

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Vedrana Ivić

**Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i  
inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora  
liječenih metforminom i liraglutidom**

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Doktorska disertacija

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

**Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih  
Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom**

Vedrana Ivić

**Disertacija je izrađena u:** Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Zagreb i Laboratoriju Zavoda za farmakodinamiku i biofarmaciju Sveučilišta u Szegedu, Szeged, Mađarska / Disertaciju je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-09-2014-2324 i Udruženje za regionalnu suradnju u zdravstvu, znanosti i tehnologiji (RECOOP HST Association).

**Mentor:** Prof.dr.sc. Marija Heffer, znanstveni savjetnik

**Kratki sažetak doktorske disertacije:** Cilj ovog istraživanja je na vlastitom animalnom modelu za pretilost potvrditi spolno specifičan razvoj inzulinske i leptinske rezistencije te utvrditi međuisnost razvoja rezistencije sa stupnjem upale. Također, istraživane su spolno specifične razlike u odgovoru središnjeg živčanog sustava na rano primijenjene antidijabetike metformin i liraglutid.

**Broj stranica:** 181

**Broj slika:** 85

**Broj tablica:** 63

**Broj literaturnih navoda:** 108

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** leptinski receptor, inzulinski receptor, prehrana bogata mastima i ugljikohidratima, dijabetes, neurodegeneracija, metformin, liraglutid

**Datum obrane:** 16. svibnja, 2017.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.
2. Doc. dr. sc. Valentina Pavić
3. Doc. dr. dc. Barbara Viljetić

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruder Bošković Institute**

**PhD thesis**

**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of  
Molecular biosciences**

**Scientific Area:** Biomedicine and healthcare

**Scientific Field:** Basic medical sciences

**A link between low-grade inflammation and leptin and insulin resistance in the brain of adult obese Sprague-Dawley rats treated with metformin and liraglutide**

Vedrana Ivić

**Thesis performed at:** Laboratory for Neurobiology, Faculty of Medicine Osijek, Laboratory for Molecular Neurobiology and Neurochemistry, Croatian Institute for Brain Research, Zagreb and Laboratory at Department of Pharmacodynamics and Biopharmacy, University of Szeged, Hungary / Thesis is supported in part by the Croatian Science Foundation under project number IP-09-2014-2324 and in part by the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology (RECOOP HST Association).

**Supervisor:** Professor Marija Heffer, MD, PhD

**Short abstract:** The aim of this research is to understand the mechanism of sex-specific development of insulin and leptin resistance on our own obesity animal model and to identify mutual reliance between these resistances and degree of inflammation. Furthermore, this research investigated sex-specific differences in central nervous system response to early application of antidiabetic drugs metformin and liraglutid.

**Number of pages:** 181

**Number of figures:** 85

**Number of tables:** 63

**Number of references:** 108

**Original language:** Croatian

**Key words:** leptinski receptor, inzulinski receptor, prehrana bogata mastima i ugljikohidratima, dijabetes, neurodegeneracija, metformin, liraglutid

**Date of the thesis defense:** May 16<sup>th</sup>, 2017

**Reviewers:**

1. Professor Ines Drenjančević, MD, PhD
2. Assistant professor Valentina Pavić, PhD
3. Assistant professor Barbara Viljetić, PhD

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

---

*Želim prije svega zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer, dr. med. na savjetima, pomoći i podršci prilikom ne samo izrade ovog rada nego i uvijek kada mi zatreba savjet ili pomoć.*

*Ogromno HVALA, koje nikad neću moći dovoljno puta izgovoriti, upućujem uvijek nasmijanima Marti Balog, Ireni Labak i Senki Blažetić. Hvala Vam na pomoći, strpljenju i stalnoj dostupnosti za raspravu, a prije svega na neiscrpnom izvoru pozitivne energije koju ste mi upućivale ne samo tijekom izrade ovog rada nego i kada mi je pozitivne energije nedostajalo!*

*Zahvaljujem svojoj neposrednoj učiteljici i savjetnici, a sada i članici Povjerenstva za obranu doktorata, doc. dr. sc. Barbari Viljetić na savjetima i podršci koji traju od dana kada sam se zaposlila.*

*Hvala prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr.med. i doc. dr. sc. Valentini Pavić što su pristale biti članice Povjerenstva za obranu doktorata te na pomoći savjetima.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj-Bognar, dr.sc. Kristini Mlinac-Jerković i Katarini Ilić, dr. med. na savjetima i pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Posebno zahvaljujem Danielu Franjiću i Valentini Perković na bezuvjetnoj podršci!*

*Zahvaljujem Miloradu Zjaliću na pomoći koja je uštedjela dane i noći analiza.*

*Hvala mojoj obitelji, mojim dečkima - velikima i malima, roditeljima, svekru i carici svekrvi :), na strpljenju i podršci tijekom izrade ovog rada.  
Bez vas nikada ne bih postigla ovoliko, a ne bi ni imalo smisla.*

---

# Sadržaj

---

1. UVOD .....	1
1.1. Nadzor energetske stanja organizma.....	2
1.2. Hormoni uključeni u nadzor energetske stanja organizma i njihovi receptori u mozgu .....	5
1.2.1. Inzulin i njegov receptor u mozgu .....	5
1.2.2. Čimbenik rasta nalik inzulinu 1 i njegov receptor.....	9
1.2.3. Leptin i njegov receptor u mozgu.....	10
1.3. Uzroci poremećaja nadzora energetske stanja organizma.....	13
1.3.1. Karakteristike upalnog odgovora potaknutog pretilošću.....	15
1.3.2. Glija u upali mozga potaknutoj pretilošću.....	16
1.4. Promjene sastava lipidnih splavi - mogući uzrok razvoja centralne inzulinske i leptinske rezistencije.....	18
1.5. Hipokampus je mjesto neurodegeneracije uslijed inzulinske i leptinske rezistencije .....	21
1.6. Antidijetici metformin i liraglutid .....	21
1.6.1. Metformin.....	21
1.6.2. Liraglutid.....	22
2. CILJ RADA.....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. Materijal .....	26
3.1.1. Pokusne životinje .....	26
3.2. Metode.....	27
3.2.1. Imunohistokemijska analiza .....	27
3.2.1.1. Priprema tkiva za imunohistokemijsko bojanje.....	28
3.2.1.2. Imunohistokemijsko bojanje .....	29
3.2.1.3. Procjena izražaja IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$ i ObR te morfologije GFAP- i Iba1-pozitivnih stanica računanim programom Fiji.....	31
3.2.2. Analiza položaja inzulinskog (IR- $\alpha$ ) i leptinskog receptora (ObR) u lipidnim splavima hipokampusa.....	34
3.2.2.1. Izolacija lipidnih splavi .....	34
3.2.2.2. Kvantitativna analiza položaja IR- $\alpha$ i ObR u lipidnim splavima hipokampusa metodom Western blot .....	34
3.2.2.3. Densitometrija izražaja proteina TfR, ObR i IR- $\alpha$ računanim programom Fiji .....	37
3.2.3. Kvantitativna analiza proteina pSTAT3 i SOCS3.....	38
3.2.3.1. Densitometrija izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3 računanim programom Fiji .....	40
3.2.4. Statistička analiza .....	40

4. REZULTATI.....	41
4.1. Imunohistokemijska analiza receptora uključenih u nadzor hranjenja i energetskog stanja organizma .....	42
4.1.1. Analiza izražaja receptora ObR u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	42
4.1.1.1 Analiza izražaja receptora ObR u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	42
4.1.1.1.1. Izražaj ObR u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetsko stanje organizma.....	46
4.1.1.1.2. Izražaj ObR u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva.....	48
4.1.1.1.3. Izražaj ObR u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja.....	49
4.1.1.1.4. Izražaj ObR u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetskog stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	50
4.1.1.1.5. Izražaj ObR u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetskom stanju organizma .....	51
4.1.1.2. Analiza izražaja receptora ObR u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	53
4.1.1.2.1. Izražaj ObR u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetsko stanje organizma.....	57
4.1.1.2.2. Izražaj ObR u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva.....	58
4.1.1.2.3. Izražaj ObR u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja .....	60
4.1.1.2.4. Izražaj ObR u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetskog stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	61
4.1.1.2.5. Izražaj ObR u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetskom stanju organizma .....	62
4.1.2. Analiza izražaja receptora IR- $\alpha$ u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	64
4.1.2.1. Analiza izražaja receptora IR- $\alpha$ u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	64
4.1.2.1.1. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetsko stanje organizma.....	68
4.1.2.1.2. Izražaj IR- $\alpha$ u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva.....	69
4.1.2.1.3. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja.....	70
4.1.2.1.4. Izražaj IR- $\alpha$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetskog stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	71

4.1.2.1.5. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma .....	72
4.1.2.2. Analiza izražaja receptora IR- $\alpha$ u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	74
4.1.2.2.1. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma .....	78
4.1.2.2.2. Izražaj IR- $\alpha$ u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva .....	79
4.1.2.2.3. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja .....	81
4.1.2.2.4. Izražaj IR- $\alpha$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	82
4.1.2.2.5. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma .....	83
4.1.3. Analiza izražaja receptora IGF-1R $\beta$ u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	85
4.1.3.1. Analiza izražaja receptora IGF-1R $\beta$ u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	85
4.1.3.1.1. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma .....	89
4.1.3.1.2. Izražaj IGF-1R $\beta$ u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva .....	90
4.1.3.1.3. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja .....	92
4.1.3.1.4. Izražaj IGF-1R $\beta$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	93
4.1.3.1.5. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma .....	94
4.1.3.2. Analiza izražaja receptora IGF-1R $\beta$ u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	95
4.1.3.2.1. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma .....	99
4.1.3.2.2. Izražaj IGF-1R $\beta$ u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva .....	101
4.1.3.2.3. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja .....	102
4.1.3.2.4. Izražaj IGF-1R $\beta$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije .....	103
4.1.3.2.5. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma .....	104
4.2. Analiza biljega glije – GFAP, Iba1 i Nestin u odabranim područjima hipotalamusa i hipokampusa .....	107

4.2.1. Analiza izražaja GFAP, biljega astrocита, u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	107
4.2.1.1. Analiza izražaja GFAP u hipotalamusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	107
4.2.1.1.1. Izražaj GFAP u područjima hipotalamusa mužjaka .....	107
4.2.1.1.2. Izražaj GFAP u područjima hipotalamusa ženki .....	109
4.2.1.2. Analiza izražaja GFAP u hipokampusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	111
4.2.1.2.1. Izražaj GFAP u područjima hipokampusa mužjaka .....	111
4.2.1.2.2. Izražaj GFAP u područjima hipokampusa ženki .....	112
4.2.2. Analiza izražaja Iba1, biljega mikroglije, u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	114
4.2.2.1. Analiza izražaja Iba1 u hipotalamusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	114
4.2.2.1.1. Izražaj Iba1 u područjima hipotalamusa mužjaka .....	114
4.2.2.1.2. Izražaj Iba1 u područjima hipotalamusa ženki .....	116
4.2.2.2. Analiza izražaja Iba1 u hipokampusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom .....	117
4.2.2.2.1. Izražaj Iba1 u područjima hipokampusa mužjaka .....	117
4.2.2.2.2. Izražaj Iba1 u područjima hipokampusa ženki .....	119
4.3. Analiza položaja receptora ObR i IR- $\alpha$ u lipidnim splavima hipokampusa .....	121
4.3.1. Analiza receptora ObR u staničnoj membrani stanica hipokampusa ispitivanih ženki i mužjaka .....	122
4.3.2. Analiza receptora IR- $\alpha$ u staničnoj membrani stanica hipokampusa ispitivanih ženki i mužjaka .....	124
4.4. Analiza proteina pSTAT3 i SOCS3 Western blot metodom .....	127
5. RASPRAVA.....	129
5.1. Analiza receptora uključenih u nadzor hranjenja i energetskeg stanja organizma.....	130
5.1.1. Analiza izražaja receptora u hipotalamičkim centrima koji direktno nadziru hranjenje i energetskeg stanje organizma .....	131
5.1.2. Analiza izražaja receptora u dopaminergičkim područjima koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva.....	134
5.1.3. Analiza izražaja receptora u područjima kore mozga koja posredno utječu na motivaciju hranjenja .....	137
5.1.4. Analiza izražaja receptora u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa koja je dio signalne mreže u nadzoru energetskeg stanja organizma i signalne mreže za reprodukciju.....	140
5.1.5. Analiza izražaja receptora u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetskeg stanju organizma .....	142
5.2. Analiza biljega aktiviranih astrocита i reaktivne glioze .....	145



5.2.1. Izražaj biljega glije u hipotalamičkim centrima koji direktno nadziru hranjenje i energetska stanje organizma.....	145
5.2.2. Izražaj biljega glije u hipokampusu čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetska stanju organizma.....	147
5.3. Analiza receptora ObR i IR- $\alpha$ u staničnoj membrani stanica hipokampusa.....	149
5.4. Analiza izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3 .....	151
6. ZAKLJUČCI.....	153
7. LITERATURA.....	155
8. SAŽETAK.....	165
9. SUMMARY .....	167
10. PRILOZI.....	169
10.1. Recepti korištenih pufera.....	170
11. POPIS KRATICA .....	172
12. ŽIVOTOPIS .....	177

# **1. UVOD**

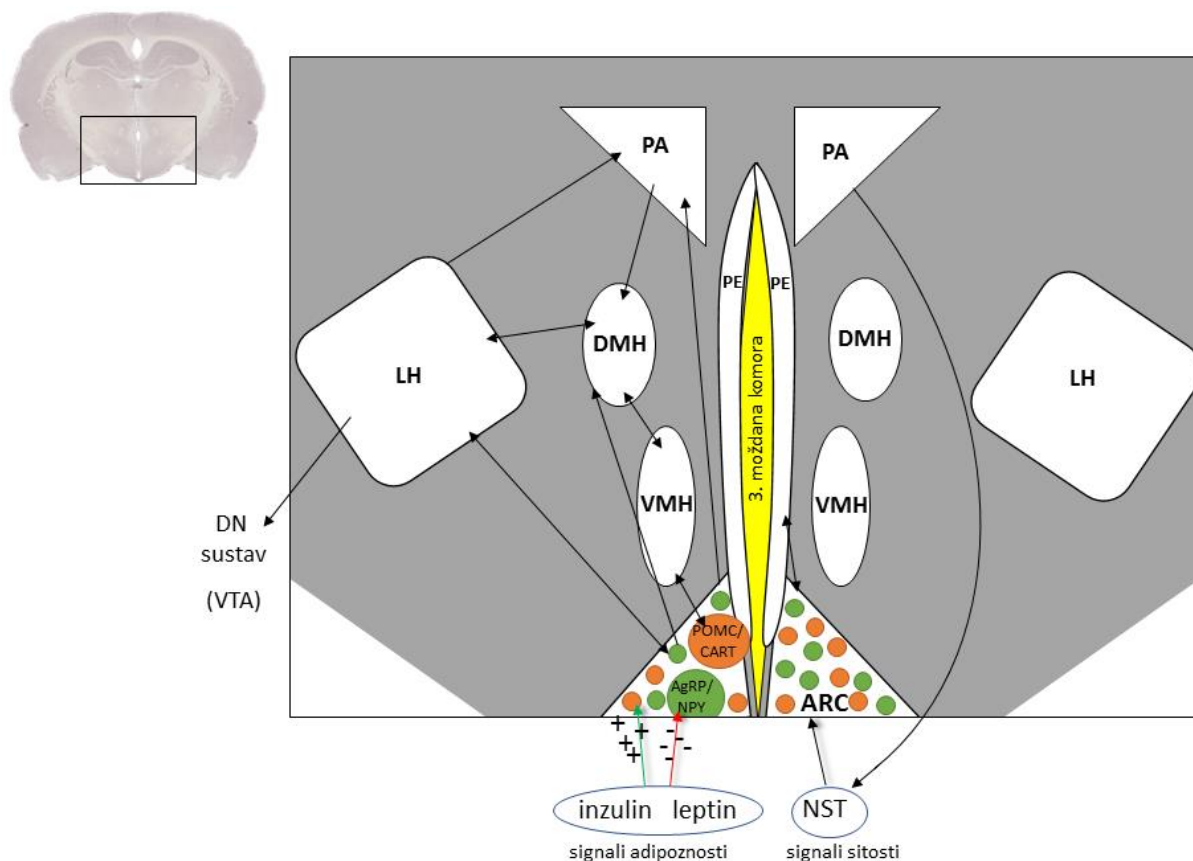
### 1.1. Nadzor energetske stanja organizma

Energetsko stanje organizma nadzire hipotalamus. To je mjesto na kojemu je zadana granična vrijednost (engl. *set-point*) količine energije kojom tijelo raspolaže (masne zalihe) i koju dnevno potražuje u obliku hrane. U hipotalamusu se odvija komunikacija između signala o količini unesene energije i veličini obroka (tzv. signali sitosti) te signala o količini zaliha energije (tzv. signali adipoznosti), te se nastoji održati konstantno stanje približno graničnoj vrijednosti (1). Hipotalamus nadzire brojne vitalne funkcije organizma poput rasta, reprodukcije, normalnog funkcioniranja imunološkog sustava, stresnog odgovora, termogeneze, održanja koštane mase i regeneracije, a usklađuje ih s informacijama o raspoloživoj energiji i čak povezuje s emocijama (2,3). Hipotalamus je glavno mjesto integracije autonomnih, endokrinih i bihevioralnih odgovora na različite podražaje koji u većini slučajeva narušavaju konstantnost unutrašnjih uvjeta u tijelu ili homeostazu.

Anatomski gledano, hipotalamus se sastoji od tri zone: periventrikularne koja je smještena uz stijenke treće moždane komore, medijalne i lateralne zone. Prema rostrokaudalnim obilježjima ove zone se mogu dodatno podijeliti na sljedeća područja: supraoptičko (anteriorno), tuberalno (medijalno) i mamilarno (posteriorno) područje. U zonama ili područjima nalaze se skupine neurona koji obavljaju iste funkcije, a nazivamo ih jezgrama hipotalamusa. Sljedeće jezgre hipotalamusa uključene su u nadzor energetske stanja organizma: arkuatna jezgra (ARC) koja se nalazi u medijalnoj zoni; paraventrikularna (PA) i periventrikularna jezgra (PE) u periventrikularnoj zoni; lateralni hipotalamus (LH) koji je smješten u lateralnoj zoni hipotalamusa. Nadzoru su pridružene i jezgre medijalne zone hipotalamusa - ventromedijalna (VMH) te dorzomedijalna jezgra (DMH) koje posreduju prilikom prijenosa signala iz ARC u PA i LH (4) (slika 1.1). Na nadzor energetske stanja organizma utječu brojni čimbenici i signali što hormonski, što signali od drugih neurona iz drugih hipotalamičkih jezgara.

Od svih nabrojanih, ARC je prva jezgra u kojoj se interpretiraju signali sitosti i adipoznosti te od nje kreće koordinacija prikladnog odgovora. Smještaj ARC omogućuje direktan kontakt njenih neurona sa signalima sitosti i adipoznosti koji cirkuliraju krvlju. Naime, ARC je dio strukture *eminetia mediana*, jednog od mjesta u mozgu gdje nema krvno-moždane barijere te su krvni optok i živčano tkivo ovdje u direktnom kontaktu (2,5,6). Iz tog razloga ARC vrlo brzo reagira na uvjete hipoglikemije i smanjene masne zalihe (3). Unutar ARC postoje dvije populacije neurona - neuroni koji suprimiraju i neuroni koji potiču apetit, tzv. anoreksigeni i oreksigeni neuroni. Anoreksigeni neuroni luče kataboličke signalne molekule – pro-opiomelanokortin (POMC) koji je prekursor hormona stimulacije melanocita- $\alpha$  (engl.  *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH*), te transkript reguliran kokainom i amfetaminom (engl. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript, CART*). Za oreksigene neurone je karakteristično lučenje anaboličkih signalnih molekula – neuropeptida Y (engl. *neuropeptide Y, NPY*) i peptida povezanog s agouti peptidom (AgRP). Izlučeni signali se prenose u PA i LH jezgre. PA je poznata po inhibiciji hranjenja te doprinosi zaustavljanju ponašanja potrage za hranom i smanjuje motivaciju rada za hranu. Dodatno projicira u jezgru solitarnog trakta (engl. *nucleus of solitary tract, NTS*). NTS je jezgra u moždanom deblu koja prima signale sitosti iz probavnog trakta i komunicira s

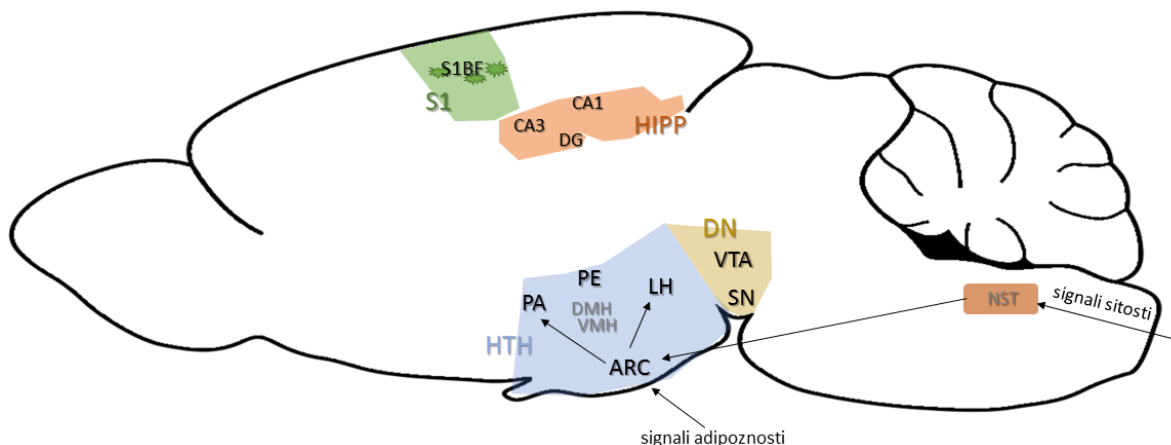
ARC. U slučaju dovoljnih količina energije, ARC signalizira PA na inhibiciju hranjenja. Usto PA jezgra NTS jezgri povećava osjetljivost na signale sitosti te prema tome dodatno inhibira hranjenje (7). Nadalje, PA će signalizirati potrošnju uskladištene energije. PA je uključena u nadzor tjelesne temperature i brzine metabolizma pa su navedene funkcije komunicirane s energetsom rezervom. U slučaju potrebe za energijom, ARC će signalizirati LH jezgri nedostatak energije pa će LH potaknuti hranjenje, kao i skladištenje energije za vrijeme kada hrana organizmu bude nedostupna. Povezanost između ARC i PE jezgara predstavlja komunikaciju reprodukcije s energetsom rezervom. Budući da je reprodukcija energetski skup proces, osobito za ženke, vrlo je važno prije začetka novog organizma provjeriti hoće li to majčinski organizam moći podnijeti. Ukoliko nema dovoljno energetske zalihe za reprodukciju, nastupit će tzv. hipotalamička neplodnost (3). Ukoliko ima dovoljno energije, iz PE će se lučiti kisspeptin1, neuropeptid koji nadzire otpuštanje hormona poticanja lučenja gonadotropina (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) (8).



Slika 1.1. Shema signalne mreže u hipotalamusu koja nadzire energetske stanje organizma, u koronarnom presjeku mozga štakora. Signali adipoznosti inhibiraju izražaj oreksigenih proteina, a potiču izražaj anoreksigenih proteina u ARC. U ARC stižu i informacije signala sitosti preko NST jezgre (vlastita ilustracija prema spoznajama iz literature).

**Legenda:** AgRP/NPY – populacija neurona koja luči peptid povezan s agouti peptidom i neuropeptid Y, ARC – arkuatna jezgra, DMH – dorzomedijalna jezgra, DN – dopaminergički, LH – lateralna jezgra, NST – jezgra solitarnog trakta (engl. *nucleus of solitary tract*), PA – paraventrikularna jezgra, PE – periventrikularna jezgra, POMC/CART – populacija neurona koja luči pro-opiomelanokortin i transkript reguliran kokainom i amfetaminom, VMH – ventromedijalna jezgra, VTA – ventralni tegmentum.

Na odluku o hranjenju ili odbijanju hrane utječe i njena ukusnost. U slučajevima kada se percipira ukusna hrana koju mozak interpretira kao zadovoljstvo, doći će do poticanja hranjenja. Iako se ovo hranjenje ponekad naziva ne-homeostatskim, zapravo ne bismo smjeli upotrebljavati taj izraz, jer hranjenje nakon gladovanja povećava zadovoljstvo koje je proizvod unesene hrane i to predstavlja vid nadzora energetske stanja organizma. U slučaju dugog gladovanja, organizam će tijekom unosa hrane osjećati ugodu i nastaviti s hranjenjem kako bi nadoknadio izgubljenu energiju. U opisanom slučaju su u nadzor unosa energije uključeni moždani centri zadovoljstva – dopaminergička područja poput ventralnog tegmentuma (VTA) ili crne jezgre (lat. *substantia nigra*, SN). Poznato je da na dopaminergička područja utječu hormoni koji obavještavaju središnji živčani sustav o energetske stanju organizma, pogotovo u stanju gladovanja (9,10). VTA jezgra je u kontaktu s LH jezgrom te se putem ove povezanosti ostvaruje hranjenje potaknuto ugodom ili željom. SN jezgra doprinosi udovoljavanju želje za hranom tako što stimulira organizam na kretanje u smjeru hrane (3). Motivaciji za hranjenje doprinose područja kore mozga uključena u interpretaciju hrane, poput primarnog osjetnog područja (S1) ili piriformnog dijela kore mozga (PIR), što su područja koja obrađuju aromu hrane. Interpretacija se nakon prvog susreta s hranom sprema u pamćenje, pa samo uslijed razmišljanja o hrani može doći do odluke o unosu hrane u organizam, neovisno o energetske statusu. Dakle, određeni utjecaj na hranjenje ima i hipokampus (HIPP). S druge strane, održanje pamćenja, tj. hipokampusa je u direktnoj vezi s energetske statusom organizma (Slika 1.2).



