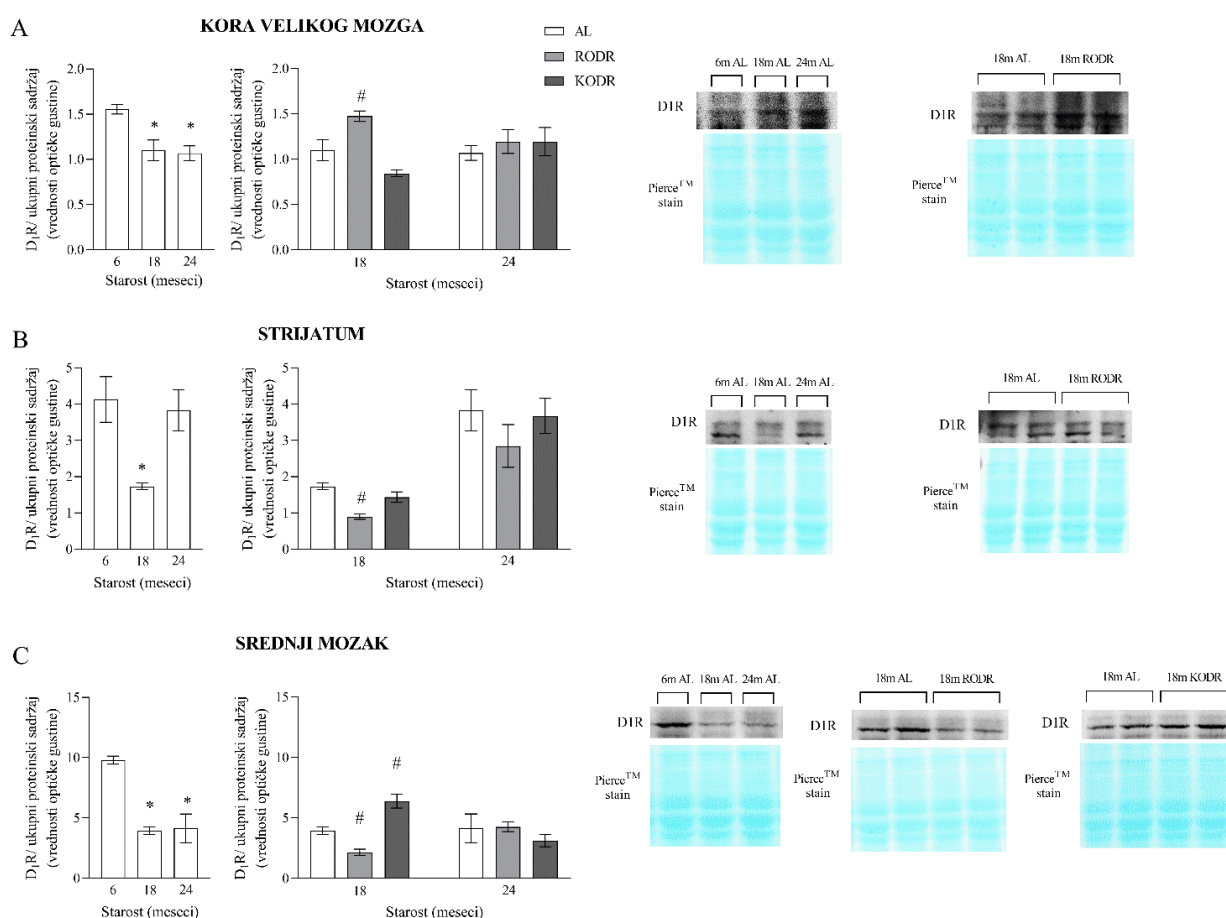
Kod ženki su promene ekspresije gena za oba dopaminska receptora na nivou proteina izraženije korelisale sa promenama ekspresije na nivou iRNK, nego što je to bio slučaj kod mužjaka.

Ekspresija D1R se smanjivala tokom starenja u kori velikog mozga ( $F_{(2, 12)} = 9,882$ ,  $p=0,0029$ ), strijatumu ( $F_{(2, 12)} = 7,132$ ,  $p=0,0091$ ) i srednjem mozgu ženki sa slobodnim pristupom

hrani ( $F_{(2, 12)} = 20,25$ ,  $p=0,0001$ ). Kod 18-mesečnih i 24-mesečnih ženki AL grupe ekspresija D1R je bila 30% niža u kori velikog mozga (*post hoc*:  $p=0,0055$ ,  $p=0,0035$ , redom) i 60% niža u srednjem mozgu (*post hoc*:  $p=0,0002$ ,  $p=0,0003$ , redom), dok je u strijatumu 18-mesečnih ženki bila 60% niža (*post hoc*:  $p=0,0087$ ) (Slika 4.22, A, B, C, beli stubići) u poređenju sa 6-mesečnim *Ad libitum* hranjenim kontrolama.

Kod 18 meseci starih ženki, ekspresija D1R se najviše menjala pod uticajem RODR: u kori velikog mozga bila je povećana za 30% ( $F_{(2, 12)} = 16,72$ ,  $p=0,0003$ , *post hoc*:  $p=0,0096$ ) (Slika 4.22, A, srednji panel), a u strijatumu i srednjem mozgu smanjena za 50% ( $F_{(2, 12)} = 15,50$ ,  $p=0,0005$  *post hoc*:  $p=0,0003$ ) ( $F_{(2, 12)} = 27,45$ ,  $p<0,0001$ , *post hoc*:  $p=0,0165$ ) (Slika 4.22, B, C, srednji paneli). Efekat KODR je detektovan samo u srednjem mozgu, gde je kod 18-mesečnih ženki izmereno povećanje od 60% u odnosu na ženke iste starosne grupe sa slobodnim pristupom hrani (*post hoc*:  $p=0,0021$ ) (Slika 4.22, C, srednji panel).

Nivo ekspresije D1R nije se menjao ni u jednoj od ispitivanih moždanih struktura ženki starih 24 meseca DR grupa (Slika 4.22, A, B, C, paneli desno).



**Slika 4.22 Ekspresija gena za D1R na nivou proteina u kori velikog mozga (A), strijatumu (B) i srednjem mozgu (C) 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

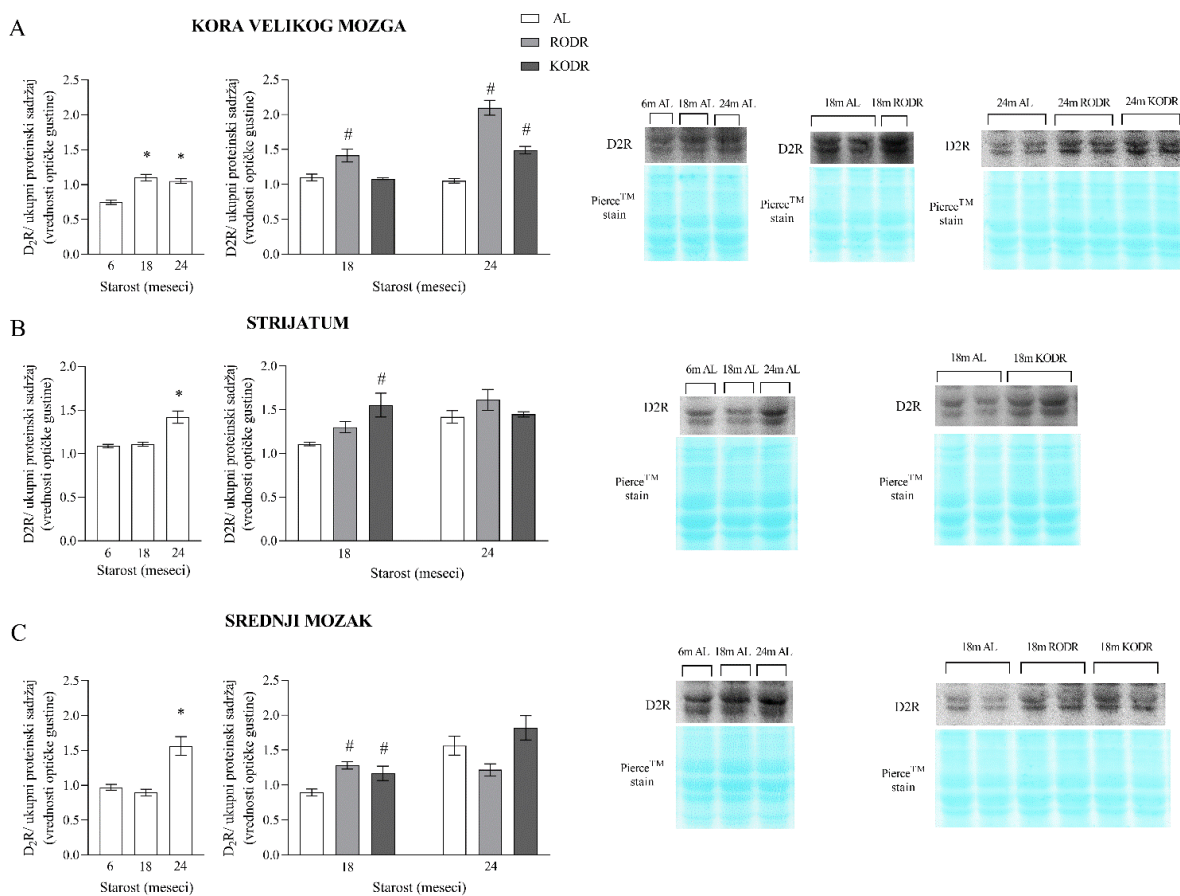
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija



Uočeno je da se ekspresija D1 i D2 receptora menjala na različite načine tokom starenja: nasuprot promenama u ekspresiji D1R, ekspresija D2R se generalno povećavala tokom starenja pri slobodnom pristupu hrani. Povećanje od 50% je izmereno u kori velikog mozga 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa ( $F_{(2, 12)} = 26,67$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*:  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0002$ , redom) (Slika 4.23, A, beli stubići). U strijatumu i srednjem mozgu, statistički značajno povećanje je detektovano u tački od 24 meseca i iznosilo je 30% u strijatumu ( $F_{(2, 12)} = 17,54$ ,  $p = 0,0003$ , *post hoc*:  $p = 0,0004$ ) i 60% u srednjem mozgu ( $F_{(2, 12)} = 18,39$ ,  $p = 0,0002$ , *post hoc*:  $p = 0,0007$ ) (Slika 4.23, B, C, beli stubići).

Kod 18 meseci starih ženki, ekspresija D2R bila je podložnija promenama uslovljenim režimima ishrane. Kod 18-mesečnih ženki RODR grupe izmerena je 30% veća ekspresija ovog dopaminskog receptora u kori velikog mozga ( $F_{(2, 12)} = 9,300$ ,  $p = 0,0036$ , *post hoc*:  $p = 0,0065$ ) i srednjem mozgu ( $F_{(2, 12)} = 7,521$ ,  $p = 0,0076$ , *post hoc*:  $p = 0,0050$ ) (Slika 4.23, A, C, srednji paneli). Povećanje ekspresije D2R je uočeno i kod 18-mesečnih ženki KODR grupe i to za 40% u strijatumu ( $F_{(2, 12)} = 6,321$ ,  $p = 0,0133$ , *post hoc*:  $p = 0,0075$ ) i 30% u srednjem mozgu (*post hoc*:  $p = 0,0368$ ), (Slika 4.23, B, C, srednji panel).

Dok kod 24 meseca starih ženki nisu detektovane promene ekspresije D1R pod uticajem DR, do značajnih promena u ekspresiji D2R došlo je u kori velikog mozga pod uticajem oba ispitivana režima ishrane ( $F_{(2, 12)} = 53,69$ ,  $p < 0,0001$ ). RODR je udvostručila ekspresiju D2R (*post hoc*:  $p < 0,0001$ ), dok je KODR rezultovala povećanjem ekspresije od 40% (*post hoc*:  $p = 0,0019$ ) (Slika 4.23, A, panel desno).



**Slika 4.23 Ekspresija gena za D2R na nivou proteina u kori velikog mozga (A), strijatumu (B) i srednjem mozgu (C) 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za**

efekat starenja, #p <0,05 za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija

4.3.2. Promene u ekspresiji i fosforilaciji određenih molekula mTOR signalnog puta u kori velikog mozga i hipokampusu mužjaka i ženki *Wistar* pacova AL i DR grupa tokom starenja

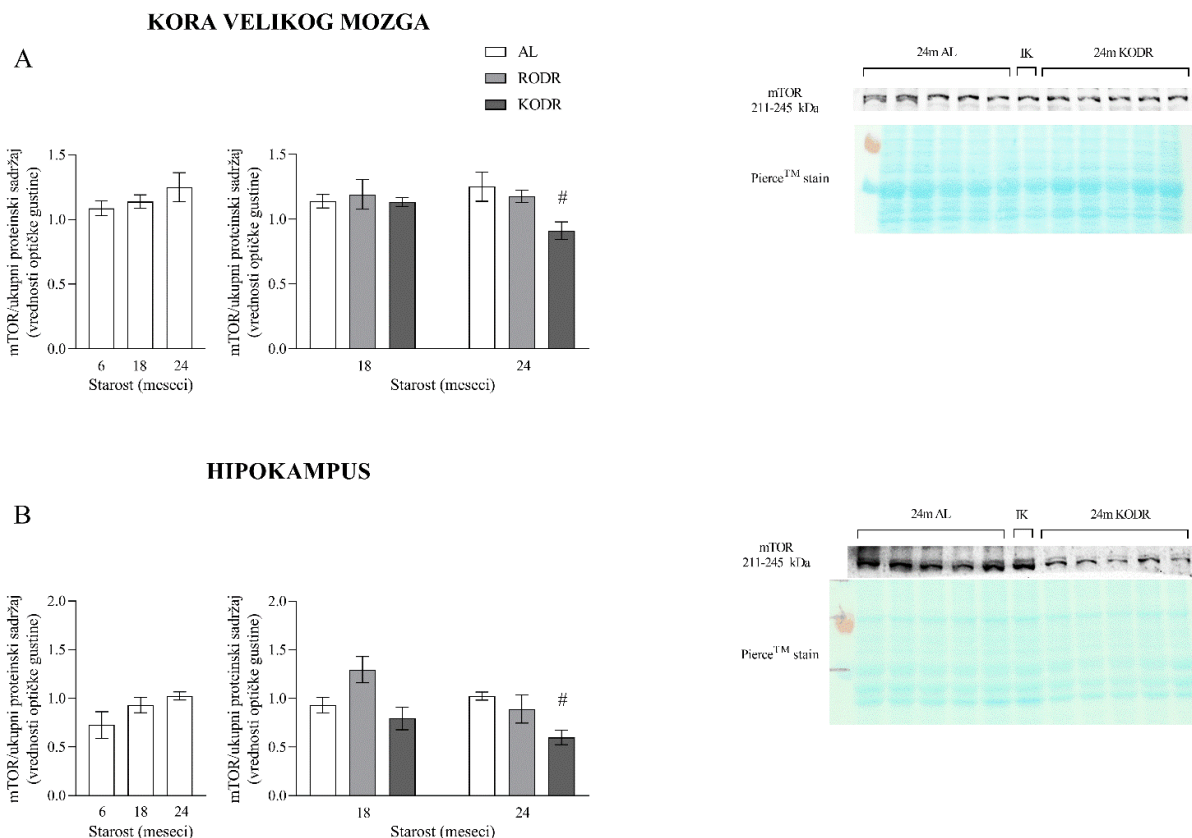
mTOR sa drugim proteinima gradi proteinske komplekse mTORC1 i mTORC2, uključene u prijem nutritivnih signala i regulaciju energetskeg metabolizma ćelije. mTORC1 je važan regulator sinaptičke plastičnosti, memorije i kognicije, dok je mTORC2 odgovoran za preživljavanje neurona, stoga oba kompleksa imaju važnu ulogu u odgovoru na stres i održavanju normalne kognitivne funkcije. Komunikacija između ova dva kompleksa odgovorna je za koordinisani odgovor ćelije na nutritivne i sredinske stimuluse.

mTOR je kinaza čija je aktivnost regulisana fosforilacijom aminokiselinskih ostataka na više mesta, karakterističnih za svaki od kompleksa. Na osnovu promena u fosforilaciji može se zaključivati i o promenama u aktivaciji mTOR kompleksa. Ovo svojstvo iskorišćeno je za ispitivanje efekta starenja i DR na aktivaciju mTOR kompleksa 1 i 2, i posledično aktivaciju nishodnih kinaza u kori velikog mozga i hipokampusu. Efekat starenja i različitih režima DR na određene molekule mTOR signalnog puta u kori velikog mozga i hipokampusu praćen je merenjem ekspresije sledećih proteina:

- ukupni mTOR,
- mTOR fosforilisan na poziciji Ser2448, koji se vezuje prevashodno za aktivnost mTORC1, procenjena na osnovu odnosa fosforilisanog i ukupnog mTOR,
- mTOR fosforilisan na poziciji Ser2481, koji se vezuje prevashodno za aktivnost mTORC2 procenjena na osnovu odnosa fosforilisanog i ukupnog mTOR
- ukupna Akt,
- Akt fosforilisana na poziciji Thr308 čija aktivacija prethodi aktivaciji mTORC1, a procenjuje se na osnovu odnosa fosforilisane i ukupne Akt,
- Akt fosforilisana na poziciji Ser473 čija je aktivaciona fosforilacija pretežno posledica aktivacije mTORC2, a procenjuje se na osnovu odnosa fosforilisane i ukupne Akt,
- ukupni p70 S6K i
- fosforilisani oblik p70 S6K na poziciji Ser434 (fosfo p70 S6K/ ukupni p70 S6K) čija se fosforilacija dešava nakon aktivacione fosforilacije na poziciji Thr389 od strane mTORC1 i odraz je stabilne aktive forme p70 S6K, na osnovu odnosa fosforilisane i ukupne p70 S6K

#### 4.3.2.1. Mužjaci

Ekspresija mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu nije se značajno razlikovala među ispitivanim grupama životinja, odnosno nije bila podložna promenama pod uticajem starenja i različitih dijetalnih režima. Jedina uočena promena u ekspresiji ukupnog mTOR zabeležena je u kori velikog mozga ( $F_{(2, 12)} = 4,874$ ,  $p=0,0282$ ) i hipokampusu ( $F_{(2, 12)} = 4,974$ ,  $p=0,0267$ ) 24 meseca starih mužjaka KODR grupe. Naime, KODR uvedena u kasnom periodu života rezultovala je smanjenom ekspresijom mTOR na nivou proteina za 30% u kori velikog mozga i 40% u hipokampusu kod 24 meseca starih mužjaka na ovom režimu ishrane u poređenju sa mužjacima iz AL kontrolne grupe iste starosti (*post hoc*:  $p=0,0215$ ,  $p=0,0174$ , redom) (Slika 4.24, A, B paneli desno).



**Slika 4.24 Ekspresija mTOR na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

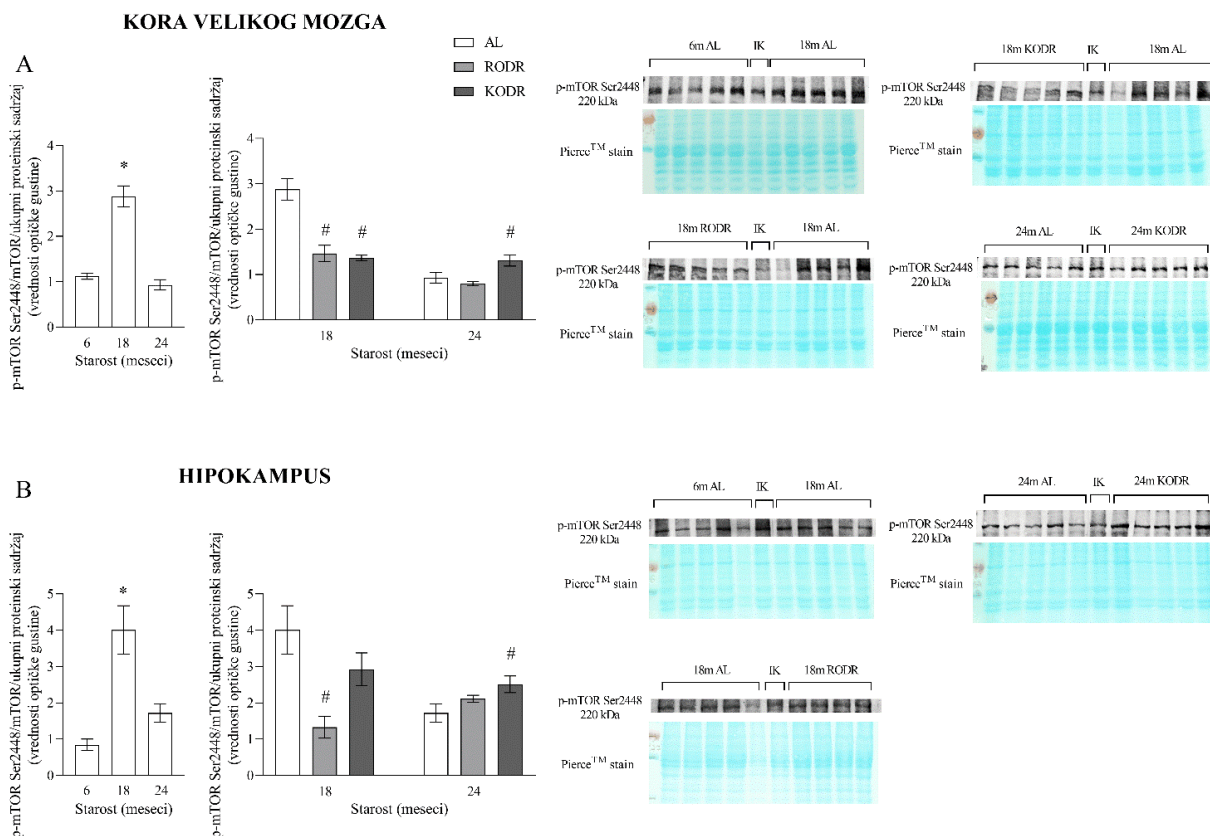
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Procena aktivacije mTOR u okviru mTORC1 kompleksa vrši se merenjem ekspresije fosforilisanog mTOR količine p-mTOR Ser2448 u odnosu na ukupnu formu. Tokom starenja uočen je trend porasta odnosa u obe ispitivane strukture (kora velikog mozga:  $F(2, 12) = 47,61$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*:  $p < 0,0001$ , hipokampus:  $F(2, 12) = 15,12$ ,  $p = 0,0005$ , *post hoc*:  $p = 0,0004$ ). Osamnaestomesečni mužjaci sa slobodnim pristupom hrani imali su 2,5 puta viši odnos p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga i 5 puta viši u hipokampusu u poređenju sa 6 meseci starim, dok se nakon 18. meseca ova vrednost polako vraćala ka početnoj kontrolnoj vrednosti, te između 24 meseca i 6 meseci starih mužjaka AL grupa nije bilo statistički značajne razlike odnosa p-mTOR Ser2448/mTOR (Slika 4.25, A, B, beli stubići).

RODR i KODR rezultovale su smanjenjem odnosa p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga ( $F(2, 12) = 24,61$ ,  $p < 0,0001$ ) 18 meseci starih mužjaka. U ovoj starosnoj tački RODR i KODR pokazale su se podjednako efikasnim u smanjenju stepena fosforilacije mTOR, odnosno rezultovale su 50% manjim odnosom fosforilisane forme u odnosu na ukupnu u kori velikog mozga (*post hoc*:  $p = 0,0003$ ,  $p = 0,0001$ , redom). U hipokampusu, uprkos trendu smanjenja prisutnom kod oba režima ishrane, statistička značajnost detektovana je samo u slučaju duge dijete ( $F(2, 11) = 6,289$ ,  $p = 0,0151$ ), te je u hipokampusu 18-mesečnih mužjaka RODR grupe nivo p-mTOR Ser2448 forme bio 3,5 puta

niži u poređenju sa vrednostima izmerenim kod mužjaka AL grupe iste starosti (*post hoc*:  $p=0,0086$ ) (Slika 4.25, B, srednji paneli).

Kod 24 meseca starih mužjaka tromesečni režim DR rezultovao je povećanjem p-mTOR Ser2448/mTOR odnosa u obe ispitivane strukture (kora velikog mozga:  $F(2, 12) = 6,832$ ,  $p=0,0105$ ; hipokampus:  $F(2, 12) = 3,747$ ,  $p=0,0574$ ). U poređenju sa 24 meseca starim mužjacima sa slobodnim pristupom hrani, 24-mesečni mužjaci KODR grupe imali su oko 40% viši nivo p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu (*post hoc*:  $p=0,0381$ ,  $p=0,0356$ , redom) (Slika 4.25, A, B, paneli desno).



**Slika 4.25 Odnos p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

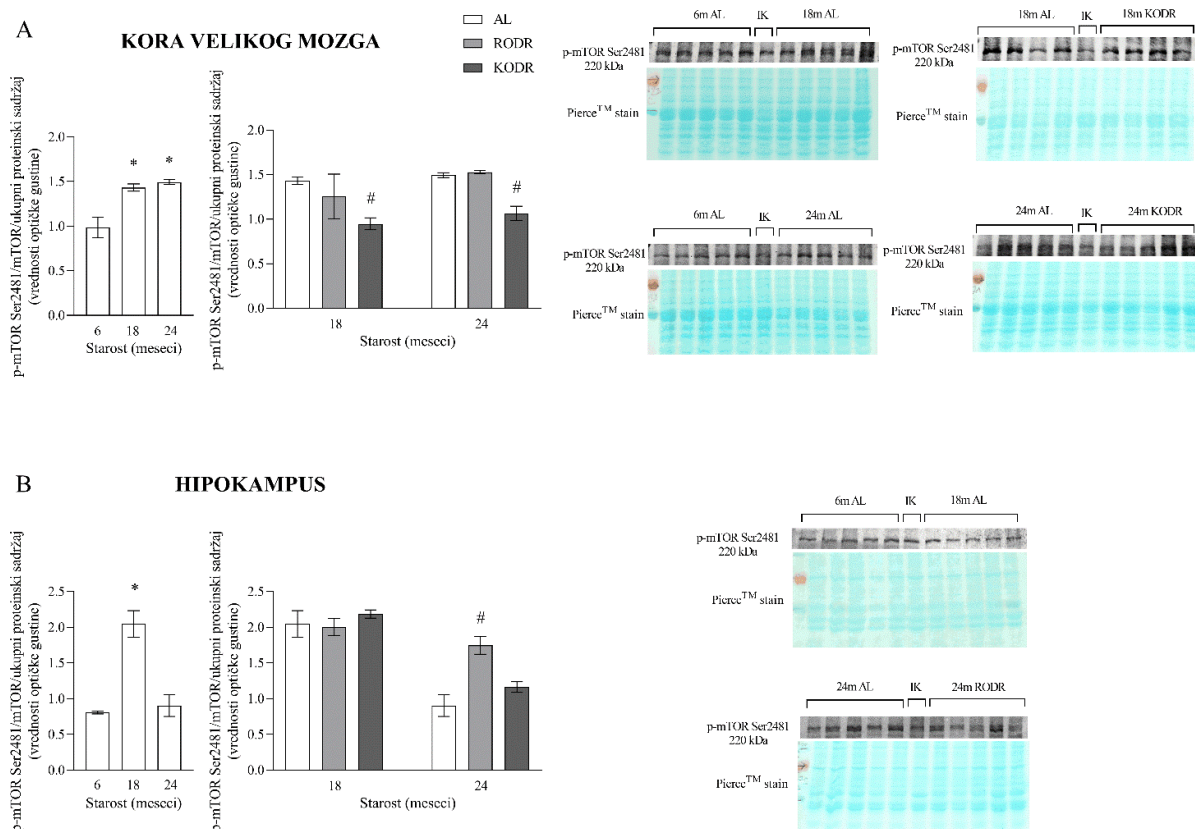
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Procena aktivacije mTOR u okviru mTORC2 kompleksa vršena je merenjem ekspresije fosforilisanog p-mTOR Ser2481 u odnosu na ukupnu formu. Ova vrednost se takođe povećavala tokom starenja u obe ispitivane strukture. Povećan odnos p-mTOR Ser2481/mTOR je detektovan u kori velikog mozga 18 i 24 meseca starih mužjaka ( $F(2, 12) = 14,44$ ,  $p=0,0006$ , *post hoc*:  $p=0,0019$ ,  $p=0,0007$ , redom) i hipokampusu 18 meseci starih životinja AL grupe ( $F(2, 12) = 25,07$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*:  $p < 0,0001$ ) (Slika 4.26, A, B, beli stubići). U kori velikog mozga uočen je kontinuirani porast odnosa p-mTOR Ser2448/mTOR tokom starenja, koji je bio 45% viši kod 18 i 50% viši kod 24 meseca starih mužjaka, dok je u hipokampusu nakon povećanja od 2,5 puta, izmerenog kod 18

meseci starih mužjaka, usledio pad, te je kod 24-mesečnih mužjaka AL grupe odnos bio približan onom kod 6-mesečnih mužjaka AL grupe.

p-mTOR Ser2481/mTOR je pokazivao trend smanjenja pod uticajem DR u kori velikog mozga 18 meseci starih mužjaka ( $F_{(2, 12)} = 3,760, p=0,0570$ ), dok u hipokampusu nije bilo značajnih promena. 18-mesečni mužjaci, koji su bili na KODR, imali su oko 35% manji odnos fosforilisane i ukupne forme ovog proteina u kori velikog mozga u odnosu na mužjake iste starosti sa slobodnim pristupom hrani (*post hoc*:  $p=0,0367$ ) (Slika 4.26, A, srednji paneli).

Iako nije dovela do značajnih promena u ispitivanim strukturama 18 meseci starih životinja, RODR je rezultovala povećanjem nivoa fosforilacije mTOR proteina na poziciji Ser2481 u hipokampusu 24 meseca starih (Slika 4.26, B, panel desno). Naime, u hipokampusu 24-mesečnih mužjaka RODR grupe izmeren je dvostruko veći odnos p-mTOR Ser2481/mTOR nego kod mužjaka AL grupe iste starosti ( $F_{(2, 12)} = 12,92, p=0,0010, post\ hoc: p=0,0006$ ). RODR nije uticala na aktivnost mTORC2 u kori velikog mozga 24 meseca starih mužjaka, međutim KODR je smanjila odnos p-mTOR Ser2481/mTOR za 30% u odnosu na vrednosti uočene kod mužjaka AL kontrolne grupe iste starosti ( $F_{(2, 12)} = 25,80, p<0,0001, post\ hoc: p=0,0001$ ) (Slika 4.26, A).



**Slika 4.26 Odnos p-mTOR Ser2481/mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

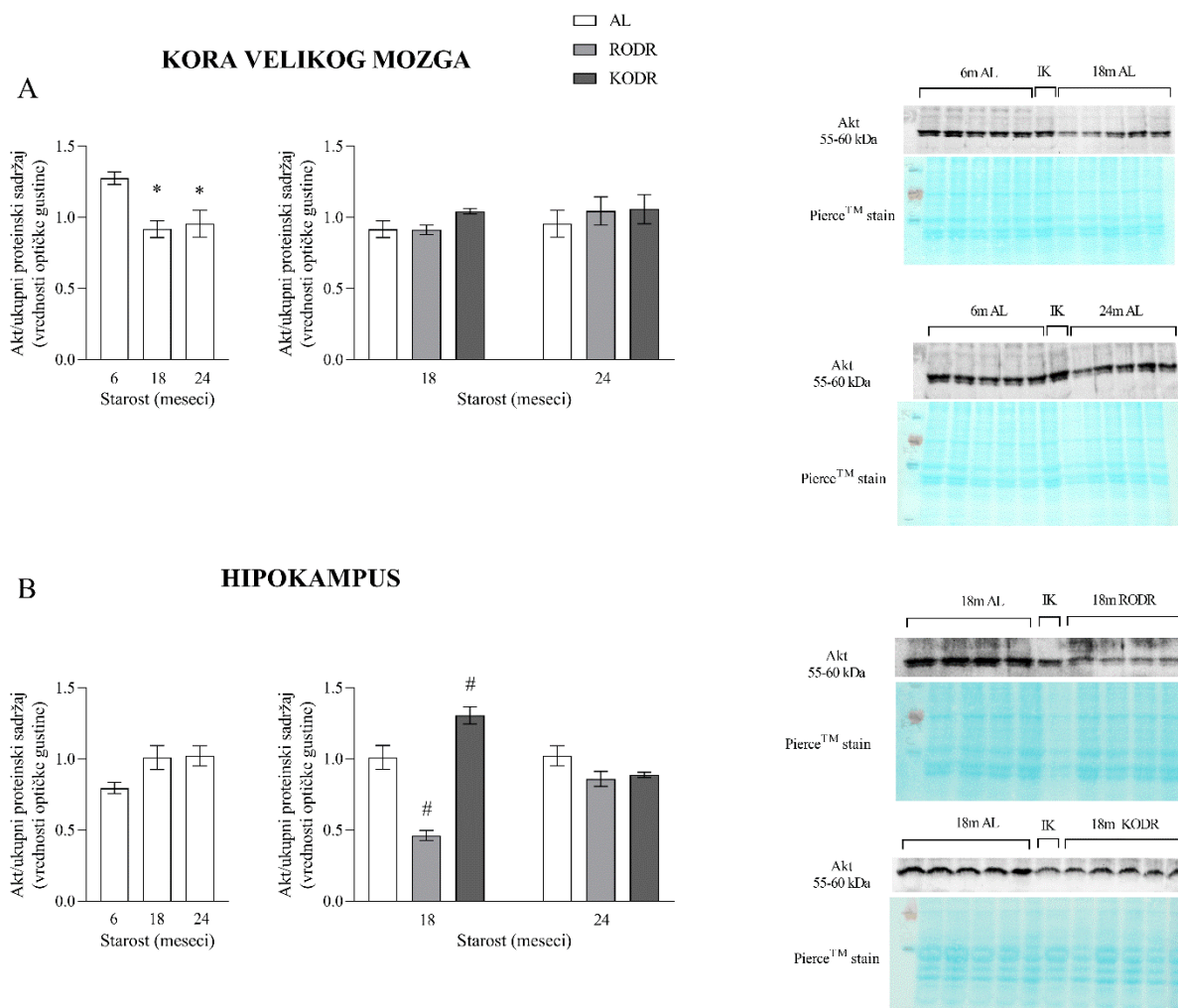
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Dok je ekspresija Akt u kori velikog mozga bilo osetljiva na proces starenja pri slobodnom pristupu hrani, nijedan od ispitivanih režima DR nije doveo do promena. U hipokampusu je pak uočen obrnuti trend, odnosno uprkos izostanku promena tokom starenja, DR je menjala ekspresiju ovog proteina, naročito u starosnoj tački od 18 meseci.