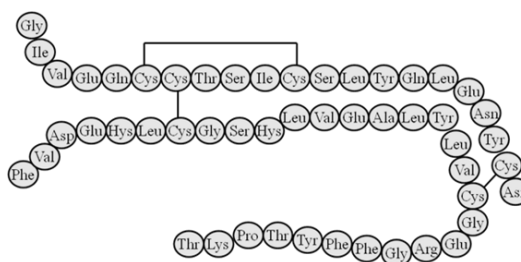
Slika 1.2. Shematski prikaz glavnih hipotalamičkih jezgara odgovornih za nadzor energetske stanja organizma (označeno plavom površinom), u sagitalnom prerezu mozga štakora. Vrlo pojednostavljeno je strelicama prikazan osnovni nadzor energetske stanja organizma – dok signali adipoznosti stižu direktno u ARC, signali sitosti se najprije interpretiraju u NST koja projicira u ARC. U nadzor su indirektno uključena i druga područja mozga – dopaminergička (DN, žuto), hipokampalna (HIPP, narančasto), primarno osjetno područje kore mozga (S1, zeleno) (Vlastita ilustracija prema spoznajama iz literature. Za određivanje položaja područja mozga korišten je atlas štakorskog mozga (11)).

**Legenda:** ARC – arkuatna jezgra, CA1 i CA3 – *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG – nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DMH – dorzomedijalna jezgra, DN – dopaminergičko područje, HIPP – hipokampus, HTH – hipotalamus, LH – lateralna jezgra hipotalamusa, NST – jezgra solitarnog trakta (engl. *nucleus of solitary tract*), PA – paraventrikularna jezgra, PE – periventrikularna jezgra, VMH – ventromedijalna jezgra, VTA – ventralni tegmentum, S1BF – dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SN – crna jezgra mozga.

## 1.2. Hormoni uključeni u nadzor energetske stanja organizma i njihovi receptori u mozgu

Inzulin i leptin dva su glavna hormona u dugoročnoj regulaciji energetske stanja organizma (7,10). Osim dva navedena hormona u nadzor je uključen i čimbenik rasta nalik inzulinu 1, jer se može vezati na receptor za inzulin (više u 1.2.2.).

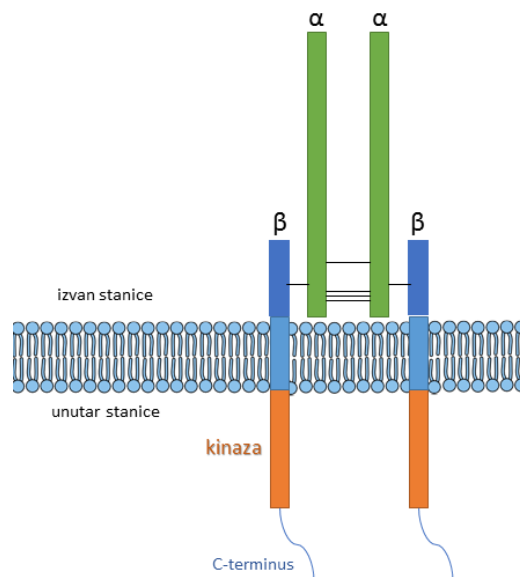
### 1.2.1. INZULIN I NJEGOV RECEPTOR U MOZGU



Slika 1.3. Molekula inzulina. Crte označavaju disulfidne mostove.

(Slika preuzeta s mrežne stranice [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011\\_1A\\_Proteinbiotech\\_hu\\_book/ch12.html](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_hu_book/ch12.html) i prilagođena)

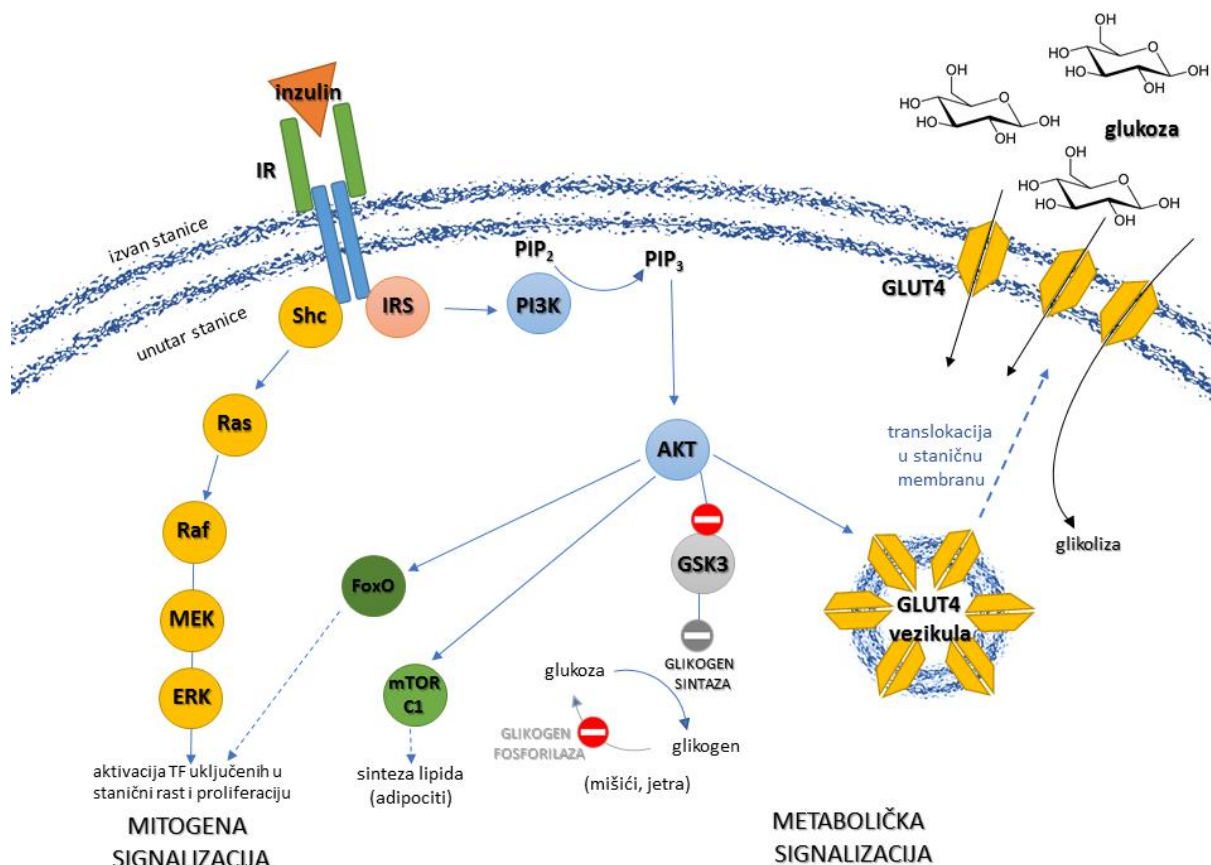
Slika 1.3. prikazuje strukturu molekule inzulina. Radi se o molekuli koja u suradnji sa svojim antagonistom glukagonom na periferiji, tj. dijelovima tijela koji ne pripadaju središnjem živčanom sustavu, osigurava stalnu koncentraciju glukoze u krvi, tzv. normoglikemiju. Inzulin se proizvodi u  $\beta$ -stanicama gušterače kao odgovor na povišenu koncentraciju glukoze u krvi, dok se glukagon proizvodi u  $\alpha$ -stanicama gušterače kao odgovor na nisku koncentraciju glukoze u krvi. Inzulin ostvaruje svoje funkcije u tkivima putem svoga receptora. Receptor za inzulin (engl. *insulin receptor*, IR) pripada tirozin-kinaznoj obitelji receptora. Receptor je heterotetramer koji se sastoji od dvije ekstracelularne  $\alpha$ -podjedinice te dvije transmembranske  $\beta$ -podjedinice s intracelularnom tirozin-kinaznom aktivnošću (slika 1.4). Osim što se IR aktivira inzulinom, može se aktivirati i s čimbenikom rasta nalik inzulinu (engl. *insulin like growth factor*, IGF) (slika 1.7; poglavlje 1.2.2). Alternativnim prekrajanjem iz prekursora IR mogu nastati dvije izoforme: duža IR-B i kraća IR-A. Dok je u čovjeka IR-B izoforma većinom prisutna u perifernim tkivima osjetljivim na inzulin (skeletni mišići, jetra, masno tkivo), IR-A izoforma je karakteristična za tkivo mozga. Ovakva distribucija je evolucijski očuvana. Međutim, IR-A je u miševima i štakorima još pronađen u slezeni te mišićima nogu (*m. extensor digitorum longus*, soleus mišić). Iako su sličnog afiniteta prema inzulinu, navedene izoforme IR se dodatno razlikuju prema funkcijama – IR-A ima veći afinitet prema IGF te se brže internalizira i reciklira nego IR-B. IR-B se češće povezuje s metaboličkim i diferencijacijskim signalima, a IR-A s rastom stanice, proliferacijom i preživljavanjem (12,13).



Slika 1.4. Struktura inzulinskog receptora. Crte-poveznice između podjedinica, označene slovima  $\alpha$  i  $\beta$ , predstavljaju disulfidne mostove.  $\alpha$ -podjedinica sadrži vezno mjesto za ligand – inzulin, dok  $\beta$ -podjedinica ima tirozin-kinaznu aktivnost (slika izrađena prema shemi iz rada autora McKern i sur. (14)).

Na periferiji inzulin vezanjem za svoj receptor na staničnoj površini stimulira stanice na ugradnju prethodno sintetiziranog transportera za glukozu (engl. *glucose transporter*, GLUT) u staničnu membranu putem aktivacije kinaze Akt (ili protein kinaze B). Radi se o signalnom putu fosfatidil-inozitol-3 kinaze (PI3K). Ukratko, aktivirani IR fosforilira supstrat inzulinskog receptora (engl. *insulin receptor substrate*, IRS). Aktivirani IRS pruža platformu za vezanje intracelularnih efektorskih molekula, a jedna od njih je (uobičajeno) PI3K. Aktivirana PI3K dalje aktivira nizvodnu kinazu Akt (protein-serin/treonin-kinaza) koja fosforilira brojne ciljane proteine. U perifernim metabolički aktivnim organima poput mišića, jetre i masnog tkiva, Akt fosforilira supstrat AS160 koji posljedično stimulira translokaciju GLUT4 iz intracelularnih vezikula u staničnu membranu (15,16). Signalni put rezultira ulaskom glukoze u stanicu koja se zatim koristi u procesu glikolize za stvaranje energije, ili u slučaju dovoljne količine energije, za stvaranje glikogena u jetri i mišićima, odnosno lipida u adipocitima (slika 1.5). Osim što su na inzulin posebno osjetljive stanice mišića, masnog tkiva, jetre, osjetljive su i stanice mozga (15,17,18).

Poremećaji u signalizaciji inzulinom narušavaju homeostazu glukoze, a krajnji ishod može biti razvoj inzulinske rezistencije ili dijabetesa. Općenito razlikujemo dva tipa dijabetesa. Dijabetes mellitus tip 1 (T1DM) ima 10% oboljelih od dijabetesa. Radi se o autoimunom oboljenju u kojem su napadnute  $\beta$ -stanice gušterače.  $\beta$ -stanice gušterače luče inzulin pri povećanoj koncentraciji glukoze u krvi pa su za oboljele od T1DM karakteristične istovremena hiperglikemija i hipoinzulinemija. T1DM liječimo nadomjesnom terapijom inzulina, pri čijoj primjeni oboljeli postaju metabolički normalni, tj. postižu normoglikemiju (19).



Slika 1.5. Inzulin pokreće dva signalna mehanizma: metabolički – mehanizam stimulacije unosa glukoze u stanicu (ugradnjom GLUT4 transportera u staničnu membranu stanica na periferiji); mitogeni – mehanizam kojim aktivira čimbenike transkripcije koji u jezgri potiču ili suprimiraju izražaj ciljnih gena. Iako Akt sudjeluje u metaboličkoj signalizaciji, uključena je i u mitogenu (vidi tekst u nastavku) (vlastita ilustracija prema spoznajama u literaturi).

**Legenda:** AKT - protein kinaza B, ERK – proteinska kinaza regulirana ekstracelularnim signalima, FoxO - „forkhead box“ protein O1, GLUT4 - transporter glukoze, GSK3 - glikogen-sintaza-kinaza 3, IR - inzulinski receptor, IRS - supstrat inzulinskog receptora, MEK - proteinska kinaza regulirana mitogenim signalima, mTORC1 - kompleks 1 ciljnih proteina rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*), PI3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*), PIP<sub>2</sub> - fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat, PIP<sub>3</sub> - fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfat, Raf – proteinska serin/treonin kinaza prvi puta pronađena u tkivu fibrosarkoma (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), Ras - GTPaza pronađena prvi puta u tkivu sarkoma, Shc – protein koji ima Src-2 homologni dio, TF – čimbenici transkripcije.

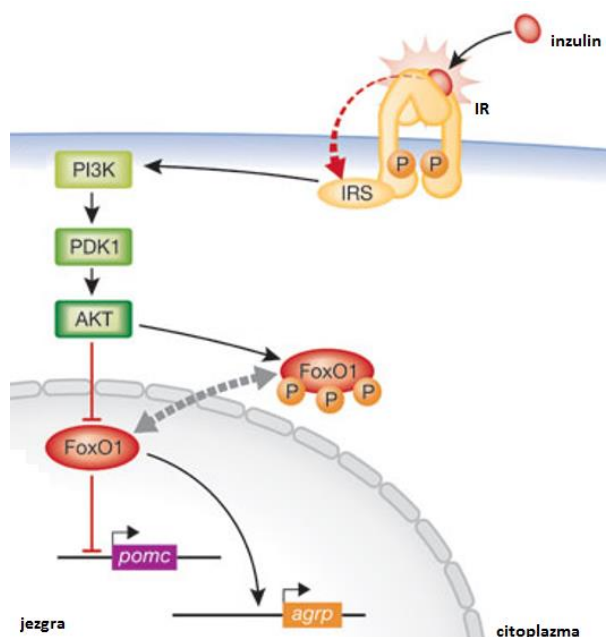
Drugi tip dijabetesa je dijabetes mellitus tip 2 (T2DM), koji ima 90-95% oboljelih od dijabetesa. Za razliku od T1DM, oboljelima od T2DM terapija inzulinom ne pomaže u postizanju normoglikemije (10). Bolest je karakterizirana hiperglikemijom i hiperinzulinemijom te kroničnom upalom, a prate ju komplikacije poput kardiovaskularnih poremećaja, nefropatije i retinopatije (20). U zadnja tri desetljeća otkriven je cijeli spektar dijabetičkih bolesti koje nisu direktno vezane uz inzulinski receptor već pogađaju nizvodne proteine signalnog puta ili diferencijaciju  $\beta$ -stanica gušterače (21).

Dugo je mozak smatran rezistentnim (neosjetljivim) na inzulin, no pokazalo se da inzulin u mozgu ima bitnu ulogu u nadzoru hranjenja i energetske stanja organizma. Naime, količina inzulina u krvi osim što prikazuje trenutne količine glukoze i metaboličke zahtjeve tkiva, proporcionalna je količini masnog tkiva (7). Inzulin je u mozgu uključen u brojne druge funkcije poput reprodukcije ili kognicije. Osim neurotrofnog, pokazano je da ima i neuromodulatorne te neuroprotektivne učinke (22,23). Do



nedavno je veliki predmet rasprava bio izvor inzulina u mozgu. Danas se smatra da se inzulin ne producira lokalno u moždanom tkivu, nego iz periferije prelazi krvno-moždanu barijeru (17,24,25). Poremećaji u signalizaciji inzulinom u mozgu rezultiraju razvojem neurodegenerativnih poremećaja, od kojih se Alzheimerova bolest (AD) danas najviše istražuje. Zapravo je AD velikim dijelom karakterizirana istim ili sličnim poremećajima zabilježenim u T2DM te se naziva i dijabetesom tipa 3 (T3DM) (26).

U mozgu inzulin ostvaruje svoje funkcije također preko svog receptora. Opisanom signalnom kaskadom puta PI3K, u ARC hipotalamusa inzulinski signalni put za rezultat ima proizvodnju signala koji će kontrolirati daljnji unos hrane. Točnije, inzulinska signalizacija potiče izražaj POMC anoreksigenog proteina, a inhibira izražaj AgRP i NPY oreksigenih proteina. Aktivirani IR može fosforilirati i druge supstrate, primjerice Shc proteine uključene u Ras/ERK signalni put koji sudjeluje u staničnom rastu (27) (slika 1.6). Prekid navedene signalizacije inzulinom događa se uz pomoć proteintirozin-fosfataze (engl. *protein tyrosine phosphatase*, PTP) koja inaktivira IRS defosforilacijom, ili pomoću fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat-3-fosfataze (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*, PTEN) koja defosforilira PIP<sub>3</sub> (28). To su samo neke od bolje istraženih molekula koje utječu na inzulinski signalni put, no na spomenute molekule u signalnim kaskadama mogu utjecati brojni čimbenici, kako pozitivno tako i negativno. Radi se o molekulama iz drugih signalnih putova ili na primjer čimbenici upale, pri čemu dolazi do izmjena ili prekida u signalizaciji inzulinom.



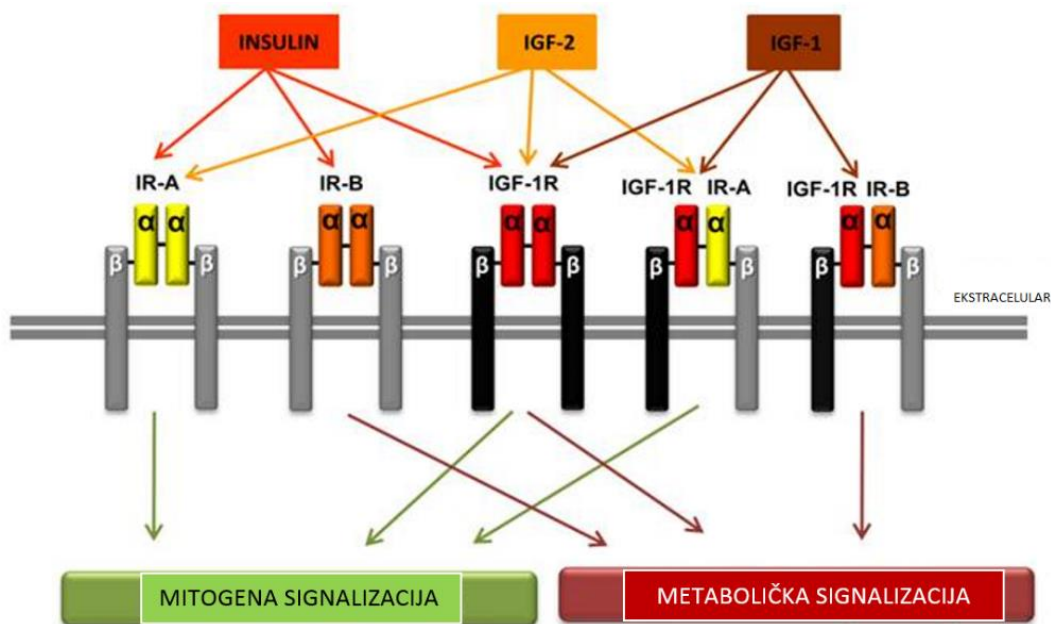
Slika 1.6. Inzulinska signalizacija u ARC jezgri hipotalamusa. Aktivacija PI3K dovodi do inaktivacije FoxO1 njegovom fosforilacijom i eksportom iz jezgre. Posljedično se oslobađa promotor *pomc* gena koji posreduje inhibiciji hranjenja, a istovremeno nestaje aktivacija *agrp* gena koji posreduje aktivaciji hranjenja (slika preuzeta iz rada autora Varela i Horvatha (2) i prilagođena).

**Legenda:** AKT - protein kinaza B, FoxO1 - „forkhead box“ protein O1, IR - inzulinski receptor, IRS - supstrat inzulinskog receptora, P - fosfatna skupina, PDK - kinaza ovisna o 3-fosfoinozitudu (engl. *Phosphoinositide-dependent kinase*), *pomc* - gen za proopiomelanokortin, *agrp* - gen za protein vezan za agouti peptid, PI3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*).

### 1.2.2. ČIMBENIK RASTA NALIK INZULINU I I NJEGOV RECEPTOR

S IR se može povezati i IGF-1, iako je jačina vezanja slabija (12). Osim po strukturi, IGF-1 inzulinu nalikuje i po funkcijama, jer aktivira isti signalni put. No, dok je glavna funkcija inzulina nadzor metabolizma energije, glavna funkcija IGF-1 je promocija staničnog rasta (slika 1.4). Luči ga jetra kao odgovor na stimulaciju hormonom rasta (engl. *growth hormone*, GH) (29). U sisavaca je zabilježeno postojanje i IGF-2 čija je aktivnost najveća tijekom embrionalnog razvoja. Međutim, u ljudi je IGF-2 normalno izražen i tijekom odraslog razdoblja (12). Receptor za IGF-1 (IGF-1R) pripada istoj tirozin-kinaznoj obitelji receptora kao i IR te se shematski jednako prikazuje (slika 1.4). Dakle, kao i IR, sastoji se od 2 ekstracelularne  $\alpha$ -podjedinice i 2 transmembranske  $\beta$ -podjedinice s intracelularnom tirozin-kinaznom aktivnošću. Signalni putovi koje IGF-1R aktivira su PI3K-Akt i Ras-Raf-MAPK, putem kojih IGF-1 stimulira stanični rast, sazrijevanje ili diferencijaciju, preživljenje i proliferaciju (30). Funkcija navedene signalizacije u mozgu se očituje tijekom embrionalnog razvoja kada za cilj ima ispravan razvoj mozga. Brojnim istraživanjima je potvrđen pozitivan utjecaj IGF-1 na sinaptičku plastičnost odraslog mozga – stimulacijom moždanih matičnih stanica na diobu (31), izmjenama na dendritima koje rezultiraju povećanim brojem dendritičkih trnova te ojačavanjem sinapsi mehanizmom dugoročne potencijacije, što je izuzetno važno za funkciju hipokampusa (30,32). IGF-1 ima značajan utjecaj na održanje ARC jezgre hipotalamusa (33). Naime, ukazano je na postojanje do nedavno nepoznatog mjesta neurogeneze u odraslom mozgu, a to je ARC u hipotalamusu (34). Iz populacije stanica vrste radijalne glije smještene uz stijenke treće moždane komore, nazvane tanciti (35), nastaju novi neuroni ARC jezgre. Pokazalo se da je navedena neurogeneza ovisna o energetskom statusu organizma i mijenja se uslijed promjena u sastavu prehrane – masna prehrana inhibira neurogenezu u ARC te dovodi do apoptoze ARC stanica (6). Upravo IGF-1 signalni put predstavlja put koji u odgovoru na energetski status organizma potiče proliferaciju tancita. Novootkrivena neurogeneza u ARC predstavlja još jedan način prilagodbe na izmjene u fiziologiji organizma. Nadalje, nedavno je uočeno da smanjen izražaj IGF-1 proteina ima veze s produljenim životnim vijekom kako eksperimentalnih životinja, tako i ljudi, a predloženi mehanizam je doprinos normalizaciji inzulinske signalizacije (12,36).

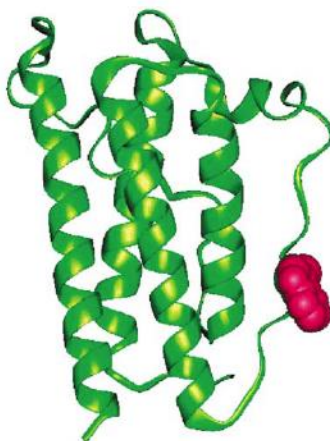
Podjedinice receptora za inzulin i IGF se mogu međusobno povezati u funkcionalne miješane receptore na koje se uglavnom vežu IGF-1 i IGF-2 (37). Ovo je dodatni stupanj u zamršenosti signalizacije inzulinom i IGF, a koja se jednim imenom naziva IIS sustav. Zamršenosti IIS sustava doprinose činjenice da postoje izoforme IR, nekoliko različitih IRS molekula (točnije 4 u sisavaca, a još 2 dodatne u ljudi) te po nekoliko izoformi nizvodnih signalnih molekula u signalnom putu inzulina i IGF. Različite izoforme, lokalizacija u stanicama, distribucija u tkivima i sl. povećale su mogućnost finog podešavanja IIS sustava u odgovoru na različita fiziološka stanja koja još treba istražiti (12). Slika 1.7. prikazuje mogućnosti IIS sustava. Unatoč ovoj zamršenosti, treba upamtiti da su glavni učinci IR metabolički, a IGF-R signalizacije mitogeni.



Slika 1.7. Čimbenik rasta sličan inzulinu i inzulin mogu stimulirati oba receptora IR i IGF-1R te tako izazvati različiti efekt u stanici. Mitogena signalizacija – stimulacija proliferacije i staničnog preživljenja, metabolička signalizacija – signalizacija uključena u energetske nadzor (Slika preuzeta iz rada autora Braun i sur. (38) i prilagođena).

**Legenda:** IR-A i IR-B - izoforme inzulinskog receptora, IGF-1R - receptor za IGF-1R,  $\alpha$  - ekstralcelularna podjedinica receptora,  $\beta$  - transmembranska podjedinica receptora s intracelularnom kinaznom aktivnošću.

### 1.2.3. LEPTIN I NJEGOV RECEPTOR U MOZGU

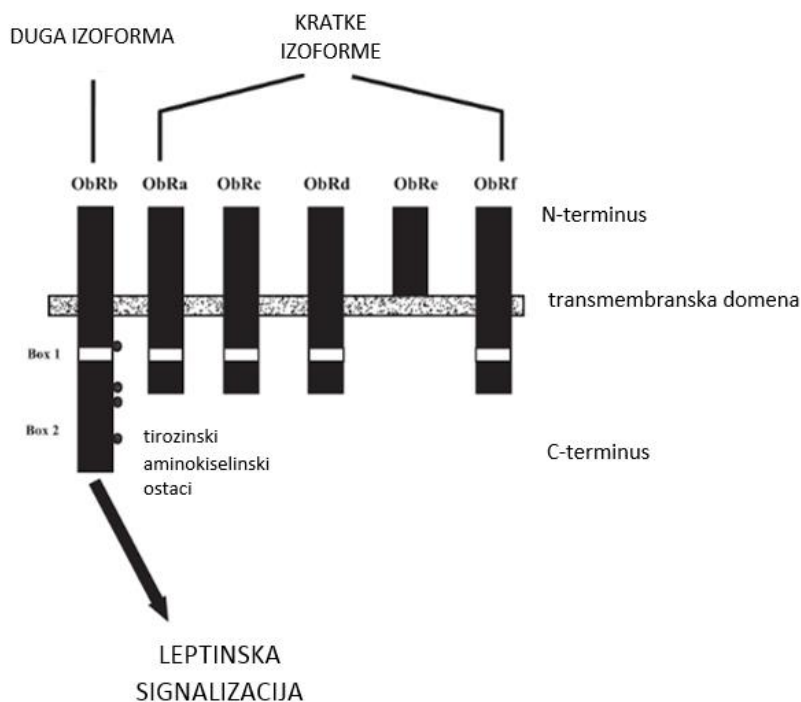


Slika 1.8. Kristalna struktura leptina. Radi se o proteinu od 146 aminokiselina organiziranih u 4  $\alpha$ -uzvojnice. Crveno su označena mjesta za povezivanje – što s receptorom, što međusobno (slika preuzeta iz rada autora Zhang i sur. (39)).

Slika 1.8. prikazuje leptin, hormon nalik citokinima koji u najvećem dijelu produciraju stanice bijelog masnog tkiva ili adipociti. Količina leptina u krvi je u pozitivnoj korelaciji s količinom masnog

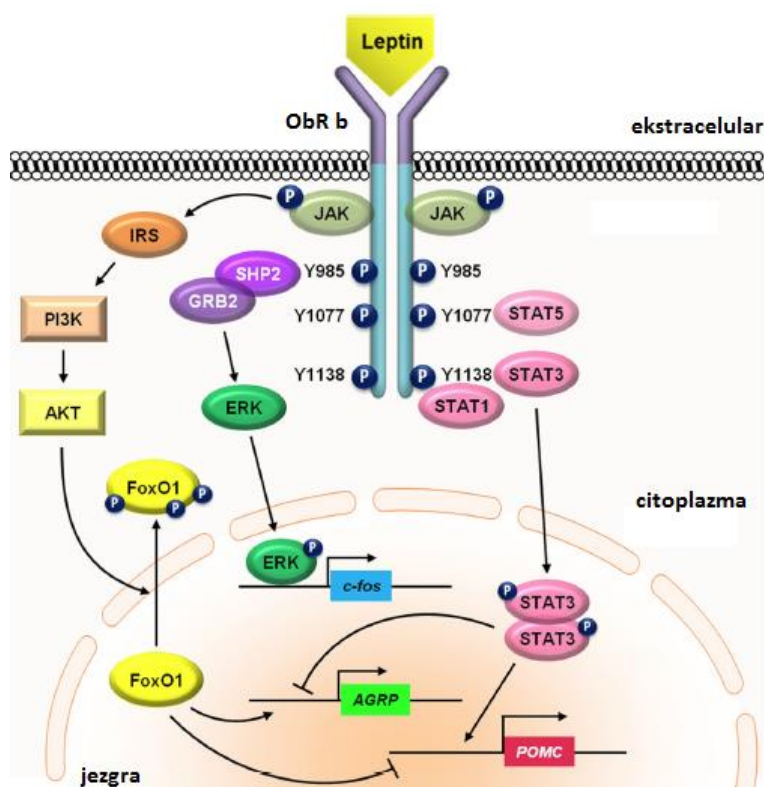
tkiva - što je adipocit veći, veći je i izražaj leptina (40). Osim što služi kao signal centralnom živčanom sustavu o količini dostupne energije, uključen je u funkcioniranje imunološkog sustava, reprodukciju, metabolizam koštanog sustava te u stresni odgovor organizma (41–43). Poznato je da tijekom starenja opada njegova razina u organizmu. Razina leptina u krvi je spolno specifična, pri čemu je veća u ženki nego u mužjaka (44,45).

Receptor za leptin (ObR) pripada obitelji citokinskih receptora. Poznato je 6 izoformi ObR (ObRa-f), od kojih je ObRb najveći i ima mogućnost pokretanja kaskade intracelularnog JAK2/STAT3 signalnog puta. Dok se kratke izoforme a i c mogu naći u brojnim organizmima, ObRd postoji samo u miševima, a ObRf u štakorima (46) (slika 1.9). Uloge kratkih izoformi nisu u potpunosti razjašnjene, ali postoje indikacije da imaju ulogu u prijenosu leptina preko krvno-moždane barijere te u njegovoj internalizaciji (39,47). ObRb je izražen u hipotalamusu, u jezgrama uključenim u nadzor energetske stanja (ARC, VMH, DMH i dr.) te u perifernim tkivima uključujući skeletne mišiće, srčani mišić, nadbubrežne žlijezde, bubrege, adipocite, stanice imunitetnog sustava, hepatocite,  $\beta$ -stanice gušterače (39). ObR je vrlo glikozilirani te dodatak šećera na strukturu ObR doprinosi masi ovog receptora s 30-70 kDa (48). Osim N-glikozilacije, na ObR je utvrđena i O-glikozilacija, no N- je važnija za interakciju ObR s leptinom. U slučaju da se ObR deglikozilira N-glikanazom, mogućnost vezanja leptina se smanjuje za 80% (49).



Slika 1.9. Shema svih poznatih izoformi receptora za leptin. Sve izoforme posjeduju jednaku ekstraselularnu domenu s mjestom za ligand. Najdulja izoforma je ObRb, a pod kratkim izoformama smatramo ostale. e izoforma je oblik koji slobodno cirkulira u krvotoku. d izoforma je karakteristična za miševima, a f izoforma za štakore. Oznake Box1 i Box2 označuju mjesta vezanja kinaze JAK2. (Slika preuzeta iz rada autorice Jenni Harvey (50) i prilagođena).

ObR aktivira već spomenuti signalni put JAK2/STAT3. ObR receptor nema kinaznu aktivnost, nego ju vrši ObR-u pridružena kinaza JAK2. Pri vezanju leptina na ObR, dva ObR receptora se dimeriziraju te ih pridružena JAK2 kinaza fosforilira. Fosforilirani intracelularni dijelovi ObR privlače protein STAT3 te zauzvrat on biva fosforiliran. Aktiviran STAT3 (pSTAT3) biva translociran u jezgru i djeluje kao transkripcijski čimbenik (47). Navedeni put je bitan u ostvarivanju nadzora apetita i metabolizma energije putem leptina. Inhibira se supresorom signalizacije citokinima 3 (SOCS3) čiju aktivnost potiče sam leptin. Osim JAK2/STAT3 puta, ObR može aktivirati i put proteinske kinaze aktivirane mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (51) te PI3K signalni put tako što JAK2 kinaza fosforilira IRS (52). Navedena aktivacija IRS čini preklapanje u signalizacijama inzulinom i leptinom. Kao što je i kod inzulinske signalizacije naglašeno, na spomenute molekule u signalnim kaskadama mogu utjecati brojni čimbenici iz drugih signalnih putova te tako modulirati aktivnost leptina.



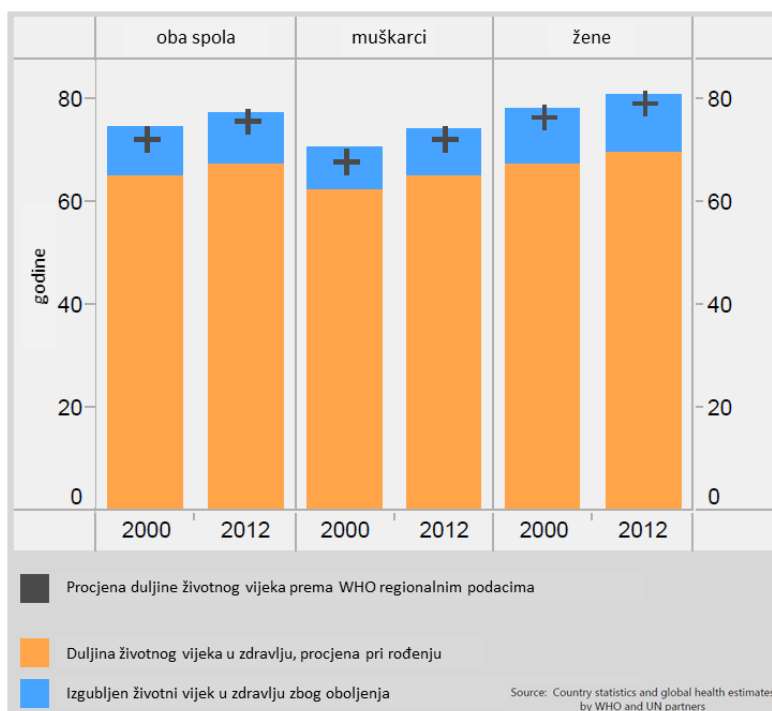
Slika 1.10. Leptinska signalizacija u ARC jezgri hipotalamusa. Aktivacija STAT3 uzrokuje njegov ulazak u jezgru gdje potiče izražaj *pomc* gena koji posreduje inhibiciji hranjenja, a inhibira izražaj *agrp* gena koji posreduje aktivaciji hranjenja. Također, leptinskom aktivacijom IRS aktivira se Akt kinaza koja fosforilirajući FoxO1 uzrokuje njegov eksport iz jezgre, što doprinosi izražaju *pomc* gena te inhibiciji *agrp* gena. Ovaj mehanizam je dodatno pojačan inzulinskom signalizacijom (usp. sa slikom 1.6). Prikazana je i mogućnost aktivacije ERK leptinom, putom u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Kwon i sur. (46)).

**Legenda:** AKT - protein kinaza B, *c-fos* - gen čiji transkript nadzire staničnu proliferaciju i diferencijaciju, ERK - proteinska kinaza regulirana ekstracelularnim signalima, FoxO1 - „forkhead box“ protein O1, GRB2 - protein 2 vezan uz receptor za čimbenike rasta (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*), IRS - supstrat inzulinskog receptora, JAK - *Janus* kinaza, ObRb - b izoforma leptinskog receptora, P - fosfatna skupina, PDK - kinaza ovisna o 3-fosfoinozitudu (engl. *phosphoinositide-dependent kinase*), *pomc* - gen za proopiomelanokortin, *agrp* - gen za protein vezan za agouti peptid, PI3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*), SHP2 - vrsta protein-tirozin fosfataze, STAT - protein koji transducira signale i potiče transkripciju (engl. *signal transducer and activator of transcription*), Y - tirozin.

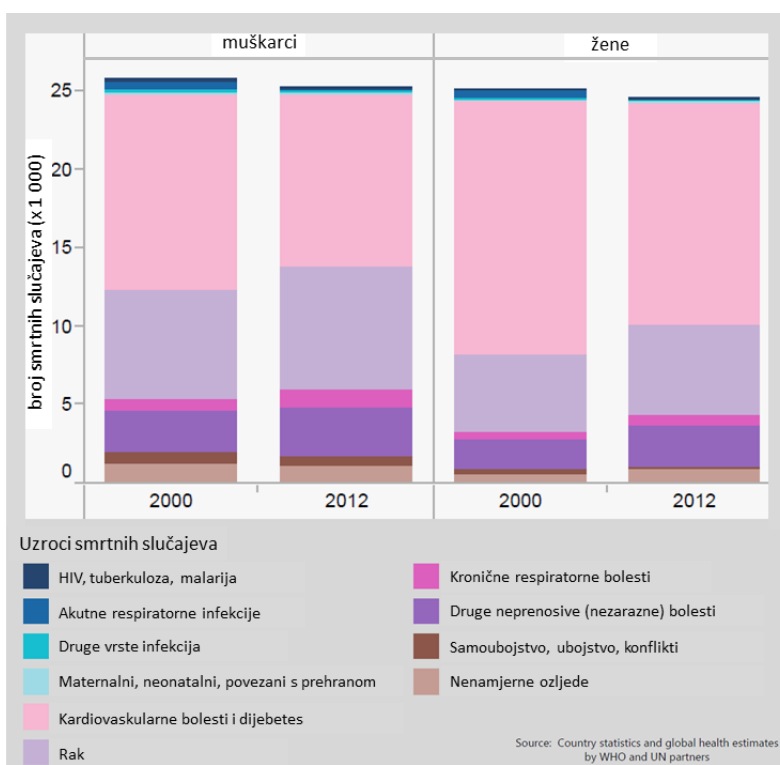
Leptin inhibira unos hrane u organizam te potiče potrošnju uskladištene energije, tj. razgradnju masti i glikogena. Primarno djeluje na ARC hipotalamusa. Ovdje leptinska signalizacija potiče izražaj anoreksigenog proteina POMC, a inhibira izražaj AgRP i NPY oreksigenih proteina kroz JAK/STAT signalizaciju. U slučaju nedostatka STAT3 proteina, dolazi do pojačanog unosa hrane, ponašanja koje se naziva hiperfagija te posljedično organizam postaje pretio (39,46) (slika 1.10). U PA jezgri postoji populacija neurona koja ima ObRb receptor te u slučaju leptinom aktivirane JAK/STAT signalizacije dolazi do izražaja hormona za otpuštanje tireotropina (engl. *thyrotropin-releasing hormone*, TRH), hormona uključenog u nadzor termogeneze i brzine metabolizma.

### **1.3. Uzroci poremećaja nadzora energetske stanja organizma**

U uvjetima ekonomske stabilnosti i obilja, kao što su u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju, tijekom proteklog stoljeća primjećujemo produljenje životnog vijeka ljudske populacije. Između 1990. i 2015. životni vijek se povećao sa 64 na 71 godinu (53), velikim dijelom zahvaljujući naporima moderne medicine u iskorjenjivanju infektivnih bolesti. No, istovremeno je nastao prostor gdje su sve prisutniji metabolički, kardiovaskularni i autoimuni poremećaji (54). Nadalje, u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju ljudi sve više vode sedentarni način života, izloženi su svakodnevnim stresnim situacijama i unose više kalorija nego što je tijelu potrebno, što se često naziva „zapadnim načinom života“ (54). Navedenim trendovima ni Republika Hrvatska (RH) nije utekla. Slike 1.11 i 1.12 prikazuju očekivano trajanje životnog vijeka u RH te razloge skraćenja očekivanog životnog vijeka uslijed različitih oboljenja, među kojima su vodeći kardiovaskularni poremećaji i dijabetes (T2DM) (podaci prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO)).



Slika 1.11. Očekivano trajanje životnog vijeka u Republici Hrvatskoj, prema WHO regionalnim podacima. Uočljivo je produljenje očekivanog životnog vijeka, što je trend u razvijenim i zemljama u razvoju koje prate „zapadni način života“ (pregledano na mrežnoj stranici <http://www.who.int/gho/en/> 12.10.2016).



Slika 1.12. Glavni uzroci preuranjene smrti u RH u muškaraca i žena prema podacima WHO organizacije. U oba spola je vidljivo da su kardiovaskularne bolesti i dijabetes (T2DM) vodeći uzroci smrti prije očekivane dobi smrtnosti te je uočljiv trend porasta pojavnosti ova dva poremećaja (pregledano na mrežnoj stranici <http://www.who.int/gho/en/> 12.10.2016).

Stalno povećan unos kalorija dovest će do pojave pretilosti (10). Pretilost i prekomjeren unos kalorija rezultiraju povećanim izražajem upalnih citokina poput čimbenika nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ), interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i IL-6 (51). Poznato je da upala narušava brojne homeostatske mehanizme, između ostalih i mehanizam za regulaciju tjelesne mase (55).

### 1.3.1. KARAKTERISTIKE UPALNOG ODGOVORA POTAKNUTOG PRETILOŠĆU

Za razliku od akutnog upalnog odgovora, upala potaknuta pretilošću ima drugačije karakteristike. Klasični upalni odgovor je specifičan i brz odgovor imunološkog sustava na infekciju ili mjesto ozljede koji za cilj ima izolirati inficirano ili mjesto ozljede od okolnog zdravog tkiva. Posljedično se izvor infekcije otklanja, kao i oštećeno tkivo, kako bi se tkivo moglo vratiti normalnim funkcijama. Upala potaknuta pretilošću se razvija postupno, a budući da upalni signali nisu dovoljno jaki da bi se pokrenuo puni akutni odgovor imunološkog sustava, upala ne prestaje trajati tijekom duljeg vremena te se smatra kroničnom pojavom. Zato ju nazivamo i upalom niskog stupnja (56). Okidač navedene upale je suvišak energije na koju reagiraju primarno adipociti te lučenjem pro-upalnih molekula šire upalu na okolna tkiva. Masno tkivo se više ne smatra statičnim deponijem viška energije, nego se radi o složenom endokrinom organu. Kada adipociti dosegnu granicu zaprimanja masti, luče vrlo mnogo leptina, zatim upalne citokine TNF $\alpha$  i interleukine, ligande kemokina (CCL), adiponektin, C-reaktivni protein (CRP) i druge molekule. Navedeni čimbenici upale privlače makrofage, stanice imunitetnog sustava, čija se koncentracija posljedično povećava u masnom tkivu. Navedeni upalni profil masnog tkiva je zapažen u brojnim istraživanjima koja su poticala debljinu u eksperimentalnim životinjama prehranom bogatom mastima (56,57). Upala potaknuta adipocitima se širi na hepatocite, stanice gušterače<sup>1</sup>, skeletne mišiće te mozak. U mozgu se uslijed upale aktivira glija te može doći do propadanja stanica (više u poglavlju 1.3.2). TNF- $\alpha$  potiče izražaj pro-upalnih gena koji zauzvrat potiču izražaj TNF- $\alpha$ . Povišena koncentracija TNF- $\alpha$  u krvi dovodi do aktivacije signalnog puta čimbenika u jezgri kapa-B (engl. *nuclear factor kappa-B*, NF- $\kappa$ B) putem aktivacije kinaza c-Jun kinaza N-terminusa proteina (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK), proteinske kinaze C (PKC) i kinaze beta podjedinice inhibitora kapa-B čimbenika (engl. *kinase subunit beta factor kappa-B inhibitor*, IKK $\beta$ ). Navedene kinaze inhibiraju aktivnost IRS uključenog u inzulinsku signalizaciju, pri čemu se zaustavlja nizvodna aktivacija čimbenika u inzulinskom putu te se posljedično razvija inzulinska rezistencija (58). Drugi mehanizam razvoja inzulinske rezistencije uključuje povećanu aktivnost specifičnih PTP (59). Uslijed inzulinske rezistencije u masnom tkivu je smanjen unos glukoze, a inhibicijom puta koji uključuje receptor PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*)<sup>2</sup> i protein koji se veže na element reguliran sterolom (engl. *sterolregulatory-element-binding protein*, SREBP), inhibira se lipogeneza (60–62). IL-1 $\beta$  neposredno utječe na sve sastavnice inzulinom potaknutog puta PI3K u masnom tkivu koji bi

<sup>1</sup> Zasada dostupni samo rezultati istraživanja na  $\beta$ -stanicama u kulturi (56).

<sup>2</sup> PPAR $\gamma$  je transkripcijski čimbenik koji dovodi do sinteze potrebnih enzima i proteina neophodnih za lipogenezu.



rezultirao unosom glukoze u stanicu. U  $\beta$ -stanicama gušterače IL-1 $\beta$  aktivira NF- $\kappa$ B koji potiče apoptozu ovih stanica. Zaključno, adipociti se od daljnjeg unosa glukoze i daljnje lipogeneze, u prostoru koji je maksimalno napunjen lipidima, brane razvojem inzulinske rezistencije putem upalnih čimbenika. IL-6 i IL-8 su veza između upale u masnom tkivu i jetrene inzulinske rezistencije i pojave masne jetre (jetrene steatoze). Ukoliko upala u jetri postane vrlo intenzivna, dolazi i do stanične smrti. IL-6 svojom aktivnošću u jetri utišava inzulinski signalni put inhibicijom fosforilacije IRS, a IL-8 je uključen u akumulaciju masnih kiselina u jetri. Dodatno, IL-6 doprinosi razvoju kardiovaskularnih poremećaja (57).

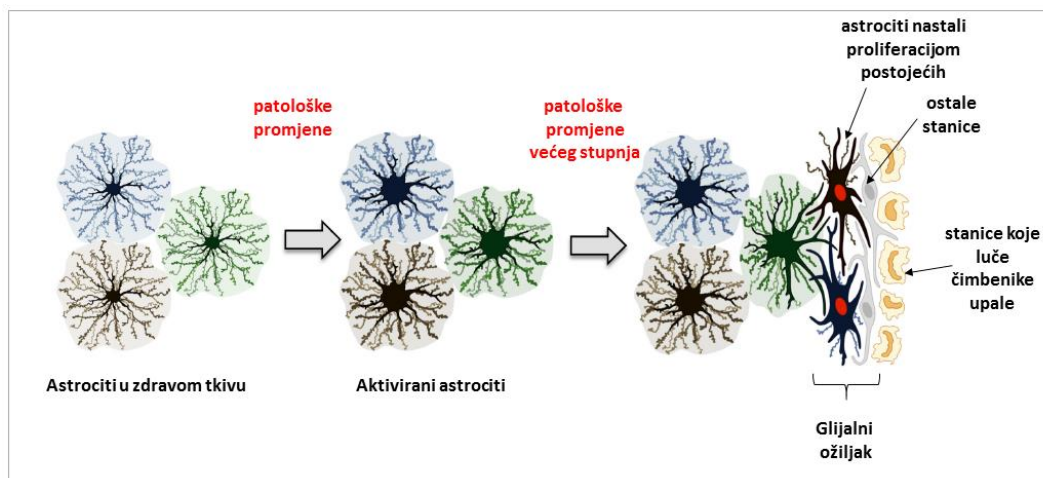
### 1.3.2. GLIJA U UPALI MOZGA POTAKNUTOJ PRETILOŠĆU

Stanice mozga se dijele na dvije vrste: neurone i glija stanice (63). Dok neuroni vrše funkcije signalizacije, glija stanice pružaju neuronima potporu, odnosno održavaju uvjete oko neurona konstantnima i prikladnima za normalnu signalizaciju. Razlikujemo nekoliko tipova glija stanica – oligodendrocite, astrocite i mikroglialne stanice (ili mikroglija).

Oligodendrociti stvaraju mijelin oko aksona neurona što utječe na brzinu prijenosa električnog signala od neurona do neurona. Astrociti su zvjezdolike stanice koje su u kontaktu s nekoliko stotina dendrita od nekoliko obližnjih neurona te se njihovi ogranci nalaze uz stotine tisuća sinapsi (64). To su stanice koje osiguravaju prikladan kemijski okoliš neuronskoj signalizaciji, ali je mogu i modulirati, pa se u zadnje vrijeme dosta raspravlja o tzv. „tripartitnoj sinapsi“. Budući da astrociti dokazano reagiraju na neurotransmitere i sami luče određene neurotransmitere (npr. glutamat, gama-aminobutiričnu kiselinu ili GABA-u), mijenja se klasičan pogled na neuronsku signalizaciju (63,65). Nadalje, astrociti svojim ograncima okružuju krvne žile mozga te tvore krvno-moždanu barijeru, a imaju mogućnost skladištenja glukoze u obliku glikogena koji se mobilizira u slučaju potrebe za energijom (66). Signalizacija koja posreduje glikogenezi u astrocitima je regulirana s IGF-1 (67). Mikroglija se smatra makrofagima mozga jer dijele mnoge karakteristike s makrofagima u perifernim tkivima. Mikroglija uklanja stanice nakon apoptoze ili ozljede. Također, poput makrofaga s periferije, imaju mogućnost lučenja upalnih čimbenika i čimbenika rasta, što znači da imaju značajnu ulogu u preživljavanju stanica (63).

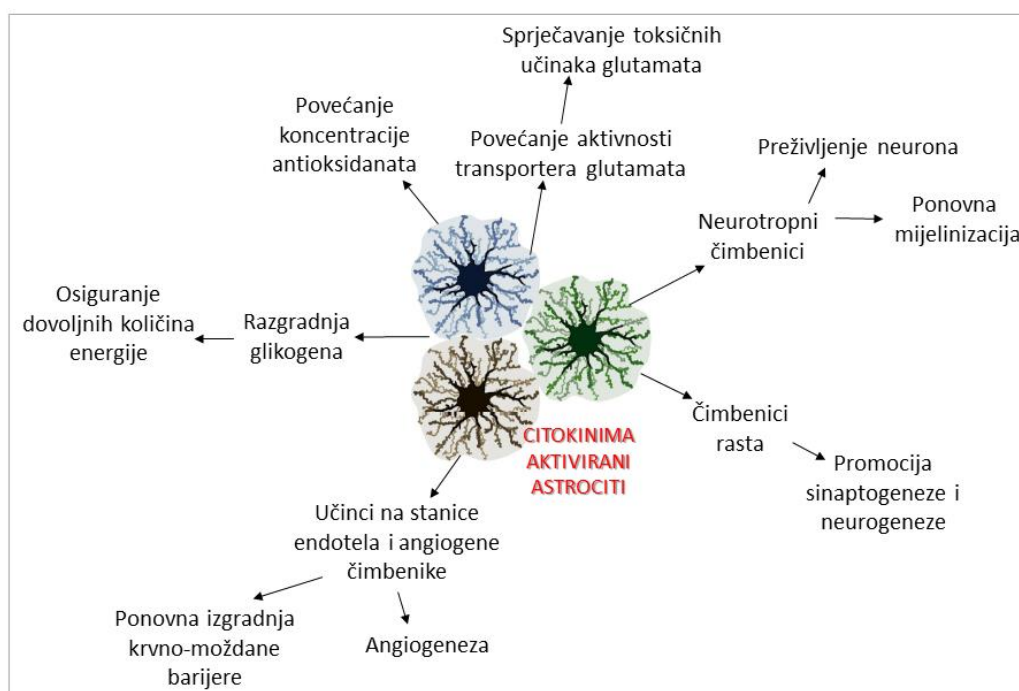
U slučaju ozljede ili patoloških promjena u mozgu, ovisno o stupnju oštećenja, dolazi redom do pojava: povećanje brojnosti mikroglije, aktiviranja astrocita i, na kraju, reaktivne glioze. Mikroglija prva reagira na oštećenje te luči upalne čimbenike (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  te brojne druge) koji posljedično aktiviraju astrocite (68,69). Astrociti postaju veći obujmom i svoje ogranke pružaju dalje u tkivo, te se, za razliku od ogranaka u zdravom tkivu, njihovi ogranci preklapaju. Ove promjene na astrocitima se lako opažaju imunohistokemijskim bojanjem s protutijelom na fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acid protein*, GFAP), biljegom astrocita koji je sastavni dio njihovog citoskeleta. Naime, u zdravom tkivu astrociti gotovo i ne izražavaju GFAP, ali u slučaju patoloških promjena izražaj GFAP se povećava. Također se povećava i izražaj drugih citoskeletnih proteina npr. vimentina i nestina (67). U slučaju većih ozljeda govorimo o reaktivnoj gliozu pri kojoj astrociti proliferirajući nadomještaju izgubljene stanice i tvore tzv. glijalni ožiljak. Glijalni ožiljak štiti okolno zdravo tkivo od upale tako što

fizički sprječava širenje čimbenika upale, a astroglia u promjenama zahvaćenom tkivu luči protu-upalne čimbenike i čimbenike rasta kako bi se ponovno uspostavila homeostaza (64,70) (slike 1.13 i 1.14).