Ekspresija Akt bila je 30 % manja tokom starenja u kori velikog 18 i 24 meseca starih mužjaka ( $F_{(2, 12)} = 7,920$ ,  $p=0,0064$ , *post hoc*:  $p=0,0065$ ,  $p=0,0133$ , redom) u odnosu na 6 meseci stare. Iako su primenjeni režimi DR rezultovali blagim povećanjem u obe starosne tačke, statistički značajna promena ekspresije Akt u kori velikog mozga nije izmerena ni u jednoj eksperimentalnoj grupi (Slika 4.27, A).

U hipokampusu 18 meseci starih mužjaka su detektovani drugačiji efekti RODR i KODR ( $F_{(2, 11)} = 38,34$ ,  $p<0,0001$ ). Naime, dok je kod 18-mesečnih mužjaka RODR grupe izmeren dvostruko manji nivo ekspresije Akt (*post hoc*:  $p=0,0003$ ), KODR je dovela do povećanja od 30% u odnosu na 18-mesečne mužjake AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0146$ ) (Slika 4.27, B, srednji panel).

Kod 24 meseca starih mužjaka ni jedan od ispitivanih režima nije doveo do promena ekspresije Akt u hipokampusu. (Slika 4.27, B, paneli desno).



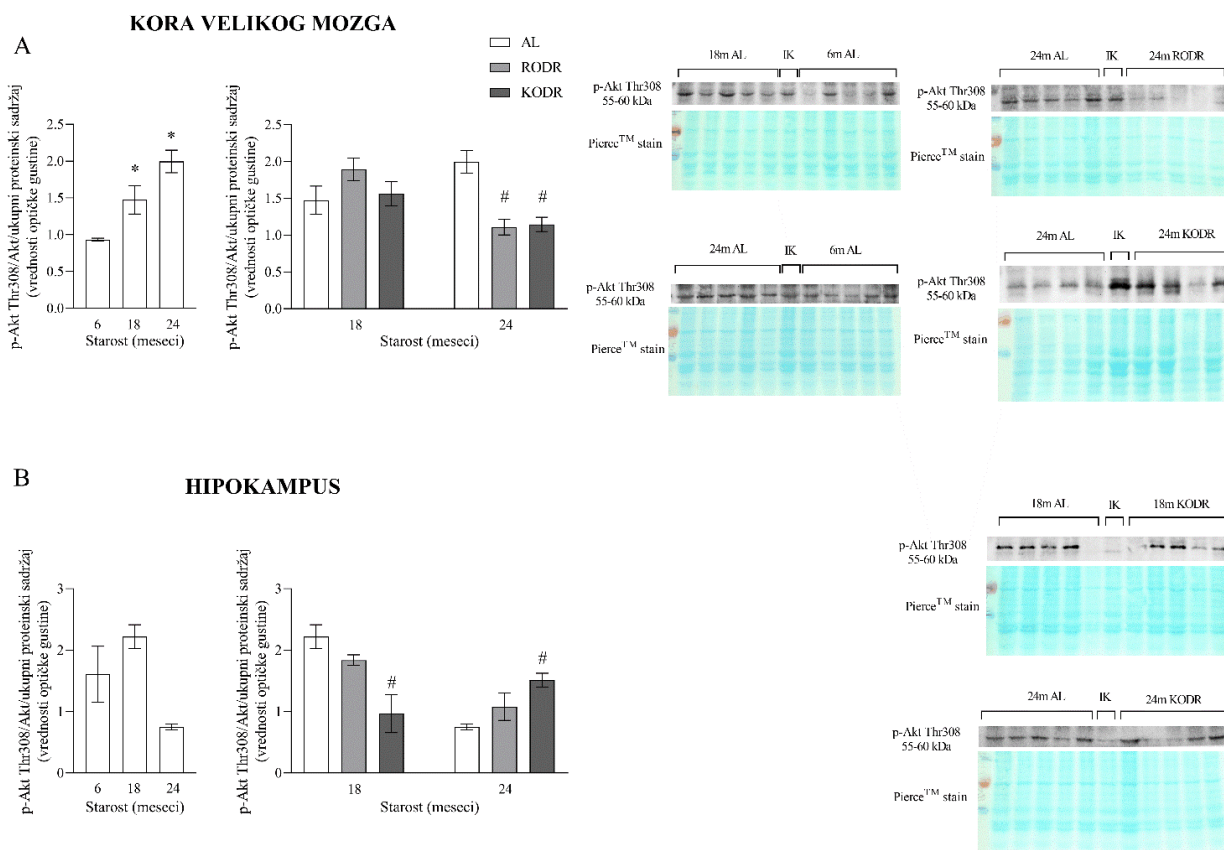
**Slika 4.27 Ekspresija Akt na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Akt se aktivira fosforilacijom treoninskog ostatka na mestu 308 od strane PDK. Merenjem odnosa p-Akt Thr308/Akt uočeno je da ova vrednost kontinuirano raste u kori velikog mozga tokom starenja ( $F_{(2, 12)} = 13,90$ ,  $p=0,0008$ ) i to 50% u 18 meseci (*post hoc*:  $p=0,0367$ ) i 100% u 24 meseca starosti (*post hoc*:  $p=0,0004$ ), dok u hipokampusu, uprkos trendu povećanja uočenom u 18. mesecu, nije zabeleženo statistički značajno povećanje ekspresije aktivirane forme Akt (Slika 4.28, A, B, beli stubići).

Promene u fosforilaciji Akt na poziciji Thr308 nisu pratile promene odnosa p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga 18 meseci starih mužjaka, obzirom da ni jedan od režima ishrane nije značajno promenio ovu vrednost u odnosu na onu uočenu kod 18-mesečnih mužjaka AL grupe. U hipokampusu je pak uočena promena u nivou ove fosforilisane forme Akt, iako je samo efekat KODR bio statistički značajan ( $F_{(2, 12)} = 8, 173$ ,  $p=0,0067$ , *post hoc*:  $p=0,0042$ ). Mužjaci stari 18 meseci KODR grupe imali su dvostruko manji odnos p-Akt Thr308/Akt u hipokampusu od mužjaka AL grupe iste starosti (Slika 4.28, B, srednji panel).

Promene u aktivaciji Akt bile su izraženije kod 24 meseca starih mužjaka u odnosu na 18 meseci stare. U kori velikog mozga 24 meseca starih mužjaka ekspresija fosforilisane forme Akt bila je duplo niža kod mužjaka DR grupa u odnosu na mužjake sa slobodnim pristupom hrani ( $F_{(2, 12)} = 16,87$ ,  $p=0,0003$ ). Iznenadjujuće, RODR i KODR dale su isti stepen promene u ovoj strukturi, rezultujući dvostruko nižim odnosom p-Akt Thr308/Akt kod ovih grupa u odnosu na 24-mesečne mužjake AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0005$ ,  $p=0,0007$ , redom) (Slika 4.28, A, panel desno). KODR je uticala na aktivacionu fosforilaciju Akt i u hipokampusu, s tim da je trend promene bio suprotan onome uočenom u kori velikog mozga. Drugim rečima, u hipokampusu mužjaka 24 meseca starih KODR grupe uočen je dvostruko veća aktivacija Akt ( $F_{(2, 12)} = 5,950$ ,  $p= 0,0177$ , *post hoc*:  $p= 0,0101$ ) (Slika 4.28, B, panel desno).



**Slika 4.28 Odnos p-Akt Thr308/Akt u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

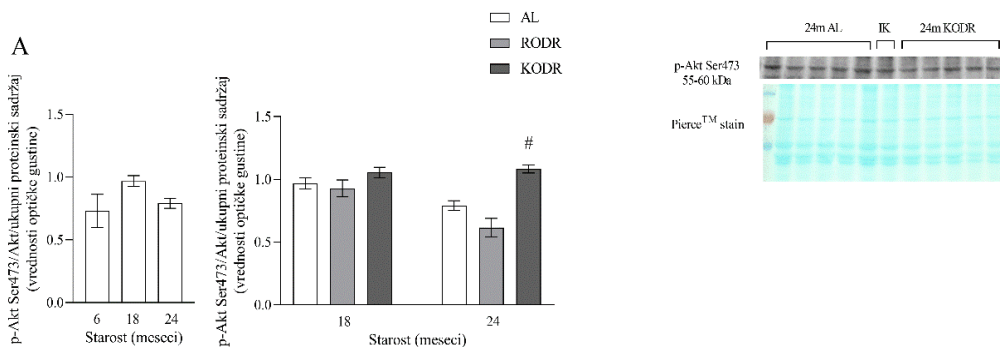
mTOR u okviru mTORC2 fosforiliše Akt na poziciji Ser473, a stepen aktivacije najbolje odražava odnosa fosforilisane i ukupne Akt. Ova vrednost se nije značajno menjala u kori velikog mozga tokom starenja pri slobodnom pristupu hrani, ali je u hipokampusu nivo bila 30% niža kod 18 i 40% niža kod 24 meseca starih mužjaka u poređenju sa 6 meseci starim ( $F_{(2, 12)} = 6,392$ ,  $p = 0,0129$ , *post hoc*:  $p = 0,0399$ ,  $p = 0,0095$ , redom) (Slika 4.29, B, beli stubići).

Dugotrajna RODR udvostručila je nivo fosforilacije Akt na poziciji Ser473 u hipokampusu 18 meseci starih mužjaka u odnosu na mužjake iste starosti AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 17,38$ ,  $p = 0,0004$ , *post hoc*:  $p = 0,0026$ ), dok u kori velikog mozga nije bilo značajnih promena (Slika 4.29, A, B, srednji paneli).

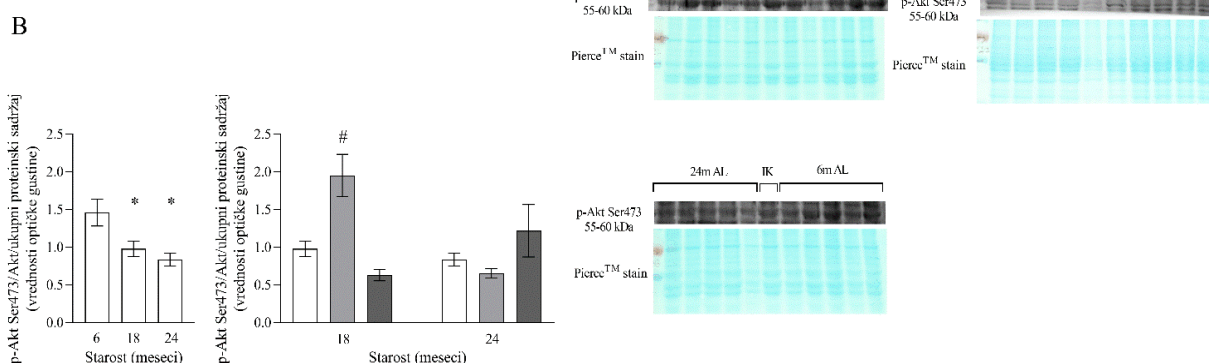
Za razliku od p-Akt Thr308 forme, čiji je nivo bio snižen, nivo p-Akt Ser473 forme bio je 35% viši u kori velikog mozga 24-mesečnih mužjaka KODR grupe u odnosu na mužjake AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 20,82$ ,  $p = 0,0001$ , *post hoc*:  $p = 0,0034$ ), dok u hipokampusu nije bilo značajnih promena (Slika 4.29, A, B, paneli desno).



## KORA VELIKOG MOZGA



## HIPOKAMPUS



**Slika 4.29 Odnos p-Akt Ser473/Akt u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

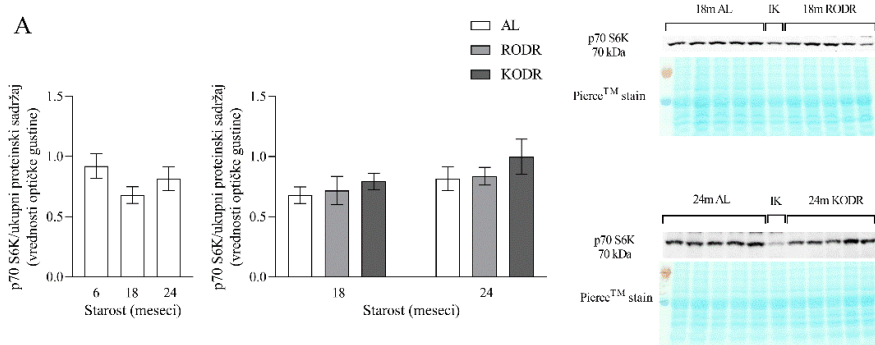
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Jedan od nishodnih molekula mTORC1 jeste ribozomalna kinaza p70 S6K. Međutim, ekspresija p70 S6K nije se menjala tokom starenja ni u jednoj od ispitivanih struktura, a u hipokampusu je bila povećana pod uticajem oba režima DR (Slika 4.30, A, B, beli stubići).

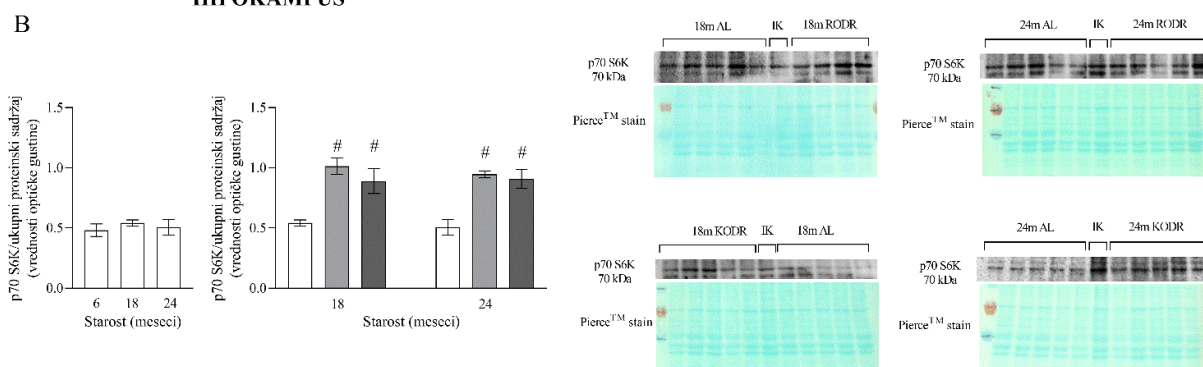
U kori velikog mozga ni DR nisu uticali na ekspresiju p70 S6K, dok su u hipokampusu oba režima DR imala isti efekat. Mužjaci stari 18 meseci RODR grupe imali su gotovo dvostruko veću ekspresiju ovog proteina ( $F(2, 11) = 10,87$ ,  $p = 0,0025$ , *post hoc*:  $p = 0,0020$ ) dok je kod 18-mesečnih mužjaka KODR grupe ovo povećanje iznosilo 60% u poređenju sa mužjacima starosno odgovarajuće AL kontrolne grupe (*post hoc*:  $p = 0,0104$ ) (Slika 4.30, B, srednji paneli).

Ovakav trend promena primećen je i kod 24 meseca starih mužjaka. U odnosu na dvogodišnje mužjake AL grupe, u hipokampusu mužjaka iste starosti RODR i KODR grupe ekspresija p70 S6K bila je veća za oko 80% ( $F(2, 12) = 16,19$ ,  $p = 0,0004$ , *post hoc*:  $p = 0,0005$ ,  $p = 0,0010$ , redom) (Slika 4.30, B, paneli desno).

## KORA VELIKOG MOZGA



## HIPOKAMPUS



**Slika 4.30 Ekspresija p70 S6K na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

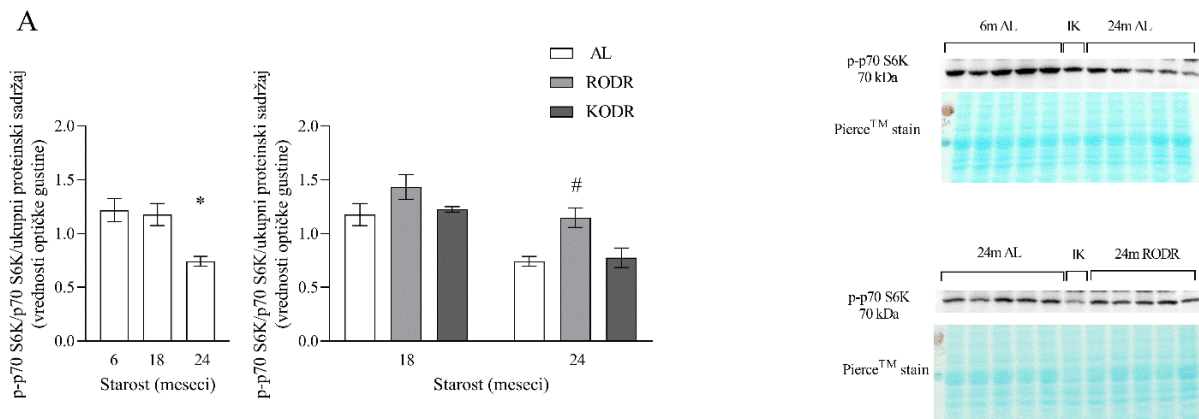
Ribozomalna kinaza p70 S6K poseduje osam mesta fosforilacije, od koji su za aktivaciju ključna Thr229, Ser371 i Thr389 (Bai i Jiang, 2010). U trenutku eksperimentalnog izvođenja ove teze bilo je jedino dostupno antitelo koje prepoznaje fosforilaciju na poziciji Ser434 te je u ovoj tezi meren nivo p70 S6K fosforilisane na poziciji Ser434. Iako Ser434 nije primarni marker mTORC1 aktivnosti, njegova modifikacija stabilizuje i pojačava aktivaciju S6K. Fosforilacija p70 S6K u karboksilnom domenu, na poziciji Ser434, je mesto autofosforilacije ove kinase koje doprinosi otkrivanju Thr389 za fosforilaciju od strane mTORC1, doprinoseći na taj način punoj aktivaciji p70 S6K (Akinyele i Wallace, 2022). Promene u aktivaciji p70 S6K bile su uočljive kod 24 meseca starih životinja, bilo da su u pitanju AL ili DR režimi ishrane.

Odnos p-p70 S6K/p70 S6K u kori velikog mozga smanjivao se tokom starenja i bio je 40% niži kod 24-mesečnih mužjaka AL grupe u odnosu na 6-mesečne mužjake AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 8,643$ ,  $p = 0,0047$ , *post hoc*:  $p = 0,0052$ ), dok u hipokampusu nije došlo do značajnih promena tokom starenja (Slika 4.31, A, B, beli stubići).

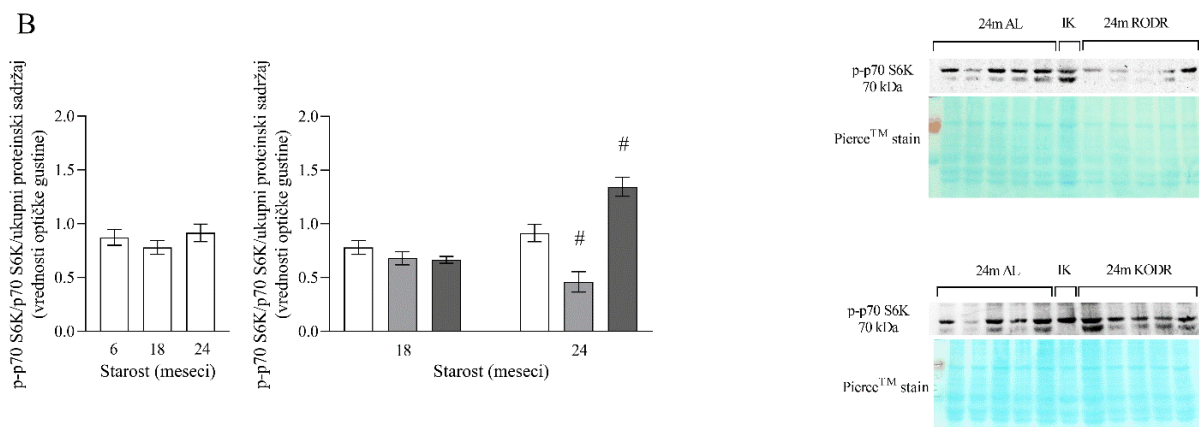
Stepen fosforilacije p70 S6K nije se menjao pod uticajem DR kod 18 meseci starih mužjaka (Slika 4.31, A, B, srednji paneli).

Jedina promena fosforilacije p70 S6K u kori velikog mozga pod uticajem DR izmerena je kod mužjaka starih 24 meseci RODR grupe ( $F_{(2, 12)} = 8,291$ ,  $p=0,0055$ ), kod kojih je izmeren 50% viši odnos p-p70 S6K/p70 S6K (*post hoc*:  $p=0,0061$ ) u odnosu na vrednosti izmerene kod mužjaka iste starosti AL grupe (Slika 4.31, A, panel desno). U hipokampusu 24 meseca starih mužjaka su oba režima DR dovela do statistički značajnih promena, iako oprečnih ( $F_{(2, 12)} = 24,92$ ,  $p<0,0001$ ). Dok je RODR, nasuprot promeni u kori velikog mozga, u hipokampusu smanjila p-p70 S6K/p70 S6K odnos za 50% (*post hoc*:  $p=0,0064$ ), KODR je povećala ovu vrednost za isti procenat u odnosu na 24-mesečne mužjake AL kontrolne grupe. (*post hoc*:  $p=0,0094$ ) (Slika 4.31, B, panel desno).

### KORA VELIKOG MOZGA



### HIPOKAMPUS



**Slika 4.31 Odnos p-p70 S6K/p70 S6K u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih mužjaka AL grupa i 18 i 24 meseca starih mužjaka RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.**

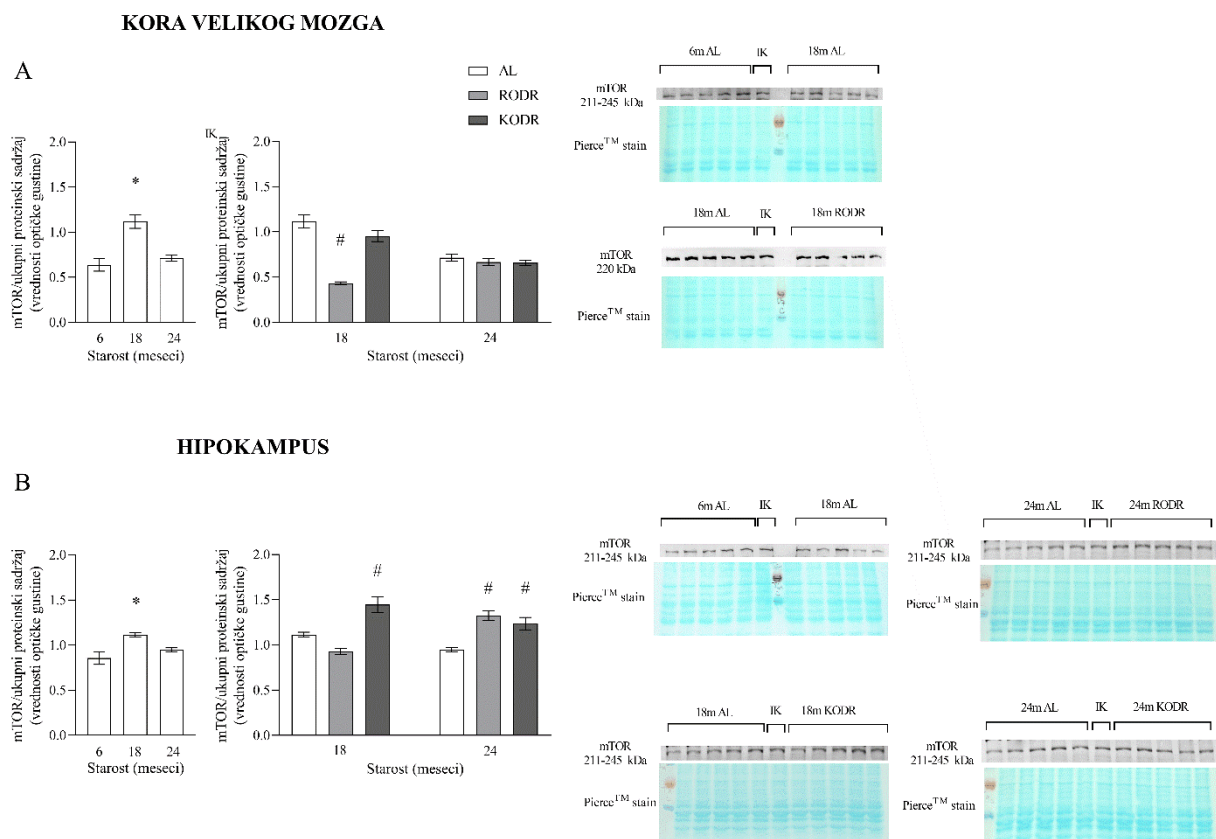
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

#### 4.3.2.2. Ženke

Kod ženki je tokom starenja došlo do povećanja ekspresije ukupnog mTOR u obe ispitivane strukture. 18 meseci stare ženke AL grupe imale su 70% veću ekspresiju mTOR u kori velikog mozga ( $F_{(2, 12)} = 16,75$ ,  $p=0,0003$ , *post hoc*:  $p=0,0003$ ) i 30% veću u hipokampusu u odnosu na 6 meseci staru grupu ( $F_{(2, 12)} = 8,685$ ,  $p=0,0047$ , *post hoc*:  $p=0,0027$ ). (Slika 4.32, A, B, beli stubići). Nakon

značajnog povećanja u 18 meseci, ekspresija mTOR se smanjivala, te kod 24 meseca starih ženki nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na 6 meseci stare.

U kori velikog mozga ekspresija mTOR pokazivala je opadajući trend pod režimima DR, dok su u hipokampusu primenjeni režimi DR uglavnom doveli do porasta ekspresije mTOR na nivou proteina. Međutim, detaljna statistička analiza je pokazala da je jedina statistički značajna promena u kori velikog mozga detektovana kod 18-mesečnih ženki RODR grupe, kod kojih je dugotrajna DR sa ranim početkom smanjila ekspresiju mTOR za 60% u poređenju sa 18-mesečnim ženkama AL grupe ( $F(2, 12) = 40,46$ ,  $p < 0,0001$  *post hoc*:  $p < 0,0001$ ) (Slika 4.32, A, srednji panel). Iako je u ovoj eksperimentalnoj grupi uočeno smanjenje ekspresije mTOR i u hipokampusu, promena nije bila statistički značajna. KODR je sa druge strane dovela do suprotne promene u ovoj starosnoj grupi. U hipokampusu 18-mesečnih ženki KODR grupe nivo ekspresije mTOR bio je 30% viši u odnosu na vršnjakinje AL grupe ( $F(2, 12) = 22,26$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*:  $p = 0,0023$ ) (Slika 4.32, B, srednji panel). U hipokampusu 24 meseca starih ženki, viši nivo ekspresije mTOR izmeren je pod uticajem oba režima DR u poređenju sa AL kontrolom ( $F(2, 12) = 13,68$ ,  $p = 0,0008$ ), i to za 40% kod ženki RODR (*post hoc*:  $p = 0,0006$ ) i 30% kod ženki KODR eksperimentalne grupe (*post hoc*:  $p = 0,0048$ ) (Slika 4.32, B, panel desno).

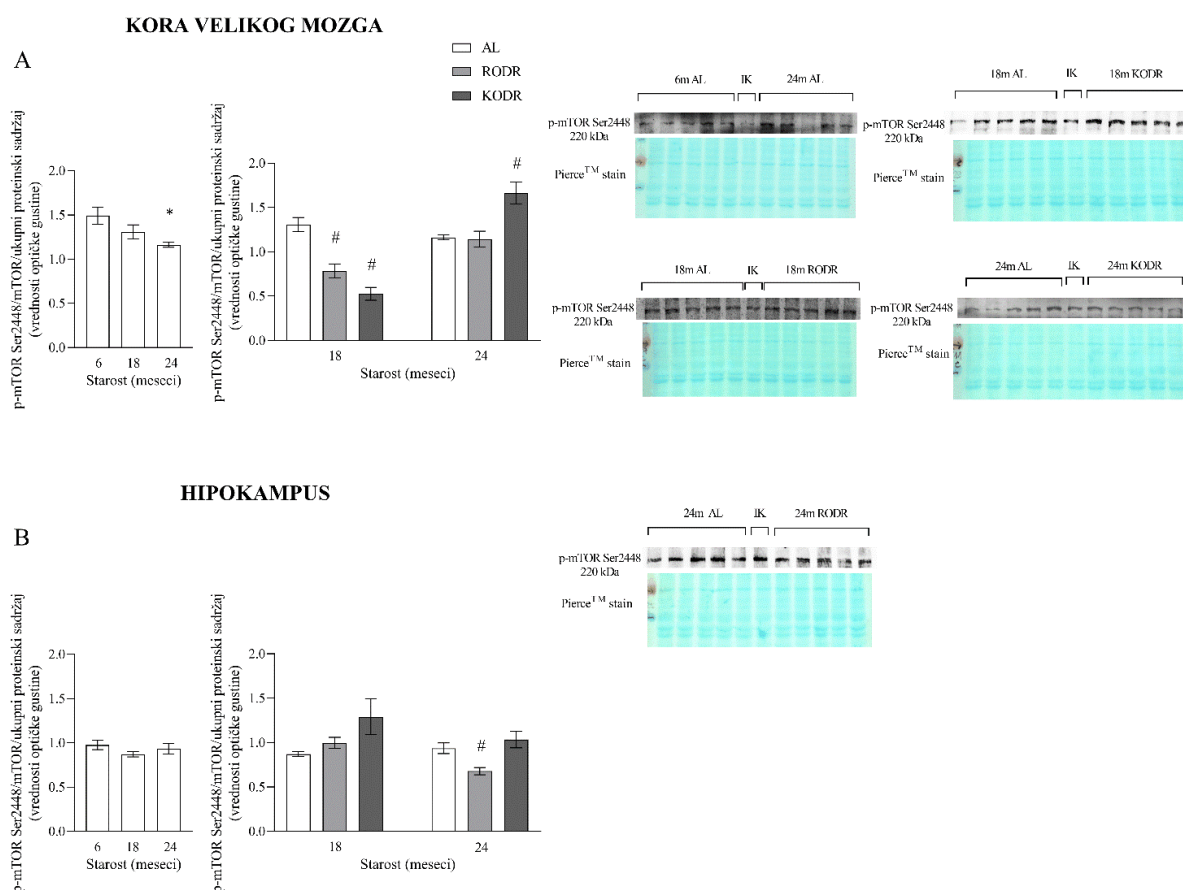


**Slika 4.32 Ekspresija mTOR na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Odnos p-mTOR Ser2448/mTOR nije se znatno menjao tokom starenja u ispitivanim strukturama te je jedina detektovana promena bila 20% niža vrednost u kori velikog mozga 24 meseca starih ženki u odnosu na 6 meseci stare ( $F_{(2, 12)} = 4,227$ ,  $p=0,0435$ , *post hoc*:  $p=0,0274$ ) (Slika 4.33, A, beli stubići).

Ženke stare 18 meseci izložene restriktivnim režimima ishrane pokazivale su smanjenje nivoa fosforilacije mTOR na poziciji Ser2448 u kori velikog mozga, u poređenju sa ženkama iste starosti sa slobodnim pristupom hrani ( $F_{(2, 12)} = 27,60$ ,  $p<0,0001$ ). Niži odnos p-mTOR Ser2448/mTOR bio je zabeležen kod 18-mesečnih ženki RODR grupe za 40% (*post hoc*:  $p=0,0014$ ) kao i kod ženki KODR grupe za 60% (*post hoc*:  $p<0,0001$ ) (Slika 4.33, A, srednji panel). Kod 24 meseca starih životinja, RODR i KODR su imale oprečne efekte. Dok je RODR vodila smanjenju, KODR je vodila povećanju stepena fosforilacije mTOR u obe strukture. Značajno niži odnos p-mTOR Ser2448/mTOR je uočen u hipokampusu 24-mesečnih ženki RODR grupe, gde je izmerena vrednosti bila 30% niža u odnosu na vrednost izmerenu kod ženki AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 12,75$ ,  $p=0,0011$ , *post hoc*:  $p=0,0051$ ) (Slika 4.33, B). U kori velikog mozga promene indukovane RODR režimom ishrane nisu bile statistički značajne, dok je KODR režim ishrane rezultovao 40% višim odnosom p-mTOR Ser2448/mTOR u poređenju sa 24-mesečnim ženkama AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 9,224$ ,  $p=0,0044$ , *post hoc*:  $p=0,0096$ ) (Slika 4.33, A, paneli desno).