Slika 1.13. Shema morfolofije normalnih i aktiviranih astrocita uslijed upale. Ukoliko se radi o upali većeg stupnja nastat će glijalni ožiljak kao funkcionalna granica između okolnog zdravog tkiva i tkiva zahvaćenog patološkim promjenama.

(Slika preuzeta iz rada autora Sofroniewa i Vintersa (64) i prilagođena)



Slika 1.14. Učinci aktiviranih astrocita na oštećeno tkivo mozga (prilagođeno prema shemi u radu autora Liberto i sur. (67), ilustracija astrocita preuzeta iz rada autora Sofroniewa i Vintersa (64)).

Masna prehrana uzrokuje upalu u hipotalamusu, u ARC, prvoj jezgri koja nadzire energetski status organizma i to u roku od 24h od izlaganja masnoj prehrani kada se debljina još nije pojavila. Za to vrijeme se upala ne može opaziti u perifernim tkivima. Upala hipotalamusa se očituje gore opisanim promjenama u mikrogliji i astrocitima. Posljedično se gube POMC stanice ARC jezgre koje inhibiraju hranjenje. Gubitak samo ovih stanica je dovoljan za dobitak na težini. Thaler i suradnici su pokazali na mužjacima miševa i štakora da navedena upala u hipotalamusu nestaje u unutar 2-3 tjedna. Međutim,

dulja izloženost masnoj prehrani uzrokuje debljinu i vraća pojavu upale, što je najvjerojatnije rezultat aktivacije mehanizma staničnog stresa (71,72). Isti tim je pretragom mozga magnetskom rezonancom potvrdio postojanje upale u mediobazalnom hipotalamusu pretilih ljudi gdje je smještena ARC jezgra (71). Uslijed kroničnog izlaganja visokokaloričnoj prehrani i posljedične upale u ARC, specifično se gube POMC neuroni. TNF- $\alpha$  aktivacijom signalnog puta NF- $\kappa$ B potiče izražaj SOCS proteina koji utišavanjem inzulinskog i leptinskog signalnog puta uzrokuje lokalnu inzulinsku i leptinsku rezistenciju (72,73). Pokazalo se da su promjene ovih signalnih putova u podlozi neurodegenerativnih poremećaja (18,26). Posljedično se razvija pretilost jer je inhibitorni mehanizam hranjenja narušen. Pretilost uzrokuje upalu u periferiji koja vodi u inzulinsku i leptinsku rezistenciju te se razvijaju ranije opisane patološke promjene u organizmu. Nadalje, dugoročno izlaganje visokokaloričnoj prehrani, kao i posljedična kronična upala u hipotalamusu, dovode do manje stope proliferacije i apoptoze moždanih matičnih stanica pa je šteta nenadoknadiva (72). Dodatno kroničnoj upali u mozgu doprinosi i periferna upala čiji upalni čimbenici dolaze u mozak putem njegovog vlastitog limfnog sustava (74), ali i zbog oslabljene krvno-moždane barijere uslijed upalnih procesa.

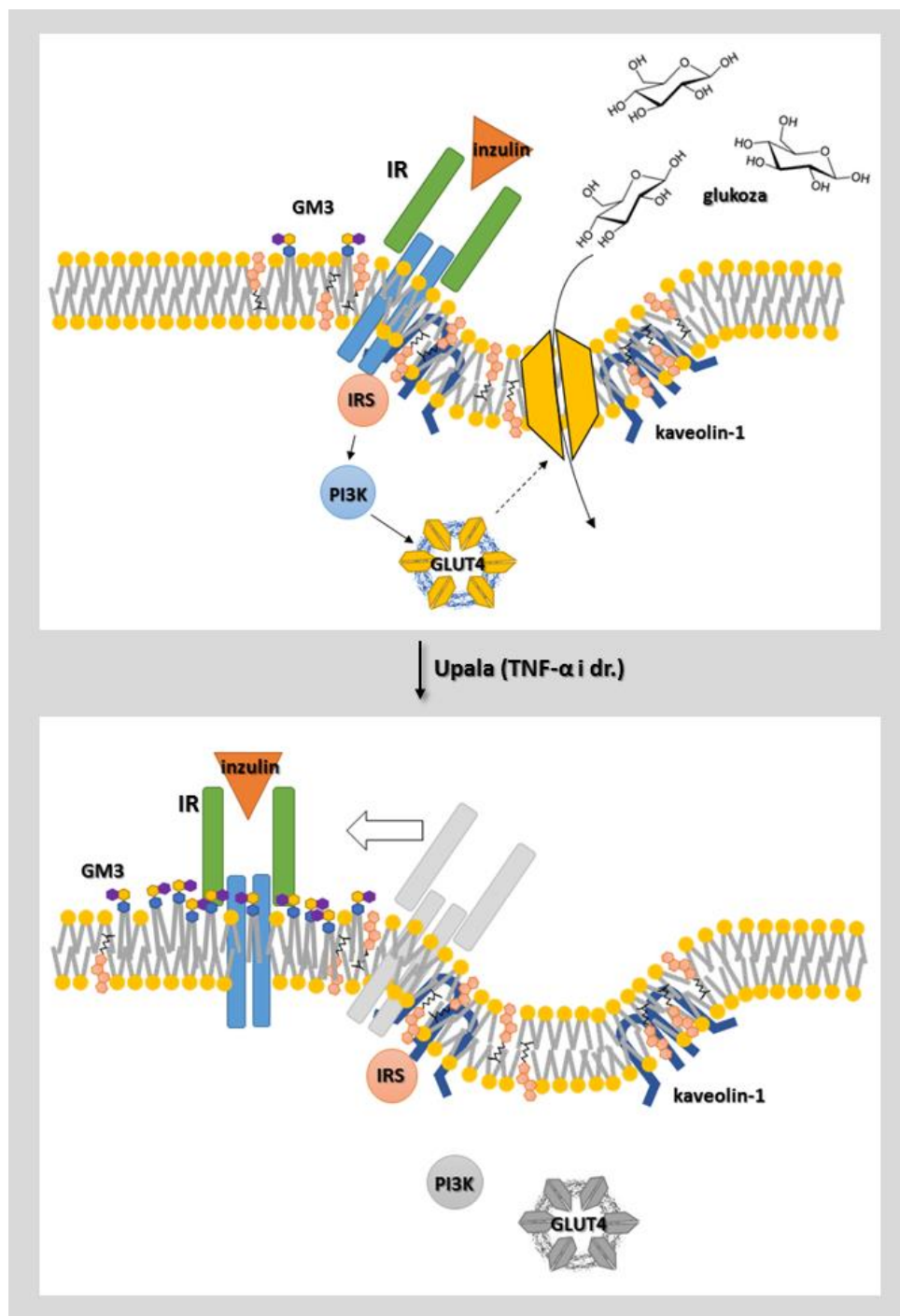
#### **1.4. Promjene sastava lipidnih splavi - mogući uzrok razvoja centralne inzulinske i leptinske rezistencije**

Stanična membrana je mjesto u stanici gdje se odvija komunikacija stanice s izvanstaničnim prostorom. Prema građi je dvosloj lipida – amfipatskih glicerofosfolipida, sfingolipida te kolesterola, u koji su ugrađeni proteini – djelomično ili kroz cijeli dvosloj (transmembranski). Lipidi i proteini mogu imati funkcionalne ugljikohidratne skupine na izvanstaničnoj strani membrane. Ugljikohidratne skupine tvore zaštitni omotač (glikokaliks) i povoljan okoliš za interakciju proteina s molekulama iz izvanstaničnog prostora. Stanična membrana nije jednostavna pločasta struktura kakvom se shematski prikazuje niti je homogena u svim svojim dijelovima. Na nekim dijelovima membrane ima više kolesterola i sfingolipida te je stoga uređenije, gušće strukture. Budući da se radi o dijelu membrane koji je manje fluidan dobio je ime lipidna splav. Podvrsta lipidnih splavi, zvane kaveole, invaginacija su u membrani s kojom su brojni receptori dovedeni u vezu. Ugradnjom proteina nalik ukosnici zvanog kaveolin u membrani nastaje malo udubljenje (75). Dosad su otkrivene 3 izoforme kaveolina. Zanimljivo je da u sintezi ovog proteina sudjeluje SREBP, jedan od glavnih čimbenika transkripcije u lipogenezi. Kaveolin-1 i kaveolin-2 su uglavnom skupa izraženi u adipocitima, fibroblastima, pneumocitima, stanicama epitela i endotela te u neuronima i astrocitima. Kaveolin-3 je izražen samo u svim vrstama mišićnog tkiva (75). Brojna istraživanja su potvrdila ulogu lipidnih splavi, odnosno kaveola, u procesu signalne transdukcije (primanja izvanstaničnih signala i pokretanja odgovarajućih signalnih putova) te se u literaturi može naći izraz za ovu funkciju - „signalna kompartmentalizacija“ (76). Osim toga, kaveole su u mozgu uključene u ostvarivanje stanične adhezije, usmjeravanje aksona, sinaptički prijenos signala te proteolizu vezanu uz membranu (77).

ObR i receptori s unutarstaničnom protein-tirozin kinaznom aktivnošću, poput IR i IGF-1R, smješteni su u perifernim tkivima u lipidnim splavima, točnije u kaveolama, te se očekuje isto i u središnjem živčanom sustavu (75,78). Receptori, osim s kaveolinom, ostvaruju interakcije s glikosfingolipidima, tj. gangliozidima koji također utječu na njihovu signalizaciju. Dodatno, IRS je vezan uz kaveolin (78–80). Slika 1.15. prikazuje na koji način gangliozid GM3 doprinosi razvoju periferne inzulinske rezistencije. Naime, u slučaju prisutnosti čimbenika upale TNF- $\alpha$  povećan je izražaj gangliozida GM3, koji stupa u interakcije s IR. IR posljedično gubi interakcije s kaveolinom-1 te biva izmješten iz kaveole (81). Na miševima sa isključenim genom *St3Gal5*<sup>3</sup> za sintezu gangliozida utvrđeno je da promjene sastava lipidnih splavi dovode do promjena u toleranciji na glukozu (82). Pretpostavka je da pretilost također izaziva promjene lipidnih splavi koje utječu na signalni put inzulina i leptina (75,77,83).

---

<sup>3</sup> gen za enzim GM3-sintazu. Bez ovog enzima neće doći do sinteze većine kompleksnih gangliozida.



Slika 1.15. Mehanizam uklanjanja IR iz kaveole, što doprinosi razvoju inzulinske rezistencije. Interakcija kaveolina-1 sa IR i IRS neophodna je za ispravnu signalizaciju inzulinom. U stanju povećanih koncentracija gangliozida GM3 (uslijed upale), IR nije s kaveolinom-1 u interakciji nego s GM3 izvan kaveole (ilustracija prema shemama u radovima autora Kabayama te Lopez i Schnaar (80,81)).

**Legenda:** GLUT4 - transporter glukoze 4, GM3 – monosijalodihexozilgangliosid, IR - inzulinski receptor, IRS - supstrat inzulinskog receptora, PI3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*), TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*).

### 1.5. Hipokampus je mjesto neurodegeneracije uslijed inzulinske i leptinske rezistencije

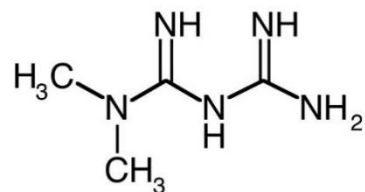
Hipokampus je dio mozga koji je uključen u stvaranje dugoročnog deklarativnog pamćenja te je zadužen za utvrđivanje prostornih odnosa. Također je jedno od rijetkih mjesta u odraslom mozgu gdje se događa stvaranje novih neurona ili neurogeneza. Smješten je u temporalnom režnju mozga te se sastoji od nekoliko različitih populacija neurona – granularni neuroni su smješteni u nazubljenoj vijugi (engl. *dentate gyrus*) (DG), a ostali piramidalni u tzv. *cornu Ammonis* područjima 1-3 (CA1-3) te u subikulumu koji povezuje hipokampus s korom mozga. Za stvaranje pamćenja su zaslužne mreže između navedenih stanica. Jedna od mreža je indirektni trisinaptički put  $DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$  kojoj informacije pristižu iz II. sloja entorinalne kore mozga, dok je druga direktan put gdje III. sloj entorinalne kore mozga projicira direktno u CA1 područje hipokampusa (63). Slijedi projekcija informacija iz CA1 područja u subikulum koji dalje informacije šalje u koru mozga (84). Kako bi se funkcija pamćenja i snalaženja u prostoru održala, potrebno je normalno preživljenje postojećih, ali i normalno stvaranje novih neurona. Upravo su za normalnu funkciju, preživljenje i neurogenezu stanicama hipokampusa potrebni leptin i inzulin. Leptin je uključen u proces dugoročne potencijacije, koja je podloga pamćenja, te je pokazao veliki utjecaj na sinaptičku plastičnost u hipokampusu (85,86). Nadalje, nekoliko je istraživanja pokazalo da leptin ima neuroprotektivan učinak na stanice hipokampusa te stanice kore mozga u ishemiji (87,88). Pokazalo se da hipokampus izražava GLUT4 transporter glukoze koji je osjetljiv na inzulin, pa inzulin djeluje na stanice hipokampusa kao na stanice periferije (89). Poznato je da inzulinska rezistencija neurona rezultira kognitivnim deficitom i demencijom (90–92).

### 1.6. Antidijabetici metformin i liraglutid

Danas najčešće korišteni lijekovi za T2DM, metformin i liraglutid, mogu prijeći krvno-moždanu barijeru i daju obećavajuće rezultate u terapiji ranih znakova poremećaja mozga (56,57). Istraživanje utjecaja ova dva antidijabetika na mozak mogla bi opravdati ranu intervenciju neurodegeneracije metforminom i liraglutidom te pronaći moguće prepreke u njihovoj primjeni.

#### 1.6.1. METFORMIN

Metformin pripada bigvanidnoj klasi lijekova (slika 1.16) koja se primjenjuje oralno. Najčešće je propisivan lijek za T2DM. Trenutne preporuke u liječenju T2DM najprije savjetuju monoterapiju metforminom. U slučaju neuspješnosti ovog pristupa, propisuje se kombinirana terapija metformina i dodatnih antidijabetika (20). Djelovanje metformina se ostvaruje kroz smanjeno otpuštanje glukoze iz jetre te dovodi do smanjenja glukoze u krvi kroz povećanje tkivne osjetljivost na inzulin, osobito osjetljivosti skeletnih mišića (95). Istovremeno ne uzrokuje hipoglikemiju.



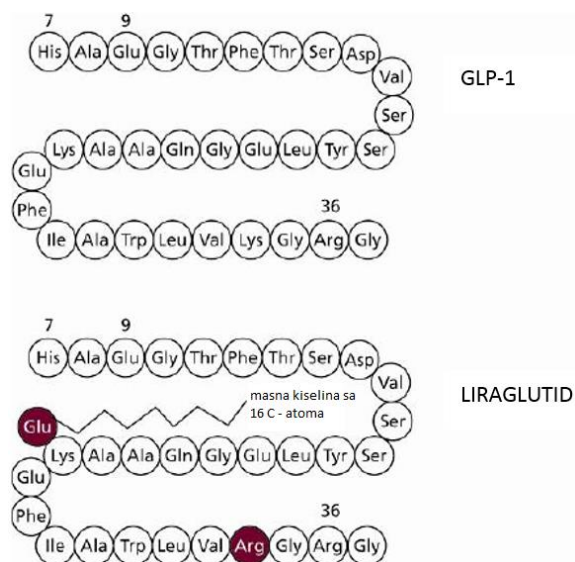
Slika 1.16. Kemijska struktura metformina (vlastita ilustracija prema spoznajama u literaturi).

Relativno nedavno je otkriveno da metformin djeluje na neurodegeneraciju u dijabetičnih miševa – primjena metformina kroz 18 tjedana rezultirala je smanjenjem fosforiliranog tau proteina, karakterističnog za AD (96).

### 1.6.2. LIRAGLUTID

Liraglutid je lijek koji se primjenjuje subkutano. Po strukturi je peptid (slika 1.17). Djeluje kao agonist receptoru za peptid nalik glukagonu 1 (engl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1). GLP-1 je hormon kojeg luče stanice crijeva kako bi obavijestio središnji živčani sustav o unosu hranjivih tvari što za posljedicu ima otpuštanje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače. Dakle, liraglutid stimulira lučenje inzulina, inhibira lučenje glukagona i dovodi do smanjenja apsorpcije hranjivih tvari te povećava osjećaj sitosti (97).

Istraživanja na miševima su pokazala da liraglutid smanjuje neurodegeneraciju u demenciji i poboljšava pamćenje (98).



Slika 1.17. Usporedba struktura GLP-1 i liraglutida.

(Slika preuzeta iz rada autora Sjöholm i sur. (99) i prilagođena)

## **2. CILJ RADA**



Specifični ciljevi istraživanja su:

- ❖ Dokazati upalu u središnjem živčanom sustavu Sprague-Dawley štakora na prehrani bogatoj mastima i ugljikohidratima pomoću biljega upale.
- ❖ Dokazati središnju rezistenciju na leptin i inzulin, tj. utišavanje signalnih putova u hipotalamičkim središtima koja reguliraju sitost.
- ❖ Pronaći poveznicu između upale niskog stupnja i rezistencije na leptin i inzulin s obzirom na raspodjelu inzulina- i leptin-pozitivnih neurona i biljega upale (aktivirana mikroglija, reaktivna gliosa) na mjestima podložnim neurodegeneraciji (hipokampus).
- ❖ Utvrditi položaj inzulinskog i leptinskog receptora u lipidnim splavima hipokampusa.
- ❖ Utvrditi utjecaj antidijabetika – metformina i liraglutida na te patološke procese.

Iz navedenih ciljeva rada proizlaze sljedeće hipoteze istraživanja:

- ❖ Stalan unos suviška kalorija izaziva pretilost u odraslih Sprague-Dawley štakora i dovodi do razvoja inzulinske i leptinske rezistencije i upale niskog stupnja u odraslom mozgu.
- ❖ Leptinska i inzulinska rezistencija međusobno su ovisni procesi (jedan potiče drugoga) u središnjem živčanom sustavu pretilog odraslog Sprague-Dawley štakora
- ❖ Razvoj inzulinske i leptinske rezistencije popraćen je premještanjem inzulinskog i leptinskog receptora unutar lipidnih splavi hipokampusa – primarnog mjesta neurodegeneracije.
- ❖ Metformin i liraglutid korekcijom leptinske i inzulinske rezistencije smanjuju stupanj središnje upale i sprječavaju degenerativne procese u štakora na prehrani bogatoj mastima i ugljikohidratima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijal

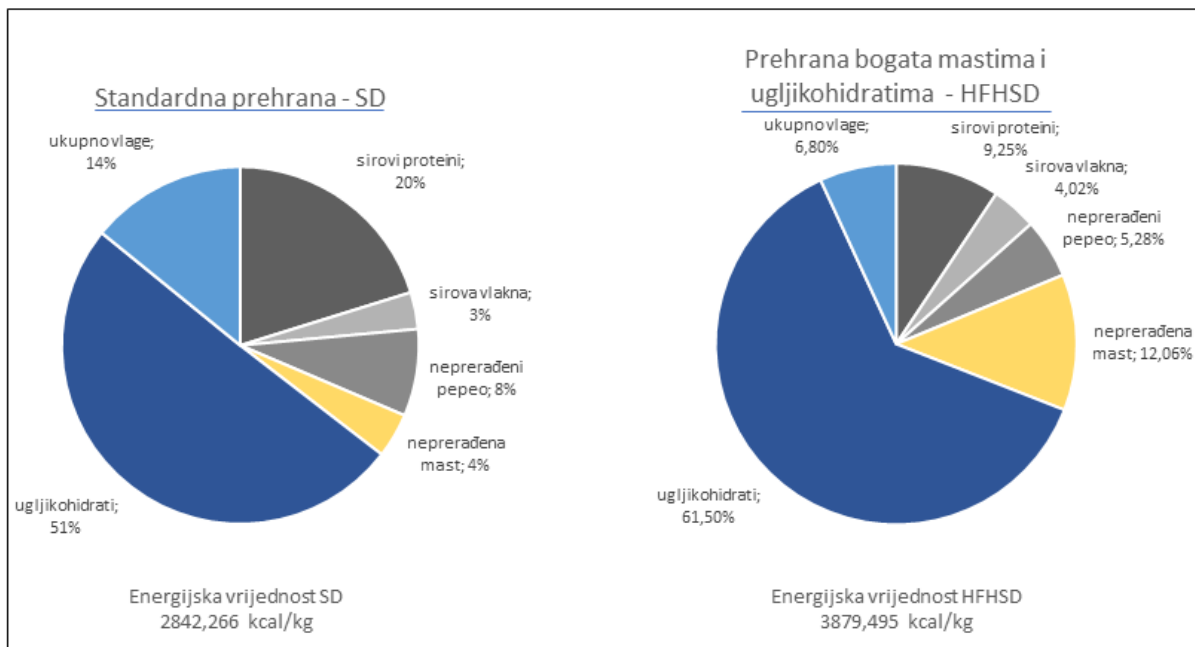
U istraživanju je korišteno moždano tkivo odraslih Sprague-Dawley štakora podvrgnutih prehrani bogatoj mastima i ugljikohidratima (engl. *high-fat high-sugar diet*, HFHSD) te tretmanima antidijabeticima, metforminom ili liraglutidom.

#### 3.1.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

U istraživanju je korišteno 64 Sprague-Dawley štakora starosti 45 tjedana (32 mužjaka i 32 ženke). Štakori su bili podijeljeni prema spolu i u 4 skupine unutar spola slijedom kako je navedeno:

1. Štakori hranjeni standardnom hranom (SD),
2. Štakori hranjeni hranom bogatom mastima i ugljikohidratima (HFHSD),
3. HFHSD tretirani metforminom i
4. HFHSD tretirani liraglutidom.

Hrana i voda su bili dostupni životinjama *ad libitum* za cijelo vrijeme trajanja istraživanja, osim 14-16h prije izvođenja testa tolerancije na glukozu (podaci nisu prikazani u disertaciji, testovi izvedeni prije početka eksperimenta, zatim u 5., 12. i 18. tjednu eksperimenta). Eksperiment je trajao 20 tjedana. U prvih 6 tjedana se inducirala pretilost u skupinama 2, 3 i 4 primjenom prehrane bogate mastima i ugljikohidratima (Alktromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Njemačka). Na slici 3.1. su prikazani sastavi korištene standardne hrane (SD) i hrane bogate mastima i ugljikohidratima (HFHSD) te njihove energijske vrijednosti.

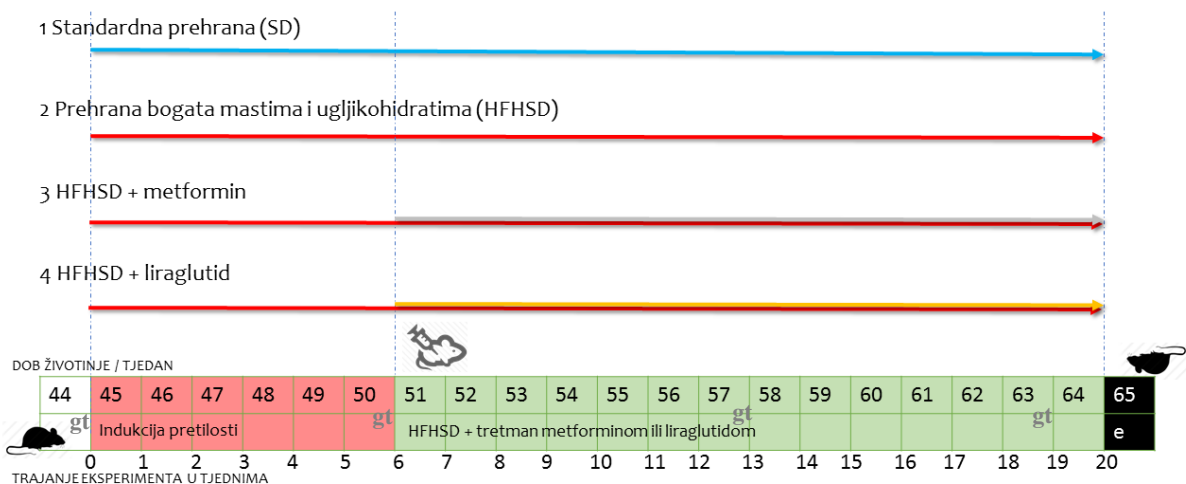


Slika 3.1. Sastav i energijska vrijednost korištene standardne i hrane bogate mastima i ugljikohidratima u eksperimentu. Obratiti pozornost na udio ugljikohidrata i masti.

Nakon što se inducirala pretilost u navedenih štakora, u sljedećih 14 tjedana primjenjivao se tretman metforminom u skupini 3 (s.c., 50 mg/kg/dan; proizvođač: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

te liraglutidom u skupini 4 (s.c., 0.3 mg/kg/dan; proizvođač: Creative Peptides, Shirley, NY, USA). Na kraju istraživanja, kada su štakori navršili 64 tjedna, eutanazirani su prevelikom dozom anestetika izoflurana (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD) te su prikupljeni uzorci moždanih tkiva za analizu (Slika 3.2).