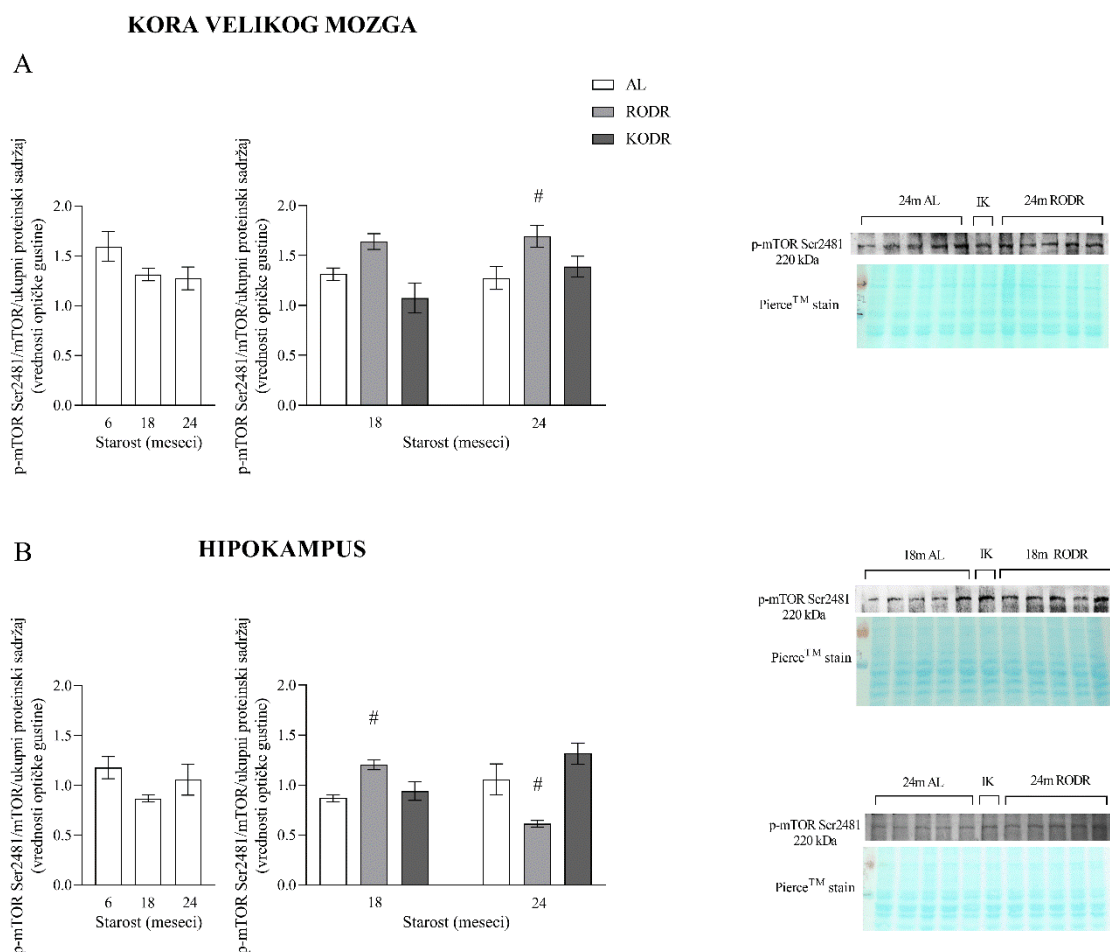


**Slika 4.33** Odnos p-mTOR Ser2448/mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Kod ženki sa slobodnim pristupom hrani tokom starenja, odnos p-mTOR Ser2481/mTOR nije se menjao u kori velikog mozga i hipokampusu, dok su u slučaju DR ženke generalno bile podložnije promenama usled RODR.

Kod 18 meseci starih ženki, režim dugotrajne DR je doveo do povećanja stepena fosforilacije mTOR Ser2481 u obe strukture, ali je statistička značajnost uočena samo u hipokampusu ( $F_{(2, 11)} = 6,570$ ,  $p=0,0133$ ). Ženke stare 18 meseci RODR grupe imale su 40% viši odnos p-mTOR Ser2481/mTOR u odnosu na vršnjakinje AL grupe (*post hoc*:  $p=0,0094$ ) (Slika 4.34, B, srednji panel). U najstarijoj grupi ženki fosforilacija mTOR Ser2481 proteina menjala samo pod uticajem RODR, ali različitim trendom. Dok je u kori velikog mozga ovaj režim ishrane doveo do povećanja odnosa p-mTOR Ser2481/mTOR ( $F_{(2, 12)} = 3,893$ ,  $p=0,0498$ , *post hoc*:  $p=0,0384$ ) u hipokampusu je rezultovao smanjenjem istog ( $F_{(2, 12)} = 10,41$ ,  $p=0,0024$ , *post hoc*:  $p=0,0267$ ). Ženke stare 24 meseca RODR grupe imale su 30% viši odnos p-mTOR Ser2481/mTOR u kori velikog mozga i 40% niži nivo u hipokampusu, u poređenju sa vršnjakinjama AL grupe (Slika 4.34, A, B, desni paneli).



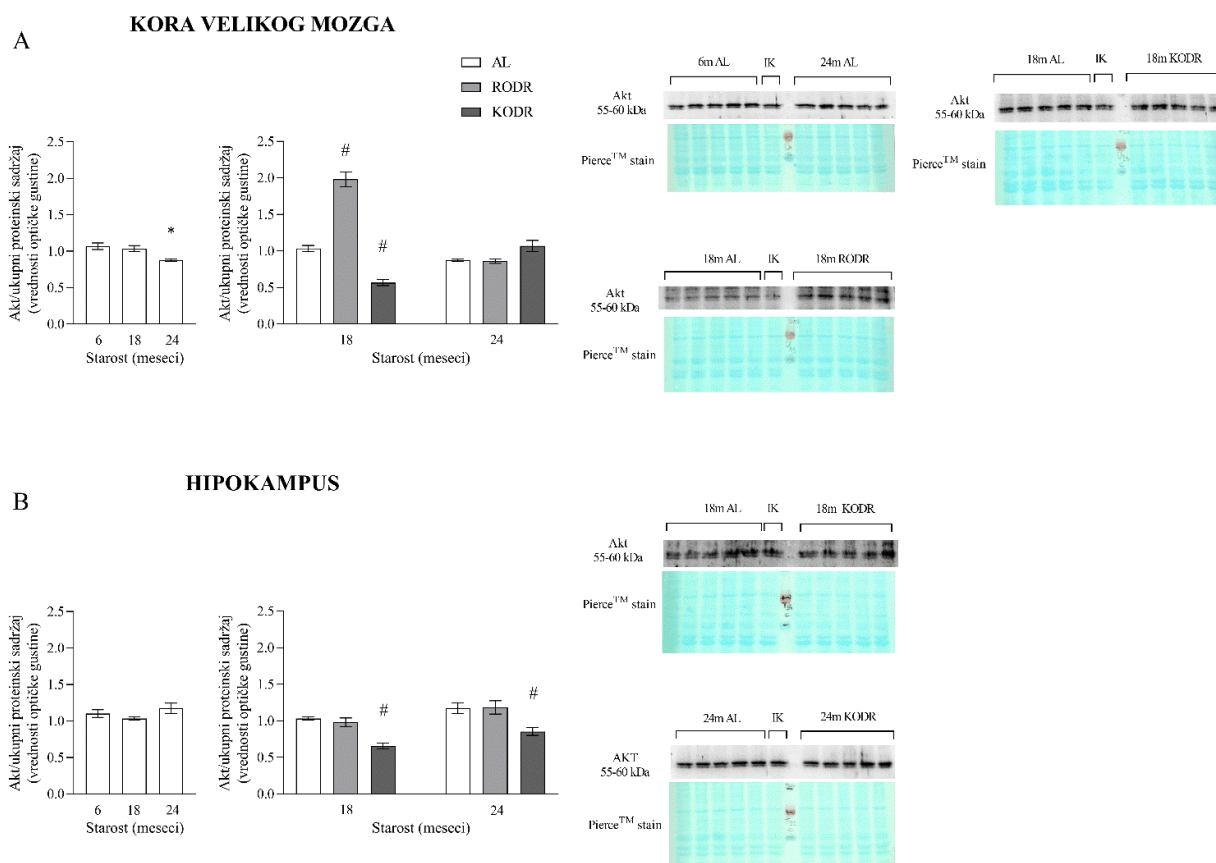
**Slika 4.34** Odnos p-mTOR Ser2481/mTOR u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Ekspresija Akt na nivou proteina bila je generalno stabilna tokom starenja u obe ispitivane strukture, uz izuzetak blagog pada od 20% u kori velikog mozga 24 meseca starih ženki sa slobodnim pristupom hrani ( $F_{(2, 12)} = 8,151$ ,  $p=0,0058$ , *post hoc*:  $p=0,0050$ ) (Slika 4.35, A, beli stubići).

U kori velikog mozga 18 meseci starih ženki, RODR režim je doveo do dvostrukog povećanja ekspresije Akt ( $F_{(2, 12)} = 117,9$ ,  $p<0,0001$ , *post hoc*:  $p<0,0001$ ), dok je KODR u istoj strukturi rezultovao dvostrukim smanjenjem u poređenju sa AL kontrolom iste starosti (*post hoc*:  $p=0,0006$ ) (Slika 4.35, A, srednji panel). KODR je menjala ekspresiju Akt na isti način i u hipokampusu 18-mesečnih ženki, gde je izmereno smanjenje od 35% u odnosu na vršnjakinje AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 21,65$ ,  $p=0,0001$ , *post hoc*:  $p=0,0001$ ) (Slika 4.35, B, srednji panel).

Ekspresija Akt bila je relativno stabilna pod DR kod 24 meseca starih životinja. Značajna promena uočena je samo u hipokampusu ženki KODR grupe, gde je izmerena 30% manja ekspresija Akt u odnosu na hipokampus dvogodišnjih ženki AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 6,638$ ,  $p=0,0114$ , *post hoc*:  $p=0,0169$ ) (Slika 4.35, B, paneli desno).



**Slika 4.35 Ekspresija Akt na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

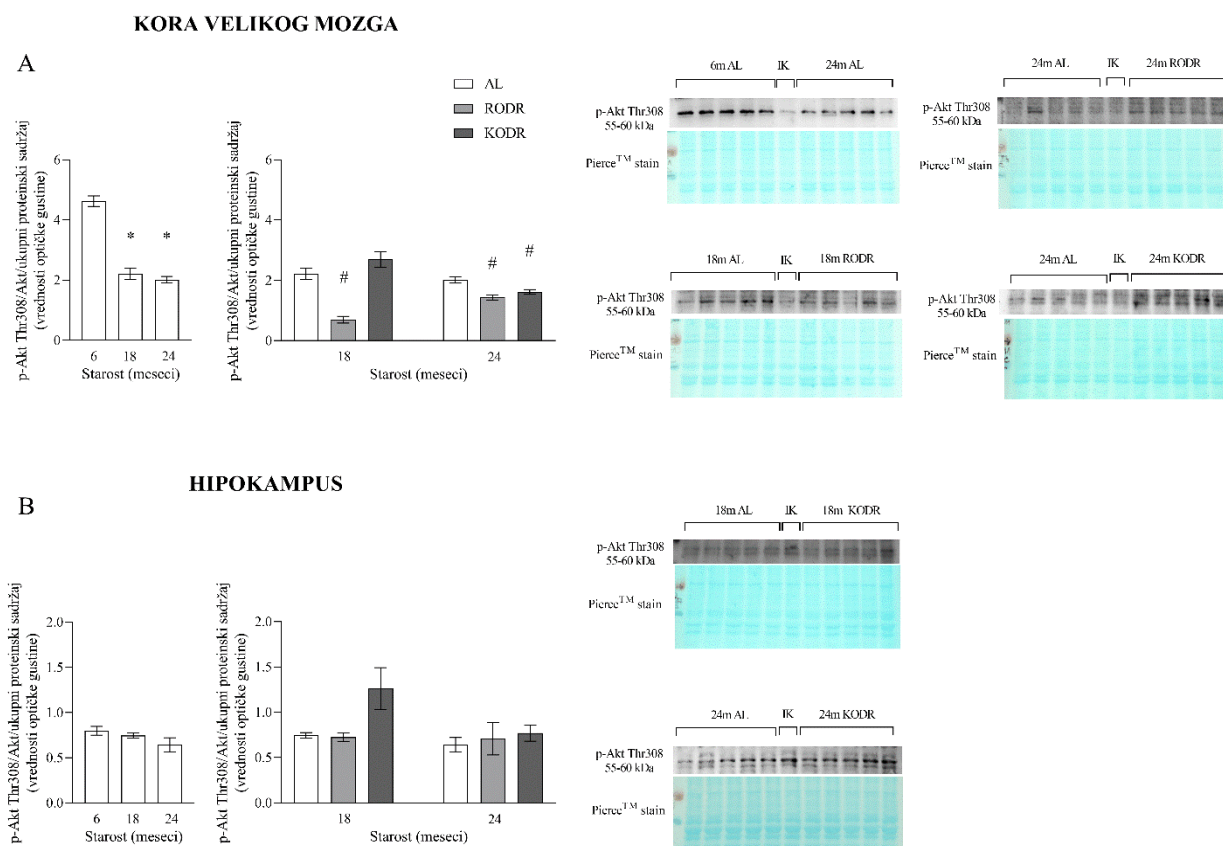
AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Aktivaciona fosforilacija Akt na Thr308 bila je podložnija promenama pod uticajem starenja i DR u kori velikog mozga nego u hipokampusu.

Odnos p-Akt Thr308/Akt bio je dvostruko niži u kori velikog mozga 18 i 24 meseca starih ženki u odnosu na 6 meseci stare ( $F_{(2, 12)} = 80,79$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*:  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ , redom) (Slika 4.36, A, beli stubići), dok se u hipokampusu ove vrednosti nisu značajno razlikovale između različitih starosnih grupa sa slobodnim pristupom hrani.

Fosforilacija Akt nije bila podložna značajnim promenama pod različitim režimima ishrane u obe moždane strukture 18 meseci starih ženki, osim u kori velikog mozga ženki RODR grupe gde je bila trostruko niža u odnosu na ženke AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 18,07$ ,  $p = 0,0002$ , *post hoc*:  $p = 0,0009$ ), (Slika 4.36, A, srednji panel).

RODR režim ishrane održao je niži stepen fosforilacije Akt na Thr308 u kori velikog mozga ženki i do 24 meseca starosti i to 30% niži od vrednosti izmerenih u kori velikog mozga ženki iste starosti AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 10,88$ ,  $p = 0,003$ , *post hoc*:  $p = 0,0021$ ). Iznenadjuće, približno isti efekat postignut je i u slučaju KODR, gde je u odnosu na AL kontrolu uočen 20% niži odnos p-Akt Thr308/Akt (*post hoc*:  $p = 0,0229$ ) (Slika 4.36, A, panel desno).



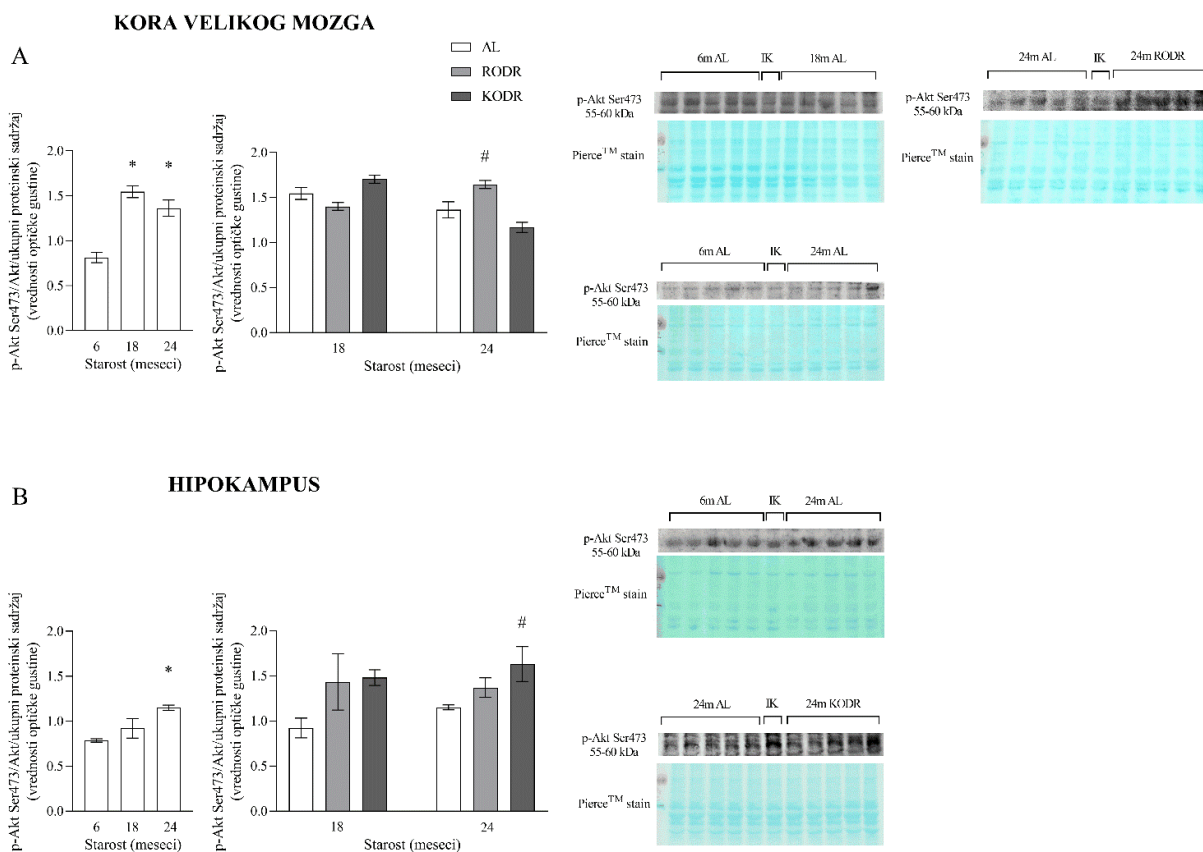
**Slika 4.36 Odnos p-Akt Thr308/Akt u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola



Nasuprot fosforilisanjoj formi Akt na Thr308, stepen fosforilacije na poziciji Ser473 povećavao se tokom starenja ( $F_{(2, 12)} = 27,49$ ,  $p < 0,0001$ ). Odnos p-Akt Ser473/Akt bio je povećan za 90% u kori velikog mozga 18-mesečnih ženki AL grupe (*post hoc*:  $p < 0,0001$ , a 70% kod 24-mesečnih ženki AL grupe u odnosu na 6-mesečne ženke AL grupe (*post hoc*:  $p = 0,0003$ ). (Slika 4.37, A, beli stubići). Rastući trend postojao je u obe starosne tačke i u hipokampusu ali je značajnost izmerena samo u 24 meseca starosti ( $p = 0,0431$ , *post hoc*:  $p = 0,0324$ ) (Slika 4.37, B, beli stubići).

Iako ispitivani režimi DR nisu značajno menjali stepen fosforilacije Akt na Ser473 u kori velikog mozga i hipokampusu 18 meseci starih životinja, promene su uočene kod 24 meseca starih životinja. U kori velikog mozga 24 meseca starih ženki, RODR je rezultovala 20% višim odnosom p-Akt Ser473/Akt u odnosu na kontrolu sa slobodnim pristupom hrani ( $F_{(2, 12)} = 11,08$ ,  $p = 0,0023$ , *post hoc*:  $p = 0,0329$ ) (Slika 4.37, A, panel desno). Viši odnos uočen je i u hipokampusu 24 meseca starih ženki podvrgnutih režimima DR. Ipak, značajna promena izmerena je samo u hipokampusu 24-mesečnih ženki KODR grupe, gde je odnos p-Akt Ser473/Akt bio 40% viši u poređenju sa vršnjakinjama AL grupe ( $p = 0,05$ , *post hoc*:  $p = 0,0473$ ) (Slika 4.37, B, panel desno).



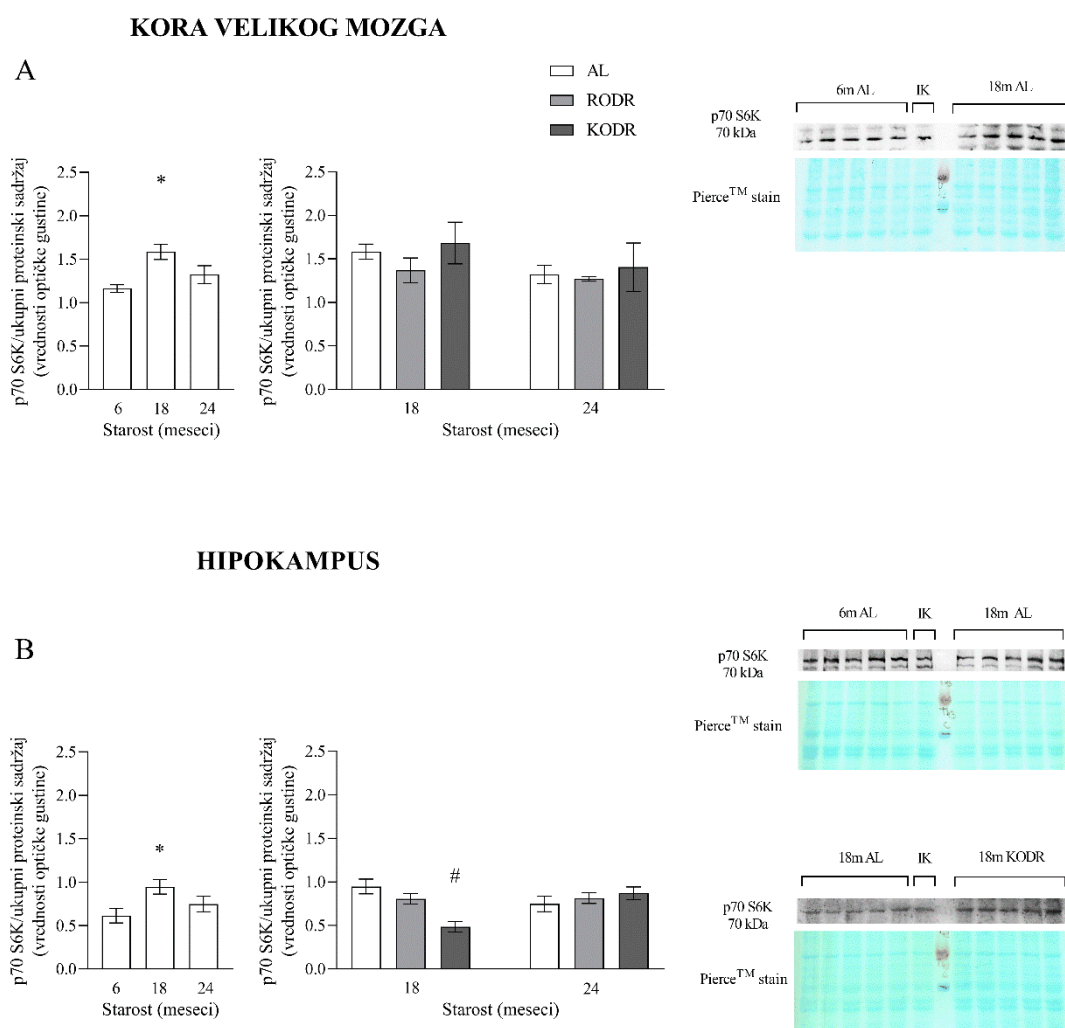
**Slika 4.37 Odnos p-Akt Ser473/Akt u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Ekspresija p70 S6K na nivou proteina se u ispitivanim moždanim strukturama ženki menjala značajno tokom starenja, dok restriktivni režimi ishrane nisu imali veći uticaj na ovu vrednost.

Ekspresija p70 S6K povećavala se u kori velikog mozga i hipokampusu tokom starenja. U obe strukture uočen je trend koji je bio prisutan i u slučaju mTOR: značajno povećanje detektovano u 18 meseci starosti, nakon koga se ekspresija smanjivala do 24. meseca, rezultujući povratkom na vrednosti izmerene kod 6 meseci starih životinja. U poređenju sa ženkama starih 6 meseci AL grupe, kod 18-mesečnih ženki AL grupe ekspresija p70 S6K bila je 30% veća u kori velikog mozga ( $F_{(2, 12)} = 6,684$ ,  $p=0,0112$ , *post hoc*:  $p=0,0065$ ) i 50% veća u hipokampusu ( $F_{(2, 12)} = 3,783$ ,  $p=0,0532$ , *post hoc*:  $p=0,0330$ ) (Slika 4.38, A, B, beli stubići).

Režimi DR pokazivali su trend smanjenja ekspresije p70 S6K kod 18 meseci starih životinja, ali je značajna promena zabeležena samo u hipokampusu 18-mesečnih ženki KODR grupe, kod kojih je nivo ekspresije ovog proteina bio upola niži u odnosu na 18-mesečne ženke AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 11,53$ ,  $p=0,0016$ , *post hoc*:  $p=0,0010$ ) (Slika 4.38, B, srednji panel).



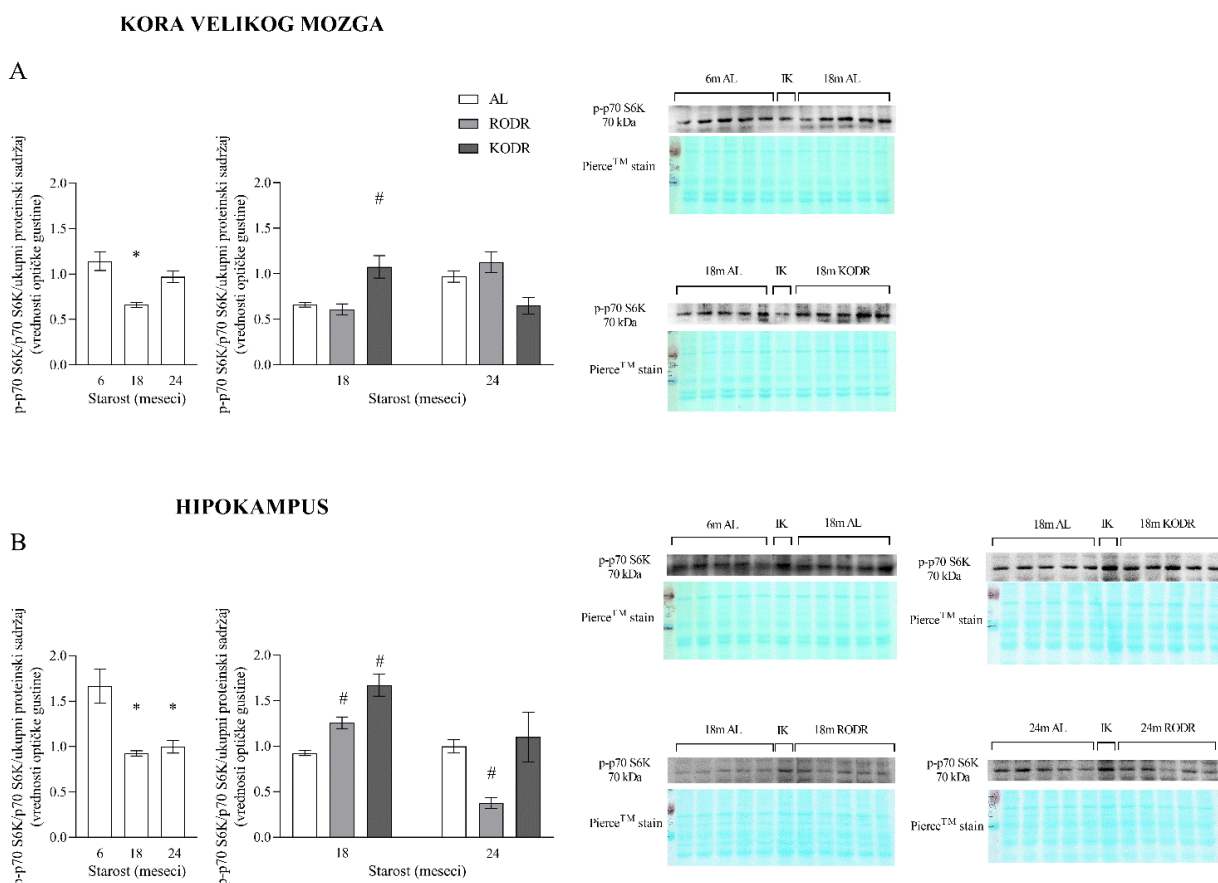
**Slika 4.38 Ekspresija p70 S6K na nivou proteina u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p < 0,05$  za efekat starenja, # $p < 0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.**

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

Fosforilacija p70 S6K smanjivala se tokom starenja, uprkos višem nivou ekspresije ukupne forme ovog proteina. Ženke stare 18 meseci imale su 40% niži odnos fosforilisanog i ukupnog p70 S6K u kori velikog mozga u poređenju sa 6 meseci starim ( $F_{(2, 12)} = 11,83, p=0,0015, post\ hoc: p=0,0008$ ), dok je u hipokampusu niža vrednost izmerena u obe starosne grupe ( $p=0,0021$ ) i bila je 55% manja u 18 meseci ( $post\ hoc: p=0,0094$ ) i 40% manja u 24 meseca starosti ( $post\ hoc: p=0,0267$ ) (Slika 4.38, A, B, beli stubići).

Stepen fosforilacije p70 S6K bio je 60% veći u kori velikog mozga 18-mesečnih ženki KODR grupe ( $F_{(2, 12)} = 10,07, p=0,0027, post\ hoc: p=0,0067$ ) u odnosu na starosno odgovarajuću kontrolu (Slika 4.38, A, srednji panel). U hipokampusu 18 meseci starih ženki je odnos p-p70 S6K/p70 S6K bio izmenjen kod obe DR grupe, odnosno bio je 35% viši kod ženki RODR grupe i 80% viši kod ženki KODR grupe ( $F_{(2, 12)} = 24, 74, p<0,001, post\ hoc: p=0,0126, p<0,001, redom$ ); u odnosu na 18-mesečne ženke AL grupe. (Slika 4.39, B, srednji panel).

Efekat RODR na stepen fosforilacije p70 S6K bio je uočen i kod 24 meseca starih ženki. RODR je smanjila odnos p-p70 S6K/p70 S6K u hipokampusu 24 meseca starih ženki za 60% u odnosu na vršnjakinje AL grupe ( $F_{(2, 12)} = 5,578, p=0,0194, post\ hoc: p=0,0386$ ) (Slika 4.39, B, panel desno).



**Slika 4.39 Odnos p-p70 S6K/ p70 S6K u kori velikog mozga i hipokampusu 6, 18 i 24 meseca starih ženki AL grupa i 18 i 24 meseca starih ženki RODR i KODR grupa.** Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. \* $p<0,05$  za efekat starenja, # $p<0,05$  za efekat režima ishrane u poređenju sa starosno odgovarajućom kontrolom sa slobodnim pristupom hrani.

AL: *Ad libitum*, RODR: rano otpočeta dijetalna restrikcija, KODR: kasno otpočeta dijetalna restrikcija, IK: interna kontrola

## 5. DISKUSIJA

Iako je napredak medicine i tehnologije doveo do produženja životnog veka, starenje svetske populacije je povećalo incidencu starosno zavisnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa 2, neurodegenerativna oboljenja, kancer i autoimunske bolesti (Most i sar., 2017). Ovakav trend promena povećao je interesovanje za intervencijama koje mogu produžiti zdrav životni vek, a ne samo dužinu života. Među intervencijama za odlaganje i usporavanje starosno zavisnih promena ističe se dijetalna restrikcija, kao najčešće primenjivana sredinska ne-farmakološka intervencija, čiji su korisni efekti dokumentovani na mnogo nivoa i koja pored toga što produžava dužinu života, produžava i tzv. zdrav životni vek, odnosno period života bez dijagnostifikovanih težih bolesti. Dijetalna restrikcija (DR) doprinosi i poboljšanju funkcije različitih organa i organskih sistema, između ostalog i nervnog, kako u animalnim modelima, tako i kod ljudi (Colman i sar., 2009; Speakman i Mitchell, 2011). Brojne studije ukazuju na protektivni efekat DR u usporavanju starosno zavisnog kognitivnog pada i razvoja neurodegenerativnih bolesti (Duan i sar., 2001; Lee i sar., 2000). Ovaj efekat DR ostvaruje kroz delovanje na ćelijskom i molekularnom nivou: podsticanjem neurogeneze i sinaptičke plastičnosti, održavanjem nivoa neurotrofina i neurotransmitera, smanjenjem oksidativnog stresa i inflamacije, kao i regulisanjem procesa autofagije. Ipak, rastući broj studija pokazuje da efekti DR nisu univerzalno pozitivni i zavise od više faktora, uključujući stepen restrikcije, trajanje DR, starosno doba u trenutku početka primene DR, pol, genetiku i zdravstveno stanje jedinke (Ingram i de Cabo, 2017; Todorovic i sar., 2018).

Starost jedinke u trenutku uvođenja DR predstavlja najvažniji među navedenim parametrima, obzirom da podaci ukazuju da uvođenje DR u jako ranom, kao i u kasnom životnom dobu može imati negativne posledice na dužinu i kvalitet života (Cardoso i sar., 2016; Todorovic i sar., 2018). DR otpočeta u ranom adultnom dobu, ima najveći korisni potencijal, i ukoliko se stepen umanjenja kreće u opsegu 10–40% ispod *Ad libitum* unosa najčešće ostvaruje pozitivan efekat kada su u pitanju odlaganje i usporavanje starosno zavisnih promena (Flanagan i sar., 2020; Speakman i Mitchell, 2011). Efekat primene DR kod osetljivijih starosnih grupa, poput adolescenata i starije populacije varira, i u nekim slučajevima može imati negativne posledice, kao što su povećana krhkost i poremećaji u memoriji (Todorovic i sar., 2018). Starosne i polne razlike dodatno komplikuju tumačenje efekata DR i zajedno sa činjenicom da složeni molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi delovanja DR još nisu u potpunosti opisani, otežavaju njenu primenu kao strategije za zdravo starenje.

U cilju proširivanja postojećeg znanja o efektima DR i detaljnog sagledavanja uticaja koji starost organizma i trajanje DR imaju na krajnji ishod primene DR, u ovoj tezi je ispitan efekat dugotrajne i kratkotrajne restrikcije hrane od 40%, uveden u ranom adultnom, kasnom adultnom i starom životnom dobu kod oba pola *Wistar* pacova. U ovoj tezi korišćeni su pacovi starosti 6 meseci, koji spadaju u kategoriju adulta (5-10 meseci starosti) a za koje je ekvivalentna starost humane populacije period od 25-40 godina. Grupe pacova starosti 15 i 18 meseci spadaju u grupu srednje dobi (period od 10 do 20 meseci), kome odgovara period od 40 do 65 godina kod ljudi, dok se pacovi starosti 20-24 meseca smatraju starim i odgovaraju ljudskoj dobi od 65 do 75 godina (Ghasemi i Jeddi, 2021). Efekat primenjenih režima ishrane ispitan je u više aspekata, praćenjem energetske potrebe organizma i promenama u telesnoj masi, praćenjem individualnih parametara koje doprinose fizičko-kognitivnom indeksu krhkosti organizma, sprovođenjem seta testova ponašanja za procenu kognitivnih funkcija i anksioznosti, i analizom ekspresije gena čiji se proteinski produkti potencijalno nalaze u osnovi mehanizma delovanja DR, konkretno receptori dopamina i molekuli mTOR signalnih puteva.

U cilju procene efekta DR na dužinu životnog veka i zdrav životni vek najpre je ispraćen stepen smrtnosti pacova oba pola svih eksperimentalnih grupa AL, RODR i KODR. Režimi DR imali

su gotovo identičan, pozitivan efekat na stepen preživljavanja kod oba pola, izuzev KODR uvedene u 21. mesecu života. Ova DR je dovela do preživljavanja 80% mužjaka i svega 50% ženki, što je bilo manje čak i u odnosu na AL grupu ženki iste starosti. Rezultati pokazuju da su ženke otpornije na proces starenja pri slobodnom pristupu hrani, te da im dodatni stresor u vidu uvođenja DR u starijem životnom dobu šteti, dok je kod mužjaka smrtnost na režimu slobodnog unosa hrane znatno veća, toliko da ovaj režim dijetalne restrikcije iako uveden kasno ima pozitivne efekte na preživljavanje. Jedno od mogućih objašnjenja leži u promeni metabolizma. Značajan skok u dnevnom unosu hrane kod mužjaka uočen je upravo u 21. mesecu, sugerišući da u ovoj tački mužjaci ulaze u „prejedanje“ što potencijalno pogoršava njihovo zdravstveno stanje. U radu autora Teofilović i saradnici (Teofilovic i sar., 2022), pokazano je da 24-mesečni mužjaci *Wistar* pacova AL grupe imaju znatno veći procenat belog masnog tkiva i veći udeo masnog tkiva u odnosu na telesnu masu, kao i povišen nivo slobodnih masnih kiselina, triglicerida i kortizola u odnosu na 6-mesečne *Ad libitum* hranjene životinje, dok KODR u starom životnom dobu vraća ove vrednosti na kontrolne. Povišen adipozitet je karakteristika starenja i gojaznosti. U oba stanja javlja se rezistencija na leptin, koja dovodi do poremećaja lipidnog metabolizma, osetljivosti ćelija na insulin i inflamacije (Bonzon-Kulichenko i sar., 2018). Uočeno povećanje telesne mase kod životinja koje imaju slobodan pristup hrani tokom celog života može biti posledica starosno zavisne rezistencije na leptin koja dovodi do izostajanja anoreksigenog efekta leptina i gubitka ravnoteže između procesa deponovanja masti i lipolize u adipocitima (Bonzon-Kulichenko i sar., 2018; Izquierdo i sar., 2019).

Li i saradnici pokazali su da kod mužjaka pacova između 3 i 24 meseca starosti dolazi do progresivnog porasta telesne mase, povećanja depoa gonadalnog i subkutanog belog masnog tkiva, i većeg indeksa adipoziteta, uprkos tome što se slobodni unos hrane nije menjao tokom starenja (Li i sar., 1997). Dodatno, kod ovih životinja uočen je veći nivo kako iRNK za leptin u belom masnom tkivu, tako i cirkulišućeg leptina. Kod humanih ispitanika muškog pola, uočeno je povećanje telesne mase od 25. do 50. godine života nakon čega sledi pad, dok kod žena težina nastavlja da se povećava do 70-tih godina (Hodge i Zimmet, 1994). Kada je reč o diskrepanci između unosa hrane i povećanja telesne mase jedno od objašnjenja sugerise da se energetska potrošnja smanjuje tokom starenja, (Li i sar., 1997), u prilog čemu govori i podatak da stariji pacovi imaju manju potrošnju kiseonika od mladih, što je uzeto kao mera termogenetske aktivnosti (Scarpacci i sar., 1994). U radu koji su sprovedeli Quiros Cognuck i saradnici životinje sa slobodnim pristupom hrani su klasifikovane kao gojazne počevši od drugog meseca u slučaju mužjaka i od 6. meseca u slučaju ženki (Quiros Cognuck i sar., 2020). Ovaj podatak objašnjava promene telesnih masa pod dejstvom RODR kod mužjaka i ženki u ovoj studiji: uvođenje DR kod 6 meseci starih ženki pomoglo je održavanje telesne mase do kraja eksperimentalnog perioda koja bi se, u slučaju *Ad libitum* načina ishrane sigurno vremenom povećavala; dok je kod mužjaka postojalo značajno inicijalno smanjenje telesne mase po uvođenju DR, nakon čega je sledila plato faza. Takođe, ženke su tokom starenja pokazale bolji lipidni profil i toleranciju na glukozu u poređenju sa mužjacima (Quiros Cognuck i sar., 2020). Uočene razlike u unosu hrane i telesnoj masi kod mužjaka i ženki mogu biti posledica hormonskih razlika, budući da testosteron povećava unos hrane, dok ga estrogeni smanjuju (Asarian i Geary, 2006, 2013). Iako je kod ženki uočeno smanjenje osetljivosti, odnosno odgovora na  $17\beta$ -estradiol (E2) tokom starenja, anoreksigeni efekat E2, odgovoran za manji unos hrane i telesnu masu, prisutan je kako kod mladih tako i kod ženki srednje dobi (Santollo i sar., 2012).

U studiji NIA, sprovedenoj krajem prošlog veka, pokazano je da je rano uvedena DR dovela do produženja životnog veka kod oba pola čak četiri soja miševa i tri soja pacova (Turturro i sar., 1999). Međutim, u slučaju kasnijeg početka DR rezultati su nešto drugačiji. Jiang i saradnici u svojoj studiji na mišjem modelu pokazali su da je DR sa ranim početkom, u 5. mesecu starosti, bila efikasna kod mužjaka i ženki kada je u pitanju produženje životnog veka, iako sa značajnim polnim razlikama (54% kod mužjaka i 18% kod ženki). Sa druge strane DR sa kasnim početkom, u 20. mesecu, produžila je životni vek mužjaka za samo 1,4% a ženki za 16% (Jiang i sar.), što ukazuje da kasniji početak DR značajnije smanjuje potencijal DR da produži životni vek kod mužjaka nego kod ženki. Smanjenje unosa kalorija kod 18 meseci starih mužjaka *Long Evans* pacova nije produžilo njihov

životni vek (Lipman i sar., 1995), dok je kasni početak DR, u 24. mesecu značajno povećao stopu smrtnosti kod mužjaka čak 3 soja miševa (Forster i sar., 2003; Turturro i sar., 1999). Uzimajući u obzir navedene studije može se zaključiti da kod ženki početak dijetalne restrikcije nema presudnu ulogu u efektima na preživljavanje, dok je kod mužjaka taj uticaj dramatičan.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su da je efekat RODR, otpočete sa 6 meseci starosti, bio isti kod mužjaka i ženki u obe starosne grupe, kao i KODR otpočet sa 15 meseci starosti. Značajno drugačiji rezultat zabeležen je u slučaju 24-mesečnih ženki KODR grupe, gde je preživljavanje bilo znatno lošije kod ženki u odnosu na mužjake. Drugačiji trend promena kod ženki i mužjaka u odnosu na gorepomenute studije može biti posledica toga što se pacovi i miševi značajno razlikuju kada su u pitanju telesna masa, deponovanje masnih rezervi, metabolizam i potrošnja energije, što se odražava i na starenje i efekat koji tretmani poput DR ostvaruju kod svakog od njih (Maric i sar., 2022).

Takođe, u ovoj studiji, ženke su pokazale viši stepen preživljavanja u odnosu na mužjake pri slobodnom pristupu hrani. Viši stepen preživljavanja ženki u odnosu na mužjake je uočen kod svih sisarskih vrsta (Borras i sar., 2007). Jedno od objašnjenja ove pojave dato je u mitohondrijskoj teoriji starenja, odnosno činjenici da mitohondrije ženki proizvode upola manje vodonik peroksida nego mitohondrije mužjaka (Borras i sar., 2007). Takođe, vezivanje estrogena za estrogenske receptore dovodi do aktivacije signalnih puteva posredovanih MAP kinazama (engl. *mitogen activated protein*, MAP) i NfκB, rezultujući pozitivnom regulacijom antioksidativnih enzima mangan superoksid dismutaze (engl. *manganese superoxide dismutase*, Mn-SOD) i glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GPx) zbog čega ženke imaju znatno niži stepen oksidativnog oštećenja mitohondrijske DNK i glutationa u odnosu na mužjake (Borras i sar., 2007).

Slobodno hranjene ženke pokazuju višu energetska potrošnju i lošiju energetska efikasnost u odnosu na mužjake (Valle i sar., 2005). Veća energetska potrošnja kod ženki je posledica više stope bazalnog metabolizma i višeg praga temperature na kojoj se aktivira proces termogeneze. Obzirom da tokom izlaganja DR, gubitak mišićne mase kod ženki odgovara onom koji je uočen kod mužjaka, pri čemu ne dolazi do gubitka mase metabolički aktivnih organa, kao ni do smanjenja fizičke aktivnosti, verovatno je da se smanjenje energetske potrošnje ostvaruje najpre inaktivacijom mrkog masnog tkiva kao efektoru nedrhteće termogeneze (Valle i sar., 2005). U novijoj literaturi pokazano je da polni hormoni igraju ulogu u aktivaciji mrkog masnog tkiva, pri čemu estrogeni imaju stimulatorni, dok androgeni ispoljavaju inhibitorni efekat na aktivaciju mrkog masnog tkiva (Kaikaew i sar., 2021). Mrko masno tkivo kod ženki doprinosi boljoj aklimatizaciji na promene unosa energije. U slučaju povišenog unosa masti i šećera, ekspresija proteina koji doprinose termogenetskoj aktivnosti je veća u mrkom masnom tkivu ženki u odnosu na mužjake. Suprotno, u slučaju kalorijske restrikcije kod ženki se uočava značajnije smanjenje termogenetske aktivnosti nego kod mužjaka, što dovodi do smanjenje energetske potrošnje i očuvanja mase i funkcije metabolički zahtevnih organa. (Kaikaew i sar., 2021). Obzirom da tokom starenja dolazi do smanjenja mase i termogenog kapaciteta MMT (McDonald i sar., 1988), moguće je da su zabeleženi rezultati kod 24-mesečnih ženki KODR grupe posledica upravo toga što je kod 21 mesec starih ženki AL grupe energetska unos već bio smanjen, odnosno prilagođen manjoj energetska potrošnji organizma sa smanjenom masom i funkcijom MMT. Po uvođenju u DR, ovakve životinje nisu imale mogućnost kompenzacije deficita energije neophodne za održavanje metaboličkih funkcija.

Navedene promene u telesnoj masi, kao i masi mišićnog i masnog tkiva govore o statusu organizma i efektu koje određene intervencije imaju, a ujedno su i parametri koji uz druge, fizičke i kognitivne parametre, ulaze u formulu za procenu krhkosti (Xue, 2011). Krhkost nije neizbežna posledica starenja već reverzibilni gerijatrijski sindrom (Capurso, Bellanti et al. 2019), te kao takav može biti modifikovan različitim intervencijama za odlaganje i usporavanje starosno zavisnih promena.

Poznato je da u humanoj populaciji žene žive duže od muškaraca uprkos većem stepenu krhkosti (Kane i sar., 2017). Ova pojava poznata je kao muško-ženski paradoks preživljavanja

(Gordon i sar., 2017), a razlog ovakve pojave između ostalog leži i u tome što se fiziološke rezerve kod muškaraca više troše za poboljšanje performansi i kvaliteta života, kao i u tome što žene danas u proseku imaju malobrojnije potomstvo nego u prošlosti (Heinze-Milne i sar., 2019). Osim toga, može biti i posledica dizajna testa koji je korišćen za procenu krhkosti (Heinze-Milne i sar., 2019). Polne razlike u animalnim modelima su nekonzistentne, budući da iako pretežno ženke pokazuju veću krhkost, ima i drugačijih rezultata. Studije tri nezavisne grupe pokazale su da ženke miševa imaju veći stepen krhkosti u odnosu na mužjake (Antoch i sar., 2017; Keller i sar., 2019; Whitehead i sar., 2014), dok su sa druge strane Kane i saradnici (Kane i sar., 2016) kao i Parks i saradnici (Parks i sar., 2012) u svojim studijama pokazali da kod miševa ne postoji značajna razlika u stepenu krhkosti među polovima. U ovoj studiji je kod oba pola došlo do povećanja indeksa krhkosti (FI) tokom starenja. Iako su i 18-mesečne i 24-mesečne ženke AL grupe imale značajno veći indeks od slobodno hranjenih 6-mesečnih ženki, nije bilo karakterističnog porasta između 18. i 24. meseca uočenog kod mužjaka. To ukazuje da ženke dostižu maksimalni stepen krhkosti ranije nego mužjaci, što govori u prilog paradoksu preživljavanja mužjaka i ženki. Ovakvi oprečni rezultati studija ukazuju da prilikom procene krhkosti kod glodara oba pola rezultati mogu varirati u zavisnosti od parametara koji se koriste za procenu, kao i od soja, naročito kada su u pitanju transgeni modeli kod kojih su mužjaci pretežno krhkiji od ženki (Kane i sar., 2018). Ono što je međutim nedvosmisleno pokazano, kako u ovoj, tako u drugim studijama, je da pol jedinke treba posmatrati kao bitan faktor u slučaju identifikacije biomarkera krhkosti (Yorke i sar., 2017) i efikasnosti različitih intervencija za odlaganje starosno zavisnih promena (Kane i sar., 2016).

Pol ima važnu ulogu u procesu starenja i odgovoru na sredinske intervencije koje taj proces modulišu, poput DR (Kane i sar., 2016; Le Couteur i sar., 2018). Kane i saradnici pokazali su da DR nije bila efikasna u odlaganju starosno zavisnih promena kod ženki miševa dva različita soja, dok je kod mužjaka uočen protektivan efekat. DR koja je trajala od 6 do 19 meseci života značajno je smanjila FI kod mužjaka C57BL/6J i DBA/2J miševa, dok kod ženki iste starosti nije imala efekta (Kane i sar., 2016). U ovoj studiji uočeno je smanjenje FI kod 18 meseci starih životinja oba pola. Ipak, kasnije u životu, kod 24 meseca starih životinja, protektivni efekat RODR održao se samo kod ženki, dok kod mužjaka uprkos pozitivnom efektu na pojedinačne parametre krhkosti, efekat DR nije bio značajan. Procena indeksa krhkosti u ovoj studiji pokazuje blagu prednost ženki u odnosu na mužjake, ali treba imati u vidu da se stepen krhkosti značajno razlikuje među eksperimentalnim modelima, kako tokom starenja tako i pod različitim sredinskim intervencijama kakva je i DR.

Činjenica da je KODR imala protektivna svojstva kada je uvedena sa navršenih 15 meseci života, a da je efekat izostao kada je uvedena kod 21 mesec starih životinja jasno upućuje na važnost trenutka uvođenja DR. Štaviše, iako na nivou trenda a bez statističke značajnosti, kod 24-mesečnih ženki je KODR dodatno pogoršavala vrednosti FI u odnosu na AL kontrolu. Može se pretpostaviti da detektovanim razlikama između mužjaka i ženki doprinose i razlike u nivou hormona stresa. Naime, poznato je da tokom starenja dolazi do povećanja bazalnog nivoa kortizola, odnosno kortikosterona (Garrido i sar., 2012; Lo i sar., 2000; Sapolsky i sar., 1983), a na šta je ukazala i ranija studija iz ove laboratorije (Tesic i sar., 2021). Takođe, zna se i da ženke generalno imaju više nivoe bazalnog i stresom-indukovanog kortikosterona uz slabiju negativnu povratnu spregu HHA osovine (Kaikaew i sar., 2019). Ovoj razlici dodatno doprinosi i to što ženke imaju viši nivo kortikosteron-vezujućeg globulina (engl. *Corticosteroid-Binding Globulin*, CBG), proteina koji vezuje 80% cirkulišućeg kortikosterona (Kaikaew i sar., 2019). Posledično, iako je nivo cirkulišućeg kortikosterona visok, on se najvećim delom nalazi u neaktivnom obliku, vezan za CBG. Ipak, tokom izlaganja stresorima skok nivoa slobodnog kortikosterona je viši kod ženki jer dolazi do oslobađanja kortikosterona od CBG. Pored starosno zavisnog povećanja, nivo cirkulišućeg kortikosterona se dodatno povećava u slučaju izlaganja DR (Dallman i Jones, 1973; Han i sar., 2001; Sabatino i sar., 1991). Imajući u vidu sve navedeno može se pretpostaviti da uvođenje DR kod starih ženki sa višim nivoom kortikosterona i sniženim nivoom CBG predstavlja dodatni stresor za organizam, koji će dodatno povećati nivo kortikosterona, zbog čega pored izostajanja uobičajenog protektivnog efekta DR nastupa i dodatno pogoršanje. Sa druge strane, uvođenje DR nešto ranije, tj sa 15 meseci, može pripremiti životinje na

nastupajuće stresore u starijem dobu, što objašnjava razliku u indeksu krhkosti između 18 i 24 meseca starih životinja koje su bile na istom, tromesečnom režimu DR.

Zbog eksperimentalnog dizajna koji podrazumeva žrtvovanje eksperimentalnih životinja u definisanim vremenskim tačkama, one nisu ostavljane da stare sve do trenutka spontane smrti, te ova studija ne raspolaže podacima o prirodnom mortalitetu, što predstavlja svojevrsno ograničenje uobičajnoj validaciji fizičko-kognitivnog indeksa krhkosti (Rockwood i sar., 2017; Rockwood i sar., 2005), koji podrazumeva da se visok stepen krhkosti životinje potvrdi njenim kraćim preživljavanjem u odnosu na životinju sa nižim stepenom krhkosti. Ipak, spontana smrtnost životinja je praćena tokom trajanja eksperimenta sve do trenutka žrtvovanja životinja i indirektno je pokazana korelacija sa stepenom krhkosti. U RODR grupama životinja kod kojih je FI bio manji, broj preživelih životinja se povećavao, dok je kasno otpočeta DR dovela do većeg FI i veće smrtnosti.

Ova studija potvrđuje da je krhkost multidimenzionalni sindrom, u čijoj karakterizaciji pored fizičkog, u obzir moraju biti uzeti i kognitivni parametri. Korelacija između performansi u dva kognitivna zadatka sa stepenom krhkosti dodatno naglašava značaj uključivanja kognitivne komponente u determinaciju indeksa krhkosti, dajući mnogo kompletniji uvid u zdravstveni status organizma.

Promene u motornim i kognitivnim parametrima korišćenim pri proceni indeksa krhkosti oslikavaju *per se* i promene u motorici i višim kognitivnim funkcijama- učenju i memoriji, koje se dešavaju tokom starenja. Ove promene mogu biti modulirane pod dejstvom DR, što je praćeno odgovarajućim testovima ponašanja. Test otvorenog polja omogućava analizu motoričkih sposobnosti životinje, koja se ogleda u obimu kretanja u areni testa otvorenog polja, dok propinjanje odnosno vertikalna aktivnost odražava istraživačko ponašanje. Sagledavanje oba ispitivana parametra daje uvid u sposobnost životinje da habituiru, odnosno da usled ponovnog izlaganja sredini sa kojom se već susrela koriguje stepen istraživačke aktivnosti, kao odraz sposobnosti učenja. Drugi test, odnosno test prepoznavanja novog predmeta, zasnovan na urođenoj sklonosti životinja ka novini (Taxier i sar., 2020) upotrebljen je za procenu kratkotrajne ali i dugotrajne memorije na osnovu vremena koje životinja provodi u istraživanju novih odnosno već poznatih predmeta.

Da se lokomotorna aktivnost glodara smanjuje tokom starenja pokazano je još u najranijim studijama u kojima je korišćen test otvorenog polja (John Archer, 1975; Furchtgott i sar., 1961). Međutim, kasnije sprovedene studije pokazale su da na ovaj rezultat utiču genetika, kao i soj i pol glodara koji je korišćen (Tachibana, 1986), ali i uslovi testiranja, odnosno da li se sprovodi u svetloj ili tamnoj fazi dana (Alstott i Timberlake, 2009). U studiji koju su sprovedeli Seliger i saradnici, pokazano je da tokom starenja obim kretanja ženki u testu otvorenog polja ostaje relativno isti (Seliger, 1977), što je potvrđeno i u ovoj studiji budući da među grupama ženki različite starosti nije bilo statistički značajne razlike u obimu kretanja prvog dana testiranja (rezultati nisu prikazani za ovo poređenje). Pored toga što mlade ženke nisu pokazale očekivano viši nivo istraživačke i lokomotorne aktivnosti u odnosu na starije jedinice, kod ove grupe nije uočeno ni smanjenje lokomotorne aktivnosti tokom 3 dana testiranja. Obzirom da je test otvorenog polja otpočinjan kada su mlade životinje bile u estrusu, fazi ciklusa u kojoj su ženke najaktivnije usled visokog nivoa estrogena, pad istraživačke aktivnosti u narednim danima testiranja bio bi očekivan, kako zbog procesa habituacije, tako i zbog prirodno manje aktivnosti u metestrusu i diestrusu (Vinogradova, 1999), posredovane padom nivoa estrogena u ovim fazama ciklusa (Stern i Zwick, 1972; Wollnik i Turek, 1988). Lokomotorna aktivnost se nije smanjivala ni kod 18-mesečnih ženki AL grupe. U prethodnim studijama iz ove laboratorije bilo je slučajeva da se kod adultnih mužjaka pad u lokomotornoj aktivnosti, odnosno habituacija, uočava tek četvrtog i petog dana (Todorovic i sar., 2018)(Todorović, 2019). U ovoj studiji je korišćena eksperimentalna paradigma gde se ponašanje životinja u testu otvorenog polja pratilo tokom 3 dana, što na žalost onemogućava poređenje sa prethodnim rezultatima i potvrdu hipoteze da je u pitanju neka odlika soja koji je korišćen. Ipak, međusesijska habituacija bila je jasno uočljiva kod 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe kao i 24-mesečnih ženki RODR grupe, pokazujući bolju sposobnost učenja kod životinja iz DR eksperimentalnih grupa. Sa druge strane, kod 24-mesečnih



ženki KODR grupe nije uočena habituacija ni u lokomotornoj ni u vertikalnoj aktivnosti. Ovakav rezultat pokazuje da rano otpočeta dugotrajna DR može značajno doprineti sposobnosti učenja i formiranja dugotrajne memorije, dok kasno uvedena DR pogoršava ove sposobnosti.

Kada je reč o unutar sesijskoj habituaciji, kod svih ispitivanih AL i DR grupa uočena je smanjena ambulatorna i vertikalna aktivnost u poslednjih 5 u odnosu na prvih 5 minuta testiranja, ukazujući na očuvanu sposobnost učenja i formiranja kratkotrajne memorije.

U literaturi postoje podaci koji ističu da mlađi pacovi ispoljavaju viši stepen anksioznosti pri izlaganju novoj sredini kakva je arena testa otvorenog polja u odnosu na starije životinje. Naime, Buechel i saradnici, u čijoj je studiji pokazano da stare životinje imaju blažu reakciju na stres na ponašajnom i molekularnom nivou usled smanjene responsivnosti HHA osovine, predstavili su starenje kao hronični stresor koji maskira efekat akutnih stresora kojima se životinje izlažu. Ovakva pojava, iako trenutno štiti stare jedinice od stresora, dugoročno gledano ima negativan uticaj jer onemogućava prilagođavanje na stresne uslove (Buechel i sar., 2014). Novinom uslovljena anksioznost može biti razlog smanjene istraživačke aktivnosti uočene kod 6-mesečnih i 18-mesečnih ženki AL grupe. U prilog tome govore i parametri anksioznosti iz testa otvorenog polja koji su pokazali da 6-mesečne slobodno hranjene ženke imaju značajno manji broj ulazaka i kraće vreme provedeno u centru arene testa otvorenog polja u odnosu na 24 meseca stare.

Takođe, ponašanje može biti izmenjeno uslovima gajenja i rukovanja životinjama. Izidio i saradnici u svojoj studiji u kojoj su testirali dva soja pacova, *Lewis* (LEW) i spontano-hipertenzivne pacove (engl. *spontaneously hypertensive rats*, SHR) pokazali su da se ponašanje životinja značajno razlikovalo u zavisnosti od položaja kaveza u odgajalištu, kao i u zavisnosti od toga da li je životinja neposredno pred testiranje bila u aktivnom ili pasivnom stanju (Izidio i sar., 2005). Smanjenje opšte motoričke aktivnosti i povišen nivo anksioznosti uočeni kod mladih ženki u ovoj studiji mogu biti posledica rukovanja životinjama tokom uzimanja vaginalnog brisa radi potvrde faze estrusnog ciklusa, koje je sprovedeno u ranim prepodnevnim satima na dan testiranja.

Praćenje defekacije je jedna od metoda za procenu emocionalnog ponašanja kod glodara, pri čemu ženke u proseku ostavljaju manje bolusa od mužjaka (J. Archer, 1975; Lovick i Zangrossi, 2021; Walsh i Cummins, 1976; Whimbey i Denenberg, 1967) što je u kombinaciji sa većom lokomotornom aktivnošću u studijama često interpretirano kao manja plašljivost ženki u odnosu na mužjake. Takođe, karakteristično je da se tokom uzastopnih dana testiranja broj bolusa smanjuje, što je uz smanjenje lokomotorne i vertikalne aktivnosti takođe karakteristika međusesijske habituacije. Među testiranim grupama ženki, životinje sa slobodnim pristupom hrani nisu pokazivale habituaciju kada je reč o broju bolusa. Habituacija je uočena kod 18 meseci starih ženki RODR i KODR grupe, kao i 24 meseca starih ženki RODR grupe, pokazujući da je DR značajno doprinela regulaciji straha kod ovih grupa. Duga dijeta sa ranim početkom rezultovala je habituacijom životinja u sva tri praćena parametra, kod obe starosne grupe. Kratka dijeta otpočeta sa navršenih 15 meseci života imala je protektivni efekat koji je parirao efektima duge dijeta u starosnoj grupi od 18 meseci.

Dok je kod ženki uočeno očekivano starosno zavisno pogoršanje kratkotrajne i dugotrajne memorije u testu prepoznavanja novog predmeta, stari mužjaci nisu imali lošije rezultate od mladih. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija, sa sličnom eksperimentalnom postavkom na Fisher-344 pacovima, pri čemu je pokazano da stari mužjaci pacova pokazuju bolje rezultate u testu dvostrukog prepoznavanja novog predmeta od mladih (Aktoprak, 2013; Gardner i sar., 2020). U svojim studijama autori Gardner i saradnici, i Korol i saradnici, pokazali su da je u regulaciju memorijskog odgovora u testu prepoznavanja novog predmeta uključen i strijatum, koji je manje osetljiv na proces starenja od hipokampusu (Gardner i sar., 2020; Korol i sar., 2019). Drugim rečima, tokom starenja uloga hipokampusu u procesima učenja gubi primat, dok se strijatum karakteriše očuvanim ili pojačanim doprinosom procesima učenja i pamćenja. Proces starenja, kao i izlaganje stresu i stimulusima koji izazivaju anksioznost, dovodi do promena u moždanim matricama procesa učenja i pamćenja, odnosno do preusmeravanja sa hipokampusnog na strijatumsko učenje

(Gold & Korol, 2012; Gruber & McDonald, 2012; Packard i Goodman, 2012, 2013; Sadowski, Jackson, Wiczorek, & Gold, 2009; Schwabe, 2013) te u tome verovatno leži objašnjenje zašto je kod starih mužjaka *Wistar* pacova detektovana očuvana kratkotrajna memorija.

Postavlja se naravno pitanje zašto ovakav efekat nije uočen kod ženki, odnosno zašto je kod njih postojalo kognitivno pogoršanje tokom starenja. Jedno od objašnjenja moglo bi biti da su uočene razlike u starosno zavisnim kognitivnim promenama kod mužjaka i ženki regulisane hormonski. Prethodno sprovedene studije su pokazale da postoje polne razlike u odgovoru glodara na test prepoznavanja novog predmeta (Cost i sar., 2012; van Goethem i sar., 2012). Iako u testovima za procenu memorije mužjaci uglavnom imaju bolje performanse od ženki (Jonasson, 2005; Luine, 2015), u testu prepoznavanja novog predmeta ženke sa nižim nivoom estrogena imale su rezultate slične mužjacima, dok su ženke sa višim nivoom estrogena imale bolje rezultate od mužjaka i ženki sa niskim nivoom estrogena (Cost i sar., 2012; van Goethem i sar., 2012). Navedeni podaci su u skladu sa rezultatima ove studije, budući da su mlade adultne ženke sa slobodnim pristupom hrani, a kod kojih je zbog uzrasta i nivo estrogena očekivano visok, imale bolji memorijski odgovor od starijih ženki kao i od mladih mužjaka. U velikom broju studija je potvrđeno da estrogeni imaju veliku ulogu u procesima učenja i pamćenja i da estradiol (E2) reguliše molekularne i ćelijske procese u hipokampusu i prefrontalnoj kori velikog mozga čime moduliše kognitivne funkcije poput učenja i memorije (pregledni rad Taxier i sar., 2020). Pad estrogena, koji se kod ženki dešava tokom starenja, narušava sinaptičku plastičnost u ovim moždanim strukturama, što dovodi do lošijih performansi u testovima za procenu memorije, kakav je test prepoznavanja novog predmeta. U prilog ovom rezultatu govore i studije u kojima su ženke ovarijektomisane u ranom adultnom dobu imale lošije rezultate u testu prepoznavanja novog predmeta od kontrolnih (Fonseca i sar., 2013; Wallace i sar., 2006), dok je egzogena primena estradiola poboljšala performans ovarijektomisanih ženki u ovom testu (Gresack i Frick, 2006; Inagaki i sar., 2010). Intrahipokampusna administracija E2 dovela je do povećanja gustine dendritskih trnova u hipokampusu 30 minuta nakon primene, a u prefrontalnoj kori velikog mozga 2 sata nakon primene, pokazujući da estradiolom-indukovana spinogeneza u hipokampusu dovodi do spinogeneze i u kori velikog mozga (Tuscher i sar., 2016). Pretpostavlja se da mehanizam kojim primena E2 u hipokampusu dovodi do povećanja gustine dendritskih trnova u kori velikog mozga leži u projekcijama neurona CA1 regiona hipokampusu, koje idu do ovog regiona kore. Administracija E2 doprinosi povećanju gustine dendritskih trnova i drugih moždanih regiona uključenih u učenje i memoriju, kao što je medijalna prečeaona kora velikog mozga (S. T. Yang i sar., 2014). Nekoliko signalnih kaskada učestvuje u estrogenima-regulisanom odgovoru u različitim moždanim strukturama uključujući MAPK/ERK (engl. *Mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase*, ERK) (Boulware i sar., 2013; Fan i sar., 2010; Fernandez i sar., 2008) i PI3K-Akt-mTOR (Fortress i sar., 2013; Taxier i sar., 2019). Pokazano je da je aktivacija ERK i mTOR u dorzalnem hipokampusu neophodna za estradiolom-posredovano poboljšanje performansi u testu prepoznavanja novog predmeta i konsolidacije memorije (Fortress i sar., 2013), dok primena rapamicina inhibira pozitivan efekat E2 na poboljšanje memorije (Fernandez i sar., 2008; Fortress i sar., 2013). Testosteron takođe reguliše više kognitivne funkcije (Romeo i sar., 2005; Schulz i Korz, 2010), ali se nasuprot naglom padu estrogena kod ženki, starosno zavisni pad testosterona kod mužjaka dešava postepeno (pregledni rad Meites i sar., 1980), što može biti razlog očuvanijeg memorijskog odgovora 24-mesečnih slobodno hranjenih mužjaka u testu procene novog predmeta, bez velikog pada u kognitivnim performansama između dve eksperimentalne grupe različite starosti.