Opisani dio istraživanja na živim životinjama proveden je na Zavodu za farmakodinamiku i biofarmaciju Sveučilišta u Szegedu, Szeged, Mađarska, u skladu s Direktivom Europske unije o životinjama korištenim u znanstvenim istraživanjima (Directive 2010/63/EU). Za istraživanje je dobiveno odobrenje Mađarskog etičkog povjerenstva za istraživanja na životinjama, broj odobrenja IV/3796/2015 i Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek, broj odobrenja: klasa 602-04/14-08/06, broj 2158-61-07-14-118.



Slika 3.2. Životinjske skupine i plan eksperimenta. **Legenda:** e – eutanazija, gt – test tolerancije na glukozu.

### 3.2. Metode

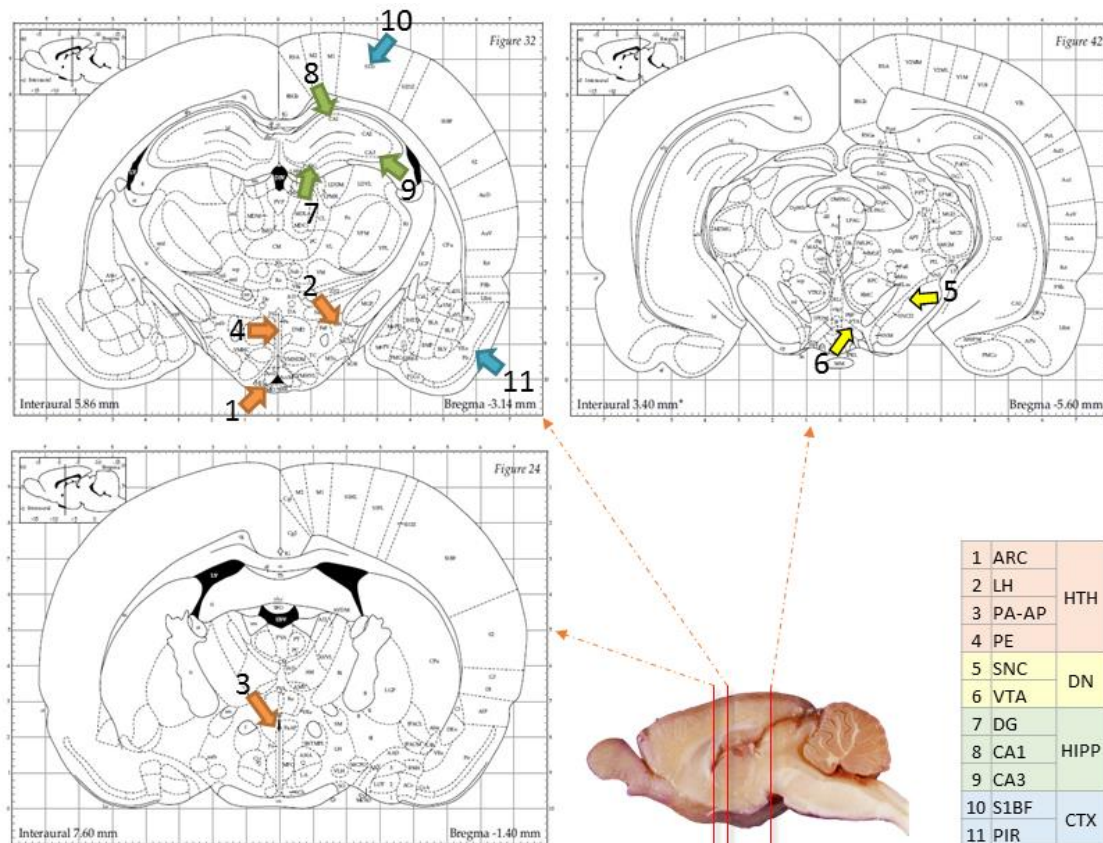
Korištene metode u istraživanju su imunohistokemijska analiza izražaja proteina, izolacija lipidnih splavi iz stanica hipokampusu ultracentrifugiranjem tkiva u gradijentu saharoza te analiza izražaja proteina Western blot metodom.

#### 3.2.1. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

Jedna je moždana hemisfera fiksirana u 4%-tnom paraformaldehidu (PFA), pH = 7,4 u trajanju od 24 sata. Zatim je krioprotektirana u gradijentu saharoza: hemisfera je držana po 24 sata u 10%-tnoj, zatim 20%-tnoj i 30%-tnoj otopini saharoze. Nakon toga je smrznuta u pothlađenom izopentanu i pohranjena na -80°C do sljedećih priprema za imunohistokemiju. Imunohistokemijski su analizirani sljedeći proteini: alfa podjedinica inzulinskog receptora (IR- $\alpha$ ), beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu 1 (IGF-1R $\beta$ ), leptinski receptor (ObR), protein supresor signalizacije citokinima 3 (SOCS3), čimbenik upale i biljeg mikroglije - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (Iba1),

vrsta intermedijarnog filamentnog proteina i biljeg astrocita - fibrilarni kiseli protein glije (GFAP) i biljeg aktivirane glije nestin (Nestin).

U imunohistokemijskoj analizi je upotrijebljeno tkivo većine životinja korištenih u istraživanju (najmanje 3, a najviše 8 ponavljanja po životinjskoj skupini, prema dostupnoj količini tkiva). Slika 3.3 prikazuje analizirana područja u mozgu: 4 područja u hipotalamusu (HTH) (narančaste strelice), 2 u dopaminergičkom području (DN) (žute strelice), 3 u hipokampusu (HIPP) (zelene strelice) i 2 u kori mozga (CTX) (plave strelice).



Slika 3.3. Imunohistokemijski analizirana područja mozga Sprague-Dawley štakora. Za izradu slike su korištene i prilagođene slike iz atlasa štakorskog mozga (11).

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SNC - kompaktni dio crne tvari mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA- ventralno područje tegmentuma.

### 3.2.1.1. Priprema tkiva za imunohistokemijsko bojanje

Fiksirane hemisfere su uklopljene u medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Njemačka) i narezane na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Njemačka) pri temperaturama CT -18°C i OT -15°C na koronarne rezove debljine 35 µm. Rezovi su prikupljeni u mikrotitarsku pločicu s 12 jažica ispunjenih puferom 1xPBS, pH=7,4. Budući da se svi rezovi nisu odmah koristili za imunohistokemijsko bojanje, bili su premješteni u DeOlmos otopinu čime je omogućena njihova pohrana na -20°C bez gubitka imunoreaktivnosti (100).

3.2.1.2. *Imunohistokemijsko bojanje*

Metodom slobodno-plutajuće imunohistokemije (engl. *free-floating immunohistochemistry*) gore nabrojani proteini su detektirani visokospecifičnim primarnim protutijelima. Korištena primarna protutijela, kao i njihove specifikacije, prikazani su u tablici 3.1. Komplex antigen-protutijelo vizualizirao se primjenom odgovarajućih sekundarnih protutijela konjugiranih s fluorescentnom bojom ili s biotinom. U slučaju korištenja sekundarnog protutijela s biotinom, primijenjen je avidin-biotin kompleks konjugiran s peroksidazom iz hrena (HRP) te supstrat za HRP, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), čijim dodavanjem HRP-u nastaje obojenje.

Tablica 3.1. Primarna protutijela korištena u slobodno-plutajućoj metodi imunohistokemijske analize.

Skraćena oznaka primarnog protutijela	Naziv primarnog protutijela	Klasa	Organizam porijekla	Proizvođač i kataloški broj
<b>IR-<math>\alpha</math></b>	Anti-alfa podjedinica inzulinskog receptora	IgG, poliklonalni	Zec	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD, SC-710
<b>IGF-1R<math>\beta</math></b>	Anti-beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu 1	IgG, poliklonalni	Zec	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD, SC-713
<b>ObR</b>	Anti-leptinski receptor	IgG, poliklonalni	Zec	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD, SC-8325
<b>Iba1</b>	Anti-ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1	IgG, poliklonalni	Zec	Wako Chemicals, Neuss, Germany 019-19741
<b>GFAP</b>	Anti-glijalni fibrilarni kiseli protein	IgG, poliklonalni	Zec	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD, Z0334
<b>Nestin</b>	Anti-nestin	IgG, poliklonalni	Koza	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD, SC-21248

Protokol imunohistokemijskog bojanja rezova štakorskog mozga protutijelima IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$ , i ObR je bio sljedeći:

- ❖ Rezovi su isprani od DeOlmos otopine 8 puta po 15 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Predretman vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kako bi se zasitile endogene peroksidaze, rezovi su inkubirani u 1%-tnoj otopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 30 minuta na tresilici pri +4°C.
- ❖ Blokiranje nespecifičnih reakcija. Rezovi su inkubirani 2 sata u otopini za blokiranje (5%-tni kozji serum i 1%-tni albumin iz seruma goveda (BSA) u 1xPBS puferu) na tresilici pri +4°C.

- ❖ Inkubacija s primarnim protutijelom. Rezovi su inkubirani u otopini primarnih protutijela anti-IR- $\alpha$  i anti-IGF-1R $\beta$  preko 1 noći, a anti-ObR preko 2 noći na tresilici pri +4°C. Otopine protutijela su pripremljene u otopini za blokiranje u sljedećim razrjeđenjima: anti-IR- $\alpha$  1:250, anti-ObR 1:50, anti-IGF-1R $\beta$  1:250.
- ❖ Ispiranje. Rezovi isprani 4 puta po 10 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Inkubacija sa sekundarnim protutijelom. Rezovi su inkubirani u otopini sekundarnog protutijela na 2 sata na tresilici pri +4°C. Korišteno je sekundarno protutijelo kozje anti-zečje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) pripremljeno u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:500.
- ❖ Ispiranje. Rezovi su isprani 3 puta po 10 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Inkubacija s kompleksom avidin-biotin konjugiran s HRP. Rezovi su inkubirani s 30 min ranije pripremljenom otopinom navedenog kompleksa (ABC Standard, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) na 2 sata na tresilici pri +4°C.
- ❖ Ispiranje. Rezovi su isprani 3 puta po 10 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Vizualizacija. Rezovi su inkubirani u otopini DAB pri sobnoj temperaturi točno 4 min, a kako bi se zaustavila reakcija između HRP i DAB premješteni su u 1xPBS pufer.
- ❖ Rezovi su navučeni na silanizirana predmetna stakalca i prekriveni Vectamount pokrivalom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) te su skenirani u Super Coolsan 9000 skeneru (Nikon, Tokyo, Japan).

Protokol imunohistokemijskog fluorescentnog bojanja rezova štakorskog mozga protutijelima Nestin, GFAP i Iba1 je bio sljedeći:

- ❖ Rezovi su isprani od DeOlmos otopine 8 puta po 15 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Blokiranje nespecifičnih reakcija. Rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje (5%-tni kozji serum i 1%-tni albumin iz seruma goveda u 1xPBS puferu) 2 sata na tresilici pri +4°C.
- ❖ Inkubacija s primarnim protutijelima. Rezovi su preko noći na tresilici pri +4°C inkubirani u otopinama primarnih protutijela pripremljenima u otopini za blokiranje. Korištena su protutijela anti-Nestin u razrjeđenju 1:300, anti-GFAP u razrjeđenju 1:4000 i anti-Iba1 u razrjeđenju 1:1000.
- ❖ Ispiranje. Rezovi su isprani 3 puta po 5 min u 1xPBS puferu.
- ❖ Inkubacija sa sekundarnim protutijelima. Rezovi su inkubirani 2 sata u otopini sekundarnih protutijela na tresilici pri +4°C. Sekundarna protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje. Korištena sekundarna protutijela su anti-kozje IgG konjugirano s fluorokromom AF488 (Santa Cruz Biotechnology, SC-21248) u razrjeđenju 1:300 za detekciju anti-Nestin te anti-zečje IgG konjugirano s fluorokromom Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) u razrjeđenju 1:300, za detekciju anti-GFAP i anti-Iba1.

- ❖ Rezovi su navučeni na silanizirana predmetna stakalca i kratko posušeni.
- ❖ Kako bi se smanjila autofluorescencija rezovi su tretirani 10 min na sobnoj temperaturi s 0,1%-tnom otopinom Sudan Black B pripremljenoj u 70%-tnom etanolu. Nakon toga su kratko isprani s destiliranom vodom (dH<sub>2</sub>O) i pokriveni Vectashield pokrivalom s nuklearnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD).

### 3.2.1.3. Procjena izražaja IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$ i ObR te morfologije GFAP- i Iba1-pozitivnih stanica računalnim programom Fiji

Nakon imunohistokemijskog bojanja uslijedilo je mikroskopiranje preparata i njihovo slikanje kamerom spojenom na mikroskop (mikroskop: Carl Zeiss Axioskop 2 MOT; kamera: Olympus D70; računalni program za prikupljanje slika: DP Manager v 1.2.1.107. i DP Controller v 1.2.1.108).

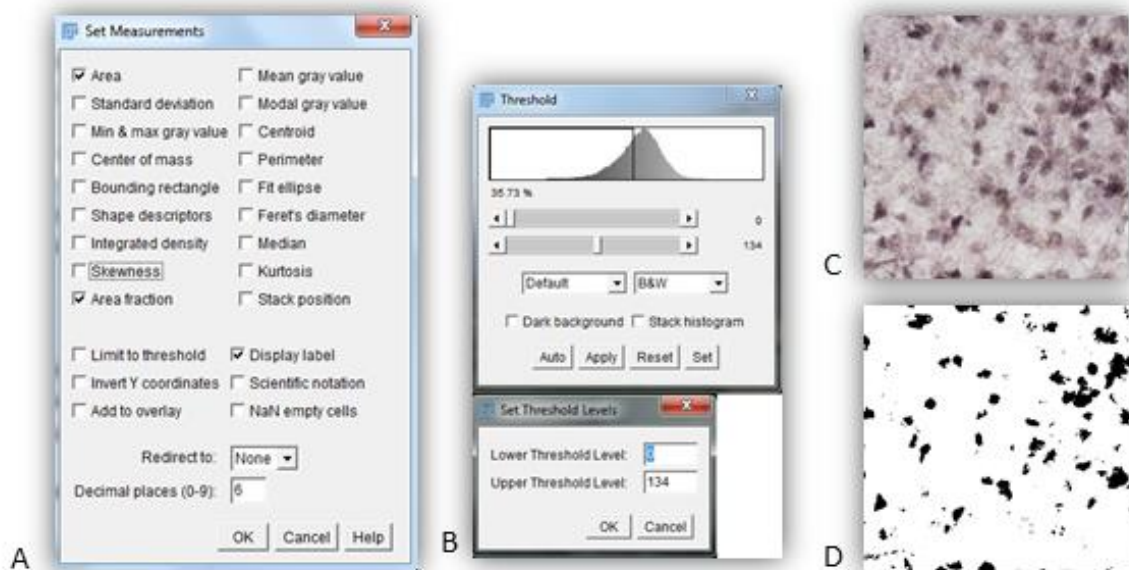
Pomoću računalnog programa Fiji (101) analizirane su slike odabranih područja mozga (slika 3.2). Na slikama preparata bojanih protutijelima na IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$  i ObR prebrojane su imunopozitivne stanice i imunopozitivni receptori u usklađenim površinama od 20 000  $\mu\text{m}^2$ . Na slikama preparata bojanih protutijelima na GFAP i Iba1 analizirane su promjene u morfologiji imunopozitivnih stanica prema dolje opisanom protokolu.

Protokol analize slika preparata bojanih protutijelima na IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$  i ObR pomoću računalnog programa Fiji:

1. U programu su zadana željena mjerenja (Traka izbornika > Analyze > Set Measurements) (slika 3.4a).
2. Otvorena je jedna slika „tiff“ formata.
3. U svrhu izrade računalnog podprograma koji će sadržavati algoritam analiziranja slika (engl. *macro*), u traci izbornika izabrana je mogućnost „Plugins“ pri čemu je otvoren izbornik u kojem je izabrana mogućnost „Macros“ i „Record“ (Traka izbornika > Plugins > Record > Macro).
4. Slika „tiff“ formata prevedena je u 8-bit format koji svakom pikselu pridružuje vrijednost između 0 i 255 (Traka izbornika > Image > Type > 8 bit).
5. Određen je raspon vrijednosti piksela u svrhu uklanjanja pozadinskog obojenja i isticanja isključivo imunopozitivne reakcije za analizu (slika 3.4b). Zadana vrijednost za donji prag (engl. *threshold*) iznosila je 0, a vrijednost gornjeg praga zadana je prema prethodno određenoj prosječnoj vrijednosti gornjih pragova pri kojima pozadinsko obojenje na slikama kontrolnih rezova više nije vidljivo (Traka izbornika > Image > Adjust > Threshold) (Tablica 3.2).
6. U traci izbornika izabrana je mogućnost „Analyze“. Nakon toga je otvoren izbornik u kojemu je izabrana mogućnost „Measure“. Rezultati su bili ispisani u novootvorenom prozoru „Results“.
7. „Macro“ je sačuvan i odabran kao željeni podprogram za analizu velikog broja slika u kratkom vremenu putem odabira mogućnosti „Process“ u traci izbornika te mogućnosti „Multiple Image Processor“.



8. Dobiveni rezultat je nakon svakog mjerenja iz prozora „Results“ unesen u Excel®, računalni program za proračunske tablice (Microsoft, Redmond, WA, SAD).



Slika 3.4. Primjer prozora dijaloga tijekom zadavanja željenih mjerenja (A) i određivanja raspona vrijednosti piksela za sliku 8-bit formata (B). Izvorna slika (C) i obradena slika za analizu (D).

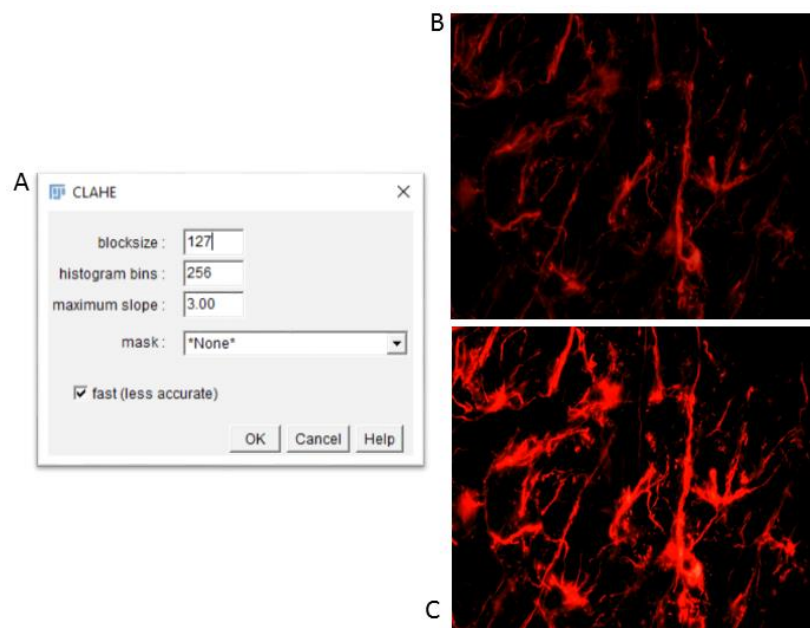
Tablica 3.2. Korištene prosječne vrijednosti gornjeg praga pri kojem pozadinsko obojenje na slikama rezova negativne kontrole više nije vidljivo u svrhu analize slika preparata bojanih protutijelima na IR- $\alpha$ , IGF-1R $\beta$  i ObR pomoću računalnog programa Fiji.

skupina		mužjaci	ženke
područje			
HTH	ARC	130	120
	LH	142	127
	PA-AP	140	143
	PE	140	147
DN	SNC	132	139
	VTA	134	145
HIPP	DG	132	141
	CA1	136	136
	CA3	153	143
CTX	S1BF	138	139
	PIR	137	145

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SNC - kompaktni dio crne tvari mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA- ventralno područje tegmentuma.

Protokol analize slika preparata bojanih protutijelima na GFAP i Iba1 pomoću računalnog programa Fiji je bio sljedeći:

1. Otvorena je jedna slika „tiff“ formata.
2. U svrhu izrade računalnog podprograma koji će sadržavati algoritam analiziranja slika (engl. *macro*), u traci izbornika izabrana je mogućnost „Plugins“ pri čemu je otvoren izbornik u kojem je izabrana mogućnost „Macros“ i „Record“ (Traka izbornika > Plugins > Record > Macro).
3. Kako bi se prilagodila slika u svrhu boljeg opažanja fluorescentnog obojenja, pomoću primjene mogućnosti „Enhance Local Contrast (CLAHE)“ prilagođen je kontrast slike (Traka izbornika > Process > Enhance Local Contrast (CLAHE)). Prilagođene vrijednosti su prikazane na slici 3.5.



Slika 3.5. Primijenjene mogućnosti pri prilagođavanju kontrasta slike (A). Izvorna slika prije (B) te slika nakon prilagođavanja kontrasta (C).

4. Nadalje, u traci izbornika izabrana je mogućnost „Plugins“. Nakon toga je otvoren izbornik u kojemu je izabrana mogućnost „Color Pixel Counter“. Rezultati su bili ispisani u novootvorenom prozoru „Results“ (Traka izbornika > Plugins > Color Pixel Counter).
5. „Macro“ je sačuvan i odabran kao željeni podprogram za analizu velikog broja slika u kratkom vremenu putem odabira mogućnosti „Process“ u traci izbornika te mogućnosti „Multiple Image Processor“.
6. Dobiveni rezultat je nakon svakog mjerenja iz prozora „Results“ unesen u Excel.

### 3.2.2. ANALIZA POLOŽAJA INZULINSKOG (IR- $\alpha$ ) I LEPTINSKOG RECEPTORA (ObR) U LIPIDNIM SPLAVIMA HIPOKAMPUSA

Dok je jedna moždana hemisfera korištena u imunohistokemijskoj analizi, iz druge je korišteno tkivo hipokampusa za izolaciju lipidnih splavi. Tkiva hipokampusa svake životinjske skupine su združena u 3 uzorka po 50 mg za izolaciju. U frakcijama izolata lipidnih splavi hipokampusa određen je položaj IR- $\alpha$  i ObR.

#### 3.2.2.1. *Izolacija lipidnih splavi*

Lipidne splavi su izolirane prema prilagođenom protokolu za izolaciju lipidnih splavi koji je proizašao iz nekoliko uobičajeno korištenih protokola. Protokol je prilagodila dr. sc. Kristina Mlinac-Jerković, Laboratorij za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Zagreb. Metoda nije detaljno opisana jer je protokol izolacije lipidnih splavi iz moždanog tkiva u pripremi za publikaciju.

Ukratko, metoda se sastojala od nekoliko koraka. (1) Klarifikacija. Tkivo hipokampusa je najprije izvagano (Sartorius GP1100S; Dana Weighing Systems, Elk Grove, IL, SAD), a zatim premješteno u pothlađeni stakleni Potter-Elvehjem homogenizator s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Nakon dodavanja homogenizacijskog pufera, uzorak je ručno homogeniziran. Homogenizirano tkivo je prebačeno u plastičnu epruvetu i centrifugirano 15 min pri 1 000 g i +4°C (centrifuga: Hettich Universal 32R; Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Njemačka). (2) Ultracentrifugiranje s ciljem izdvajanja staničnih membrana u talog (ultracentrifuga: Beckman Optima XL-80K, rotor 50,4 Ti; Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD), te (3) ultracentrifugiranje s ciljem izdvajanja lipidnih splavi iz prethodno dobivenog taloga. Nakon završetka ultracentrifugiranja iz svake epruvete su skupljene frakcije. Ukupno je dobiveno 10 ili 11 frakcija po uzorku, volumena 1,5 mL. Frakcije su spremljene na -20°C do analize položaja IR- $\alpha$  i ObR metodom Western blot. Supernatant dobiven iz koraka (2) sadržavao je citosolne proteine pa je zbog susljednih analiza izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3 prikupljen i spremljen na -20°C.

#### 3.2.2.2. *Kvantitativna analiza položaja IR- $\alpha$ i ObR u lipidnim splavima hipokampusa metodom Western blot*

Položaj IR- $\alpha$  i ObR utvrđen je metodom Western blot u odnosu na biljege lipidnih splavi – protein flotilin1 (Flot1) i gangliozid GM1 te na biljeg ostatka stanične membrane – transferinski receptor (TfR). Uzorci za Western blot bile su frakcije izolata lipidnih splavi hipokampusa.

Protokol Western blot metode je sljedeći:

- ❖ Denaturacija proteina. Po 15  $\mu$ L frakcije je pomiješano s 5  $\mu$ L pufera za uzorke (Novex NuPage LDS sample buffer 4x; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prethodno pomiješanog s reducirajućim agensom (NuPage sample reducing buffer; Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, SAD) u omjeru pufer za uzorke : reducirajući agens = 2:1. Pripremljena smjesa je kuhana 5 min na 95°C na termobloku (Eppendorf Thermomixer Compact; Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

- ❖ Elektroforetsko razdvajanje proteina. Sav je volumen smjese premješten u jažice gela za poliakrilamidnu elektroforezu (NuPage 4-12% BisTris gels; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Na gel je dodano i 8 µL standarda (Precision Plus Dual Color Marker; Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Budući da se elektroforeza odvijala u reducirajućim uvjetima, u pufer za elektroforezu dodano je 250 µL antioksidansa (NuPage Antioxidant; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Elektroforeza je trajala 1h pri električnom naponu iznosa 150 V.
- ❖ Prijenos proteina na membranu. PVDF membrana (Immobilion P; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) izrezana je prema dimenzijama gela, zatim je aktivirana potapanjem u metanol na 3 min te isprana destiliranom vodom dok nije izgubila masni sjaj. Do trenutka slaganja kazete za prijenos proteina, membrana je stajala u puferu za prijenos. U pufer za prijenos namočeni su i ostali dijelovi potrebni za slaganje kazete (spužvice i filter-papiri). Po završetku elektroforeze uslijedilo je slaganje kazete za prijenos proteina prema uputama proizvođača (Mini Blot Module; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Prijenos proteina na PVDF membranu trajao je 1h pri električnom naponu iznosa 20V.
- ❖ Vizualizacija proteina i gangliozida GM1. Specifičnim su protutijelima na PVDF membrani detektirani Flot1, TfR, IR- $\alpha$  i ObR, a kompleks antigen-protutijelo je detektiran odgovarajućim sekundarnim protutijelom konjugiranim s HRP (anti-mišje IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD; kat. br. SC-2005) i anti-zečje (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD; kat. br. 111-035-144), oba korištena u razrjeđenju 1:4000). Tablica 3.3. prikazuje specifikacije navedenih protutijela i razrjeđenja u kojima su korišteni. Gangliozid GM1 specifično je detektiran pomoću podjedinice B toksina kolere konjugirane s HRP (CTB) (Life Technologies C34780; korištena u razrjeđenju 1:100 000). Dodavanjem kemiluminiscentnog supstrata enzimu HRP došlo je do enzimske reakcije pri kojoj se oslobađaju fotoni. Intenzitet emitiranog svjetla detektirao se pomoću sustava Chemidoc XRS+ (BioRad, Hercules, CA, SAD). Protokol vizualizacije proteina i gangliozida GM1 je sljedeći:
  - Blokiranje nespecifičnih reakcija. Po završetku transfera membrana je inkubirana s otopinom za blokiranje. U slučaju Flot1, TfR i GM1 vizualizacije otopina za blokiranje bila je 5%-tna otopina nemasnog mlijeka u prahu, pripremljena u 0,1%-tnoj otopini detergenta Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u 1xPBS puferu (1xPBST), a u slučaju vizualizacije ObR i IR- $\alpha$ , 3%-tna otopina BSA u 1xPBST. Inkubacija je pri sobnoj temperaturi (engl. *room temperature*, RT) trajala 1h.
  - Inkubacija s primarnim protutijelom i CTB. Membrane su inkubirane u otopinama protutijela pripremljenima u navedenom razrjeđenju (tablica 3.3) u pripadajućoj otopini

za blokiranje (5%-tna otopina nemasnog mlijeka ili 3%-tna otopina BSA). Otopina CTB je pripremljena u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka. Inkubacija je trajala preko noći na tresilici pri +4°C.

- Ispiranje. Nakon inkubacije u otopini primarnog protutijela, membrane su isprane 3 puta po 10 min u 1xPBST. Membrana inkubirana sa otopinom CTB je nakon ovog koraka bila spremna za vizualizaciju primjenom kemiluminiscentnog supstrata.
- Inkubacija sa sekundarnim protutijelom. Membrane su inkubirane u otopini sekundarnog protutijela na tresilici u trajanju od 1h pri RT. Otopina sekundarnog protutijela je pripremljena u 1xPBST prema gore navedenim razrjeđenjima.
- Ispiranje. Membrane su isprane 3 puta po 10 min u 1xPBST.
- Vizualizacija. Neposredno prije uporabe je pripremljena otopina kemiluminiscentnog supstrata prema uputama proizvođača (Immun Star Western C kit; Biorad, Hercules, CA, SAD) koja je zatim dodana membranama. Uslijedila je detekcija i slikanje reakcije na membranama pomoću sustava Chemidoc XRS+ te obrada slika u računalnom programu Image Lab (Biorad, Hercules, CA, SAD).

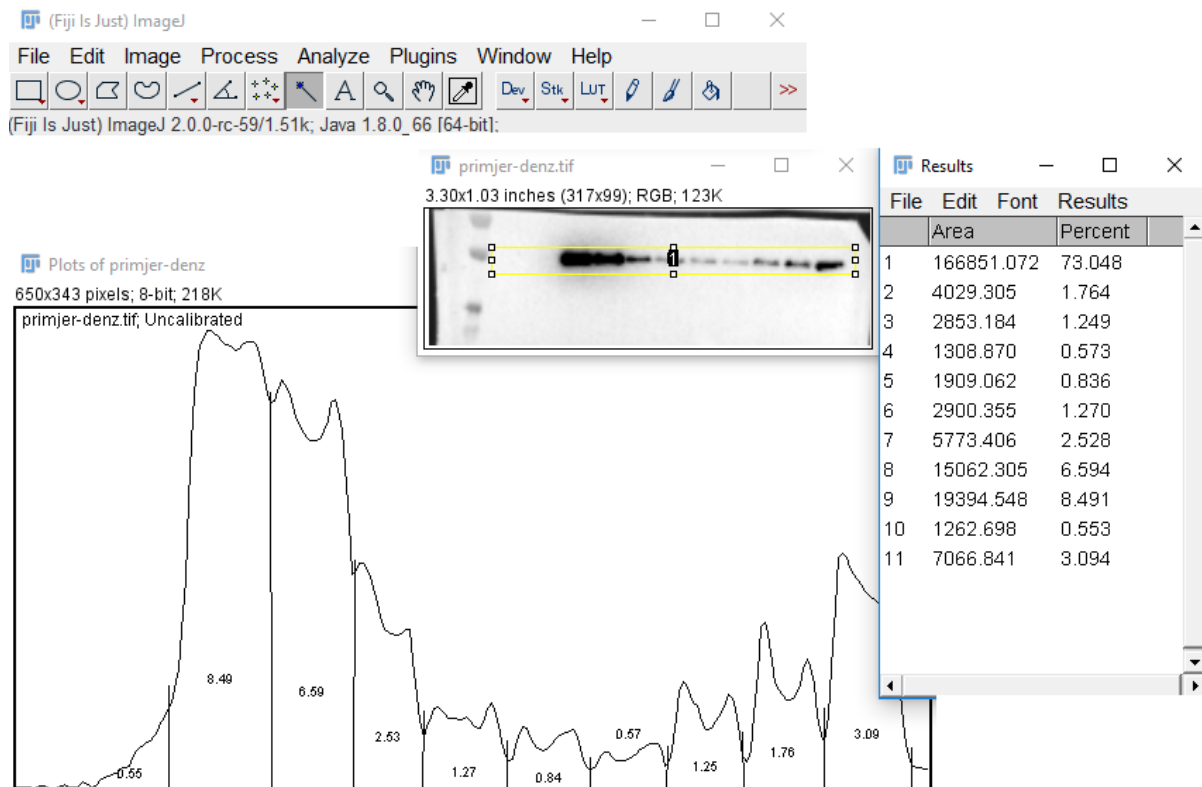
Tablica 3.3. Primarna protutijela korištena u Western blot metodi za potvrdu frakcija splavi i ostatka stanične membrane te detekciju receptora za leptin i inzulin.

Skraćena oznaka primarnog protutijela	Naziv primarnog protutijela	Klasa	Organizam porijekla	Proizvođač i kataloški broj	Razrjeđenje u 5% mlijeku pripremljenom u 1xPBS
Flot1	Anti-flotilin 1	IgG, monoklonski	Miš	BD Biosciences, Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, SAD; 610821	1:5000
TfR	Anti-transferin	IgG, monoklonski	Miš	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, SAD; 13-6800	1:2000
ObR	Anti-leptinski receptor	IgG, monoklonski	Miš	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD; SC-8391	1:150 **napomena: inkubacija preko 2 noći.
IR- $\alpha$	Anti-alfa podjedinica inzulinskog receptora	IgG, poliklonski	Zec	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD; SC-710	1:200

3.2.2.3. Denzitometrija izražaja proteina TfR, ObR i IR- $\alpha$  računalnim programom Fiji

Kako bi se procijenio izražaj proteina TfR, ObR i IR- $\alpha$  napravljena je denzitometrija membrana računalnim programom Fiji (slika 3.6) na sljedeći način:

- ❖ U računalnom program Fiji otvorena je slika membrane „tiff“ formata (Traka izbornika>File>Open>biramo sliku).
- ❖ U traci izbornika je odabrana mogućnost „Rectangular“, pomoću koje se na slici izradio pravokutnik. Pravokutnikom je odabrana površina slike za analizu u kojoj su bile proteinske vrpce željene veličine.
- ❖ Definirana je površina za analizu (Traka izbornika>Analyze>Gels>Select First Lane).
- ❖ Iz definirane površine za analizu je izrađen grafički prikaz izraženosti proteina (Traka izbornika>Analyze>Gels>Plot Lanes).
- ❖ U grafičkom prikazu su pojedinoj proteinskoj vrpici pridružene odgovarajuće površine ispod krivulje tako što su vertikalno povučene granice između pojedinih proteinskih vrpca (Traka izbornika>Straight).
- ❖ Definirane su pojedine površine primjenom mogućnosti „Wand“ (Traka izbornika>Wand).
- ❖ Ispisane su vrijednosti udjela površine pojedine proteinske vrpce u ukupnoj površini ispod krivulje koja je prikazivala izražaj proteina na membrani (Traka izbornika>Analyze>Gels>Label Peaks).
- ❖ Rezultati su ispisani u novootvorenom prozoru „Results“ te preneseni u Excel proračunsku tablicu.



Slika 3.6. Denzitometrija izražaja proteina na PVDF membrani u računalnom programu Fiji.

## 3.2.3. KVANTITATIVNA ANALIZA PROTEINA pSTAT3 I SOCS3

Iz supernatanta dobivenog nakon drugog ultracentrifugiranja ( $S_2$ ) pripremljeni su uzorci za analizu citosolnih proteina pSTAT3 (fosforilirani STAT3) i SOCS3 (supresor signalizacije citokinima) Western blot metodom. Budući da se u  $S_2$  nalaze citosolni proteini u nepoznatoj koncentraciji, koncentracija je određena metodom prema Bradfordu. Radi se o metodi koja se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju apsorbancije protein-vežuće boje Coomassie Brilliant Blue G-250 pri valnoj duljini od 595 nm. Boja je otopljena u smjesi s metanolom i fosfornom kiselinom, a ta se smjesa naziva Bradfordov reagens. U istraživanju je korišten komercijalno dostupan Bradfordov reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD; kat. br. A6932.0250). Nakon što se Bradfordov reagens doda uzorcima, boja se veže za proteine te dolazi do promjene obojenja iz crveno-smeđeg u plavo. Promjena u intenzitetu obojenja ovisi o koncentraciji proteina u uzorku.

Protokol određivanja koncentracije proteina metodom prema Bradfordu je sljedeći:

- ❖ Slijepa proba. U epruvetu je uliveno 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .
- ❖ Standardne otopine. U duplikatu su pripremljene četiri otopine BSA ukupnog volumena 100  $\mu\text{L}$  sljedećih koncentracija: „Standard 1“ – 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , „Standard 2“ – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , „Standard 3“ – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i „Standard 4“ – 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- ❖ Uzorci nepoznate koncentracije. U duplikatu su pripremljene 10 puta razrijeđene otopine uzoraka tako što je u epruvetu uliveno 10  $\mu\text{L}$  otopine uzorka i 90  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .
- ❖ Mjerenje apsorbancije. U sve je epruvete dodano po 1 mL Bradfordovog reagensa. Nakon kratkog miješanja i inkubacije od 2 minute, sadržaj epruvete je premješten u kivetu. Prvo je u spektrofotometar (CamSpec M201; Spectronic Camspec Ltd., Garforth, Leeds, UK) stavljena kiveta slijepe probe te su pri valnoj duljini od 595 nm podešene transmitancija na 100% i apsorbancija na 0. Zatim su mjerene apsorbancije standardnih otopina, a onda i apsorbancije uzoraka nepoznate koncentracije.
- ❖ Određivanje koncentracije proteina u uzorcima. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija standardnih otopina nacrtan je interpolirani pravac u koordinatnom sustavu, pri čemu su na apscisu unesene vrijednosti masene koncentracije otopine, a na ordinatu vrijednosti apsorbancije. Zatim je prema prosječnoj vrijednosti izmjerenih apsorbancija uzoraka iz koordinatnog sustava očitana koncentracija proteina. Budući da su uzorci bili razrijeđeni 10 puta, dobivena vrijednost masene koncentracije je množena s 10. Tablica 3.4 prikazuje dobivene vrijednosti masenih koncentracija za pojedini uzorak te volumen koji je upotrijebljen za nanošenje određene mase proteina na poliakrilamidni gel za elektroforezu.

Tablica 3.4. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima metodom prema Bradfordu te vrijednosti potrebnog volumena za nanošenje 8 µg proteina u svaku jažicu poliakrilamidnog gela za elektroforezu.

UZORAK	A (srednja vrijednost)	Koncentracija µg/mL (10x razrijeđeno)	Konačna koncentracija (µg/mL)	V za nanijeti na PAGE (µL)
1F	0,141	51,53	515,3	15,5
2F	0,178	76,20	762,0	10,5
3F	0,168	69,53	695,3	11,5
4F	0,172	72,20	722,0	11,1
1M	0,158	62,87	628,7	12,7
2M	0,180	77,53	775,3	10,3
3M	0,227	108,87	1088,7	7,3
4M	0,130	44,20	442,0	18,1

**Legenda:** A – apsorbancija, F – ženke, M – mužjaci, PAGE – poliakrilamidna elektroforeza, V – volumen, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Zbog ograničenja volumena koji stane u jažice poliakrilamidnog gela za elektroforezu (najveći mogući volumen je 20 µL), određeno je nanošenje po 8 µg proteina iz svakog uzorka na gel. Iz svakog uzorka S<sub>2</sub> pripremljeni su uzorci za Western blot metodu koja je izvedena prema opisanom protokolu, a protokol vizualizacije proteina pSTAT3 i SOCS3 je sljedeći:

- ❖ Blokiranje nespecifičnih reakcija. Po završetku transfera membrane su inkubirane 1h na tresilici pri RT otopinom za blokiranje – 3%-tna otopina BSA pripremljena u 0,1%-tnoj otopini detergenta Tween 20 u 1,5xTris-HCl puferu (1,5xTBST).
- ❖ Inkubacija s primarnim protutijelom. Membrane su inkubirane u otopinama primarnog protutijela pripremljenih u otopini za blokiranje. Korištena primarna protutijela su zečje monoklonalno protutijelo anti-pSTAT3 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, SAD; kat. br. 9145S; korišteno u razrjeđenju 1:2000) i mišje monoklonalno protutijelo anti-SOCS3 (Abcam, Cambridge, MA, SAD; kat. br. ab14939; korišteno u razrjeđenju 1:3000). Inkubacija je trajala preko noći na tresilici pri +4°C.
- ❖ Ispiranje. Nakon inkubacije u otopini primarnog protutijela, membrane su isprane 3 puta po 10 min u 1,5xTBST.
- ❖ Inkubacija sa sekundarnim protutijelom. Membrane su inkubirane u otopini sekundarnog protutijela na tresilici u trajanju od 1h pri RT. Otopina sekundarnog protutijela je pripremljena u 1,5xTBST u sljedećim razrjeđenjima:
  - anti-mišji IgG 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD; kat. br. SC-2005),
  - anti-zečji IgG 1:3000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD; kat. br. 111-035-144).



- ❖ Vizualizacija. Neposredno prije uporabe je pripremljena otopina kemiluminiscentnog supstrata prema uputama proizvođača (Immun Star Western C kit; Biorad, Hercules, CA, SAD), koja je zatim dodana membrani. Uslijedila je detekcija i slikanje reakcije na membrani pomoću sustava Chemidoc XRS+ te obrada slika u računalnom programu Image Lab (Biorad, Hercules, CA, SAD).

#### 3.2.3.1. *Denzitometrija izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3 računalnim programom Fiji*

Slika PVDF membrane s imunodetektiranim proteinima se denzitometrijski analizirala računalnim programom Fiji na način opisan u poglavlju 3.2.2.3.

#### 3.2.4. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističke analize korišten je program Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Normalnost distribucije podataka testiran je Shapiro-Wilk testom. Kako podaci nisu imali normalnu raspodjelu, razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene su Mann-Whitney-U testom uz Bonferronijevu korekciju. Navedena se korekcija primijenila kako bi se smanjila pogreška prve vrste zbog višestruke usporedbe. Razina značajnosti ( $\alpha$ - ili  $p$ -vrijednost) je 0,50.

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Imunohistokemijska analiza receptora uključenih u nadzor hranjenja i energetske stanje organizma**

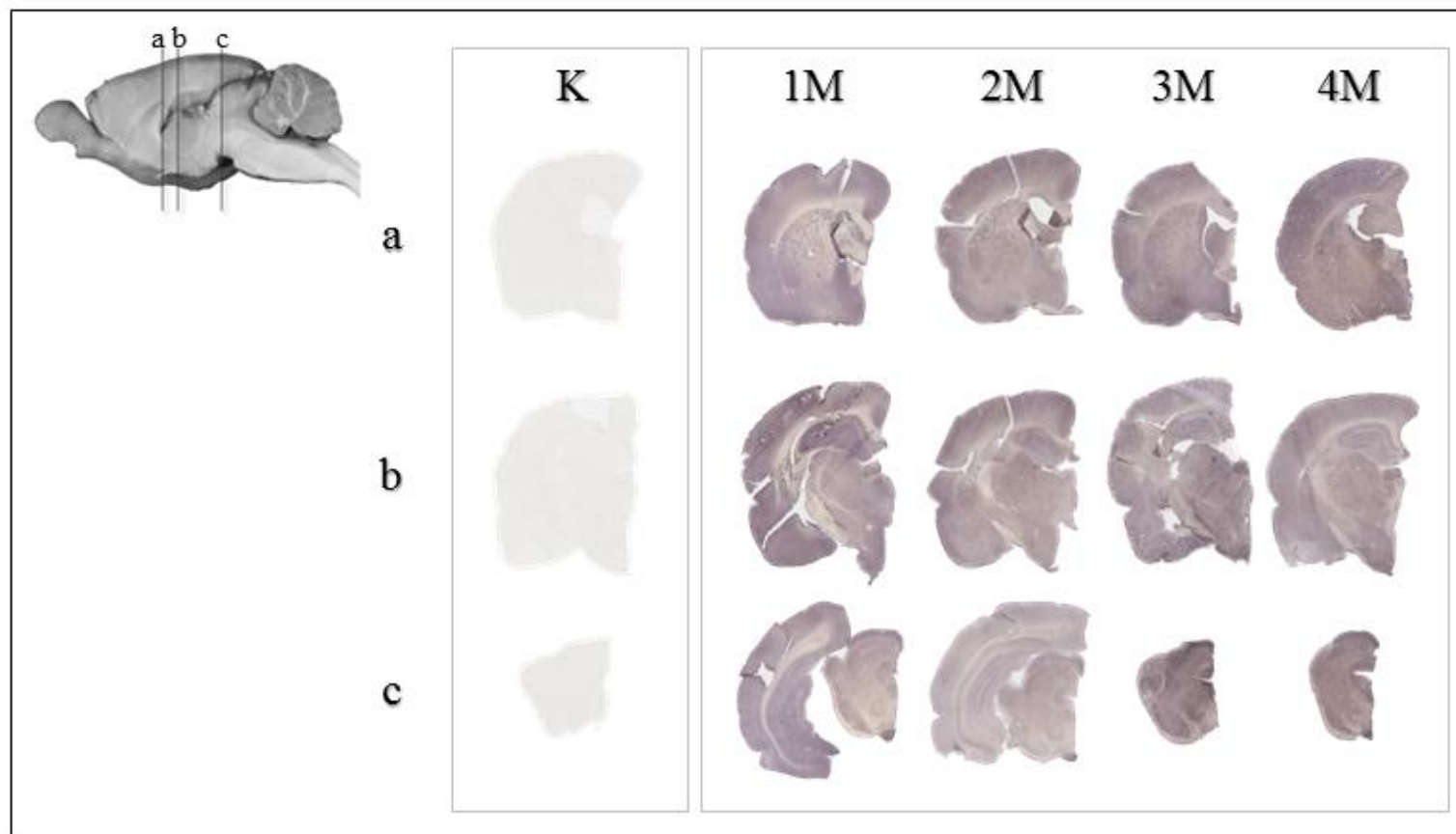
Analiziran je izražaj tri receptora uključena u nadzor hranjenja i energetske stanje organizma: ObR, IR- $\alpha$  i IGF-1R $\beta$ . Rezultati su prikazani za svaki receptor posebno. Najprije su opisani rezultati za mužjake, a zatim za ženke.

##### **4.1.1. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA ObR U MOZGU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH SD ILI HFHSD PREHRANI S ILI BEZ TRETMANA METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM**

Prvo je analiziran izražaj receptora ObR zato što se pomoću njega nadzire stanje energetske rezerve u organizmu, a upravo se ona povećava zahvaljujući HFHSD prehrani. Premda je ključno mjesto nadzora hranjenja, hipotalamus, ujedno i mjesto dobro opisanog izražaja ovog receptora ObR je analiziran i u svim drugim regijama mozga koje su zadužene za hranjenje, sudjeluju u obradi podražaja koji stiže putem okusa, određuje razinu zadovoljstva ili su bitne za navigaciju i pamćenje podražaja.

##### **4.1.1.1 Analiza izražaja receptora ObR u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom**

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je ObR u mozgovima svih analiziranih skupina mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni, što pokazuje da nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj ObR nije bio u svim skupinama mužjaka jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.1).



Slika 4.1. Imunohistokemijsko obojenje mozga mužjaka na Obr. a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR – piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** K - kontrola, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Na slici 4.2. prikazane su apsolutne vrijednosti izražaja ObR receptora u mozgu mužjaka dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

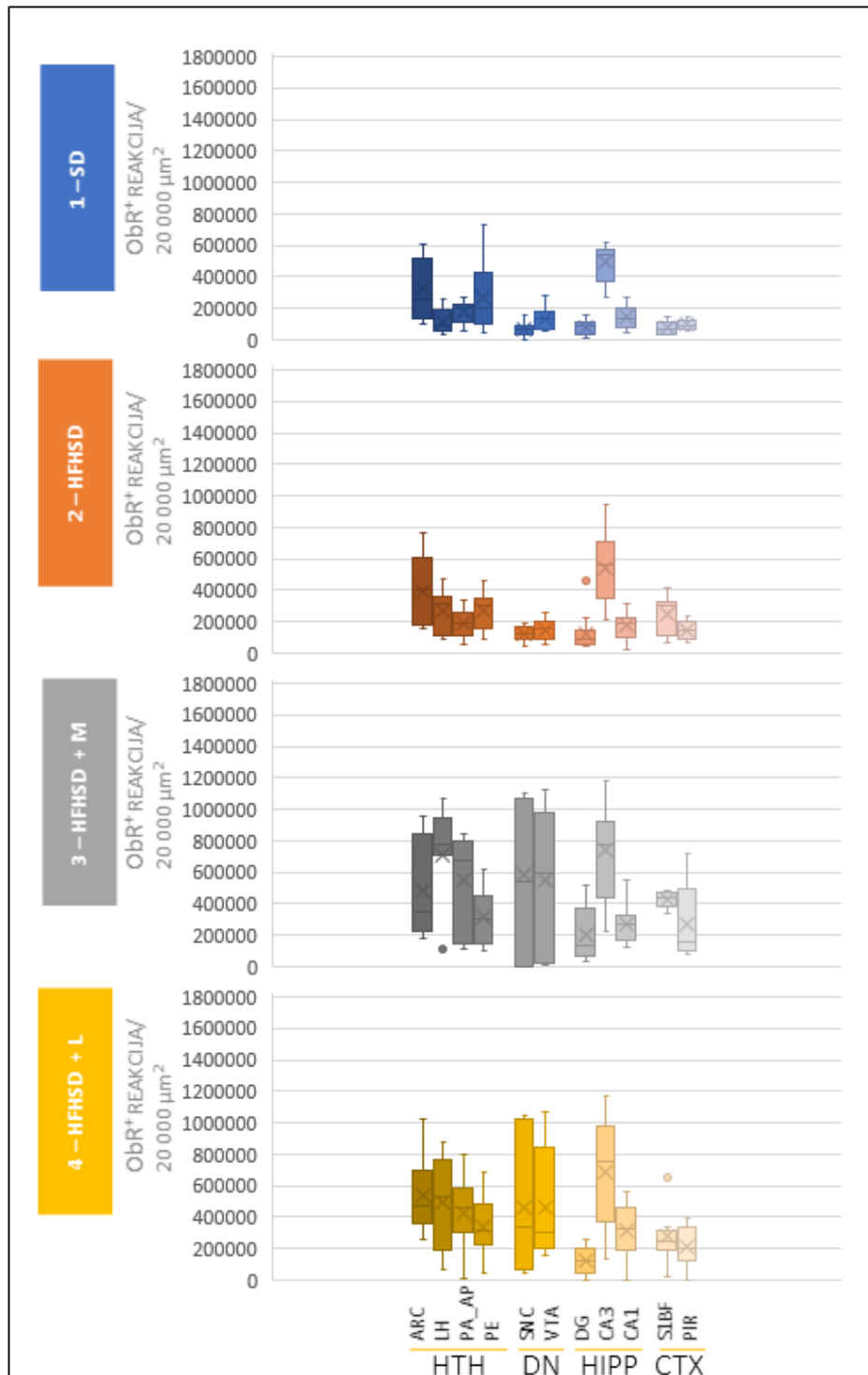
U skupini 1M je najveći apsolutni izražaj ObR imalo CA3 područje hipokampusa, a zatim jezgra ARC hipotalamusa. Najmanju vrijednost izražaja ObR je imalo dopaminergičko SNC područje. Sve ostale vrijednosti izražaja ObR u skupini 1M su bile između navedenih vrijednosti. Najveća varijabilnost u izražaju ObR u skupini 1M zabilježena je u PE području hipotalamusa. Ako promatramo cijelu strukturu hipokampusa tada se tri promatrana dijela (DG, CA1 i CA3) jako razlikuju u izražaju ObR pa je on najviši za CA3, a najmanji u DG području.

Najveća apsolutna vrijednost izražaja ObR u skupini 2M je bila kao i u skupini 1M, u CA3 području hipokampusa, a zatim ARC hipotalamusa. Najmanja vrijednost je zabilježena u DG području hipokampusa. Najveći izražaj ObR u CA3 i najmanji u DG, trend koji je već uočen u hipokampusu skupine 1M, ponavlja se i u skupini 2M. U hipotalamusu 2M skupine je primijećeno da je distribucija izražaja ObR u LH i PA područjima obrnuta. Dok je u 1M skupini izražaj ObR u LH bio manji nego u PA, u 2M skupini je izražaj ObR bio veći u LH nego u PA.