Kada je reč o efektima dijete, prema rezultatima testa prepoznavanja novog predmeta, najbolji efekti RODR uočeni su kod 18 meseci starih ženki, obzirom da je ovaj režim ishrane sačuvao kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju, dok je KODR u ovoj starosnoj grupi čuvao samo kratkotrajnu memoriju.

Prethodne studije su pokazale da različiti molekularni mehanizmi leže u osnovi krakotrajne i dugotrajne memorije (Vogel-Ciernia i sar., 2013). Rezultati ove studije pokazali su da 3 meseca duga DR otpočeta u srednjoj dobi ne može da utiče na već nastali starosno zavisni pad u dugotrajnoj

memoriji, dok isti režim uveden u kasnoj dobi dodatno pogoršava rezultate testiranja i kratkotrajne i dugotrajne memorije u odnosu na *Ad libitum* hranjene kontrole, ukazujući da uvođenje DR u ovom životnom periodu može dovesti do značajnog pogoršanja kognitivnih performansi. U preglednom radu autora Dias i saradnika istaknuto je da efekat DR može varirati zavisno od stepena restrikcije, dužine trajanja i vremena sprovođenja DR, pokazujući da su pozitivni efekti na kogniciju kod svih eksperimentalnih modela od mušica do primata bili prisutni samo kada je DR uvedena rano tokom života (Dias i sar., 2020). Dodatno, pokazano je da čak i kratkotrajna DR može biti efikasna u čuvanju funkcije učenja i memorije u slučaju starosno zavisnih patologija nervnog sistema, kao što su Alchejmerova i Parkinsonova bolest, kada je uvedena kod mladih adultnih PDAPP-J20 miševa, genetski modifikovanih životinja koji eksprimiraju humani prekursor amiloidnog proteina, APP (Gregosa i sar., 2019) i kod miševa sa Tau patologijom (Brownlow i sar., 2014).

Iznenadujuće, pomenuta protektivna svojstva DR na memorijski odgovor uočena su samo kod ženki, dok je kod mužjaka bio uočljiv samo negativni efekat tromesečnog režima DR otpočetog u kasnom adultnom periodu. Veći benefit DR na očuvanje memorije kod ženki u odnosu na mužjake pacova tokom starenja se najverovatnije ponovo može objasniti ulogama estrogena, odnosno efektima DR na procese regulisane estrogenima poput neuroinflamacije, oksidativnog stresa i metaboličkih puteva (Villa i sar., 2016). Poznato je da DR odlaže i usporava starosno zavisni gubitak receptora za estrogene, održavajući estrogenima regulisane procese (Yaghmaie i sar., 2005), tako da uvođenje DR oponaša efekat egzogene primene estrogena (Hajjalizadeh i sar., 2022). Moguće je da u ovoj studiji ženke pacova koje imaju slobodan pristup hrani, tokom starenja doživljavaju značajniji gubitak kognitivnih sposobnosti usled smanjenja nivoa estrogena, dok uvedeni režimi DR ublažavaju ove promene, održavanjem nivoa ekspresije estrogenskih receptora i zaštitom mozga od stresora koji prate starenje. Prisustvo estrogena smanjuje oksidativni stres, inhibira apoptotske puteve i pospešuje energetske metabolizam u neuronima čime doprinosi očuvanju moždane funkcije tokom starenja. Smanjenje nivoa estrogena povezano je sa povećanom osetljivošću mozga na različite stresore poput inflamacije i oksidativnog oštećenja, procesa koji doprinose kognitivnom padu (Albert i Newhouse, 2019; Viña i sar., 2013). S druge strane, mužjaci koji imaju znatno manju fluktuaciju hormona kao i manji porast neuroinflamacije i oksidativnog stresa tokom starenja (Cyr i de Rivero Vaccari, 2023), pokazuju očuvaniji memorijski odgovor tokom starenja ali istovremeno nemaju benefit DR, barem kada su u pitanju rezultati ovog testa, što rezultuje sličnim performansama između AL i DR grupa životinja iste starosti.

Uprkos postojanju diskrepance između rezultata testa prepoznavanja novog predmeta, koji je pokazao očuvan memorijski odgovor kod mladih ženki, i testa otvorenog polja koji je pokazao smanjeno istraživačko ponašanje ovih životinja i izostanak habituacije, rezultati dobijeni u primenjenim testovima ponašanja nisu oprečni. Testom otvorenog polja procenjuje se neasocijativna prostorna memorija, odgovorna za proces habituacije, dok test prepoznavanja novog predmeta meri deklarativnu, eksplicitnu memoriju, koja predstavlja sposobnost prepoznavanja prethodno naučenih objekata i iskustava (Reus i sar., 2008). Različiti rezultati u ova dva testa uočeni su i ranije. Intrahipokampusno aplikovan rapamicin, inhibitor mTOR kinaze koji ispoljava efekte slične DR, doveo je do pogoršanja rezultata u testu prepoznavanja novog predmeta za procenu dugotrajne memorije, dok kratkotrajna memorija u testu prepoznavanja novog predmeta kao ni istraživačko ponašanje i ponašanje nalik anksioznom nisu bili izmenjeni ovim tretmanom (Myskiw i sar., 2008). Ovakvi rezultati ističu da pojedini tipovi memorije postaju nestabilni nakon inicijalnog prisećanja i zahtevaju još jedan ciklus sinteze proteina za proces rekonsolidacije memorije, kako bi se uskladištili u dugotrajnoj memoriji (Tronson i Taylor, 2007). Proteini neophodni u ovom procesu spadaju u gene ranog odgovora i transkripcione faktore (poput c-FOS, Egr-1 (engl. *Early Growth Response 1*) i CREB (engl. *cAMP Response Element-Binding Protein*), protein kinaze (CaMKII (engl. *Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II*), PKA, MAPK), neurotrofine (BDNF) i proteine uključene u remodelovanje sinapsi (ARC (engl. *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) i proteini ubikvitin-proteazomskog sistema) Prethodno pomenuta mTOR signalna kaskada koja je

uključena u molekularne odgovore izazvane estrogenima, ima dodatnu važnu ulogu u ovoj eksperimentalnoj paradigmi. Naime mTOR integriše signale o dostupnosti hranljivih materija i faktora rasta i pokreće nishodne puteve putem dva različita proteinska kompleksa, mTOR kompleksa 1 (mTORC1) i mTOR kompleksa 2 (mTORC2), koji regulišu različite ćelijske procese povezane sa rastom, diferencijacijom i metaboličkom homeostazom (Shimobayashi i Hall, 2014). Menjajući sintezu proteina preko 4E-BP inicijatora translacije ili fosforilaciju supstrata preko kinaze koja aktivira ribozomalni protein S6, p70-S6K, faktori koji modulišu aktivnost mTORC1 istovremeno utiču i na metaboličke procese koji podrazumevaju sintezu nukleotida, metabolizam lipida i funkciju mitohondrija (Papadopoli i sar., 2019; Saxton i Sabatini, 2017). U većini ćelija, inhibicija mTOR rapamicinom dovodi do znatnog smanjenja fosforilacije p70-S6K dok je uticaj na fosforilaciju 4E-BP znatno manji (Kang i sar., 2013; Yoon i Roux, 2013). Dodatno, aktivacija mTOR signalnog puta u neuronima zavisi i od statusa NMDA i AMPA jonotropnih receptora za glutamat, BDNF, dopaminskih i metabotropnih receptora za glutamat (mGluR), koji su uključeni u regulaciju dugotrajne potencijacije i dugotrajne depresije (pregledni rad Graber i sar., 2013), što mTOR čini jednim od posrednika u regulaciji sinaptičke plastičnosti.

Podaci koji govore o uticaju DR na kognitivne promene posredovane aktivacijom odnosno inhibicijom mTOR signalnog puta su brojni i oprečni. U studiji Teng i saradnika, redukcija kalorijskog unosa od 40% tokom 8 nedelja nije imala uticaj na performanse mladih (4 meseca) i starih (24 meseca) C57BL/6 miševa u testu otvorenog polja, dok je u testu prepoznavanja novog predmeta uočena bolja dugotrajna memorija kod miševa obe grupe u odnosu na AL kontrolne (Teng i sar., 2019). U istoj studiji pokazano je da se 2 nedelje po vraćanju na AL režim ishrane gubi protektivni efekat DR na dugotrajnu memoriju, te životinje imaju iste rezultate u testu prepoznavanja novog predmeta kao AL kontrole, što implicira da je za efekat DR na memoriju neophodna njena hronična primena (Teng i sar., 2019). U istoj studiji je pokazano da je DR uzrokovala inhibiciju fosforilacije p70 S6K, ali ne i fosforilacije Akt, i da je primena analoga rapamicina mTOR smanjila razgranatost i dužinu dendrita, povećala gustinu dendritskih trnova i doprinela normalnoj gustini CA1 piramidalnih hipokampusnih neurona. U studiji Ma i saradnika, poboljšanje u hipokampus-zavisnom učenju uočeno u DR grupama je takođe bilo praćeno smanjenjem nivoa fosforilacije mTORC1 i p70 S6K (Ma i sar., 2015). Yang i saradnici pokazali su da je protektivni efekat DR na starosno zavisne kognitivne deficite C57BL/6 miševa bio praćen inhibicijom mTORC1 signalnog puta i aktivacijom autofagije u hipokampusu, ali i da je tokom starenja došlo je do smanjenja procesa autofagije nezavisno od negativne regulacije od strane mTORC1. Obzirom da se i aktivacija ovog signalnog puta smanjivala tokom starenja autori su došli do zaključka da do patološkog starenja ne dolazi usled hiperaktivacije mTORC1, već usled nedovoljnog starosno zavisnog smanjenja njegove aktivacije (F. Yang i sar., 2014). U testu pasivnog izbegavanja, koji je uključivao treniranje životinja odnosno učenje, u hipokampusu životinja uočena je povišena fosforilacija mTOR na serinskom ostatku na poziciji Ser2448, kao i fosforilacija p70 S6K, što označava aktivirano stanje mTORC1 (Bekinschtein i sar., 2007). Istovremeno, inhibicija fosforilacije mTOR intrahipokampusnim aplikovanjem rapamicina pre treniranja životinje smanjila je fosforilaciju p70 S6K za 60% i narušila sposobnost pamćenja. Ovaj tretman je značajno narušio dugotrajnu, ali nije imao efekta na kratkotrajnu memoriju, što ukazuje da mTOR aktivacija utiče više na konsolidaciju nego na formiranje memorije. Narušena konsolidacija memorije je bila prisutna i 7 dana nakon tretmana, što ukazuje na dugotrajnost efekta tretmana rapamicinom na sposobnost pamćenja (Bekinschtein i sar., 2007), kao i na razliku u trajanju efekata DR i rapamicina (Teng i sar., 2019), bez obzira što rapamicin i DR ispoljavaju slične efekte.

Poznato je da u uslovima optimalnog energetskeg statusa PDK fosforiliše Akt na poziciji Thr308, koja aktivirana zatim fosforiliše mTOR na Ser2448, aktivirajući time mTORC1 i sledstveno nishodnu kinazu p70 S6K, koja učestvuje u energetski zahtevnim biosintetskim procesima. Aktivirana p70 S6K takođe vrši inhibiciju IRS-1, ključnog regulatora PI3K/Akt, te ova inhibicija posledično smanjuje PI3K posredovanu produkciju PIP3, a samim tim i fosforilaciju Akt Thr308 i

aktivaciju mTORC2. Usled smanjenje aktivacije mTORC2 smanjuje se fosforilacija Akt Ser473 neophodne za punu aktivnost Akt, što dovodi do narušene Akt signalizacije i poremećaja metabolizma ćelije (Bai i Jiang, 2010). Nasuprot inhibitornom efektu koji aktivnost mTORC1 ostvaruje na mTORC2, aktivnost mTORC2 fosforilacijom Akt Ser473 i samim tim inhibicijom TSC2 stimuliše aktivnost mTORC1 (pregledni rad Szwed i sar., 2021). Iako su podaci o statusu aktivacije mTORC2, tokom starosno zavisnih promena u kognitivnim funkcijama oskudni, u skorijim studijama razmotrena je i njegova uloga zajedno sa kompleksom 1. Aktivacija mTORC2 je takođe povećana tokom procesa učenja, što se manifestuje povećanom fosforilacijom Akt na Ser473, koja izostaje u eksperimentalnom mišjem modelu kod koga je uklonjena mTORC2 aktivnost u ekscitatornim neuronima. Štaviše, kod ovih miševa ne dolazi do uspostavljanja dugotrajne potencijacije, zbog čega posledično ispoljavaju problem sa učenjem i formiranjem dugotrajne memorije, što implicira važnu ulogu funkcionalnog mTORC2 kompleksa u ovim procesima (Huang et al. 2013).

U ovoj studiji, inhibicija fosforilacije mTOR na Ser2448 detektovana je u kori velikog mozga i hipokampusu 18 meseci starih mužjaka na oba režima DR (RODR i KODR), uprkos tome što je fosforilacija ushodne Akt na Thr308 bila inhibirana samo u hipokampusu, dok je u kori velikog mozga postojao trend povećanja, iako bez statističke značajnosti. Moguće je da je inhibicija fosforilacije Akt na Thr308 i nishodnog mTOR na Ser2448 u hipokampusu posledično smanjila fosforilaciju mTOR i u kori velikog mozga zahvaljujući projekcijama CA1 neurona hipokampusa. Iako se mTORC1 i mTORC2 nalaze u međusobnoj dinamičkoj regulaciji u zavisnosti od energetske zahteva ćelije, promene u fosforilaciji mTOR na Ser2481 i Akt na Ser473 nisu pratile promene uočene u fosforilaciji Akt na Thr308 i mTOR na Ser 2448, ukazujući da se inhibicija mTORC1 u ovim strukturama dešavala nezavisno od aktivacije mTORC2. Dodatno, kod 18-mesečnih mužjaka RODR i KODR grupe uočena je povišena ekspresija ukupne forme p70 S6K dok se odnos p-p70 S6K/p70 S6K nije menjao. Uočena promena može biti rezultat kompenzatornih mehanizama sistema koji u uslovima hronično sniženog energetskeg statusa usled hronično inhibirane aktivnosti mTORC1, nastoji da poveća ekspresiju proteina neophodnih za sinaptičku funkciju, uključujući presinaptičke i postsinaptičke proteine kao i proteine citoskeleta, strukturne proteine i receptore neurotransmitera (Berven i sar., 2004; Lee i sar., 2005; Thomas i sar., 2005) koji su direktno ili indirektno regulisani aktivnošću S6K. Iako se inhibicija mTORC1 signalnog puta smatra protektivnom kada je reč o dužini životnog veka i toku starosno zavisnih promena uključujući i promene u kognitivnim performansama (Ma i sar., 2015; Teng i sar., 2019; F. Yang i sar., 2014), moguće je da prekomerna inhibicija usled deprivacije nutrijenata može imati negativne posledice kada je reč o strukturama koje zahtevaju intenzivnu sintezu proteina. Dobro je poznato da formiranje dugoročne memorije zahteva sintezu proteina (Squire i Davis, 1981). Stoga, obzirom na važnu ulogu mTORC1 u kontroli sinteze proteina, nije iznenađujuće da inhibicija mTORC1 rapamicinom blokira formiranje dugoročne memorije (Bekinshtein i sar., 2007; Belelovsky i sar., 2009; Blundell i sar., 2008; Deli i sar., 2012; Gafford i sar., 2011; Glover i sar., 2010; Halloran i sar., 2012; Jobim i sar., 2012; Parsons i sar., 2006; Tischmeyer i sar., 2003). Verovatno najubedljiviji dokazi dolaze iz istraživanja na mTOR<sup>+/-</sup> miševima, gde je pokazano da i konsolidacija i rekonsolidacija memorije bivaju blokirane primenom nižih koncentracija rapamicina, direktno povezujući dejstvo rapamicina na memoriju sa mTOR signalizacijom (Stoica i sar., 2011).

Mušjaci RODR i KODR grupe stari 18 meseci, kod kojih je uočena inhibicija mTORC1 signalizacije, uprkos uočenim benefitima DR na stepen krhkosti i dugovečnost, nisu pokazali bolji rezultat u testu kratkotrajne i dugotrajne memorije. Nasuprot ovim promenama, u hipokampusu i kori velikog mozga 24-mesečnih mužjaka KODR grupe uočeno je povećanje stepena fosforilacije Akt na Thr308 u hipokampusu i mTOR na Ser2448 u hipokampusu i kori velikog mozga, koje je bilo praćeno i povećanim stepenom fosforilacije p70 S6K u hipokampusu. Iako ovi rezultati ukazuju na povišenu sintezu proteina u ispitivanim strukturama, ova grupa imala je najlošiji rezultat u kognitivnim testovima. Hiperaktivacija mTOR signalnih puteva uočena je i tokom fiziološkog starenja mužjaka sa slobodnim pristupom hrani, iako je ova promena bila izraženija kod 18 meseci starih nego kod 24

meseca starih životinja. I u drugim studijama detektovana je povišena proteinska ekspresija sinaptičkih i dendritskih markera kao što su PSD-95 (engl. *Postsynaptic density protein-95*), sinaptofizin, MAP2, (engl. *Microtubule-associated protein 2*), i N-kadherin. koja je bila u korelaciji sa lošijim kognitivnim statusom (Baazaoui i sar., 2017; Barbosa-Silva i sar., 2022; László i Lele, 2022; Preissmann i sar., 2012). Povišena ekspresija presinaptičkih proteina sinaptofizina, GAP43, alfa-sinukleina i postsinaptičkog proteina PSD-95 uočena je u kori velikog mozga 24 meseca starih mužjaka *Wistar* pacova, izloženih tromesečnom režimu DR, iako nivo iRNK nije bio povišen (Prvulovic i sar., 2024). Povišena ekspresija sinaptičkih markera može ukazivati na promene u sinaptičkoj platičnosti, koja se može javiti u slučaju nutritivnih intervencija u kojima sistem stalno teži kompenzatornoj promeni. Po uspostavljanju funkcionalnih sinapsi ekspresija sinaptičkih proteina se smanjuje dok se u slučaju neadekvatne sinaptičke aktivnosti ekspresija proteina i dalje povećava u pokušaju da se nadomesti manjak funkcionalnih sinapsi. Takođe, u fiziološkim uslovima, višak sintetisanih proteina koji ne doprinosi funkcionalnosti sinapsi podleže degradaciji, dok izlaganje stresu poput kasno uvedene DR, dovodi do povećanja nivoa proteina u ćeliji, verovatno usled izmenjene funkcije sistema za degradaciju proteina, između ostalog smanjenog procesa autofagije čija je funkcija inhibirana u slučaju hiperaktivacije mTORC1 signalnog puta koja je uočena kod 24-mesečnih mužjaka KODR grupe. Naravno, treba imati na umu da sinaptička plastičnost predstavlja složen proces i nije regulisana samo aktivnošću mTORC1 signalnog puta. Aktivnost mTORC1 obezbeđuje proteine neophodne za sinaptičku plastičnost dok su dodatni mTORC1 nezavisni signalni putevi neophodni za formiranje plastičnosti (Graber i sar., 2013). Drugim rečima, iako je pokazano da će uvođenje DR dovesti do povećanja ekspresije sinaptičkih proteina, dodatni mehanizmi, neophodni za uspostavljanje sinaptičke plastičnosti, nisu pozitivno regulisani ovom intervencijom.

Uprkos uočenom smanjenju fosforilacije Akt na Thr308 i mTOR na Ser2448 u kori velikog mozga 18 meseci starih ženki podvrgnutih režimima DR, u hipokampusu nije detektovano smanjenje fosforilacije Akt na Thr308 kao i mTOR na Ser2448, dok je fosforilacija nishodnog supstrata p70 S6K na poziciji Ser434 bila povišena. Upravo kod ove dve grupe 18-mesečnih ženki, RODR i KODR, uočen je očuvan memorijski odgovor u gore pomenutom testu prepoznavanja novog predmeta. Ponovo, jedno od mogućih objašnjenja uočenih polnih razlika može biti vezano za estrogene, odnosno mogućnost da se protektivni uticaj DR odvija kroz promenu estrogenske signalizacije i posledične regulacije sinaptičke plastičnosti (Tuscher i sar., 2016). U studiji autora Veder i saradnika, povišen nivo E2 poboljšao je sinaptičku plastičnost i memoriju, i stimulisao proces dugotrajne potencijacije (Vedder i sar., 2013) koji je doprineo boljim rezultatima u kognitivnim zadacima oslonjenih na funkciju hipokampusa. Poznato je da spinogeneza zahteva sintezu proteina a brzina kojom egzogena primena E2 reguliše spinogenezu implicira da se sinteza proteina odvija mehanizmima za lokalnu sintezu proteina na nivou samih dendrita, koja je regulisana mTOR signalizacijom (Hoeffler i Klann, 2010). Iako je inhibicija mTOR signalnog puta povezana sa brojnim benefitima DR, moguće je da je pozitivna regulacija mTOR od strane estrogena zapravo odgovorna za izostanak inhibicije mTOR u hipokampusu ženki pod dejstvom DR i posledično regulisanu dugotrajnu sinaptičku potencijaciju, koja je odgovorna za bolji memorijski odgovor ženki u zadacima za procenu deklarativne memorije u odnosu na mužjake.

Tokom starenja je kod ženki detektovan trend smanjenjafosforilacije ispitivanih proteina, sa izuzetkom fosforilisane forme Akt na Ser473 čiji je nivo bio povišen u hipokampusu i kori velikog mozga 18-mesečnih i 24-mesečnih *Ad libitum* hranjenih životinja. Kako nivo fosforilacije mTOR na Ser2481 nije bio povišen u ovim eksperimentalnim grupama, uočena fosforilacija Akt verovatno je regulisana nekom drugom kinazom (Sarbasov i sar., 2005).

Hiperaktivacija sinteze proteina zavisne od mTORC1 u mozgu tokom starenja može dovesti do akumulacije inkluzionih tela povezanih sa neurodegenerativnim bolestima kao što su Alchajmerova, Hantingtonova i Parkinsonova bolest. U ovom kontekstu, inhibicija mTORC1 može imati protektivni efekat blokiranjem translacije proteina i podsticanjem autofagije (Bové i sar., 2011; Laplante i Sabatini, 2012). Međutim, dugotrajna ili prekomerna inhibicija sinteze proteina zavisne od

mTOR-a može narušiti sposobnost učenja i pamćenja. Stoga je precizna regulacija aktivnosti mTOR-a, kako bi se izbegla hipo- ili hiperaktivacija, neophodna za optimalnu kognitivnu funkciju tokom celog života.

Diskrepanca u ponašajnom odgovoru među polovima uočena je i iz rezultata dobijenih u testovima za procenu ponašanja nalik anksioznom. Ponašanje nalik anksioznom u ovoj studiji procenjivano je testom otvorenog polja i testom svetlo tamne kutije.

Među oskudnim studijama o uticaju DR na ponašanje nalik anksioznom ima kontradiktornih tvrdnji. Kratkotrajna DR (do deset dana) u kojoj je životinjama hrana bila dostupna 2 sata dnevno rezultovala je smanjenjem ponašanja nalik anksioznom kod odraslih mužjaka pacova, a efekat ovog režima ishrane zadržao se i nakon vraćanja na AL unos kalorija (Inoue i sar., 2004). Druge studije pokazale su da kratkotrajna primena DR na način da se životinje održavaju na 85% svoje prvobitne telesne mase, a u trajanju od 7 dana, ima polno specifične efekte na stepen anksioznosti, delujući anksiolitički kod adultnih mužjaka, ali ne i ženki (Genn i sar., 2003). Ista grupa autora pokazala je da sedmodnevna restrikcija hrane dovodi do smanjenja ponašanja nalik anksioznom kod ženki, ukoliko se uvede u adolescentnom periodu (Genn i sar., 2003). Autori koji su ispitivali efekat dugotrajne DR pokazali su variranja u zavisnosti od vremena početka DR: uvođenje DR 28. postnatalnog dana dovelo je do toga da je kod mužjaka pacova ponašanje nalik anksioznom bilo izraženiji (Jahng i sar., 2007), dok je uvedena sa 3 meseca starosti DR rezultovala smanjenom anksioznošću (Levay i sar., 2007). Podaci iz navedenih studija sugerišu da starost jedinke u trenutku implementacije DR može imati ključnu ulogu u efektima DR na anksioznost.

U ovoj studiji je, primenom testa otvorenog polja i testa svetlo tamne kutije, uočeno da tokom starenja slobodno hranjeni mužjaci ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom. Ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom zabeleženo je u oba testa i kod mužjaka izloženih tromesečnoj DR bez obzira na vreme početka. Za razliku od mužjaka, kod ženki sa starenjem ne dolazi do povećane anksioznosti pri slobodnom pristupu hrani. Štaviše, 24-mesečne ženke AL grupe imale su značajno veći broj ulazaka i duže vreme provedeno u centralnom delu arene testa otvorenog polja u poređenju sa 6-mesečnim AL ženkama. Takođe, za razliku od mužjaka, efekat DR na ponašanje nalik anksioznom se kod ženki razlikovao u zavisnosti od vremena početka, te je pretežno protektivan efekat DR uočen kod 18 meseci starih ženki, bilo da se radilo o dugotrajnoj ili kratkotrajnoj DR, kao i kod 24 meseca starih ženki na dugoj dijeti sa ranim početkom. Međutim, slično mužjacima, i kod ženki je uočeno pogoršanje stepena anksioznosti pod uticajem kratke dijete primenjene u kasnom životnom dobu. Negativan efekat kasno otpočete kratkotrajne DR bio je dakle prisutan kod oba pola.

Iako je u brojnim studijama pokazano da kod pacova tokom starenja dolazi do pogoršanja u ispoljavanju ponašanja nalik anksioznom (Frussa-Filho i sar., 1991; Sotoudeh i sar., 2020) novije studije ističu postojanje polnih razlika, budući da mužjaci pokazuju viši stepen anksioznosti tokom starenja u poređenju sa ženkama (Domonkos i sar., 2017; Renard i sar., 2005; Scholl i sar., 2019), verovatno usled starosno zavisnog smanjenja endogene produkcije testosterona. Uloga testosterona u regulaciji anksioznosti potvrđena je u studijama koje su pokazale da je ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom kod mužjaka uočeno kako tokom starenja, tako i kao posledica orhiektomije (Edinger i Frye, 2006). Dodatno su autori ove i drugih studija pokazali da suplementacija testosteronom ima anksiolitička svojstva kod orhiektomisanih mužjaka (Carrier i sar., 2015; Edinger i Frye, 2006; Khakpai, 2014). Iako je pokazano da kod ovariektomisanih ženki takođe dolazi do pogoršanja u ponašanju nalik anksioznom, stare intaktne ženke pokazivale su isti stepen anksioznosti kao mlade kontrole (de Chaves i sar., 2009). Zanimljivo je da su stare ženke u istoj studiji imale gotovo identičan nivo, odnosno stepen smanjenja cirkulišućeg E2 kao ovariektomisane ženke, što je u ovoj studiji dovelo do zaključka da starosno zavisno smanjenje nivoa cirkulišućih estrogena ne utiče na ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom (de Chaves i sar., 2009). U prirodnim uslovima, ženke provode više vremena u stanju opreznosti i pripravnosti kako bi osigurale preživljavanje, kako sopstveno tako i potomstva. Ovakav evolutivni pritisak može biti uzrok generalno višeg stepena opreznosti ali i anksioznosti kod ženki tokom reproduktivne zrelosti, koja se u slučaju laboratorijskih

glodara manifestuje kao ponašanje nalik anksioznom, te tokom starenja ne dolazi do pogoršanja kakvo se uočava kod mužjaka.

Anksiolitički efekat primene dugotrajne restrikcije hrane kod mužjaka pacova uočen je u više studija (Govic i sar., 2022; Kenny i sar., 2014; Levay i sar., 2007; Toufexis i sar., 2016). Ipak, treba uzeti u obzir da je u navedenim studijama redukcija unosa hrane iznosila između 20 i 25%, dok je u ovoj studiji smanjenje iznosilo 40%. Efekat većeg procenta restrikcije hrane ispitivan je u prethodno pomenutoj studiji autora Levay i saradnika, gde je pokazano da hronična, rano uvedena redukcija hrane od 50% pojačava ponašanje nalik anksioznom. Pored postojećih podataka koji pokazuju da primena DR može dovesti do povećanja nivoa kortikosterona (Chacon i sar., 2005; Levay i sar., 2007), više nezavisnih grupa autora iznelo je tvrdnju da restrikcija unosa hrane dovodi do hiperaktivacije HHA osovine (Grayson i sar., 2014; Jahng i sar., 2007; Seimon i sar., 2013) jedne od najčešćih promena u osnovi poremećaja raspoloženja kakva je anksioznost (pregledni radovi Faravelli i sar., 2012; Risbrough i Stein, 2006).

Anksiolitički efekat DR kod ženki je pak pokazan u više studija baziranih na ponašajnom odgovoru ženki pacova u testu otvorenog polja i testu uzdignutog krstastog lavirinta (Genn i sar., 2003; Toufexis i sar., 2016). Efekat DR razlikovao se među različitim starosnim grupama, implicirajući da kod ženki, kao i mužjaka, DR svoj efekat na ponašanje nalik anksioznom ostvaruje u sprezi sa starosno zavisnim promenama koncentracija cirkulišućih polnih hormona (Genn i sar., 2003). U svojoj studiji, Kampos i saradnici uočili su da je restrikcija hrane od 60% imala anksiozni efekat kod adultnih ženki, koji je poništavala administracija E2 ili agonista  $\beta$  receptora za estrogene, pokazujući da je smanjeni nivo estrogena u osnovi anksioznog efekta DR (Campos i sar., 2019). Uloga E2 u regulaciji ponašanja nalik anksioznom uočena je i u nekoliko drugih studija, u kojima je kako sistemska tako i lokalna administracija E2 kod ovariektomisanih ženki pacova imala anksiolitički efekat (Daendee i sar., 2013; Frye i Walf, 2004; Koss i sar., 2004; Pandaranandaka i sar., 2006).

Gore pomenute studije na mužjacima, zajedno sa ovde prezentovanim podacima o promenama detektovanim kod oba pola, ukazuju na ključnu ulogu stepena restrikcije hrane na stepen anksioznosti. Iz rezultata se može zaključiti da postoji opseg umanjena unosa kalorija koji može biti blagotvoran kada je u pitanju ponašanje nalik anksioznom, ali da restrikcija van tog opsega može imati i negativne efekte na anksioznost. Prekomerna DR može dovesti do gubitka masnog tkiva koje sa sobom povlači gubitak funkcije polnih žlezda i hormona. Kako je holesterol prekursor estrogena, smanjenje nivoa holesterola uočeno kod životinja podvrgnutih 60% DR (de Souza i sar., 2015) takođe može biti uzrok smanjenja nivoa estrogena (Campos i sar., 2019). Iz priloženih rezultata može se zaključiti da su, kada je u pitanju ponašanje nalik anksioznom, ženke imale bolju toleranciju na restrikciju hrane od 40%, nego mužjaci. Uzevši u obzir podatke iz postojeće literature, moguće je da bi u slučaju manjeg stepena restrikcije protektivni efekat DR bio prisutan kod oba pola.

Mehanizmi koji leže u osnovi efekata DR na ponašanje nalik anksioznom nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, poznato je da, zajedno sa glutamatskim i GABA sistemima, dopaminski sistem ima značajnu ulogu u kontroli anksioznog ponašanja (Zarrindast i Khakpai, 2015). Istovremeno, dopaminski sistem je povezan sa energetsom homeostazom, i može biti modulisan dijetalnom restrikcijom (Kenneth D. Carr, 2007; Zhen i sar., 2006), i posredovati u metaboličkim benefitima dijetalne restrikcije (de Leeuw van Weenen i sar., 2011). Iz postojeće literature poznato je da je smanjeni unos hrane povezan sa smanjenim nivoom dopamina u hipotalamusu, hipokampusu i dorzalnom strijatumu, dok je, s druge strane, povećanje sadržaja dopamina u hipotalamusu usled DR dovelo do hiperaktivnosti životinja (pregledni rad Kontis i Theochari, 2012).

Određivanje ekspresije dopaminskih receptora predstavlja indirektan način za procenu dopaminske signalizacije u mozgu. Obzirom da su D1 i D2 receptori najzastupljeniji dopaminski receptori u mozgu (Baik, 2013) u ovoj studiji su uzeti kao predstavnici svojih klasa receptora. U



prethodnim studijama potvrđena je uloga D1R i D2R u regulaciji ponašanja nalik anksioznom (K. D. Carr, 2007; Carr i sar., 2001; Carr i sar., 2003; DeGroot i sar., 2020; Fernandes i sar., 2021; Gallardo i sar., 2014; Nikolaus i sar., 2010) kao i veza izmenjenog unosa hrane sa promenom u ekspresiji ovih receptora (Adams i sar., 2015; Alsiö i sar., 2010; Huang i sar., 2006).

Dok je tokom starenja ekspresija D1 i D2 receptora bila stabilna ili čak u porastu u kori velikog mozga i strijatumu mužjaka, kod ženki je to bio slučaj samo sa D2R i to u svim ispitivanim strukturama, dok je ekspresija D1R pokazivala trend smanjenja. Kako tokom starenja dolazi do smanjenja sadržaja dopamina (Haycock i sar., 2003), naročito u strijatumu (Diao i sar., 1997) i kori velikog mozga (Del Arco i sar., 2011), povećana ekspresija gena za D1R i D2R na nivou iRNK i proteina verovatno predstavlja kompenzatorni mehanizam sistema koji pokušava da iskoristi sav raspoloživi dopamin.

Povećana ekspresija obe klase receptora uočena je i u strijatumu 18 meseci starih mužjaka podvrgnutih restrikciji hrane, bez obzira da li je DR trajala 12 ili 3 meseca, kao i u strijatumu i srednjem mozgu 24-mesečnih mužjaka RODR grupe. Dok su se kod mužjaka obe klase receptora menjale pretežno istim trendom, kod ženki na DR je uočen trend smanjenja ekspresije D1R, ali povećanja ekspresije D2R. Izuzetak je uočen u kori velikog mozga 18-mesečnih ženki RODR grupe, kod kojih je zabeležena povećana ekspresija oba tipa receptora. Generalno, trend povećanja ekspresije D2R u svim ispitivanim strukturama uočen je kod istih grupa ženki kod kojih je uočeno smanjenje anksioznosti, odnosno kod 18-mesečnih ženki RODR, KODR i 24-mesečnih ženki RODR grupe.

Nažalost, iz uočenih rezultata u ovoj studiji nije moguće izvesti jasan zaključak o korelaciji između anksioznosti i ekspresije dopaminskih receptora, jer promene u ponašanju nisu dosledno povezane sa promenama ekspresije D1R i D2R. Ipak, rezultati ukazuju na to da su dopaminski putevi osetljivi na redukovani unos kalorija. Strukturna složenost dopaminskog sistema, sa neuronima u specifičnim regijama mozga i njihovim projekcijama ka mnogim drugim regijama, mogla bi biti jedan od glavnih uzroka određene neusklađenosti primećene između ekspresije gena za dopaminske receptore na nivou iRNK i proteina. Razlika u ekspresiji gena na nivou iRNK i proteina uočena je i u ranijim istraživanjima ove laboratorije (Mladenovic Djordjevic i sar., 2010; Mladenovic Djordjevic i sar., 2014) i nije izuzetak, s obzirom na to da značajan broj gena pokazuje znatnu razliku u ekspresiji između transkriptoma i proteoma (Wu i sar., 2020). Ova pojava je naročito izražena u nervnom sistemu (Wang i sar., 2019), gde nivo proteina u specifičnoj regiji mozga može biti zbir translacije postojećih lokalnih iRNK i/ili proteina distribuiranih iz drugih anatomski udaljenih regiona mozga. Dodatno, određena količina iRNK podleže procesu degradacije bez translacije, dok na ekspresiju proteina mogu uticati posttranskripcioni i posttranslacioni procesi, što sve zajedno može izazvati neslaganje u njihovim nivoima (Brion i Lutz, 2020; Di Liegro i sar., 2014).

Kako bi se u potpunosti razjasnila veza između anksioznosti i DR na molekularnom nivou, pored dopaminskog trebalo bi sagledati i promene u drugim relevantnim neurotransmiterskim sistemima, poput serotoniniskog i noradrenaliniskog, kao i njihove međusobne interakcije u različitim moždanim strukturama (Portero-Tresserra i sar., 2020; Zarrindast i Khakpai, 2015), naročito u hipokampusu (Jimenez i sar., 2018; Loh i sar., 2017; Wang i sar., 2019). Iako bi sveobuhvatnija studija mogla ukazati na specifičnije efekte DR na ponašanje nalik anksioznom, rezultati predstavljeni u sklopu ove teze pokazuju da DR utiče na nivo anksioznosti i ekspresiju dopaminskih receptora na način specifičan za starost, trajanje i regiju mozga.

Podaci dobijeni u ovoj tezi pokazali su da starost jedinke u trenutku uvođenja DR i pol imaju odlučujuću ulogu u determinisanju efekata DR, više nego dužina trajanja DR. Prethodne studije iz ove laboratorije pokazale su da je period između 18. i 21. meseca kod glodara, period povišene osetljivosti, kada dolazi do ispoljavanja negativnih posledica starenja, koje uključuju morfološke i funkcijske promene nervnog sistema, izmenjenu ekspresiju sinaptičkih proteina GAP 43, sinaptofizin

i alfa-sinuklein i narušenu homeostazu holesterola u mozgu (Mladenovic Djordjevic i sar., 2010; Mladenovic Djordjevic i sar., 2014; Smiljanic i sar., 2014). I u studijama drugih autora ističe se da postoji stepen razvoja ili stadijum starenja nakon kog uvođenje DR više ne može da produži životni vek (Vaughan i sar., 2017).

Osim ključne uloge koju na ishod DR imaju dužina trajanja i stepen restrikcije, fiziološki parametri, tj. zdravstveni status jedinke, značajno može uticati na ishod DR (Ingram i de Cabo, 2017; Mattson, 2014; Villareal i sar., 2006). Genetika i pol takođe mogu modulirati efekat DR (Mitchell i sar., 2016). Naime, pojedini inbredovani sojevi bolje reaguju na DR kada su u pitanju produžetak životnog veka i zdravog dela života dok je kod drugih sojeva ovaj efekat manje izražen (Mitchell i sar., 2016).

Tokom fiziološkog starenja, mužjaci i ženke *Wistar* pacova u ovoj studiji pokazivali su različite promene kada su u pitanju unos hrane, energetska potrošnja i telesna masa. Zbog toga je i DR imala različite efekte na stepen preživljavanja i parametre krhkosti kod određenih eksperimentalnih grupa. Dugotrajna DR sa ranim početkom pokazala se efikasnom u odlaganju starosno zavisnih promena koje doprinose povećanju stepena krhkosti kod 18 meseci starih životinja oba pola, iako se ovaj efekat održao i do 24. meseca kod ženki, dok kod mužjaka ove starosti više nije bio uočljiv. Iznenadujuće, kod oba pola, KODR uvedena sa 15 meseci života rezultovala je preživljavanjem životinja od 100%, kao i indeksom krhkosti manjim od onog uočenog kod 18-mesečnih životinja AL grupa i RODR grupa, pokazujući da DR kraćeg trajanja ima potencijal da umanji određene starosno zavisne promene ukoliko je uvedena na vreme. Već je pomenut podatak iz literature da ženke tokom starenja pokazuju bolji lipidni profil i toleranciju na glukozu nego mužjaci (Quiros Cognuck i sar., 2020). U studiji Mitchell i saradnika najbolji stepen preživljavanja pokazan je kod miševa koji su imali očuvan nivo masnog tkiva tokom druge godine života, sugerišući da postoji minimalan nivo adipoziteta u organizmu koji je neophodan da bi organizam imao maksimalni benefit DR kao i da masno tkivo ima važnu ulogu u metaboličkoj regulaciji u uslovima DR (Mitchell i sar., 2016). U prilog ovome ide i podatak da dugoživeći sojevi miševa, kao što su patuljasti sojevi *Ames* i *Snell*, imaju blago povišen procenat masnog tkiva iako su sitnijeg rasta u odnosu na kontrole divljeg soja iz istog okota (Mitchell i sar., 2016). Možemo pretpostaviti da su manja telesna masa i rezerve masnog tkiva kod ženki pri slobodnim pristupu hrani rezultovale većom smrtnošću u odnosu na mužjake pri uvođenju KODR u 21. mesecu života, iako ni kod jednog pola nije uočen veći indeks krhkosti u odnosu na AL kontrolu.

Bitno je naglasiti i da koristan efekat DR uočen na određenom aspektu zdravlja ne znači nužno i univerzalnost korisnih efekata DR. Na primer, u studiji Ouellette i saradnika (Ouellette i sar., 2022) pokazano je da je dugotrajna restrikcija hrane od 40% dovela do pogoršanja performansi u dva kognitivna testa ponašanja kod DO ženki miševa (engl. *Diversity Outbred*, DO). Ovakav rezultat naveo je autore na zaključak da uprkos pozitivnom efektu DR na dužinu životnog veka i zdravog dela životnog veka, efekat na kognitivne sposobnosti može biti negativan među populacijom koja je raznovrsna u smislu opšteg stanja organizma.

U ovoj disertaciji pokazano je da 40% dijetalna restrikcija dovodi do poboljšanja u testovima ponašanja za procenu kognitivnih funkcija i ponašanja nalik anksioznom kod ženki, bez obzira na dužinu trajanja DR. Naime, kod 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe, uočena je poboljšana habituacija u testu otvorenog polja, očuvanost memorije u testu prepoznavanja novog predmeta ali i manji stepen anksioznosti u testu otvorenog polja i testu svetlo-tamne kutije. Istovremeno, kod ovih ženki nije uočeno očekivano smanjenje aktivacije mTOR signalizacije u hipokampusu i kori velikog mozga kao relevantnim moždanim strukturama uključenim u više kognitivne funkcije. Pod dejstvom rano otpočete DR kod mužjaka nije uočeno poboljšanje u memorijskom odgovoru kao ni u ponašanju nalik anksioznom dok je na molekularnom nivou, kod mužjaka uočena smanjena aktivacija mTOR signalnog puta u ispitivanim strukturama. Iako je mnogo puta potvrđen protektivni efekat inhibicije mTOR signalnog puta, ovde prikazani rezultati ističu značaj uspostavljanja balansa, odnosno postizanja optimalnog nivoa inhibicije mTOR signalizacije kako bi se ostvario maksimalni pozitivni

efekat. Iako inhibicija mTOR generalno doprinosi dugovečnosti usled aktivacije procesa autofagije i regulacije proteostaze, hronična inhibicija može značajno narušiti funkcije koje zahtevaju visok stepen sinteze proteina, poput formiranja i rekonsolidacije memorije. Protektivna uloga estrogena, verovatno je bila razlog izostanka inhibicije mTOR signalizacije u hipokampusu ženki, i očuvanosti njihovog memorijskog odgovora.

Bolji rezultati uočeni u pretežno svim ispitivanim parametrima kod ženki, ponašajnim i molekularnim, verovatno su posledica pozitivnog efekta DR na estrogensku signalizaciju, odnosno očuvanja njene intaktne funkcije tokom starenja. Takođe, moguće je da mužjaci i ženke pokazuju različitu osetljivost kada je u pitanju stepen DR, i da bi pozitivan efekat bio uočljiv i kod mužjaka u slučaju manjeg procenta redukcije hrane.

Negativan efekat dijetalne restrikcije sa kasnim početkom registrovan je kod oba pola, i odražavao se na gotovo sve ispitivane parametre. Ovakav rezultat ukazuje na postojanje vremenskog okvira kada je moguće uvesti DR kako bi se postigao maksimalni benefit. Nakon ovog perioda, nezavisno od pola, primena dijetalne restrikcije gubi potencijal da zaustavi, spreči ili neutrališe negativne posledice starenja, a neretko može dovesti do dodatnih pogoršanja.

Ovakvi rezultati ističu značaj praktikovanja umerene dijetalne restrikcije tokom celog života, i njenog blagotvornog dejstva na brojne aspekte starenja. Istovremeno, uočene negativne posledice primene DR kod starih životinja oba pola pozivaju na oprez kada je u pitanju uvođenje DR kod stare populacije.

CALERIE studija, naročito CALERIE 2, predstavlja prekretnicu u razumevanju efekta primene DR na tok starosno zavisnih promena kod ljudi. Iako je većina studija usmerena na primenu DR kod mladih ili sredovečnih osoba koje imaju normalnu ili povećanu telesnu masu, implikacije za stariju populaciju su posebno značajne, s obzirom na njihovu osetljivost. Primena DR kod starijih osoba nosi sa sobom značajne izazove. Fiziološke promene koje prate starenje, poput smanjenja mišićne mase, gustine kostiju i energetske rezerve, mogu predstavljati rizik za uvođenje DR, koja bi mogla dodatno pogoršati neka od ovih stanja. DR kod starijih osoba mora biti optimizovana kako bi se uspostavila ravnoteža između smanjenja unosa kalorija i adekvatnog unosa nutritijenata, naročito proteina, kalcijuma i vitamina D. Pored toga, praktikovanje restriktivnog režima ishrane može biti izazov za starije osobe sa psihološkog i socijalnog aspekta. Buduća istraživanja primene DR kod starije populacije trebala bi biti usmerena na intervencije koje su bezbedne i praktične za ovu demografsku grupu kao što su režimi sa manjim stepenom restrikcije ili različiti oblici povremenog gladovanja, koji mogu imati neke od metaboličkih i antiinflamatornih benefita svakodnevne DR. Takođe, kombinovanje DR sa umerenom fizičkom aktivnošću moglo bi smanjiti rizik od gubitka mišićne mase i poboljšati ishod primene DR. Sprovođenje DR kod starije populacije mora biti pažljivo planirano i pod nadzorom stručnog lica, uz temeljnu procenu potencijalnih benefita i rizika, sa osvrtnom na krhkost, zdravstveno stanje i životne navike pojedinca.

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima ispitivanja uticaja starenja i dijetalne restrikcije različitog početka i dužine trajanja (RODR i KODR) kod mužjaka i ženki *Wistar* pacova oba pola, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Pri slobodnom pristupu hrani tokom starenja, ženke su imale veći stepen preživljavanja u odnosu na mužjake. Dugotrajna dijeta otpočeta sa 6 meseci smanjila je smrtnost u starosnim tačkama od 18 i 24 meseca kod oba pola. Kratkotrajna dijeta je takođe smanjila smrtnost kod 18 meseci starih životinja oba pola, dok se kod 24 meseca starih pacova efekat KODR razlikovao u zavisnosti od pola: kod mužjaka je uočena manja smrtnost u odnosu na AL kontrole, dok je kod ženki uočena veća smrtnost.
2. Tokom starenja pri slobodnom pristupu hrani došlo je do povećanja unosa hrane i značajnog povećanja telesne mase mužjaka dok se kod ženki unos hrane smanjivao tokom starenja uz manji prirast telesne mase. U slučaju RODR, kod mužjaka je uočeno smanjenje telesne mase tokom prva tri meseca nakon uvođenja dijeta, dok je kod ženki ovo smanjenje bilo diskretnije i najuočljivije u prvom mesecu. KODR uvedena kod 15-mesečnih životinja dovela je do sličnog obrasca promena kod oba pola. Kod 21 mesec starih mužjaka KODR grupe je telesna masa padala tokom čitavog trajanja režima dok kod ženki nakon gubitka težine u prvom mesecu nije dolazilo do daljih promena.
3. Tokom starenja je uočeno povećanje indeksa krhkosti kod životinja oba pola pri slobodnom pristupu hrani. Kod 18 meseci starih životinja oba pola primena DR je dovela do smanjenja stepena krhkosti bez obzira da li se radilo o KODR ili RODR. Pozitivan efekat RODR na stepen krhkosti bio je uočljiv i kod 24 meseca starih ženki, ali ne i kod mužjaka. Nasuprot RODR, KODR otpočeta u 21. mesecu nije umanjila stepen krhkosti pacova ni kod jednog pola.
4. Korišćenjem testa otvorenog polja pokazano je da je neasocijativna prostorna memorija očuvana tokom starenja kod ženki pacova sa slobodnim pristupom hrani, odnosno životinje su pokazivale normalnu habituaciju. Normalna habituacija je bila prisutna je i kod 18 i 24 meseca starih ženki RODR grupa i 18 meseci starih ženki KODR grupe. Kod životinja kod kojih je KODR režim ishrane uveden u 21. mesecu starosti odsustvo normalne habituacije je ukazivalo na narušenu prostornu memoriju.
5. Korišćenjem testa prepoznavanja novog predmeta su uočene značajne polne razlike u procesu formiranja kratkotrajne i dugotrajne memorije, tokom starenja i pod režimima DR. Dok je kod ženki sa slobodnim pristupom hrani uočeno starosno zavisno pogoršanje kratkotrajne i dugotrajne memorije, kod mužjaka različitih starosnih grupa nije bilo razlike u prepoznavanju novog predmeta. Takođe, kod mužjaka nije detektovan značajan uticaj DR na sposobnost prepoznavanje novog predmeta. Izuzetak su bili 24-mesečni mužjaci KODR grupe kod kojih je uočeno pogoršanje u dugotrajnoj memoriji, a isti efekat je detektovan i kod ženki iste starosti na KODR režimu. Nasuprot tome, u 18. mesecu života je kod ženki uočen protektivan efekat RODR i KODR na kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju.
6. Kod mužjaka sa slobodnim pristupom hrani starenje je dovelo do ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom. Dijetalna restrikcija, bez obzira na vreme uvođenja i dužinu trajanja, je kod mužjaka dovela do daljeg pogoršanja parametara anksioznosti oba testa. Kod ženki, međutim, starenje nije

dovelo do ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom, čak su 24 meseca stare ženke AL grupe pokazivale smanjen stepen anksioznosti. Efekti dijetalne restrikcije na ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom su zavisili od vremena uvođenja i trajanja DR, budući da je kod 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe i 24-mesečnih ženki RODR grupe ponašanje nalik anksioznom bilo smanjeno, a kod 24 meseca starih ženki KODR grupe povećano.

7. Kod AL hranjenih mužjaka je ekspresija D1 i D2 dopaminskih receptora bila stabilna ili se povećavala tokom starenja u kori velikog mozga i strijatumu, a kod ženki se povećavala samo ekspresija D2R, dok je ekspresija D1R pokazivala trend smanjenja u svim ispitivanih strukturama.

Dijetalna restrikcija je dovela do povećanja ekspresije obe klase dopaminskih receptora u strijatumu i srednjem mozgu 18-mesečnih mužjaka, a isti trend je uočen i kod 24-mesečnih mužjaka. U istim moždanim strukturama ženki iste starosti DR je izazvala tendenciju smanjivanja ekspresije D1R u strijatumu i srednjem mozgu, a povećanja D2R, dok je kod 24-mesečnih ženki uočeno samo povećanje ekspresije D2R u kori velikog mozga.

8. Tokom starenja je kod mužjaka mahom detektovano povećanje fosforilacije ispitivanih proteina, dok je kod ženki je tokom starenja generalano detektovano smanjenje fosforilacije ispitivanih proteina, sa izuzetkom Akt Ser473.

Efekat režima DR na ekspresiju i fosforilaciju signalnih proteina mTOR puta razlikovao se među polovima. Najznačajnije promene uočene su kod 18 meseci starih mužjaka RODR i KODR grupe, kod kojih je detektovana smanjena aktivacija mTOR signalizacije u kori velikog mozga i hipokampusu, kao i 24-mesečnih KODR mužjaka kod kojih se mTOR signalni put aktivirao u obe ispitivane strukture. Kod 18-mesečnih ženki RODR i KODR grupe uočena je smanjena aktivacija mTOR signalne kaskade u kori velikog mozga, ali ne i u hipokampusu.

Na osnovu prethodno navedenih pojedinačnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak, da je dijetalna restrikcija koja predstavlja 60% normalnog dnevnog unosa hrane imala značajan uticaj na stepen krhkosti, motoričke i kognitivne sposobnosti životinja, kao i ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom. Uočeni efekat DR bio je posredovan, makar delimično, modulacijom mTOR signalnog puta u hipokampusu i kori velikog mozga. Ipak, uočeni efekti dijetalne restrikcije značajno su se razlikovali kod mužjaka i ženki, kao i u zavisnosti od vremena početka i dužine trajanja DR. Dijetalna restrikcija uvedena u kasnoj životnoj dobi (21 mesec) pacova oba pola, imala je negativan efekat u skoro svim ispitivanim aspektima, što ukazuje na postojanje optimalnog vremenskog okvira za uvođenje DR, nakon koga rizici i negativni efekti njene primene prevazilaze njene potencijalne benefite.

## 7. LITERATURA

- Abdulsada, M. M., Wilhelm, Z. R., Opekun, A. R., Devaraj, S., Jalal, P. K., & Mindikoglu, A. L. (2021). The effect of four-week intermittent fasting from dawn to sunset on circulating brain-derived neurotrophic factor levels in subjects with metabolic syndrome and healthy subjects. *Metabol Open*, 9, 100070. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2020.100070>
- Adams, M. M., Shi, L., Linville, M. C., Forbes, M. E., Long, A. B., Bennett, C.,...Brunso-Bechtold, J. K. (2008). Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Exp Neurol*, 211(1), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.01.016>
- Adams, W. K., Sussman, J. L., Kaur, S., D'Souza A, M., Kieffer, T. J., & Winstanley, C. A. (2015). Long-term, calorie-restricted intake of a high-fat diet in rats reduces impulse control and ventral striatal D2 receptor signalling - two markers of addiction vulnerability. *Eur J Neurosci*, 42(12), 3095-3104. <https://doi.org/10.1111/ejn.13117>
- Akinyele, O., & Wallace, H. M. (2022). Understanding the Polyamine and mTOR Pathway Interaction in Breast Cancer Cell Growth. *10*(3). <https://doi.org/10.3390/medsci10030051>
- Aktoprak, I., Dinc, P. , Gunay, G. , Adams, M. (2013). Novel object recognition is not affected by age despite age-related brain changes. *World Journal of Neuroscience*, 3, 269-274. <https://doi.org/10.4236/wjns.2013.34036>.
- Albert, K. M., & Newhouse, P. A. (2019). Estrogen, Stress, and Depression: Cognitive and Biological Interactions. *Annu Rev Clin Psychol*, 15, 399-423. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050718-095557>
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 7(4), 261-269. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00122-9)
- Alkurd, R., Mahrous, L., Zeb, F., & Khan, M. A. (2024). Effect of Calorie Restriction and Intermittent Fasting Regimens on Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels and Cognitive Function in Humans: A Systematic Review. *60*(1). <https://doi.org/10.3390/medicina60010191>
- Alsö, J., Olszewski, P. K., Norbäck, A. H., Gunnarsson, Z. E., Levine, A. S., Pickering, C., & Schiöth, H. B. (2010). Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*, 171(3), 779-787. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.046>
- Alstott, J., & Timberlake, W. (2009). Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls. *Behav Brain Res*, 196(2), 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.001>
- Altun, M., Bergman, E., Edström, E., Johnson, H., & Ulfhake, B. (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiology & behavior*, 92(5), 911-923. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.017>
- Andreescu, C., & Lee, S. (2020). Anxiety Disorders in the Elderly. *Adv Exp Med Biol*, 1191, 561-576. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_28](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_28)
- Antoch, M. P., Wrobel, M., Kuropatwinski, K. K., Gitlin, I., Leonova, K. I., Toshkov, I.,...Gudkov, A. V. (2017). Physiological frailty index (PFI): quantitative in-life estimate of individual biological age in mice. *Aging (Albany NY)*, 9(3), 615-626. <https://doi.org/10.18632/aging.101206>
- Anton, S., & Leeuwenburgh, C. (2013). Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Exp Gerontol*, 48(10), 1003-1005. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.04.011>
- Anton, S. D., Moehl, K., Donahoo, W. T., Marosi, K., Lee, S. A., Mainous, A. G., 3rd,...Mattson, M. P. (2018). Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. *Obesity (Silver Spring)*, 26(2), 254-268. <https://doi.org/10.1002/oby.22065>
- Antoni, R., Johnston, K. L., Collins, A. L., & Robertson, M. D. (2018). Intermittent v. continuous energy restriction: differential effects on postprandial glucose and lipid metabolism following matched weight loss in overweight/obese participants. *Br J Nutr*, 119(5), 507-516. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003890>

- Arango-Lopera, V. E., Arroyo, P., Gutierrez-Robledo, L. M., Perez-Zepeda, M. U., & Cesari, M. (2013). Mortality as an adverse outcome of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*, *17*(3), 259-262. <https://doi.org/10.1007/s12603-012-0434-0>
- Archer, J. (1975). Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral Biology*, *14*(4), 451-479. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90636-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90636-7)
- Archer, J. (1975). Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behav Biol*, *14*(4), 451-479. [https://doi.org/10.1016/s0091-6773\(75\)90636-7](https://doi.org/10.1016/s0091-6773(75)90636-7)
- Asarian, L., & Geary, N. (2006). Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *361*(1471), 1251-1263. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1860>
- Asarian, L., & Geary, N. (2013). Sex differences in the physiology of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *305*(11), R1215-1267. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00446.2012>
- Ayala, V., Naudí, A., Sanz, A., Caro, P., Portero-Otin, M., Barja, G., & Pamplona, R. (2007). Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *62*(4), 352-360. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.4.352>
- Ayano, G. (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures.
- Baar, E. L., Carbajal, K. A., Ong, I. M., & Lamming, D. W. (2016). Sex- and tissue-specific changes in mTOR signaling with age in C57BL/6J mice. *Aging Cell*, *15*(1), 155-166. <https://doi.org/10.1111/ace.12425>
- Baazaoui, N., Flory, M., & Iqbal, K. (2017). Synaptic Compensation as a Probable Cause of Prolonged Mild Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease: Implications from a Transgenic Mouse Model of the Disease. *J Alzheimers Dis*, *56*(4), 1385-1401. <https://doi.org/10.3233/jad-160845>
- Backman, L., Nyberg, L., Lindenberger, U., Li, S. C., & Farde, L. (2006). The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev*, *30*(6), 791-807. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.005>
- Bagherniya, M., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2018). The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Res Rev*, *47*, 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.08.004>
- Bai, X., & Jiang, Y. (2010). Key factors in mTOR regulation. *Cell Mol Life Sci*, *67*(2), 239-253. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0163-7>
- Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits*, *7*, 152. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152>
- Barbosa-Silva, M. C., RM, P. C., Del Castilo, I., França, J. V., Frost, P. S., Penido, C.,...Ribeiro-Resende, V. T. (2022). Mice lacking 5-lipoxygenase display motor deficits associated with cortical and hippocampal synapse abnormalities. *Brain Behav Immun*, *100*, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.12.004>
- Barrows, C. H., Jr., & Kokkonen, G. (1975). Protein synthesis, development, growth and life span. *Growth*, *39*(4), 525-533. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1205236>
- Bartke, A. (2008). Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. *Aging Cell*, *7*(3), 285-290. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00387.x>
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem*, *87*(2), 303-307. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.08.007>
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A., & Rosenblum, K. (2009). Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci*, *29*(23), 7424-7431. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3809-08.2009>
- Belsky, D. W., Huffman, K. M., Pieper, C. F., Shalev, I., & Kraus, W. E. (2017). Change in the Rate of Biological Aging in Response to Caloric Restriction: CALERIE Biobank Analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *73*(1), 4-10. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx096>

- Berchtold, N. C., Cribbs, D. H., Coleman, P. D., Rogers, J., Head, E., Kim, R.,...Cotman, C. W. (2008). Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(40), 15605-15610. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806883105>
- Berry, A. S., White, R. L., 3rd, Furman, D. J., Naskolnakorn, J. R., Shah, V. D., & D'Esposito, M. (2019). Dopaminergic Mechanisms Underlying Normal Variation in Trait Anxiety. 39(14), 2735-2744. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2382-18.2019>
- Berven, L. A., Willard, F. S., & Crouch, M. F. (2004). Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res*, 296(2), 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.032>
- Bhatia, A., Lenchner, J. R., & Saadabadi, A. (2024). Biochemistry, Dopamine Receptors. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855830>
- Blagosklonny, M. V. (2009). TOR-driven aging: speeding car without brakes. *Cell Cycle*, 8(24), 4055-4059. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10310>
- Blagosklonny, M. V. (2010). Calorie restriction: decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans). *Cell Cycle*, 9(4), 683-688. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10766>
- Blundell, J., Kouser, M., & Powell, C. M. (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*, 90(1), 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.12.004>
- Bojang, K. P., & Manchana, V. (2023). Nutrition and Healthy Aging: A Review. *Curr Nutr Rep*, 12(3), 369-375. <https://doi.org/10.1007/s13668-023-00473-0>
- Bonzon-Kulichenko, E., Molto, E., Pintado, C., Fernandez, A., Arribas, C., Schwudke, D.,...Andres, A. (2018). Changes in Visceral Adipose Tissue Plasma Membrane Lipid Composition in Old Rats Are Associated With Adipocyte Hypertrophy With Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(9), 1139-1146. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly081>
- Borras, C., Gambini, J., & Vina, J. (2007). Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci*, 12, 1008-1013. <https://doi.org/10.2741/2120>
- Boulware, M. I., Heisler, J. D., & Frick, K. M. (2013). The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *J Neurosci*, 33(38), 15184-15194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1716-13.2013>
- Bové, J., Martínez-Vicente, M., & Vila, M. (2011). Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*, 12(8), 437-452. <https://doi.org/10.1038/nrn3068>
- Breuleux, M., Klopfenstein, M., Stephan, C., Doughty, C. A., Barys, L., Maira, S. M.,...Lane, H. A. (2009). Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther*, 8(4), 742-753. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0668>
- Brion, C., & Lutz, S. M. (2020). Simultaneous quantification of mRNA and protein in single cells reveals post-transcriptional effects of genetic variation. 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.60645>
- Brito, D. V. C., Esteves, F., Rajado, A. T., Silva, N., & Araújo, I. (2023). Assessing cognitive decline in the aging brain: lessons from rodent and human studies. 9(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41514-023-00120-6>
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756-758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
- Brown, J. C., Higgins, E. S., & George, M. S. (2022). Synaptic Plasticity 101: The Story of the AMPA Receptor for the Brain Stimulation Practitioner. *Neuromodulation*, 25(8), 1289-1298. <https://doi.org/10.1016/j.neurom.2021.09.003>
- Brownlow, M. L., Joly-Amado, A., Azam, S., Elza, M., Selenica, M. L., Pappas, C.,...Morgan, D. (2014). Partial rescue of memory deficits induced by calorie restriction in a mouse model of tau deposition. *Behav Brain Res*, 271, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.001>



- Buchman, A. S., Yu, L., Boyle, P. A., Schneider, J. A., De Jager, P. L., & Bennett, D. A. (2016). Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. *Neurology*, *86*(8), 735-741. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002387>
- Buechel, H. M., Popovic, J., Staggs, K. H., Anderson, K. L., Thibault, O., & Blalock, E. (2014). Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: implications for psychosocial stress in aging [Original Research]. *Front Aging Neurosci*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00013>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *43*, 175-197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
- Calabrese, F., Guidotti, G., Racagni, G., & Riva, M. A. (2013). Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging*, *34*(12), 2768-2776. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.014>
- Campos, G. V., de Noronha, S. R., de Souza, A. A., Lima, P. M., Abreu, A. R., Chianca-Jr, D., & de Menezes, R. C. (2019). Estrogen receptor beta activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. *Behav Brain Res*, *357-358*, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.029>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(7), 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.008>
- Cardoso, A., Marrana, F., & Andrade, J. P. (2016). Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem*, *133*, 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.013>
- Carr, K. D. (2002). Augmentation of drug reward by chronic food restriction: behavioral evidence and underlying mechanisms. *Physiology & behavior*, *76*(3), 353-364. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00759-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00759-x)
- Carr, K. D. (2007). Chronic food restriction: enhancing effects on drug reward and striatal cell signaling. *Physiology & behavior*, *91*(5), 459-472. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.021>
- Carr, K. D. (2007). Chronic food restriction: Enhancing effects on drug reward and striatal cell signaling. *Physiology & Behavior*, *91*(5), 459-472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.021>
- Carr, K. D., Kim, G. Y., & Cabeza de Vaca, S. (2001). Rewarding and locomotor-activating effects of direct dopamine receptor agonists are augmented by chronic food restriction in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *154*(4), 420-428. <https://doi.org/10.1007/s002130000674>
- Carr, K. D., Tsimberg, Y., Berman, Y., & Yamamoto, N. (2003). Evidence of increased dopamine receptor signaling in food-restricted rats. *Neuroscience*, *119*(4), 1157-1167. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00227-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00227-6)
- Carrier, N., Saland, S. K., Duclot, F., He, H., Mercer, R., & Kabbaj, M. (2015). The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biol Psychiatry*, *78*(4), 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.024>
- Carstensen, L. L., Isaacowitz, D. M., & Charles, S. T. (1999). Taking time seriously. A theory of socioemotional selectivity. *Am Psychol*, *54*(3), 165-181. <https://doi.org/10.1037//0003-066x.54.3.165>
- Carter, C. S., Leeuwenburgh, C., Daniels, M., & Foster, T. C. (2009). Influence of calorie restriction on measures of age-related cognitive decline: role of increased physical activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *64*(8), 850-859. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp060>
- Catenacci, V. A., Pan, Z., Ostendorf, D., Brannon, S., Gozansky, W. S., Mattson, M. P.,...Troy Donahoo, W. (2016). A randomized pilot study comparing zero-calorie alternate-day fasting to daily caloric restriction in adults with obesity. *Obesity (Silver Spring)*, *24*(9), 1874-1883. <https://doi.org/10.1002/oby.21581>
- Chacon, F., Esquifino, A. I., Perello, M., Cardinali, D. P., Spinedi, E., & Alvarez, M. P. (2005). 24-hour changes in ACTH, corticosterone, growth hormone, and leptin levels in young male rats subjected to calorie restriction. *Chronobiol Int*, *22*(2), 253-265. <https://doi.org/10.1081/cbi-200053522>