Metformin u skupini 3M povećava izražaj ObR u svim analiziranim područjima mozga mužjaka. Ipak, i u ovoj skupini najveća je vrijednost izražaja ObR i dalje u CA3, a zatim slijedi LH. Najmanji izražaj ObR u skupini 3M je bio u DG. Istovremena najveća vrijednost izražaja u CA3 i najmanja u DG je distribucija ObR u 3M skupini koja je već uočena u 1M i 2M skupinama. U dopaminergičkim područjima zaduženima za ugodu je uočeno veliko povećanje izražaja ObR koje je bilo i najvarijabilnije od svih analiziranih područja mozga 3M skupine. U hipotalamusu 3M skupine ARC područje nije imalo najveći izražaj ObR, nego LH.

U svim analiziranim područjima mozga mužjaka skupine 4M je liraglutid također povećao izražaj ObR receptora. Najveći izražaj ObR je bio u CA3, a najmanji u DG, što je identično s obrascem opisanim u svim ostalim skupinama do sada. Kao i u slučaju tretmana metforminom, u dopaminergičkim područjima je uočeno veliko povećanje izražaja ObR nakon primjene liraglutida. SNC područje je pokazalo najveću varijabilnost. Također, kao i kod tretmana metforminom, u hipotalamusu 4M skupine je zapažen nešto veći izražaj ObR u LH nego u ostalim područjima.

Možemo zaključiti kako se u mozgu mužjaka općenito najveći izražaj ObR nalazi u CA3 području hipokampusa, dok CA1 ima manji, a DG najmanji izražaj ObR, neovisno o dijeli i tretmanu lijekovima. Također, ARC ima najviše vrijednosti ObR od svih hipotalamičkih jezgara kako u SD tako i u HFHSD hranjenih životinja. Jedino u slučaju tretmana s metforminom ili liraglutidom LH ima veći izražaj.



Slika 4.2. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora ObR u analiziranim područjima mozga mužjaka dobivene računanim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.1.1.1. Izražaj ObR u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma

Izražaj ObR u područjima hipotalamusa mužjaka zaduženih za nadzor hranjenja i energetskog stanja organizma je analiziran te su rezultati posebno prikazani za svako područje. ObR nije bio jednako izražen u hipotalamusu svih skupina mužjaka. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.1.

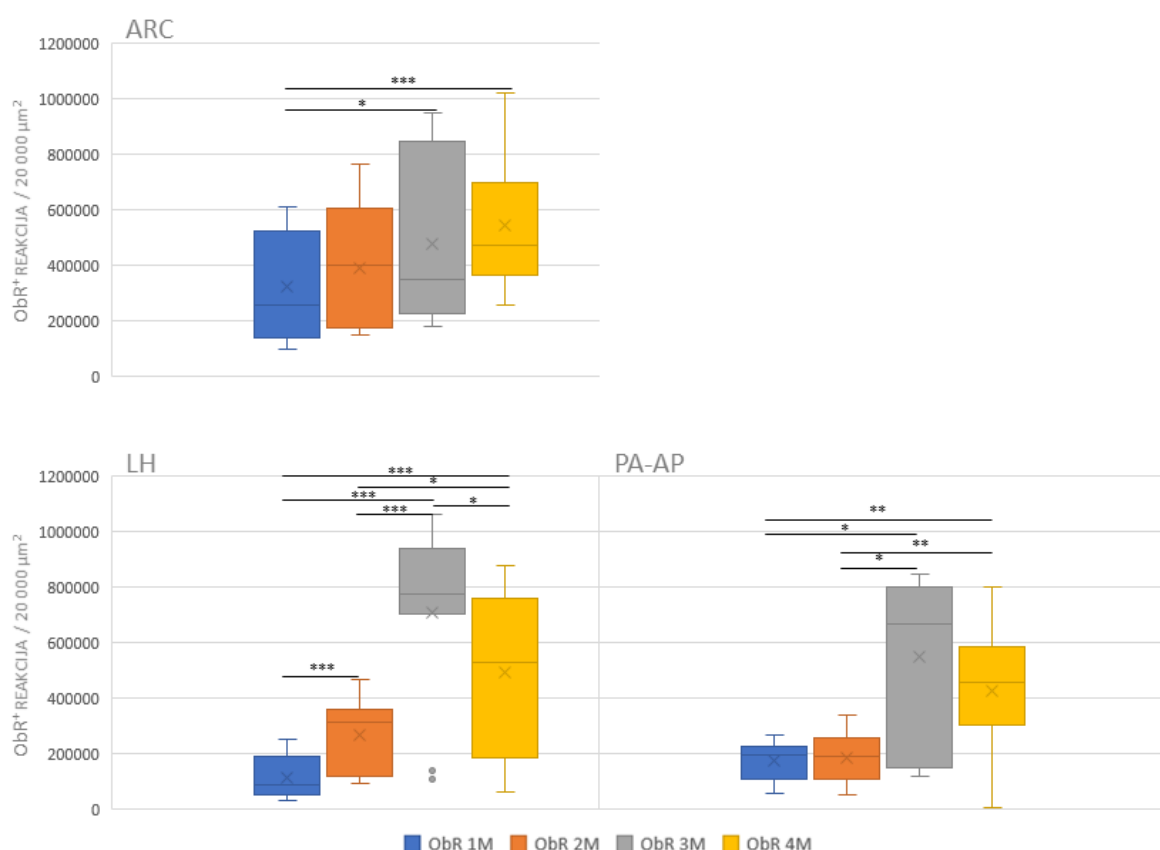
Iako je 2M skupina imala veći izražaj ObR u ARC od skupine 1M, povećanje nije bilo statistički značajno. Davanje metformina i liraglutida mužjacima je povećalo varijabilnost unutar skupine, pa su neke životinje imale izrazito visoke vrijednosti ObR u jezgri ARC. Upravo zato su 3M i osobito 4M imale statistički značajno veći izražaj ObR u ARC od skupine 1M ( $U_{1/3}^4 = 35$ ,  $N_1 = 7$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,039$ ;  $U_{1/4} = 21$ ,  $N_1 = 7$ ,  $N_4 = 12$ ,  $p = 0,001$ ).

HFHSD u odnosu na SD dovodi do statistički značajnog povećanja izražaja ObR u LH svih skupina životinja koje su jele masnu hranu bogatu ugljikohidratima ( $U_{1/2} = 18$ ,  $N_1 = 9$ ,  $N_2 = 15$ ,  $p < 0,001$ ;  $U_{1/3} = 9$ ,  $N_1 = 9$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p < 0,001$ ;  $U_{1/4} = 23$ ,  $N_1 = 9$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p < 0,001$ ). Također, oba tretmana, a osobito metformin, u odnosu na HFHSD kontrolnu skupinu (2M) dovode do još većeg povećanja izražaja ObR u LH ( $U_{2/3} = 35$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,001$ ;  $U_{2/4} = 68$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,016$ ). I konačno, porast izražaja ObR je statistički značajno veći u 3M nego u 4M skupini ( $U_{3/4} = 76$ ,  $N_3 = 15$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,034$ ).

Sama HFHSD u odnosu na SD ne mijenja izražaj ObR u PA području hipotalamusa, ali zato metformin i liraglutid značajno povećavaju izražaj ObR i u odnosu na SD hranjenu 1M skupinu ( $U_{1/3} = 53$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,048$ ;  $U_{1/4} = 90$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,003$ ) kao i u odnosu na HFHSD hranjenu 2M skupinu ( $U_{2/3} = 24$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,036$ ;  $U_{2/4} = 40$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,004$ ). 4M skupina je imala manji izražaj ObR u PA od 3M skupine (Slika 4.3).

Možemo zaključiti kako sama HFHSD ne djeluje niti na ARC niti na PA-AP, već samo na LH. Naprotiv, oba tretmana – metformin i liraglutid, dovode do povećanja izražaja ObR u svim hipotalamičkim jezgrama, a osobito u LH kod mužjaka.

<sup>4</sup>  $U_{1/3}$  – U vrijednost usporedbe skupina 1 i 3. U vrijednost je kritična vrijednost pomoću koje Mann-Whitney-U test odbacuje nultu hipotezu ( $H_0$ : „skupine se ne razlikuju“). Što je U vrijednost manja to je veća vjerojatnost da se skupine razlikuju, a u slučaju  $U=0$  skupine se razlikuju u potpunosti.



Slika 4.3. Usporedba izražaja receptora ObR u područjima hipotalamusa mozga mužjaka.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, M - mužjaci, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.1. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u hipotalamusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,039	0,001	> 0,05
HTH-LH	< 0,001	0,001	0,016	< 0,001	< 0,001	0,034
HTH-PA-AP	> 0,05	0,036	0,004	0,048	0,003	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HTH-ARC	$N_1 = 7$	$N_2 = 9$	$N_3 = 9$	$N_4 = 12$		
HTH-LH	$N_1 = 9$	$N_2 = 15$	$N_3 = 15$	$N_4 = 18$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 12$	$N_2 = 12$	$N_3 = 9$	$N_4 = 18$		

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .



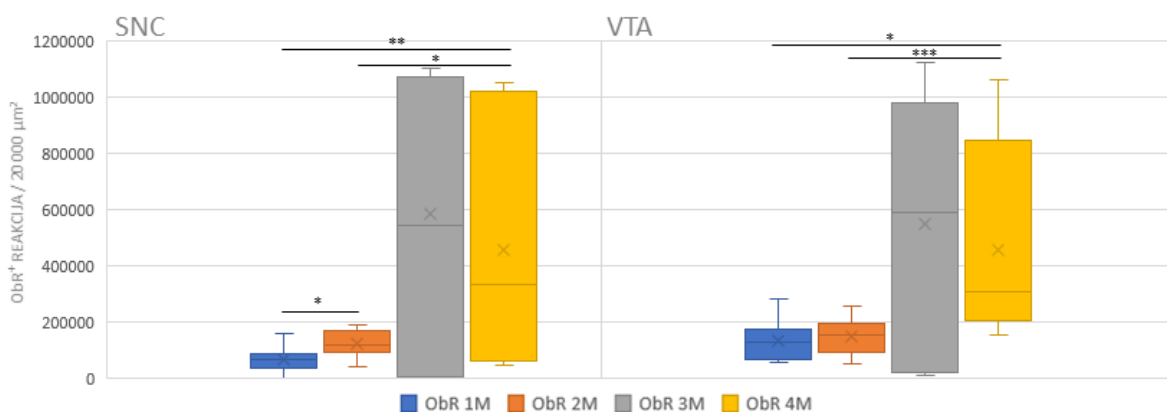
#### 4.1.1.1.2. Izražaj ObR u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

Imunohistokemijski su analizirana dopaminergička područja mozga mužjaka te su rezultati posebno prikazani za svako područje. U dopaminergičkim područjima svih skupina mužjaka receptor ObR nije bio jednako izražen (Slika 4.4). Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.2.

U području SNC je HFHSD prehrana statistički značajno povećala izražaj ObR ( $U_{1/2} = 96$ ,  $N_1 = 28$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 0,034$ ). Tretmani metforminom i liraglutidom su dodatno povećali varijabilnost izražaja ObR. I dok se izražaj ObR u SNC mužjaka na HFHSD nije statistički značajno razlikovao od kontrolnih skupina (1M i 2M) nakon tretmana metforminom, izražaj ObR u SNC mužjaka na HFHSD je nakon tretmana liraglutidom bio statistički značajno veći ( $U_{1/4} = 58$ ,  $N_1 = 28$ ,  $N_4 = 11$ ,  $p = 0,003$ ;  $U_{2/4} = 31$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_4 = 11$ ,  $p = 0,034$ ).

U VTA području mužjaka nije bilo značajnih promjena u izražaju ObR uslijed HFHSD prehrane. Ali je, kao i u SNC, uočeno povećanje varijabilnosti izražaja ObR nakon primjene lijekova. Porast izražaja ObR u VTA mužjaka na HFHSD je bio statistički značajan nakon tretmana liraglutidom u odnosu na obje kontrolne skupine (1M i 2M) ( $U_{1/4} = 70$ ,  $N_1 = 24$ ,  $N_4 = 12$ ,  $p = 0,014$ ;  $U_{2/4} = 18$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 12$ ,  $p < 0,001$ ).

Zaključno, kombinacija HFHSD prehrane i lijekova povećavaju izražaj ObR u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka, osobito kombinacija HFHSD i liraglutida.



Slika 4.4. Usporedba izražaja receptora ObR u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, ObR - leptinski receptor, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.2. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	0,034	> 0,05	0,034	> 0,05	0,003	> 0,05
DN-VTA	> 0,05	> 0,05	< 0,001	> 0,05	0,014	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
DN-SNC	N <sub>1</sub> = 19	N <sub>2</sub> = 12	N <sub>3</sub> = 10	N <sub>4</sub> = 11		
DN-VTA	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 12		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

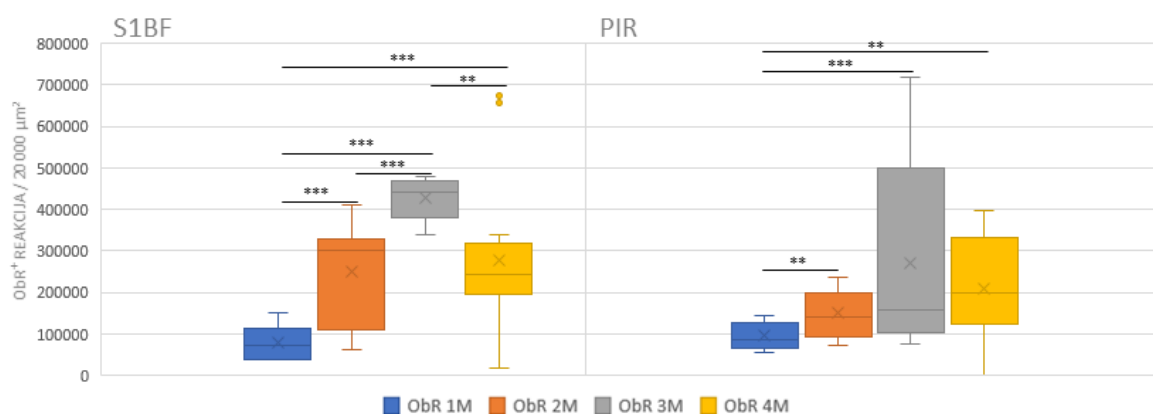
#### 4.1.1.1.3. Izražaj ObR u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane. ObR nije bio jednako izražen u kori mozga svih skupina mužjaka, što je za svako posebno područje prikazano slikom 4.5. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.3.

U osjetnom području S1BF je masna prehrana bogata ugljikohidratima statistički značajno povećala izražaj ObR ( $U_{1/2} = 21$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 0,001$ ). Primijenjeni lijekovi su različito djelovali na spomenuto povećanje izražaja ObR u S1BF mužjaka – metformin ga je dodatno povećao, pri čemu je povećanje statistički značajno ( $U_{2/3} = 4$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ), a liraglutid mu je smanjio varijabilnost. Iako je uslijed tretmana liraglutidom izražaj ObR u mužjaka na HFHSD bio manji, razlika nije bila statistički značajna. Prema statistički značajno većem izražaju ObR u 3M i 4M skupinama od skupine 1M, koja je bila na SD prehrani ( $U_{1/3} = 0$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ,  $U_{1/4} = 40$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_4 = 21$ ,  $p < 0,001$ ), možemo reći da lijekovi nisu uspjeli vratiti izražaj ObR na kontrolnu razinu. Mužjaci na HFHSD tretirani liraglutidom su imali statistički značajno manji izražaj ObR u S1BF području kore mozga ( $U_{3/4} = 28$ ,  $N_3 = 9$ ,  $N_4 = 21$ ,  $p = 0,003$ ).

HFHSD prehrana je statistički značajno povećala izražaj ObR u PIR mužjaka ( $U_{1/2} = 33$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 0,001$ ) te su lijekovi doprinijeli ovom učinku. Kao i u slučaju S1BF područja, lijekovi nisu uspjeli vratiti izražaj ObR na razinu promatranu u skupini 1M te je veći izražaj ObR u PIR lijekovima tretiranih skupina statistički značajan ( $U_{1/3} = 59$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,001$ ;  $U_{1/4} = 80$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,002$ ).

Zaključno, masna prehrana bogata ugljikohidratima povećava izražaj ObR u kori mozga mužjaka te je taj učinak dodatno pojačan primjenom lijekova.



Slika 4.5. Usporedba izražaja receptora ObR u kori mozga mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, ObR - leptinski receptor, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.3. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u kori mozga mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
CTX-S1BF	0,001	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,001	0,003
CTX-PIR	0,001	> 0,05	> 0,05	0,001	0,002	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
CTX-S1BF	$N_1 = 6$	$N_2 = 12$	$N_3 = 9$	$N_4 = 21$		
CTX-PIR	$N_1 = 12$	$N_2 = 21$	$N_3 = 15$	$N_4 = 18$		

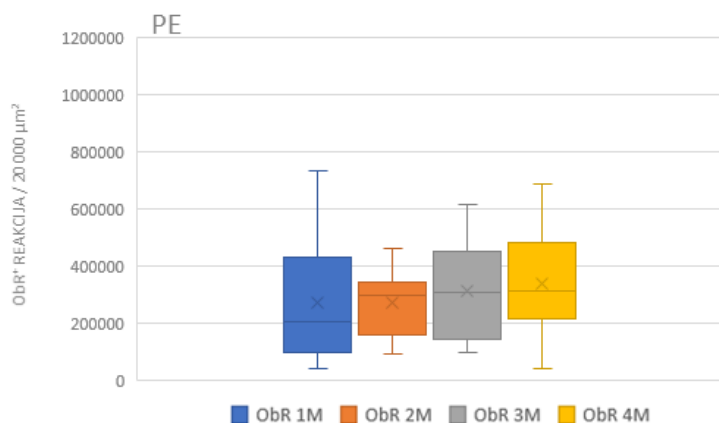
**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.1.4. Izražaj ObR u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetskeg stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa koja osim što je uključena u nadzor energetskeg stanja organizma ima i određenu ulogu u reprodukciji. Slika 4.6. prikazuje vrijednosti izražaja ObR u PE svih skupina mužjaka. Tablicom 4.4 su prikazane razine značajnosti u razlikama izražaja ObR između skupina mužjaka.

HFHSD je smanjila varijabilnost izražaja ObR u PE jezgri hipotalamusa mužjaka. Promatrana povećanja izražaja ObR u PE svih mužjaka na HFHSD (skupine 2M, 3M i 4M) u odnosu na PE mužjaka na SD (skupina 1M) nisu bila značajna.

Dakle, sama HFHSD ili kombinacija HFHSD s lijekovima nije utjecala na izražaj ObR u PE jezgri hipotalamusa mužjaka.



Slika 4.6. Usporedba izražaja receptora ObR u PE području hipotalamusa mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, ObR - leptinski receptor, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.4. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u PE području hipotalamusa mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HTH-PE	$N_1 = 12$	$N_2 = 18$	$N_3 = 16$	$N_4 = 17$		

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.1.5. Izražaj ObR u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

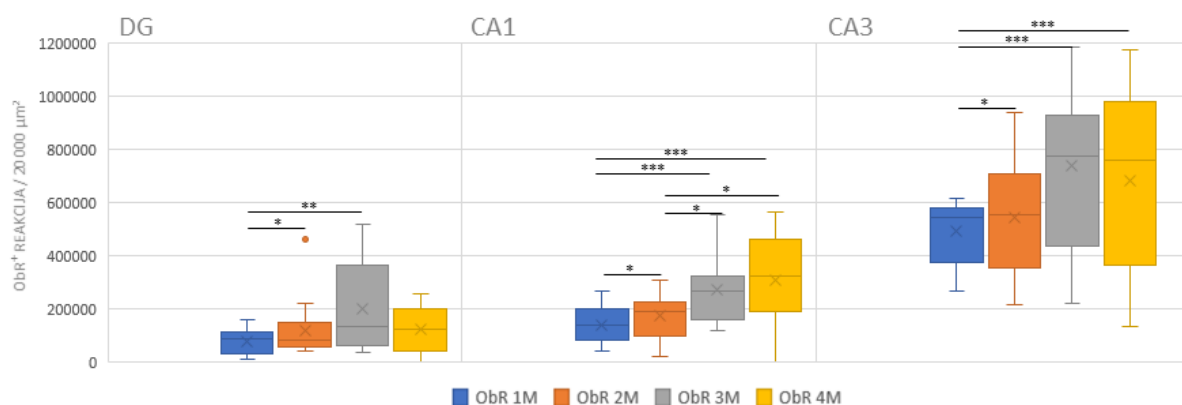
Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. ObR nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina mužjaka, što je za svako posebno analizirano područje hipokampusa prikazano slikom 4.7. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.5.

HFHSD prehrana je statistički značajno povećala izražaj ObR u DG području hipotalamusa mužjaka ( $U_{1/2} = 124$ ,  $N_1 = 27$ ,  $N_2 = 15$ ,  $p = 0,039$ ). Učinak povećanja izražaja ObR HFHSD prehranom je pojačan primjenom lijekova, no sveukupno povećanje nije bilo statistički značajno. Metformin i liraglutid su povećali varijabilnost izražaja ObR u DG ženki na HFHSD. U odnosu na kontrolnu skupinu 1M, skupine mužjaka 3M i 4M su imale veći izražaj ObR u DG, pri čemu je povećanje uslijed kombinacije HFHSD i metformina statistički značajno ( $U_{1/3} = 84$ ,  $N_1 = 27$ ,  $N_3 = 14$ ,  $p = 0,004$ ).

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je i u CA1 mužjaka statistički značajno povećala izražaj ObR ( $U_{1/2} = 121$ ,  $N_1 = 28$ ,  $N_2 = 15$ ,  $p = 0,023$ ). Ovaj učinak je bio dodatno pojačan primjenom lijekova - metformin i liraglutid su još dodatno povećali izražaj ObR u CA1 mužjaka na HFHSD. Spomenuto povećanje izražaja ObR u CA1 mužjaka skupine 3M i 4M u odnosu na skupinu 2M je statistički značajno ( $U_{2/3} = 39$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p = 0,014$ ;  $U_{2/4} = 78$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,041$ ). Promatran veći izražaj ObR uslijed kombinacije HFHSD i lijekova je statistički značajan u odnosu na kontrolnu skupinu 1M ( $U_{1/3} = 45$ ,  $N_1 = 28$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p < 0,001$ ;  $U_{1/4} = 84$ ,  $N_1 = 28$ ,  $N_4 = 15$ ,  $p = 0,001$ ).

Kao i u analizama izražaja ObR u prethodna dva područja hipokampusa, analiza izražaja ObR u CA3 mužjaka je pokazala da je HFHSD prehrana dovela do statistički značajnog povećanja ( $U_{1/2} = 91$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_2 = 15$ ,  $p = 0,033$ ). Učinak povećanja izražaja ObR u CA3 mužjaka uslijed HFHSD su dodatno pojačali lijekovi metformin i liraglutid. Iako, povećanje uslijed kombinacije HFHSD i lijeka u odnosu na povećanje uslijed HFHSD nije statistički značajno. Lijekovi nisu uspjeli vratiti izražaj ObR u CA3 mužjaka na kontrolnu razinu - kontrolna skupina 1M je imala statistički značajno manji izražaj ObR u CA3 u odnosu na lijekovima tretirane skupine mužjaka na HFHSD (3M i 4M) ( $U_{1/3} = 58$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p < 0,001$ ;  $U_{1/4} = 97$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_4 = 22$ ,  $p = 0,001$ ).

Zaključno, masna prehrana bogata ugljikohidratima povećava izražaj ObR u hipokampusu mužjaka. Izražaj ObR se još dodatno povećao uslijed tretmana antidijabetičkim lijekovima.



Slika 4.7. Usporedba izražaja receptora ObR u hipokampusu mužjaka.

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), M - mužjaci, ObR - leptinski receptor, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.5. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u hipokampusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	0,039	> 0,05	> 0,05	0,004	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA3	0,033	> 0,05	> 0,05	0,001	0,001	> 0,05
HIPP-CA1	0,023	0,014	0,041	< 0,001	0,001	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HIPP-DG	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 14	N <sub>4</sub> = 21		
HIPP-CA3	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 22		
HIPP-CA1	N <sub>1</sub> = 19	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 12	N <sub>4</sub> = 18		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.2. Analiza izražaja receptora ObR u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je ObR u mozgovima svih analiziranih skupina ženki izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni, dakle nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj ObR nije bio u svim skupinama ženki jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.8).

Na slici 4.9. prikazane su apsolutne vrijednosti izražaja ObR receptora u mozgu ženki dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

Najveći izražaj receptora ObR u skupini 1F je bio u dopaminergičkom VTA području, a zatim u CA3 području hipokampusa. Najmanji izražaj ObR je bio u LH području hipotalamusa. U hipotalamusu je najveću vrijednost izražaja ObR imalo ARC područje. U hipokampusu je ObR bio podjednako izražen u DG i CA1.