- Chaix, A., Manoogian, E. N. C., Melkani, G. C., & Panda, S. (2019). Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annu Rev Nutr*, 39, 291-315. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124320>
- Chang, H., & Zou, Z. (2020). Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *13*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01000-2>
- Chellappa, K., Brinkman, J. A., Mukherjee, S., Morrison, M., Alotaibi, M. I., Carbajal, K. A.,...Lamming, D. W. (2019). Hypothalamic mTORC2 is essential for metabolic health and longevity. *18*(5), e13014. <https://doi.org/10.1111/ace1.13014>
- Clark, B. C., & Taylor, J. L. (2011). Age-related changes in motor cortical properties and voluntary activation of skeletal muscle. *Curr Aging Sci*, 4(3), 192-199. <https://doi.org/10.2174/1874609811104030192>
- Collier, T. J., Gash, D. M., & Sladek, J. R., Jr. (1987). Norepinephrine deficiency and behavioral senescence in aged rats. Transplanted locus ceruleus neurons as an experimental replacement therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 495, 396-403. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb23689.x>
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M.,...Weindruch, R. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325(5937), 201-204. <https://doi.org/10.1126/science.1173635>
- Copp, J., Manning, G., & Hunter, T. (2009). TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 69(5), 1821-1827. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3014>
- Cost, K. T., Williams-Yee, Z. N., Fustok, J. N., & Dohanich, G. P. (2012). Sex differences in object-in-place memory of adult rats. *Behav Neurosci*, 126(3), 457-464. <https://doi.org/10.1037/a0028363>
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 13(2), 167-170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)
- Crawley, J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 9(1), 37-44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2)
- Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*, 9, 179. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179>
- Cunha-Santos, J., Duarte-Neves, J., Carmona, V., Guarente, L., Pereira de Almeida, L., & Cavadas, C. (2016). Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nat Commun*, 7, 11445. <https://doi.org/10.1038/ncomms11445>
- Cyr, B., & de Rivero Vaccari, J. P. (2023). Sex Differences in the Inflammatory Profile in the Brain of Young and Aged Mice. *Cells*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/cells12101372>
- Daendee, S., Thongsong, B., & Kalandakanond-Thongsong, S. (2013). Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats. *Behav Brain Res*, 246, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.008>
- Dakic, T., Jevdjovic, T., Vujovic, P., & Mladenovic, A. (2022). The Less We Eat, the Longer We Live: Can Caloric Restriction Help Us Become Centenarians? *Int J Mol Sci*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126546>
- Dal-Pan, A., Pifferi, F., Marchal, J., Picq, J. L., Aujard, F., & Consortium, R. (2011). Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS One*, 6(1), e16581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016581>
- Dallman, M. F., & Jones, M. T. (1973). Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology*, 92(5), 1367-1375. <https://doi.org/10.1210/endo-92-5-1367>
- Das, S. K., Roberts, S. B., Bhapkar, M. V., Villareal, D. T., Fontana, L., Martin, C. K.,...Group, C.-S. (2017). Body-composition changes in the Comprehensive Assessment of Long-term Effects of

- Reducing Intake of Energy (CALERIE)-2 study: a 2-y randomized controlled trial of calorie restriction in nonobese humans. *Am J Clin Nutr*, 105(4), 913-927. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.137232>
- de Chaves, G., Moretti, M., Castro, A. A., Dagostin, W., da Silva, G. G., Boeck, C. R.,...Gavioli, E. C. (2009). Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. *Physiology & behavior*, 97(3-4), 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.016>
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*, 2(6), 1101-1113. <https://doi.org/10.1177/193229680800200619>
- de Leeuw van Weenen, J. E., Auvinen, H. E., Parlevliet, E. T., Coomans, C. P., Schröder-van der Elst, J. P., Meijer, O. C., & Pijl, H. (2011). Blocking dopamine D2 receptors by haloperidol curtails the beneficial impact of calorie restriction on the metabolic phenotype of high-fat diet induced obese mice. *J Neuroendocrinol*, 23(2), 158-167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02092.x>
- de Souza, A. A., de Menezes, R. C., Abreu, A. R., Araujo, G. R., Costa, D. C., & Chianca, D. A., Jr. (2015). Increased alpha1-adrenoreceptor activity is required to sustain blood pressure in female rats under food restriction. *Life Sci*, 128, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.007>
- DeGroot, S. R., Zhao-Shea, R., Chung, L., Klenowski, P. M., Sun, F., Molas, S.,...Tapper, A. R. (2020). Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *Biol Psychiatry*, 88(11), 855-866. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.018>
- Del Arco, A., Segovia, G., de Blas, M., Garrido, P., Acuña-Castroviejo, D., Pamplona, R., & Mora, F. (2011). Prefrontal cortex, caloric restriction and stress during aging: studies on dopamine and acetylcholine release, BDNF and working memory. *Behav Brain Res*, 216(1), 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.024>
- Deli, A., Schipany, K., Rosner, M., Höger, H., Pollak, A., Li, L.,...Lubec, G. (2012). Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 229(2), 320-324. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.017>
- Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *J Vis Exp*(141). <https://doi.org/10.3791/58593>
- Di Liegro, C. M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2014). Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). *Int J Mol Med*, 33(4), 747-762. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1629>
- Di Meo, F., Margarucci, S., Galderisi, U., Crispi, S., & Peluso, G. (2019). Curcumin, Gut Microbiota, and Neuroprotection. *Nutrients*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/nu11102426>
- Diao, L. H., Bickford, P. C., Stevens, J. O., Cline, E. J., & Gerhardt, G. A. (1997). Caloric restriction enhances evoked DA overflow in striatum and nucleus accumbens of aged Fischer 344 rats. *Brain Res*, 763(2), 276-280. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00494-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00494-0)
- Dias, I. R., Santos, C. S., Magalhães, C., de Oliveira, L. R. S., Peixoto, M. F. D., De Sousa, R. A. L., & Cassilhas, R. C. (2020). Does calorie restriction improve cognition? *IBRO Rep*, 9, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.05.001>
- Dillman, A. A., Majounie, E., Ding, J., Gibbs, J. R., Hernandez, D., Arepalli, S.,...Cookson, M. R. (2017). Transcriptomic profiling of the human brain reveals that altered synaptic gene expression is associated with chronological aging. *Sci Rep*, 7(1), 16890. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17322-0>
- Dogan, S., Johannsen, A. C., Grande, J. P., & Cleary, M. P. (2011). Effects of intermittent and chronic calorie restriction on mammalian target of rapamycin (mTOR) and IGF-I signaling pathways in mammary fat pad tissues and mammary tumors. *Nutr Cancer*, 63(3), 389-401. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.535968>
- Domonkos, E., Borbélyová, V., Csongová, M., Bosy, M., Kačmárová, M., Ostatníková, D.,...Celec, P. (2017). Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. *Horm Behav*, 93, 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.05.019>
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 62(6), 649-671. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x)

- Duan, W., Lee, J., Guo, Z., & Mattson, M. P. (2001). Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci*, *16*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1385/jmn:16:1:1>
- Edinger, K. L., & Frye, C. A. (2006). Intrahippocampal administration of an androgen receptor antagonist, flutamide, can increase anxiety-like behavior in intact and DHT-replaced male rats. *Horm Behav*, *50*(2), 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.003>
- Fan, L., Zhao, Z., Orr, P. T., Chambers, C. H., Lewis, M. C., & Frick, K. M. (2010). Estradiol-induced object memory consolidation in middle-aged female mice requires dorsal hippocampal extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurosci*, *30*(12), 4390-4400. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4333-09.2010>
- Faravelli, C., Lo Sauro, C., Lelli, L., Pietrini, F., Lazzeretti, L., Godini, L.,...Ricca, V. (2012). The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. *Curr Pharm Des*, *18*(35), 5663-5674. <https://doi.org/10.2174/138161212803530907>
- Fernandes, M. F., Lau, D., Sharma, S., & Fulton, S. (2021). Anxiety-like behavior in female mice is modulated by STAT3 signaling in midbrain dopamine neurons. *Brain Behav Immun*, *95*, 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.04.013>
- Fernandez, S. M., Lewis, M. C., Pechenino, A. S., Harburger, L. L., Orr, P. T., Gresack, J. E.,...Frick, K. M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci*, *28*(35), 8660-8667. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1968-08.2008>
- Firth, J., Marx, W., Dash, S., Carney, R., Teasdale, S. B., Solmi, M.,...Sarris, J. (2019). The Effects of Dietary Improvement on Symptoms of Depression and Anxiety: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Psychosom Med*, *81*(3), 265-280. <https://doi.org/10.1097/psy.0000000000000673>
- Flanagan, E. W., Most, J., Mey, J. T., & Redman, L. M. (2020). Calorie Restriction and Aging in Humans. *Annu Rev Nutr*, *40*, 105-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-122319-034601>
- Fok, W. C., Zhang, Y., Salmon, A. B., Bhattacharya, A., Gunda, R., Jones, D.,...Pérez, V. I. (2013). Short-term treatment with rapamycin and dietary restriction have overlapping and distinctive effects in young mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *68*(2), 108-116. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls127>
- Fonseca, C. S., Gusmão, I. D., Raslan, A. C., Monteiro, B. M., Massensini, A. R., Moraes, M. F., & Pereira, G. S. (2013). Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiol Learn Mem*, *101*, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.016>
- Fontana, L., Klein, S., & Holloszy, J. O. (2010). Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*, *32*(1), 97-108. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9118-z>
- Forster, M. J., Morris, P., & Sohal, R. S. (2003). Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *FASEB J*, *17*(6), 690-692. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0533fje>
- Fortress, A. M., Fan, L., Orr, P. T., Zhao, Z., & Frick, K. M. (2013). Estradiol-induced object recognition memory consolidation is dependent on activation of mTOR signaling in the dorsal hippocampus. *Learn Mem*, *20*(3), 147-155. <https://doi.org/10.1101/lm.026732.112>
- Foster, T. C. (2006). Biological markers of age-related memory deficits: treatment of senescent physiology. *CNS Drugs*, *20*(2), 153-166. <https://doi.org/10.2165/00023210-200620020-00006>
- Francaux, M., Demeulder, B., Naslain, D., Fortin, R., Lutz, O., Caty, G., & Deldicque, L. (2016). Aging Reduces the Activation of the mTORC1 Pathway after Resistance Exercise and Protein Intake in Human Skeletal Muscle: Potential Role of REDD1 and Impaired Anabolic Sensitivity. *Nutrients*, *8*(1). <https://doi.org/10.3390/nu8010047>
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J.,...McBurnie, M. A. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *56*(3), M146-156. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>

- Frussa-Filho, R., Otoboni, J. R., Uema, F. T., & Sá-Rocha, L. C. (1991). Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. *Braz J Med Biol Res*, *24*(7), 725-728.
- Frye, C. A., & Walf, A. A. (2004). Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci*, *118*(2), 306-313. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.2.306>
- Furchtgott, E., Wechkin, S., & Dees, J. W. (1961). Open-field exploration as a function of age. *J Comp Physiol Psychol*, *54*, 386-388. <https://doi.org/10.1037/h0044087>
- Gafford, G. M., Parsons, R. G., & Helmstetter, F. J. (2011). Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*, *182*, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.023>
- Gage, F. H., Kelly, P. A., & Björklund, A. (1984). Regional changes in brain glucose metabolism reflect cognitive impairments in aged rats. *J Neurosci*, *4*(11), 2856-2865. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-11-02856.1984>
- Gallardo, C. M., Darvas, M., Oviatt, M., Chang, C. H., Michalik, M., Huddy, T. F.,...Steele, A. D. (2014). Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *Elife*, *3*, e03781. <https://doi.org/10.7554/eLife.03781>
- Garcia-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcantara, C., & Collado, M. C. (2018). Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*, *9*, 890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00890>
- Garcia-Montero, C., Fraile-Martinez, O., Gomez-Lahoz, A. M., Pekarek, L., Castellanos, A. J., Nogueras-Fraguas, F.,...Ortega, M. A. (2021). Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota-Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. *Nutrients*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/nu13020699>
- Gardner, R. S., Newman, L. A., Mohler, E. G., Tunur, T., Gold, P. E., & Korol, D. L. (2020). Aging is not equal across memory systems. *Neurobiol Learn Mem*, *172*, 107232. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107232>
- Garrido, P., de Blas, M., Del Arco, A., Segovia, G., & Mora, F. (2012). Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiol Aging*, *33*(2), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.015>
- Geffken, S. J., Moon, S., Smith, C. O., Tang, S., Lee, H. H., Lewis, K.,...Cai, W. (2022). Insulin and IGF-1 elicit robust transcriptional regulation to modulate autophagy in astrocytes. *Mol Metab*, *66*, 101647. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101647>
- Genn, R. F., Tucci, S., Edwards, J. E., & File, S. E. (2003). Dietary restriction and nicotine can reduce anxiety in female rats. *Neuropsychopharmacology*, *28*(7), 1257-1263. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300168>
- Genn, R. F., Tucci, S. A., Thomas, A., Edwards, J. E., & File, S. E. (2003). Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, *27*(1-2), 155-161. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(03\)00017-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(03)00017-4)
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 441-466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Ghasemi, A., & Jeddi, S. (2021). The laboratory rat: Age and body weight matter. *20*, 1431-1445. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4072>
- Glover, E. M., Ressler, K. J., & Davis, M. (2010). Differing effects of systemically administered rapamycin on consolidation and reconsolidation of context vs. cued fear memories. *Learn Mem*, *17*(11), 577-581. <https://doi.org/10.1101/lm.1908310>
- Goodrick, C. L. (1978). Body weight increment and length of life: the effect of genetic constitution and dietary protein. *J Gerontol*, *33*(2), 184-190. <https://doi.org/10.1093/geronj/33.2.184>
- Gordon, E. H., Peel, N. M., Samanta, M., Theou, O., Howlett, S. E., & Hubbard, R. E. (2017). Sex differences in frailty: A systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*, *89*, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.021>

- Govic, A., Nasser, H., Levay, E. A., Zelko, M., Ebrahimie, E., Mohammadi Dehcheshmeh, M.,...Hazi, A. (2022). Long-Term Calorie Restriction Alters Anxiety-like Behaviour and the Brain and Adrenal Gland Transcriptomes of the Ageing Male Rat. *Nutrients*, *14*(21). <https://doi.org/10.3390/nu14214670>
- Goyal, P., Balkan, L., Ringel, J. B., Hummel, S. L., Sterling, M. R., Kim, S.,...Levitan, E. B. (2021). The Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet Pattern and Incident Heart Failure. *J Card Fail*, *27*(5), 512-521. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2021.01.011>
- Graber, T. E., McCamphill, P. K., & Sossin, W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learn Mem*, *20*(10), 518-530. <https://doi.org/10.1101/lm.027664.112>
- Grayson, B. E., Hakala-Finch, A. P., Kekulawala, M., Laub, H., Egan, A. E., Ressler, I. B.,...Ulrich-Lai, Y. M. (2014). Weight loss by calorie restriction versus bariatric surgery differentially regulates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in male rats. *Stress*, *17*(6), 484-493. <https://doi.org/10.3109/10253890.2014.967677>
- Green, C. L., Lamming, D. W., & Fontana, L. (2022). Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *23*(1), 56-73. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00411-4>
- Gregosa, A., Vinuesa, Á., Todero, M. F., Pomilio, C., Rossi, S. P., Bentivegna, M.,...Beauquis, J. (2019). Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy. *Neurobiol Dis*, *132*, 104542. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104542>
- Gresack, J. E., & Frick, K. M. (2006). Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *84*(1), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.013>
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J.,...Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, *11*(6), 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>
- Guo, F., Zhang, B., Fu, Z., Ma, Y., Gao, Y., Shen, F.,...Li, Y. (2016). The rapid antidepressant and anxiolytic-like effects of YY-21 involve enhancement of excitatory synaptic transmission via activation of mTOR signaling in the mPFC. *Eur Neuropsychopharmacol*, *26*(7), 1087-1098. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.05.006>
- Hadamitzky, M., Herring, A., Kirchhof, J., Bendix, I., Haight, M. J., Keyvani, K.,...Schedlowski, M. (2018). Repeated Systemic Treatment with Rapamycin Affects Behavior and Amygdala Protein Expression in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, *21*(6), 592-602. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy017>
- Hajjalizadeh, Z., Khaksari, M., Najafipour, H., Sanjari, M., Mahani, F. D., & Raji-Amirhasani, A. (2022). Substitution of calorie restriction for protective effects of estrogen on cardiometabolic risk factors and oxidative stress in obese postmenopausal rat model. *Life Sci*, *294*, 120367. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120367>
- Halloran, J., Hussong, S. A., Burbank, R., Podlutskaya, N., Fischer, K. E., Sloane, L. B.,...Galvan, V. (2012). Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience*, *223*, 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.054>
- Han, E. S., Evans, T. R., Shu, J. H., Lee, S., & Nelson, J. F. (2001). Food restriction enhances endogenous and corticotropin-induced plasma elevations of free but not total corticosterone throughout life in rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *56*(9), B391-397. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.9.b391>
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S.,...Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, *110*(2), 177-189. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00833-4)

- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(4), 251-262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Harries, L. W., Fellows, A. D., Pilling, L. C., Hernandez, D., Singleton, A., Bandinelli, S.,...Melzer, D. (2012). Advancing age is associated with gene expression changes resembling mTOR inhibition: evidence from two human populations. *Mech Ageing Dev*, *133*(8), 556-562. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.07.003>
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K.,...Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, *460*(7253), 392-395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>
- Haycock, J. W., Becker, L., Ang, L., Furukawa, Y., Hornykiewicz, O., & Kish, S. J. (2003). Marked disparity between age-related changes in dopamine and other presynaptic dopaminergic markers in human striatum. *J Neurochem*, *87*(3), 574-585. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02017.x>
- Hebda-Bauer, E. K., Dokas, L. A., Watson, S. J., & Akil, H. (2019). Adaptation to single housing is dynamic: Changes in hormone levels, gene expression, signaling in the brain, and anxiety-like behavior in adult male C57Bl/6J mice. *Horm Behav*, *114*, 104541. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.06.005>
- Hedman, A. M., van Haren, N. E., Schnack, H. G., Kahn, R. S., & Hulshoff Pol, H. E. (2012). Human brain changes across the life span: a review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp*, *33*(8), 1987-2002. <https://doi.org/10.1002/hbm.21334>
- Heilbronn, L. K., de Jonge, L., Frisard, M. I., DeLany, J. P., Larson-Meyer, D. E., Rood, J.,...Pennington, C. T. (2006). Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA*, *295*(13), 1539-1548. <https://doi.org/10.1001/jama.295.13.1539>
- Heinze-Milne, S. D., Banga, S., & Howlett, S. E. (2019). Frailty Assessment in Animal Models. *Gerontology*, *65*(6), 610-619. <https://doi.org/10.1159/000501333>
- Hendriksen, H., Prins, J., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2010). Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. *PLoS One*, *5*(8), e11943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011943>
- Hodge, A. M., & Zimmet, P. Z. (1994). The epidemiology of obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, *8*(3), 577-599. [https://doi.org/10.1016/s0950-351x\(05\)80287-3](https://doi.org/10.1016/s0950-351x(05)80287-3)
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*, *33*(2), 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.11.003>
- Holben, D. H., & Marshall, M. B. (2017). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Food Insecurity in the United States. *J Acad Nutr Diet*, *117*(12), 1991-2002. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2017.09.027>
- Horakova, M., Deyl, Z., Hausmann, J., & Macek, K. (1988). The effect of low protein-high dextrin diet and subsequent food restriction upon life prolongation in Fischer 344 male rats. *Mech Ageing Dev*, *45*(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(88\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(88)90014-0)
- Huang, X. F., Zavitsanou, K., Huang, X., Yu, Y., Wang, H., Chen, F.,...Deng, C. (2006). Dopamine transporter and D2 receptor binding densities in mice prone or resistant to chronic high fat diet-induced obesity. *Behav Brain Res*, *175*(2), 415-419. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.034>
- Huber, K. M., Roder, J. C., & Bear, M. F. (2001). Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*, *86*(1), 321-325. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.321>
- Hughes, R. N. (2004). The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev*, *28*(5), 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.006>
- Hunter, S. K., & Pereira, H. M. (2016). The aging neuromuscular system and motor performance. *121*(4), 982-995. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00475.2016>

- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*, *27*(14), 1919-1931. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.119>
- Inagaki, T., Gautreaux, C., & Luine, V. (2010). Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Horm Behav*, *58*(3), 415-426. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.013>
- Ingram, D. K., & de Cabo, R. (2017). Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res Rev*, *39*, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.008>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, *4*(9), 648-657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Inoue, K., Zorrilla, E. P., Tabarin, A., Valdez, G. R., Iwasaki, S., Kirriike, N., & Koob, G. F. (2004). Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. *Biol Psychiatry*, *55*(11), 1075-1081. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.01.026>
- Inoue, R., & Nishimune, H. (2023). Neuronal Plasticity and Age-Related Functional Decline in the Motor Cortex. *I2*(17). <https://doi.org/10.3390/cells12172142>
- Izídio, G. S., Lopes, D. M., Spricigo, L., Jr., & Ramos, A. (2005). Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. *Genes Brain Behav*, *4*(7), 412-419. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00121.x>
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112704>
- Jahng, J. W., Kim, J. G., Kim, H. J., Kim, B. T., Kang, D. W., & Lee, J. H. (2007). Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res*, *1150*, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.080>
- Jiang, N., Diaz, V., Strong, R., & Nelson, J. *Sex Differences in Lifespan Responding to Early and Late Onset Dietary Restriction*. *Innov Aging*, 2022 Dec 20;6(Suppl 1):816. doi: 10.1093/geroni/igac059.2937. eCollection 2022 Nov.
- Jimenez, J. C., Su, K., Goldberg, A. R., Luna, V. M., Biane, J. S., Ordek, G.,...Kheirbek, M. A. (2018). Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*, *97*(3), 670-683.e676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016>
- Jobim, P. F., Pedroso, T. R., Christoff, R. R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G. K., & Roesler, R. (2012). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem*, *97*(1), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.10.002>
- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev*, *28*(8), 811-825. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.006>
- Kaikaew, K., Grefhorst, A., & Visser, J. A. (2021). Sex Differences in Brown Adipose Tissue Function: Sex Hormones, Glucocorticoids, and Their Crosstalk. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 652444. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.652444>
- Kaikaew, K., Steenbergen, J., van Dijk, T. H., Grefhorst, A., & Visser, J. A. (2019). Sex Difference in Corticosterone-Induced Insulin Resistance in Mice. *Endocrinology*, *160*(10), 2367-2387. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00194>
- Kane, A. E., Gregson, E., Theou, O., Rockwood, K., & Howlett, S. E. (2017). The association between frailty, the metabolic syndrome, and mortality over the lifespan. *Geroscience*, *39*(2), 221-229. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9967-9>
- Kane, A. E., Hilmer, S. N., Boyer, D., Gavin, K., Nines, D., Howlett, S. E.,...Mitchell, S. J. (2016). Impact of Longevity Interventions on a Validated Mouse Clinical Frailty Index. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *71*(3), 333-339. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu315>



- Kane, A. E., Shin, S., Wong, A. A., Fertan, E., Faustova, N. S., Howlett, S. E., & Brown, R. E. (2018). Sex Differences in Healthspan Predict Lifespan in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, *10*, 172. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00172>
- Kang, S. A., Pacold, M. E., Cervantes, C. L., Lim, D., Lou, H. J., Ottina, K.,...Sabatini, D. M. (2013). mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*, *341*(6144), 1236566. <https://doi.org/10.1126/science.1236566>
- Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Périn, L.,...Holzenberger, M. (2008). Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol*, *6*(10), e254. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060254>
- Katewa, S. D., & Kapahi, P. (2010). Dietary restriction and aging, 2009. *Aging Cell*, *9*(2), 105-112. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00552.x>
- Keller, K., Kane, A., Heinze-Milne, S., Grandy, S. A., & Howlett, S. E. (2019). Chronic Treatment With the ACE Inhibitor Enalapril Attenuates the Development of Frailty and Differentially Modifies Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Aging Male and Female C57BL/6 Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *74*(8), 1149-1157. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly219>
- Kennard, J. A., & Woodruff-Pak, D. S. (2011). Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. *Front Aging Neurosci*, *3*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2011.00009>
- Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2016). The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab*, *23*(6), 990-1003. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.009>
- Kenny, R., Dinan, T., Cai, G., & Spencer, S. J. (2014). Effects of mild calorie restriction on anxiety and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in the male rat. *Physiol Rep*, *2*(3), e00265. <https://doi.org/10.1002/phy2.265>
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, *464*(7288), 504-512. <https://doi.org/10.1038/nature08980>
- Keys, A., Brožek, J., Henschel, A., Mickelsen, O., Taylor, H. L., Simonson, E.,...Williams, R. R. (1950). *The Biology of Human Starvation*  
*Volume I*. University of Minnesota Press. <https://doi.org/10.5749/j.ctv9b2tqv>
- Khakpai, F. (2014). The effect of opiodergic system and testosterone on anxiety behavior in gonadectomized rats. *Behav Brain Res*, *263*, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.013>
- Khandia, R., Dadar, M., & Munjal, A. (2019). A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *8*(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070674>
- Kheirouri, S., & Alizadeh, M. (2022). MIND diet and cognitive performance in older adults: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *62*(29), 8059-8077. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1925220>
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H.,...Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, *110*(2), 163-175. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00808-5)
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, *13*(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, *120*(4), 437-447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Koehl, M., Ladevèze, E., Catania, C., & Cota, D. (2021). Inhibition of mTOR signaling by genetic removal of p70 S6 kinase 1 increases anxiety-like behavior in mice. *11*(1), 165. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01187-5>
- Kontis, D., & Theochari, E. (2012). Dopamine in anorexia nervosa: a systematic review. *Behav Pharmacol*, *23*(5-6), 496-515. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328357e115>

- Korol, D. L., Gardner, R. S., Tunur, T., & Gold, P. E. (2019). Involvement of lactate transport in two object recognition tasks that require either the hippocampus or striatum. *Behav Neurosci*, *133*(2), 176-187. <https://doi.org/10.1037/bne0000304>
- Koss, W. A., Gehlert, D. R., & Shekhar, A. (2004). Different effects of subchronic doses of 17-beta estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Horm Behav*, *46*(2), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.02.011>
- Kouda, K., & Iki, M. (2010). Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J Physiol Anthropol*, *29*(4), 127-132. <https://doi.org/10.2114/jpa2.29.127>
- Kraus, W. E., Bhapkar, M., Huffman, K. M., Pieper, C. F., Krupa Das, S., Redman, L. M.,...Investigators, C. (2019). 2 years of calorie restriction and cardiometabolic risk (CALERIE): exploratory outcomes of a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *7*(9), 673-683. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30151-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30151-2)
- Lamming, D. W., Mihaylova, M. M., Katajisto, P., Baar, E. L., Yilmaz, O. H., Hutchins, A.,...Sabatini, D. M. (2014). Depletion of Rictor, an essential protein component of mTORC2, decreases male lifespan. *Aging Cell*, *13*(5), 911-917. <https://doi.org/10.1111/ace1.12256>
- Lamming, D. W., Ye, L., Sabatini, D. M., & Baur, J. A. (2013). Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest*, *123*(3), 980-989. <https://doi.org/10.1172/JCI64099>
- Lang, U. E., Heger, J., Willbring, M., Domula, M., Matschke, K., & Tugtekin, S. M. (2009). Immunosuppression using the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor everolimus: pilot study shows significant cognitive and affective improvement. *Transplant Proc*, *41*(10), 4285-4288. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.08.050>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274-293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Larson-Meyer, D. E., Redman, L., Heilbronn, L. K., Martin, C. K., & Ravussin, E. (2010). Caloric restriction with or without exercise: the fitness versus fatness debate. *Med Sci Sports Exerc*, *42*(1), 152-159. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181ad7f17>
- László, Z. I., & Lele, Z. (2022). Flying under the radar: CDH2 (N-cadherin), an important hub molecule in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Front Neurosci*, *16*, 972059. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.972059>
- Lauretani, F., Testa, C., Salvi, M., Zucchini, I., Lorenzi, B., Tagliaferri, S.,...Maggio, M. (2022). Reward System Dysfunction and the Motoric-Cognitive Risk Syndrome in Older Persons. *Biomedicines*, *10*(4).
- Le Couteur, D. G., Anderson, R. M., & de Cabo, R. (2018). Sex and Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *73*(2), 139-140. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx221>
- Le Couteur, D. G., Solon-Biet, S., Wahl, D., Cogger, V. C., Willcox, B. J., Willcox, D. C.,...Simpson, S. J. (2016). New Horizons: Dietary protein, ageing and the Okinawan ratio. *Age Ageing*, *45*(4), 443-447. <https://doi.org/10.1093/ageing/afw069>
- Lee, C. C., Huang, C. C., Wu, M. Y., & Hsu, K. S. (2005). Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem*, *280*(18), 18543-18550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414112200>
- Lee, J., Duan, W., Long, J. M., Ingram, D. K., & Mattson, M. P. (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*(2), 99-108. <https://doi.org/10.1385/jmn:15:2:99>
- Leussis, M. P., & Bolivar, V. J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, *30*(7), 1045-1064. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.006>
- Levy, E. A., Govic, A., Penman, J., Paolini, A. G., & Kent, S. (2007). Effects of adult-onset calorie restriction on anxiety-like behavior in rats. *Physiology & behavior*, *92*(5), 889-896. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.018>
- Levine, M. E. (2013). Modeling the rate of senescence: can estimated biological age predict mortality more accurately than chronological age? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *68*(6), 667-674. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls233>

- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A., Jr. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*, *19*(2), 181-191. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon>
- Li, H., Matheny, M., Nicolson, M., Tumer, N., & Scarpace, P. J. (1997). Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes*, *46*(12), 2035-2039. <https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2035>
- Liao, D., Grigoriants, O. O., Wang, W., Wiens, K., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2007). Distinct effects of individual opioids on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *35*(3), 456-469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.04.007>
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., & Bingham, S. A. (2000). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem*, *11*(6), 326-331. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(00\)00085-1](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(00)00085-1)
- Lipman, R. D., Smith, D. E., Bronson, R. T., & Blumberg, J. (1995). Is late-life caloric restriction beneficial? *Aging (Milano)*, *7*(2), 136-139. <https://doi.org/10.1007/bf03324303>
- Liu, H. H., & Li, J. J. (2015). Aging and dyslipidemia: a review of potential mechanisms. *Ageing Res Rev*, *19*, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.12.001>
- Liu, P., Gan, W., Chin, Y. R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J.,...Wei, W. (2015). PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov*, *5*(11), 1194-1209. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0460>
- Liu, S., Yao, S., Yang, H., Liu, S., & Wang, Y. (2023). Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*, *14*(10), 648. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06154-8>
- Lo, M. J., Kau, M. M., Cho, W. L., & Wang, P. S. (2000). Aging effects on the secretion of corticosterone in male rats. *J Investig Med*, *48*(5), 335-342.
- Loh, E., Kurth-Nelson, Z., Berron, D., Dayan, P., Duzel, E., Dolan, R., & Guitart-Masip, M. (2017). Parsing the Role of the Hippocampus in Approach-Avoidance Conflict. *Cereb Cortex*, *27*(1), 201-215. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw378>
- Longo, V. D., Di Tano, M., Mattson, M. P., & Guidi, N. (2021). Intermittent and periodic fasting, longevity and disease. *Nat Aging*, *1*(1), 47-59. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00013-3>
- Lopez-Lluch, G., & Navas, P. (2016). Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol*, *594*(8), 2043-2060. <https://doi.org/10.1113/JP270543>
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, *186*(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Lovick, T. A., & Zangrossi, H., Jr. (2021). Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. *Front Psychiatry*, *12*, 711065. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711065>
- Luine, V. (2015). Recognition memory tasks in neuroendocrine research. *Behav Brain Res*, *285*, 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.032>
- Lynn, D. A., & Brown, G. R. (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev Psychobiol*, *52*(8), 731-739. <https://doi.org/10.1002/dev.20468>
- Ma, L., Dong, W., Wang, R., Li, Y., Xu, B., Zhang, J.,...Wang, Y. (2015). Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. *Brain Res Bull*, *116*, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.06.004>
- Mahajan, K., & Mahajan, N. P. (2012). PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol*, *227*(9), 3178-3184. <https://doi.org/10.1002/jcp.24065>
- Maiese, K., Chong, Z. Z., Shang, Y. C., & Wang, S. (2013). mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med*, *19*(1), 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.001>
- Maric, I., Krieger, J. P., van der Velden, P., Borchers, S., Asker, M., Vujicic, M.,...Skibicka, K. P. (2022). Sex and Species Differences in the Development of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disturbances in Rodents. *Front Nutr*, *9*, 828522. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.828522>

- Martel, J., Chang, S. H., Wu, C. Y., Peng, H. H., Hwang, T. L., Ko, Y. F.,...Ojcius, D. M. (2021). Recent advances in the field of caloric restriction mimetics and anti-aging molecules. *Ageing Res Rev*, 66, 101240. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101240>
- Masoro, E. J. (2009). Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(10), 1040-1048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.011>
- Mathiasen, J. R., & DiCamillo, A. (2010). Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5, Unit 5.59. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0559s49>
- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L.,...de Cabo, R. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, 489(7415), 318-321. <https://doi.org/10.1038/nature11432>
- Mattson, M. P. (2014). Challenging oneself intermittently to improve health. *Dose Response*, 12(4), 600-618. <https://doi.org/10.2203/dose-response.14-028.Mattson>
- Mattson, M. P., Longo, V. D., & Harvie, M. (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev*, 39, 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>
- Mattson, M. P., Maudsley, S., & Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 27(10), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.001>
- McCay, C. M., Crowell, M. F., & Maynard, L. A. (1935). The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size: One Figure. *J Nutr*, 10(1), 63-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/10.1.63>
- McDonald, R. B., Horwitz, B. A., Hamilton, J. S., & Stern, J. S. (1988). Cold- and norepinephrine-induced thermogenesis in younger and older Fischer 344 rats. *Am J Physiol*, 254(3 Pt 2), R457-462. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.254.3.R457>
- Meites, J., Steger, R. W., & Huang, H. H. (1980). Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects. *Fed Proc*, 39(14), 3168-3172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7002619>
- Meltzer, C. C., Smith, G., DeKosky, S. T., Pollock, B. G., Mathis, C. A., Moore, R. Y.,...Reynolds, C. F., 3rd. (1998). Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology*, 18(6), 407-430. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00194-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00194-2)
- Mercken, E. M., Crosby, S. D., Lamming, D. W., JeBailey, L., Krzysik-Walker, S., Villareal, D. T.,...Fontana, L. (2013). Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell*, 12(4), 645-651. <https://doi.org/10.1111/accel.12088>
- Mirzaei, H., Suarez, J. A., & Longo, V. D. (2014). Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. *Trends Endocrinol Metab*, 25(11), 558-566. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.07.002>
- Mishra, A., Singh, S., & Shukla, S. (2018). Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *J Exp Neurosci*, 12, 1179069518779829. <https://doi.org/10.1177/1179069518779829>
- Mitchell, S. J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., Gonzalez-Reyes, J. A.,...de Cabo, R. (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab*, 23(6), 1093-1112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.027>
- Mladenovic Djordjevic, A., Perovic, M., Tesic, V., Tanic, N., Rakic, L., Ruzdijic, S., & Kanazir, S. (2010). Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem Int*, 56(2), 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.10.008>
- Mladenovic Djordjevic, A. N., Perovic, M., Smiljanic, K., Todorovic, S., Tesic, V., Ruzdijic, S., & Kanazir, S. (2014). The effects of dietary restriction and aging on amyloid precursor protein and presenilin-1 mRNA and protein expression in rat brain. *Neuroreport*, 25(6), 398-403. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000107>

- Mohan, A., Mather, K. A., Thalamuthu, A., Baune, B. T., & Sachdev, P. S. (2016). Gene expression in the aging human brain: an overview. *Curr Opin Psychiatry*, 29(2), 159-167. <https://doi.org/10.1097/ycp.0000000000000238>
- Mohr, A. E., McEvoy, C., Sears, D. D., Arciero, P. J., & Sweazea, K. L. (2021). Impact of intermittent fasting regimens on circulating markers of oxidative stress in overweight and obese humans: A systematic review of randomized controlled trials. *Advances in Redox Research*, 3, 100026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arres.2021.100026>
- Mohseni, F., Ghorbani Behnam, S., & Rafeaiee, R. (2020). A Review of the Historical Evolutionary Process of Dry and Water Maze Tests in Rodents. *Basic Clin Neurosci*, 11(4), 389-402. <https://doi.org/10.32598/bcn.11.4.1425.1>
- Moreira, E. A., Most, M., Howard, J., & Ravussin, E. (2011). Dietary adherence to long-term controlled feeding in a calorie-restriction study in overweight men and women. *Nutr Clin Pract*, 26(3), 309-315. <https://doi.org/10.1177/0884533611405992>
- Morgan, T. E., Wong, A. M., & Finch, C. E. (2007). Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. *Interdiscip Top Gerontol*, 35, 83-97. <https://doi.org/10.1159/000096557>
- Moro, T., Tinsley, G., Bianco, A., Marcolin, G., Pacelli, Q. F., Battaglia, G.,...Paoli, A. (2016). Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *J Transl Med*, 14(1), 290. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1044-0>
- Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Barnes, L. L., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet slows cognitive decline with aging. *Alzheimers Dement*, 11(9), 1015-1022. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.04.011>
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci*, 13(4), 240-250. <https://doi.org/10.1038/nrn3200>
- Morselli, E., Maiuri, M. C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K.,...Kroemer, G. (2010). Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*, 1(1), e10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.8>
- Most, J., Gilmore, L. A., Smith, S. R., Han, H., Ravussin, E., & Redman, L. M. (2018). Significant improvement in cardiometabolic health in healthy nonobese individuals during caloric restriction-induced weight loss and weight loss maintenance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 314(4), E396-e405. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00261.2017>
- Most, J., Tosti, V., Redman, L. M., & Fontana, L. (2017). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev*, 39, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005>
- Muller, M., Bélanger, J., Hadj-Aissa, I., Zhang, C., & Sephton, C. F. (2024). GATOR1 Mutations Impair PI3 Kinase-Dependent Growth Factor Signaling Regulation of mTORC1. 25(4). <https://doi.org/10.3390/ijms25042068>
- Myers, J., Kokkinos, P., & Nyelin, E. (2019). Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071652>
- Myskiw, J. C., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, 89(3), 338-351. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.002>
- Nikolaus, S., Antke, C., Beu, M., & Müller, H. W. (2010). Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders--results from in vivo imaging studies. *Rev Neurosci*, 21(2), 119-139. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2010.21.2.119>
- Oh, W. J., & Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*, 10(14), 2305-2316. <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16586>
- Osborne, T. B., Mendel, L. B., & Ferry, E. L. (1917). THE EFFECT OF RETARDATION OF GROWTH UPON THE BREEDING PERIOD AND DURATION OF LIFE OF RATS. *Science*, 45(1160), 294-295. <https://doi.org/10.1126/science.45.1160.294>
- Ouellette, A. R., Hadad, N., Deighan, A., Robinson, L., O'Connell, K., Freund, A.,...Kaczorowski, C. C. (2022). Life-long dietary restrictions have negligible or damaging effects on late-life cognitive

- performance: A key role for genetics in outcomes. *Neurobiol Aging*, *118*, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2022.07.004>
- Our world in data*. <https://ourworldindata.org/>
- Pal, S., & Tyler, J. K. (2016). Epigenetics and aging. *Sci Adv*, *2*(7), e1600584. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600584>
- Pandaranandaka, J., Poonyachoti, S., & Kalandakanond-Thongsong, S. (2006). Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiology & behavior*, *87*(4), 828-835. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.02.002>
- Panwar, V., Singh, A., Bhatt, M., Tonk, R. K., Azizov, S., Raza, A. S.,...Garg, M. (2023). Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *8*(1), 375. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01608-z>
- Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., Pollak, M., Mallette, F. A., Topisirovic, I., & Hulea, L. (2019). mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Res*, *8*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17196.1>
- Parikh, I., Guo, J., Chuang, K. H., Zhong, Y., Rempe, R. G., Hoffman, J. D.,...Lin, A. L. (2016). Caloric restriction preserves memory and reduces anxiety of aging mice with early enhancement of neurovascular functions. *Aging (Albany NY)*, *8*(11), 2814-2826. <https://doi.org/10.18632/aging.101094>
- Park, D. C., & Reuter-Lorenz, P. (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*, *60*, 173-196. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093656>
- Park, H. K., & Ahima, R. S. (2014). Leptin signaling. *F1000Prime Rep*, *6*, 73. <https://doi.org/10.12703/P6-73>
- Parks, R. J., Fares, E., Macdonald, J. K., Ernst, M. C., Sinal, C. J., Rockwood, K., & Howlett, S. E. (2012). A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *67*(3), 217-227. <https://doi.org/10.1093/gerona/qlr193>
- Parsons, R. G., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J Neurosci*, *26*(50), 12977-12983. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4209-06.2006>
- Patterson, R. E., & Sears, D. D. (2017). Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr*, *37*, 371-393. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064634>
- Perovic, M., Tesic, V., Mladenovic Djordjevic, A., Smiljanic, K., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Ruzdijic, S., & Kanazir, S. (2013). BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age (Dordr)*, *35*(6), 2057-2070. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9495-6>
- Portero-Tresserra, M., Rojic-Becker, D., Vega-Carbajal, C., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martínez, A., & Martí-Nicolovius, M. (2020). Caloric restriction modulates the monoaminergic system and metabolic hormones in aged rats. *Sci Rep*, *10*(1), 19299. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76219-7>
- Preissmann, D., Leuba, G., Savary, C., Vernay, A., Kraftsik, R., Riederer, I. M.,...Savioz, A. (2012). Increased postsynaptic density protein-95 expression in the frontal cortex of aged cognitively impaired rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, *237*(11), 1331-1340. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012020>
- Prvulovic, M., Sokanovic, S., Simeunovic, V., Vukojevic, A., Jovic, M., Todorovic, S., & Mladenovic, A. (2024). The complex relationship between late-onset caloric restriction and synaptic plasticity in aged Wistar rats. *76*(8), 548-562. <https://doi.org/10.1002/iub.2812>
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E., & Chen, D. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*, *12*(6), 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.015>
- Quiros Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., de Paula, F. J. A.,...Antunes-Rodrigues, J. (2020). Sex differences in body composition, metabolism-related

- hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiol Rep*, 8(20), e14597. <https://doi.org/10.14814/phy2.14597>
- Renard, G. M., Suárez, M. M., Levin, G. M., & Rivarola, M. A. (2005). Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiology & behavior*, 85(3), 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.05.003>
- Reus, G. Z., Valvassori, S. S., Machado, R. A., Martins, M. R., Gavioli, E. C., & Quevedo, J. (2008). Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 376(5), 295-300. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0235-x>
- Revuelta, M., & Matheu, A. (2017). Autophagy in stem cell aging. *Aging Cell*, 16(5), 912-915. <https://doi.org/10.1111/accel.12655>
- Ribeiro, L. C., Rodrigues, L., Quincozes-Santos, A., Tramontina, A. C., Bambini-Junior, V., Zanotto, C.,...Gottfried, C. (2012). Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. *Brain Res*, 1472, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.021>
- Rieckmann, A., & Nyberg, L. (2020). Cognitive Aging: The Role of Neurotransmitter Systems. In A. K. Thomas & A. Gutchess (Eds.), *The Cambridge Handbook of Cognitive Aging: A Life Course Perspective* (pp. 82-100). Cambridge University Press. <https://doi.org/DOI:10.1017/9781108552684.006>
- Risbrough, V. B., & Stein, M. B. (2006). Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Horm Behav*, 50(4), 550-561. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.06.019>
- Rockwood, K., Blodgett, J. M., Theou, O., Sun, M. H., Feridooni, H. A., Mitnitski, A.,...Howlett, S. E. (2017). A Frailty Index Based On Deficit Accumulation Quantifies Mortality Risk in Humans and in Mice. *Sci Rep*, 7, 43068. <https://doi.org/10.1038/srep43068>
- Rockwood, K., Song, X., MacKnight, C., Bergman, H., Hogan, D. B., McDowell, I., & Mitnitski, A. (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *Cmaj*, 173(5), 489-495. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050051>
- Romeo, R. D., Staub, D., Jasnow, A. M., Karatsoreos, I. N., Thornton, J. E., & McEwen, B. S. (2005). Dihydrotestosterone increases hippocampal N-methyl-D-aspartate binding but does not affect choline acetyltransferase cell number in the forebrain or choline transporter levels in the CA1 region of adult male rats. *Endocrinology*, 146(4), 2091-2097. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0886>
- Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol Cell Biol*, 38(12). <https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>
- Russo, E., Leo, A., Crupi, R., Aiello, R., Lippiello, P., Spiga, R.,...De Sarro, G. (2016). Everolimus improves memory and learning while worsening depressive- and anxiety-like behavior in an animal model of depression. *J Psychiatr Res*, 78, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.03.008>
- Sabatino, F., Masoro, E. J., McMahan, C. A., & Kuhn, R. W. (1991). Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J Gerontol*, 46(5), B171-179. <https://doi.org/10.1093/geronj/46.5.b171>
- Sanchez-Morate, E., Gimeno-Mallench, L., Stromsnes, K., Sanz-Ros, J., Roman-Dominguez, A., Parejo-Pedrajas, S.,...Mas-Bargues, C. (2020). Relationship between Diet, Microbiota, and Healthy Aging. *Biomedicines*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080287>
- Sandri, M., Barberi, L., Bijlsma, A. Y., Blaauw, B., Dyar, K. A., Milan, G.,...Schiaffino, S. (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology*, 14(3), 303-323. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9432-9>
- Santini, Z. I., Jose, P. E., York Cornwell, E., Koyanagi, A., Nielsen, L., Hinrichsen, C.,...Koushede, V. (2020). Social disconnectedness, perceived isolation, and symptoms of depression and anxiety among older Americans (NSHAP): a longitudinal mediation analysis. *Lancet Public Health*, 5(1), e62-e70. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(19\)30230-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(19)30230-0)

- Santollo, J., Yao, D., Neal-Perry, G., & Etgen, A. M. (2012). Middle-aged female rats retain sensitivity to the anorexigenic effect of exogenous estradiol. *Behav Brain Res*, *232*(1), 159-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.010>
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1983). The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol*, *18*(1), 55-64. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(83\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0531-5565(83)90051-7)
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H.,...Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, *14*(14), 1296-1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F.,...Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, *22*(2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Saré, R. M., Huang, T., Burlin, T., Loutaev, I., & Smith, C. B. (2018). Decreased rates of cerebral protein synthesis measured in vivo in a mouse model of Tuberous Sclerosis Complex: unexpected consequences of reduced tuberin. *145*(5), 417-425. <https://doi.org/10.1111/jnc.14311>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Scarpace, P. J., Matheny, M., Borst, S., & Tumer, N. (1994). Thermoregulation with age: role of thermogenesis and uncoupling protein expression in brown adipose tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*, *205*(2), 154-161. <https://doi.org/10.3181/00379727-205-43691>
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*, *221*(2), 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J., & Forster, G. L. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & behavior*, *211*, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>
- Schulz, K., & Korz, V. (2010). Hippocampal testosterone relates to reference memory performance and synaptic plasticity in male rats. *Front Behav Neurosci*, *4*, 187. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00187>
- Seidler, R. D., Bernard, J. A., Burutolu, T. B., Fling, B. W., Gordon, M. T., Gwin, J. T.,...Lipps, D. B. (2010). Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev*, *34*(5), 721-733. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.005>
- Seimon, R. V., Hostland, N., Silveira, S. L., Gibson, A. A., & Sainsbury, A. (2013). Effects of energy restriction on activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in obese humans and rodents: implications for diet-induced changes in body composition. *Horm Mol Biol Clin Investig*, *15*(2), 71-80. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0038>
- Seliger, D. L. (1977). Effects of age, sex, and brightness of field on open-field behaviors of rats. *Percept Mot Skills*, *45*(3 Pt 2), 1059-1067. <https://doi.org/10.2466/pms.1977.45.3f.1059>
- Sengupta, A., Molkentin, J. D., & Yutzey, K. E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, *284*(41), 28319-28331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024406>
- Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S., & Sabatini, D. M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*, *468*(7327), 1100-1104. <https://doi.org/10.1038/nature09584>
- Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(3), 155-162. <https://doi.org/10.1038/nrm3757>
- Simpson, S. J., & Raubenheimer, D. (2009). Macronutrient balance and lifespan. *Aging (Albany NY)*, *1*(10), 875-880. <https://doi.org/10.18632/aging.100098>



- Small, S. A., Schobel, S. A., Buxton, R. B., Witter, M. P., & Barnes, C. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci*, *12*(10), 585-601. <https://doi.org/10.1038/nrn3085>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9654-z>
- Smith, S. F., & Collins, S. E. (2020). Ras, PI3K and mTORC2 - three's a crowd? , *133*(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.234930>
- Snyder, H. R., Kaiser, R. H., Whisman, M. A., Turner, A. E., Guild, R. M., & Munakata, Y. (2014). Opposite effects of anxiety and depressive symptoms on executive function: the case of selecting among competing options. *Cogn Emot*, *28*(5), 893-902. <https://doi.org/10.1080/02699931.2013.859568>
- Sotoudeh, N., Namavar, M. R., Zarifkar, A., & Heidarzadegan, A. R. (2020). Age-dependent changes in the medial prefrontal cortex and medial amygdala structure, and elevated plus-maze performance in the healthy male Wistar rats. *IBRO Rep*, *9*, 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.08.002>
- Speakman, J. R., & Mitchell, S. E. (2011). Caloric restriction. *Mol Aspects Med*, *32*(3), 159-221. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001>
- Spilman, P., Podlutska, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D.,...Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, *5*(4), e9979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009979>
- Squire, L. R., & Davis, H. P. (1981). The pharmacology of memory: a neurobiological perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *21*, 323-356. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.21.040181.001543>
- Stern, J. J., & Zwick, G. (1972). Hormonal Control of Spontaneous Activity during the Estrous Cycle of the Rat. *Psychological Reports*, *30*, 983 - 988.
- Stewart, T. M., & Martin, C. K. (2022). The Complicated Relationship between Dieting, Dietary Restraint, Caloric Restriction, and Eating Disorders: Is a Shift in Public Health Messaging Warranted? , *19*(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph19010491>
- Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., & Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(9), 3791-3796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014715108>
- Sukoff Rizzo, S. J., Anderson, L. C., Green, T. L., McGarr, T., Wells, G., & Winter, S. S. (2018). Assessing Healthspan and Lifespan Measures in Aging Mice: Optimization of Testing Protocols, Replicability, and Rater Reliability. *Curr Protoc Mouse Biol*, *8*(2), e45. <https://doi.org/10.1002/cpmo.45>
- Sutton, E. F., Beyl, R., Early, K. S., Cefalu, W. T., Ravussin, E., & Peterson, C. M. (2018). Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab*, *27*(6), 1212-1221 e1213. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.010>
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, *341*, 112-153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>
- Szwed, A., Kim, E., & Jacinto, E. (2021). Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *101*(3), 1371-1426. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2020>
- Tachibana, T. (1986). Two Types of Strain Differences in Open-Field Behavior in Rats and their Mapping. *The Journal of General Psychology*, *113*(3), 263-275. <https://doi.org/10.1080/00221309.1986.9711037>
- Takahara, T., & Maeda, T. (2013). Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling. *J Biochem*, *154*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt047>

- Tamura, K., Sasaki, H., Shiga, K., Miyakawa, H., & Shibata, S. (2019). The Timing Effects of Soy Protein Intake on Mice Gut Microbiota. *Nutrients*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010087>
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(1), 467-472. <https://doi.org/10.1073/pnas.012605299>
- Taxier, L. R., Gross, K. S., & Frick, K. M. (2020). Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(10), 535-550. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7>
- Taxier, L. R., Philippi, S. M., Fortress, A. M., & Frick, K. M. (2019). Dickkopf-1 blocks 17beta-estradiol-enhanced object memory consolidation in ovariectomized female mice. *Horm Behav*, *114*, 104545. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.06.009>
- Teng, L. L., Lu, G. L., Chiou, L. C., Lin, W. S., Cheng, Y. Y., Hsueh, T. E.,... Wang, P. Y. (2019). Serotonin receptor HTR6-mediated mTORC1 signaling regulates dietary restriction-induced memory enhancement. *17*(3), e2007097. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2007097>
- Teofilovic, A., Vratarić, M., Velickovic, N., Vojnovic Milutinovic, D., Mladenovic, A., Prvulovic, M., & Djordjevic, A. (2022). Late-Onset Calorie Restriction Improves Lipid Metabolism and Aggravates Inflammation in the Liver of Old Wistar Rats. *Front Nutr*, *9*, 899255. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.899255>
- Tesic, V., Ciric, J., Jovanovic Macura, I., Zogovic, N., Milanovic, D., Kanazir, S., & Perovic, M. (2021). Corticosterone and Glucocorticoid Receptor in the Cortex of Rats during Aging—The Effects of Long-Term Food Restriction. *Nutrients*, *13*(12), 4526. <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/12/4526>
- Thobe, K., Sers, C., & Siebert, H. (2017). Unraveling the regulation of mTORC2 using logical modeling. *Cell Commun Signal*, *15*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0159-5>
- Thomas, G. M., Rumbaugh, G. R., Harrar, D. B., & Haganir, R. L. (2005). Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(42), 15006-15011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507476102>
- Tischmeyer, W., Schicknick, H., Kraus, M., Seidenbecher, C. I., Staak, S., Scheich, H., & Gundelfinger, E. D. (2003). Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci*, *18*(4), 942-950. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02820.x>
- Todorović, S. (2019). *Uticaj dugotrajne dijetalne restrikcije na insulinski signalni put u mozgu pacova tokom starenja: doktorska disertacija* University of Belgrade ]. <http://phaidrabg.bg.ac.rs/o:20262>.
- Todorovic, S. T., Smiljanic, K. R., Ruzdijic, S. D., Djordjevic, A. N. M., & Kanazir, S. D. (2018). Effects of Different Dietary Protocols on General Activity and Frailty of Male Wistar Rats During Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *73*(8), 1036-1044. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly015>
- Toufexis, D. J., Lipatova, O., Johnson, A. C., & Abizaid, A. (2016). Food-Restriction Lowers the Acoustic Startle Response in both Male and Female Rats, and, in Combination with Acute Ghrelin Injection, Abolishes the Expression of Fear-Potentiated Startle in Male Rats. *J Neuroendocrinol*, *28*(11). <https://doi.org/10.1111/jne.12436>
- Trepanowski, J. F., & Bloomer, R. J. (2010). The impact of religious fasting on human health. *Nutr J*, *9*, 57. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-57>
- Trepanowski, J. F., Kroeger, C. M., Barnosky, A., Klempel, M. C., Bhutani, S., Hoddy, K. K.,... Varady, K. A. (2017). Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*, *177*(7), 930-938. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2017.0936>
- Troca-Marin, J. A., Alves-Sampaio, A., & Montesinos, M. L. (2011). An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci*, *31*(26), 9445-9455. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0011-11.2011>

- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*, 8(4), 262-275. <https://doi.org/10.1038/nrn2090>
- Turturro, A., Witt, W. W., Lewis, S., Hass, B. S., Lipman, R. D., & Hart, R. W. (1999). Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 54(11), B492-501. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.11.b492>
- Tuscher, J. J., Luine, V., Frankfurt, M., & Frick, K. M. (2016). Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *J Neurosci*, 36(5), 1483-1489. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3135-15.2016>
- Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L. J., & Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 287(36), 30240-30256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374405>
- Valle, A., Catala-Niell, A., Colom, B., Garcia-Palmer, F. J., Oliver, J., & Roca, P. (2005). Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(1), E15-22. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00553.2004>
- van den Buuse, M., Van Acker, S. A., Fluttert, M., & De Kloet, E. R. (2001). Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. *Psychophysiology*, 38(3), 490-499. <https://doi.org/10.1017/s0048577201990687>
- van Goethem, N. P., Rutten, K., van der Staay, F. J., Jans, L. A., Akkerman, S., Steinbusch, H. W.,...Prickaerts, J. (2012). Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav Brain Res*, 232(2), 323-334. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.023>
- Varady, K. A., Bhutani, S., Klempel, M. C., Kroeger, C. M., Trepanowski, J. F., Haus, J. M.,...Calvo, Y. (2013). Alternate day fasting for weight loss in normal weight and overweight subjects: a randomized controlled trial. *Nutr J*, 12(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-146>
- Vaughan, K. L., Kaiser, T., Peadar, R., Anson, R. M., de Cabo, R., & Mattison, J. A. (2017). Caloric Restriction Study Design Limitations in Rodent and Nonhuman Primate Studies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(1), 48-53. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx088>
- Vedder, L. C., Smith, C. C., Flannigan, A. E., & McMahon, L. L. (2013). Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus*, 23(1), 108-115. <https://doi.org/10.1002/hipo.22068>
- Vekshina, N. L., Anokhin, P. K., Veretinskaya, A. G., & Shamakina, I. Y. (2017). [Heterodimeric D1-D2 dopamine receptors: a review]. *Biomed Khim*, 63(1), 5-12. <https://doi.org/10.18097/pbmc201763015> (Geteromernye komplekсы D1-D2-dofaminovykh retseptorov: obzor literaturnykh dannyxh.)
- Velthuis-te Wierik, E. J., van den Berg, H., Schaafsma, G., Hendriks, H. F., & Brouwer, A. (1994). Energy restriction, a useful intervention to retard human ageing? Results of a feasibility study. *Eur J Clin Nutr*, 48(2), 138-148. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194495>
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., & Maggi, A. (2016). Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr Rev*, 37(4), 372-402. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1007>
- Villareal, D. T., Banks, M., Sinacore, D. R., Siener, C., & Klein, S. (2006). Effect of weight loss and exercise on frailty in obese older adults. *Arch Intern Med*, 166(8), 860-866. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.8.860>
- Viña, J., Gambini, J., García-García, F. J., Rodríguez-Mañas, L., & Borrás, C. (2013). Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 16(2), 65-72. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0039>
- Vinogradova, E. P. (1999). [The effect of different stages of the sex cycle on rat behavior in a plus maze]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 49(6), 1039-1045. (Vliianie razlichnykh stadii polovogo tsikla na povedenie krysa v krestoobraznom labirinte.)
- Vogel-Ciernia, A., Matheos, D. P., Barrett, R. M., Kramár, E. A., Azzawi, S., Chen, Y.,...Wood, M. A. (2013). The neuron-specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory. *Nat Neurosci*, 16(5), 552-561. <https://doi.org/10.1038/nn.3359>

- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*, 69, 8.31.31-17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37), 15037-15042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Walford, R. L., Mock, D., Verdery, R., & MacCallum, T. (2002). Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57(6), B211-224. <https://doi.org/10.1093/gerona/57.6.b211>
- Wallace, M., Luine, V., Arellanos, A., & Frankfurt, M. (2006). Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res*, 1126(1), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.064>
- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83(3), 482-504.
- Wang, C., Zhang, Y., Shao, S., Cui, S., Wan, Y., & Yi, M. (2019). Ventral Hippocampus Modulates Anxiety-Like Behavior in Male But Not Female C57BL/6 J Mice. *Neuroscience*, 418, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.032>
- Wang, Y., Li, Y., Ding, H., Li, D., Shen, W., & Zhang, X. (2023). The Current State of Research on Sirtuin-Mediated Autophagy in Cardiovascular Diseases. *J Cardiovasc Dev Dis*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jcdd10090382>
- Weiss, E. P., Racette, S. B., Villareal, D. T., Fontana, L., Steger-May, K., Schechtman, K. B.,...Washington University School of Medicine, C. G. (2007). Lower extremity muscle size and strength and aerobic capacity decrease with caloric restriction but not with exercise-induced weight loss. *J Appl Physiol (1985)*, 102(2), 634-640. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00853.2006>
- Whimbey, A. E., & Denenberg, V. H. (1967). Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol*, 63(3), 500-504. <https://doi.org/10.1037/h0024620>
- Whitehead, J. C., Hildebrand, B. A., Sun, M., Rockwood, M. R., Rose, R. A., Rockwood, K., & Howlett, S. E. (2014). A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(6), 621-632. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt136>
- Wollnik, F., & Turek, F. W. (1988). Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiology & behavior*, 43(3), 389-396. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90204-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90204-1)
- Wu, P., Jiang, C., Shen, Q., & Hu, Y. (2009). Systematic gene expression profile of hypothalamus in calorie-restricted mice implicates the involvement of mTOR signaling in neuroprotective activity. *Mech Ageing Dev*, 130(9), 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.07.005>
- Wu, X., Zhao, W., Cui, Q., & Zhou, Y. (2020). Computational screening of potential regulators for mRNA-protein expression level discrepancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 523(1), 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.052>
- Xie, K., Kapetanou, M., Sidiropoulou, K., Bano, D., Gonos, E. S., Djordjevic, A. M., & Ehninger, D. (2020). Signaling pathways of dietary energy restriction and metabolism on brain physiology and in age-related neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev*, 192, 111364. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111364>
- Xue, Q. L. (2011). The frailty syndrome: definition and natural history. *Clin Geriatr Med*, 27(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.08.009>
- Yaghmaie, F., Saeed, O., Garan, S. A., Freitag, W., Timiras, P. S., & Sternberg, H. (2005). Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice. *Neuro Endocrinol Lett*, 26(3), 197-203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990721>
- Yang, F., Chu, X., Yin, M., Liu, X., Yuan, H., Niu, Y., & Fu, L. (2014). mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav Brain Res*, 264, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.005>

- Yang, P. C., Yang, C. H., Huang, C. C., & Hsu, K. S. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem*, 283(5), 2631-2643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706954200>
- Yang, S. T., Shi, Y., Wang, Q., Peng, J. Y., & Li, B. M. (2014). Neuronal representation of working memory in the medial prefrontal cortex of rats. *Mol Brain*, 7, 61. <https://doi.org/10.1186/s13041-014-0061-2>
- Yoon, S. O., & Roux, P. P. (2013). Rapamycin resistance: mTORC1 substrates hold some of the answers. *Curr Biol*, 23(19), R880-883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.030>
- Yorke, A., Kane, A. E., Hancock Friesen, C. L., Howlett, S. E., & O'Blenes, S. (2017). Development of a Rat Clinical Frailty Index. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 72(7), 897-903. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw339>
- Yu, B. P., Masoro, E. J., & McMahan, C. A. (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol*, 40(6), 657-670. <https://doi.org/10.1093/geronj/40.6.657>
- Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med*, 18(9), 591-603.
- Zhai, J., Kongsberg, W. H., Pan, Y., Hao, C., Wang, X., & Sun, J. (2022). Caloric restriction induced epigenetic effects on aging. *Front Cell Dev Biol*, 10, 1079920. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1079920>
- Zhen, J., Reith, M. E., & Carr, K. D. (2006). Chronic food restriction and dopamine transporter function in rat striatum. *Brain Res*, 1082(1), 98-101. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.094>
- Zullo, A., Simone, E., Grimaldi, M., Musto, V., & Mancini, F. P. (2018). Sirtuins as Mediator of the Anti-Ageing Effects of Calorie Restriction in Skeletal and Cardiac Muscle. *Int J Mol Sci*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040928>

## BIOGRAFIJA

Milica Prvulović je rođena 13.04.1992. godine u Požarevcu. Osnovnu školu završila je u Ranovcu, a srednju u Beogradu. Osnovne akademske studije upisala je 2011. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (BF UB), modul Molekularna biologija i fiziologija, a diplomirala je 2017. godine. Master akademske upisala je 2017. godine na BF UB, modul Eksperimentalna biomedicina, a završila 2018. godine. Doktorske akademske studije je upisala 2018. godine na BF UB, u okviru studijskog programa Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Od decembra 2018. godine zaposlena je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju UB. Zvanje istraživač pripravnik je stekla u decembru 2018. godine, a zvanje istraživač saradnik u junu 2021. godine.

Milica Prvulović je dobitnik nekoliko inostranih grantova za učešće i prezentovanje rezultata na kongresima, među kojima se ističe FENS Travel Grant award za učešće na „11th IBRO World Congress of Neuroscience IBRO 2023 – Granada“, FENS-IBRO/PERC Travel Grant award za učešće na FENS Forum 2022, i COST stipendija za učešće na 1st Forum on Fermented Foods - 3F 2023.

Milica Prvulović je tokom 2024/2025 rukovodila projektom IAM-FerCo u okviru SEED granta finansiranog od strane SAIGE. Član je Omladinskog odbora Mediteranskog društva za neuronauke (YMNSC), i aktivni član COST akcije CA20128, Evropske federacije društava za neuronauke (FENS), Društva za neuronauke Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju (MolBioS). Autor je ili koautor 8 naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima iz M20 kategorije (jedan M21a, pet M21, jedan M22 i jedan M23). Autor je brojnih saopštenja na međunarodnim skupovima iz kategorije M34.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Првуловић

број индекса Б3012/2018

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај режима смањеног уноса хране различитог трајања на понашање и mTOR сигнални пут у кори великог мозга и хипокампусу мужјака и женки *Wistar* 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, 24.02.2025.

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Милица Првуловић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3012/2018 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада Утицај режима смањеног уноса хране различитог трајања на понашање и mTOR сигнални пут у кори великог мозга и хипокампусу мужјака и женки *Wistar* пацова током старења

Ментор др Александра Младеновић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Милица Првуловић \_\_\_\_\_

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, 24.02.2025. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Изјава о коришћењу

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

Утицај режима смањеног уноса хране различитог трајања на понашање и mTOR сигнални пут у кори великог мозга и хипокампусу мужјака и женки *Wistar* 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, 24.02.2025.

\_\_\_\_\_

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.