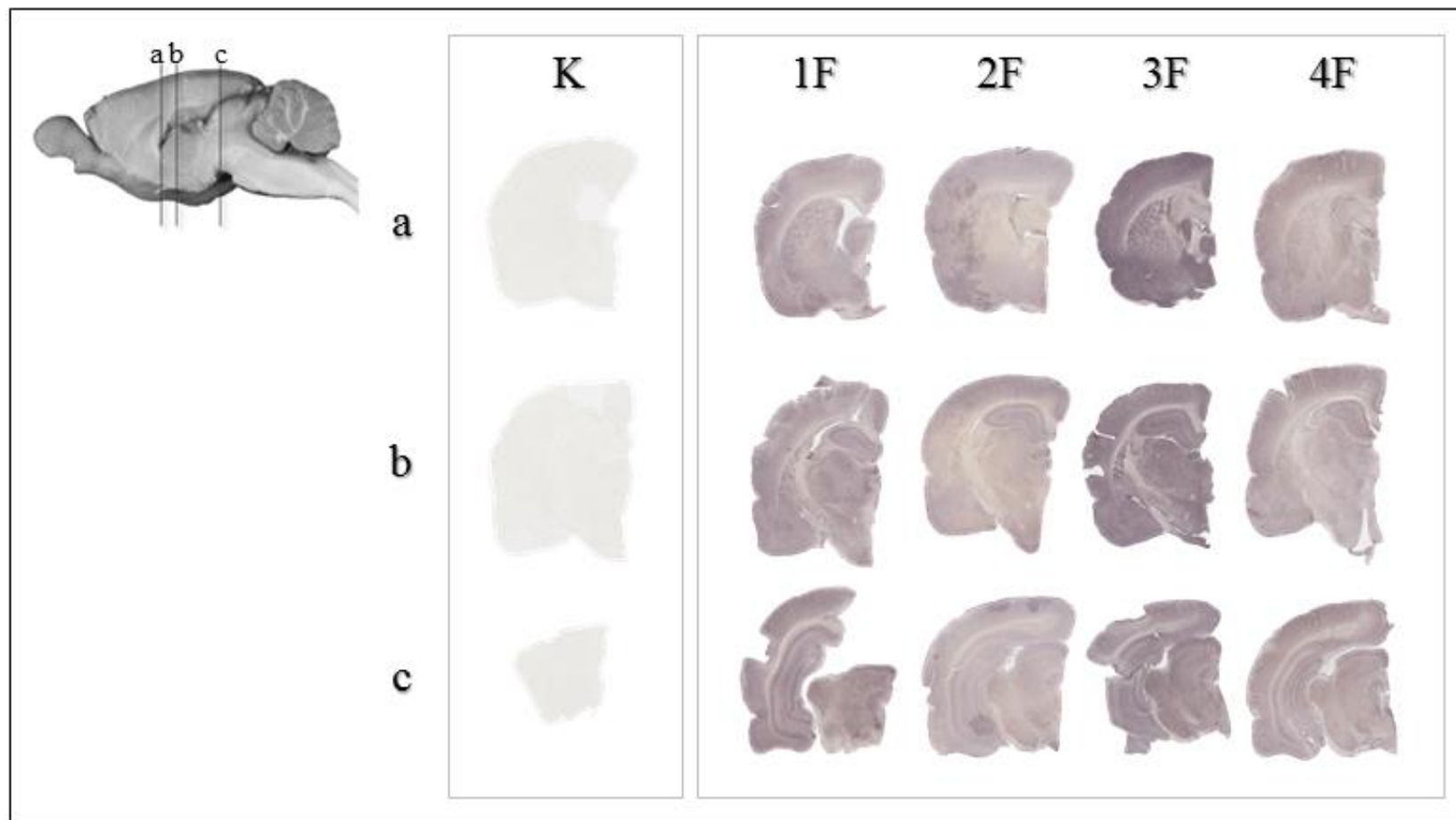
U skupini 2F je ObR bio najviše izražen u VTA te u PE području hipotalamusa. Najmanju vrijednost izražaja ObR u 2F ženki je primijećen u LH te samo u jednom slučaju u CA3. Sve ostale vrijednosti izražaja ObR su bile između navedenih vrijednosti. U hipokampusu je distribucija ObR bila kao i u hipokampusu 1F skupine, tj. u CA3 je bio najviše izražen te podjednako u DG i CA1 područjima. Najveća varijabilnost izražaja ObR je uočena u PE. U hipotalamusu su područja PE i PA imala više izraženog ObR od ARC.

Metformin je u svim analiziranim područjima mozga ženki na HFHSD prehrani (skupina 3F) povećao izražaj ObR. Najveća vrijednost izražaja ObR je zabilježena u DG području hipokampusa, a zatim u PE području hipotalamusa i S1BF području kore mozga koja je pokazala najveću varijabilnost.

Najmanji izražaj ObR je zapažen u LH. ARC je u hipotalamusu imao više izraženog ObR od PA područja.

Liraglutid je također povećao izražaj ObR receptora u mozgu ženki na HFHSD prehrani (skupina 4F), ali ne u tolikoj mjeri kao metformin. Najveću vrijednost izraženog ObR je imalo VTA područje. Najmanje vrijednosti izraženog ObR su uočene u područjima LH i PE u hipotalamusu i PIR u kori mozga.

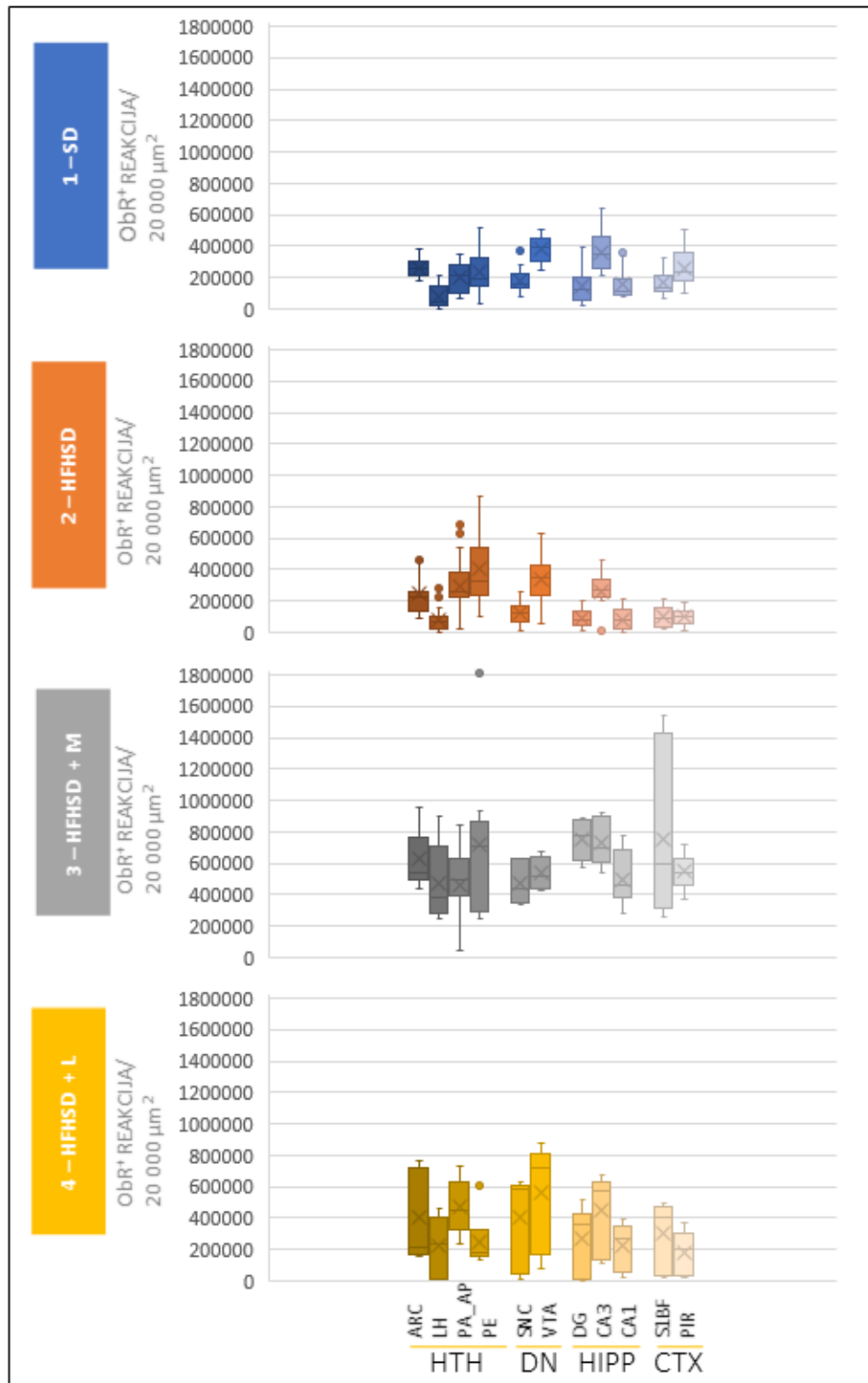
Zaključno, ženke neovisno o prehrani i tretmanu imaju visoke vrijednosti ObR u područjima koje hranjenje interpretiraju kao nagradu tj. dopaminergičkom VTA. Ženke, baš kao i mužjaci imaju najviše vrijednosti ObR u CA3 području hipokampusa. Prehrana bogata mastima i šećerima najviše utječe na PE jezgru koja je u vezi s reprodukcijom. Oba tretmana, a osobito metformin, dovode do povećanja ekspresije ObR u svim regijama mozga.



Slika 4.8. Imunohistokemijsko obojenje mozga ženki na Obr. a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** F - ženke, K - kontrola, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom





Slika 4.9. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora ObR u analiziranim područjima mozga ženki dobivene računalnim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

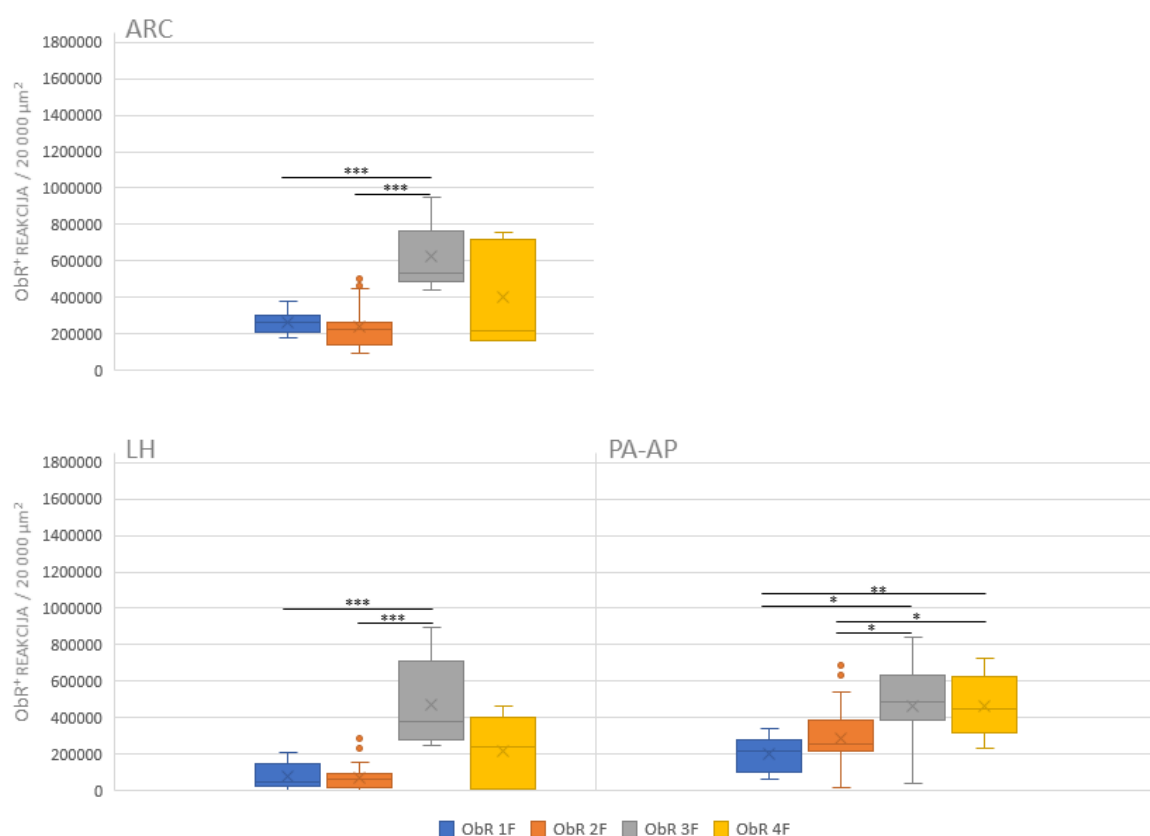
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.1.2.1. Izražaj ObR u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u područjima hipotalamusa zaduženih za nadzor hranjenja i energetske stanja organizma. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. ObR nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina ženki, što je prikazano slikom 4.10. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.6.

U ARC ženki na HFHSD je uočen manji izražaj ObR, iako smanjenje nije bilo statistički značajno. Uz HFHSD prehranu, metformin je statistički značajno povećao izražaj ObR u ARC ženki ( $U_{2/3} = 5$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ), dok je liraglutid izražaju ObR povećao varijabilnost. U odnosu na kontrolnu skupinu ženki 1F, skupina 3F je imala statistički značajno veći izražaj ObR u ARC ( $U_{1/3} = 0$ ,  $N_1 = N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Skupina 3F je imala veći izražaj ObR od skupine 4F.

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je u ženki na HFHSD smanjila varijabilnost izražaja ObR u LH u odnosu na promatranu u skupini 1F. Lijekovi ženka na HFHSD povećavaju izražaj ObR u LH, i to metformin statistički značajno ( $U_{2/3} = 3$ ,  $N_2 = 24$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p < 0,001$ ). U odnosu na kontrolnu skupinu 1F, skupine 3F i 4F su imale veći izražaj ObR u LH, pri čemu je veći izražaj ObR u 3F skupini statistički značajan ( $U_{1/3} = 0$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p < 0,001$ ).



Slika 4.10. Usporedba izražaja receptora ObR u područjima hipotalamusa mozga ženki.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, F - ženke, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

U PA jezgri hipotalamusa ženki na HFHSD se uočilo povećanje izražaja ObR uslijed HFHSD, no nije bilo statistički značajno. Primjena oba lijeka na ženke na HFHSD prehrani je statistički značajno povećala izražaj ObR u PA ( $U_{2/3} = 88$ ,  $N_2 = 23$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,012$ ;  $U_{2/4} = 44$ ,  $N_2 = 23$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,013$ ). U PA skupina 3F i 4F lijekovi nisu uspjeli vratiti vrijednosti izražaja ObR na kontrolnu vrijednost promatranu u skupini 1F, nego su 3F i 4F imale statistički značajno veći izražaj ObR ( $U_{1/3} = 26$ ,  $N_1 = 9$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,014$ ;  $U_{1/4} = 6$ ,  $N_1 = N_4 = 9$ ,  $p = 0,003$ ).

Ukratko, masna prehrana bogata ugljikohidratima nije utjecala značajno na izražaj ObR u jezgrama hipotalamusa zaduženima za nadzor energetskog stanja organizma. Metformin i liraglutid su povećali izražaj ObR u hipotalamusu iznad vrijednosti iz SD i HFHSD kontrolnih skupina, pri čemu je metformin utjecao na izražaj ObR u sve tri analizirane jezgre hipotalamusa.

Tablica 4.6. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u hipotalamusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	0,000	> 0,05	0,000	> 0,05	> 0,05
HTH-LH	> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05
HTH-PA-AP	> 0,05	0,012	0,013	0,014	0,003	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HTH-ARC	$N_1 = 9$	$N_2 = 15$	$N_3 = 9$	$N_4 = 7$		
HTH-LH	$N_1 = 18$	$N_2 = 24$	$N_3 = 12$	$N_4 = 9$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 9$	$N_2 = 23$	$N_3 = 15$	$N_4 = 9$		

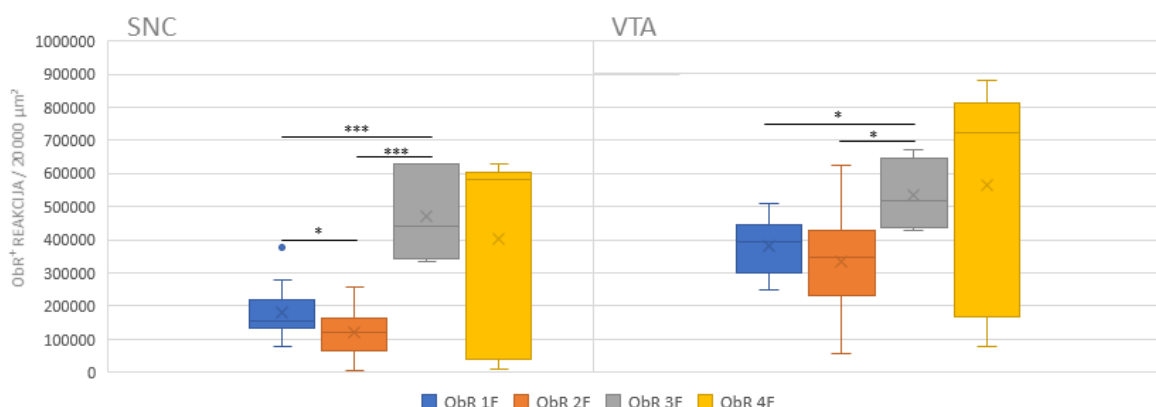
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriori dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.2.2. Izražaj ObR u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u dopaminergičkim područjima mozga ženki. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. ObR nije bio jednako izražen u analiziranim područjima svih skupina ženki, što je prikazano slikom 4.11. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.7.

U ženki na HFHSD prehrani je izražaj ObR u SNC bio statistički značajno manji od izražaja ObR u SNC ženki na SD prehrani ( $U_{1/2} = 87$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_2 = 17$ ,  $p = 0,043$ ). Metformin je u ženki na HFHSD statistički značajno povećao izražaj ObR u SNC ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 17$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p < 0,001$ ). Liraglutid je povećao izražaj ObR u SNC ženki na HFHSD, ali je povećana i varijabilnost pa uočena promjena nije statistički značajna. U odnosu na kontrolnu skupinu 1F, skupine 3F i 4F su imale više izražen ObR, pri

čemu je povećanje u 3F uslijed kombinacije HFHSD i metformina statistički značajno ( $U_{1/3} = 2$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p = 0,001$ ).



Slika 4.11. Usporedba izražaja receptora ObR u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, ObR - leptinski receptor, SNC - kompakti dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je smanjila izražaj ObR u VTA, ali i povećala varijabilnost pa razlika između 1F i 2F skupine nije statistički značajna. Kada su se ženke na HFHSD tretirale metforminom, izražaj ObR u VTA je bio statistički značajno veći ( $U_{2/3} = 10$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 5$ ,  $p = 0,018$ ).

Tablica 4.7. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	0,043	< 0,001	> 0,05	0,001	> 0,05	> 0,05
DN-VTA	> 0,05	0,018	> 0,05	0,011	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
DN-SNC	$N_1 = 18$	$N_2 = 17$	$N_3 = 6$	$N_4 = 9$		
DN-VTA	$N_1 = 15$	$N_2 = 15$	$N_3 = 5$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompakti dio crne tvari mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Slično kao u SNC području, liraglutid je u VTA području ženki na HFHSD povećao izražaj ObR, ali i varijabilnost pa uočena promjena nije statistički značajna. U odnosu na kontrolnu skupinu 1F na SD prehrani, ženke iz 3F skupine su imale statistički značajno veći izražaj ObR u VTA ( $U_{1/3} = 8$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_3 = 5$ ,  $p = 0,011$ ). Pri usporedbi s 1F na SD prehrani, ženke na HFHSD prehrani po primjeni liraglutida nisu imale statistički značajnu promjenu u izražaju ObR u VTA, iako se mogao uočiti veći izražaj u potonjima.

Općenito, HFHSD prehrana smanjuje izražaj ObR u dopaminergičkim područjima ženki, ali ga primijenjeni lijekovi povećavaju, osobito metformin.

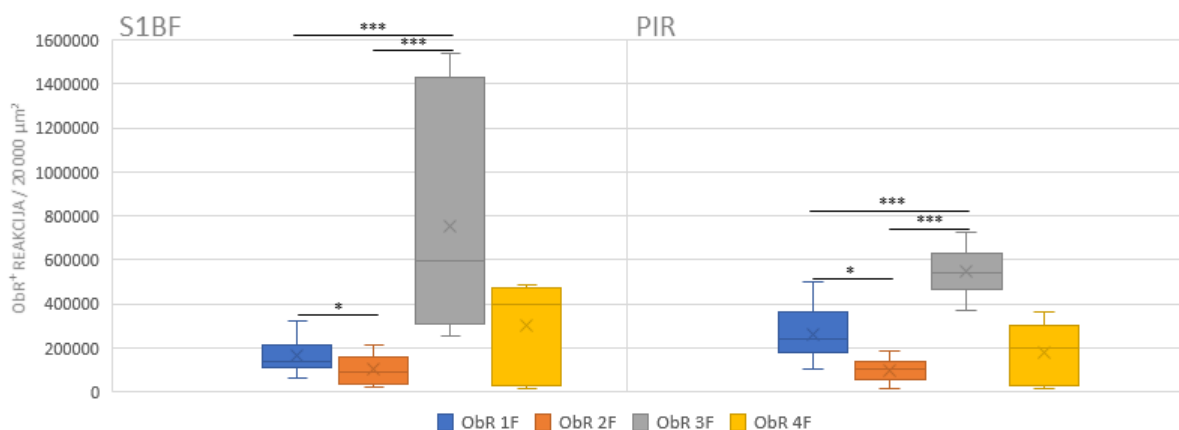
#### 4.1.1.2.3. Izražaj ObR u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga ženki koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane. ObR nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki, što je za svako posebno područje prikazano slikom 4.12. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.8.

HFHSD prehrana je statistički značajno smanjila izražaj ObR u S1BF području kore mozga ženki ( $U_{1/2} = 94$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_2 = 22$ ,  $p = 0,029$ ). Nakon tretmana metforminom izražaj ObR je bio veći u S1BF ženki na HFHSD ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 22$ ,  $N_3 = 11$ ,  $p < 0,001$ ). Dok je nakon tretmana ženki na HFHSD liraglutidom izražaj ObR bio povećan u S1BF, razlika u odnosu na netretirane ženke na HFHSD nije bila statistički značajna. Lijekovi su podigli vrijednosti izražaja ObR u S1BF, osobito metformin čije je povećanje izražaja ObR u S1BF bilo statistički značajno ( $U_{1/3} = 7$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_3 = 11$ ,  $p < 0,001$ ).

U PIR području kore mozga ženki na HFHSD je izražaj ObR bio statistički značajno smanjen u odnosu na ženke na SD prehrani ( $U_{1/2} = 17$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 18$ ,  $p = 0,029$ ). Metformin je u ženki na HFHSD statistički značajno povećao izražaj ObR u PIR ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 18$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). U ženki na HFHSD tretiranih liraglutidom je uočen povećan izražaj ObR u PIR u odnosu na HFHSD kontrolnu skupinu, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Dok su HFHSD i metformin statistički značajno povećali izražaj ObR u S1BF ženki ( $U_{1/3} = 4$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ), HFHSD i liraglutid su smanjili na početnu razinu.

Zaključno, HFHSD prehrana smanjuje izražaj ObR u kori mozga ženki. Kombinacija HFHSD prehrane i tretmana metforminom izrazito povećavaju izražaj ObR u kori mozga ženki, dok ga liraglutid smanjuje na kontrolnu razinu pri SD prehrani.



Slika 4.12. Usporedba izražaja receptora ObR u kori mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, ObR - leptinski receptor, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.8. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u kori mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
CTX-S1BF	0,029	0,000	> 0,05	0,000	> 0,05	> 0,05
CTX-PIR	0,029	0,000	> 0,05	0,000	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
CTX-S1BF	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 22	N <sub>3</sub> = 11	N <sub>4</sub> = 9		
CTX-PIR	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 18	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 9		

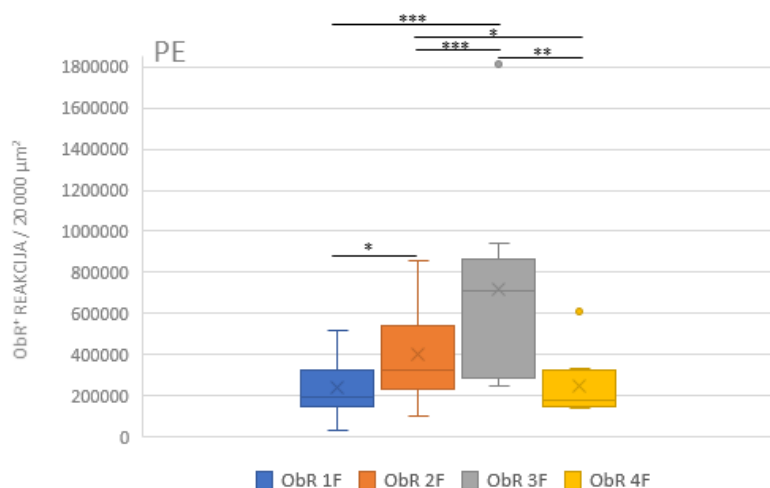
**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.2.4. Izražaj ObR u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa koja osim što je uključena u nadzor energetske stanja organizma ima i određenu ulogu u reprodukciji. Slika 4.13. prikazuje vrijednosti izražaja ObR u PE svih skupina ženki. Tablicom 4.9 su prikazane razine značajnosti u razlikama izražaja ObR između skupina ženki.

Ženke na HFHSD prehrani su imale statistički značajno veći izražaj ObR u PE od ženki na SD prehrani ( $U_{1/2} = 73$ ,  $N_1 = N_2 = 17$ ,  $p = 0,014$ ). Tretman ženki na HFHSD metforminom je statistički značajno povećao izražaj ObR u PE ( $U_{2/3} = 42$ ,  $N_2 = 17$ ,  $N_3 = 10$ ,  $p < 0,001$ ). S druge strane, tretman ženki na HFHSD liraglutidom je statistički značajno smanjio izražaj ObR u PE ( $U_{2/4} = 39$ ,  $N_2 = 17$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,046$ ). Kombinacija HFHSD prehrane i tretman metforminom je statistički značajno povećao izražaj ObR u PE ( $U_{1/3} = 4$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_3 = 8$ ,  $p < 0,001$ ), dok ga je liraglutid vratio na kontrolnu razinu pri SD prehrani. Izražaj ObR u PE ženki skupine 3F je bio statistički značajno veći od izražaja u 4F skupini ( $U_{3/4} = 29$ ,  $N_3 = 19$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,006$ ).

Dakle, masna prehrana bogata ugljikohidratima povećava izražaj ObR u PE i metformin dodatno pojačava taj učinak. No, liraglutid dovodi razinu ObR na kontrolnu pri SD prehrani.



Slika 4.13. Usporedba izražaja receptora ObR u PE području hipotalamusa ženki.

**Legenda:** F - ženke, ObR - leptinski receptor, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.9. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u PE području hipotalamusa ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	0,014	< 0,001	0,046	0,000	> 0,05	0,006
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-PE	$N_1 = 17$	$N_2 = 17$	$N_3 = 10$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.2.5. Izražaj ObR u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

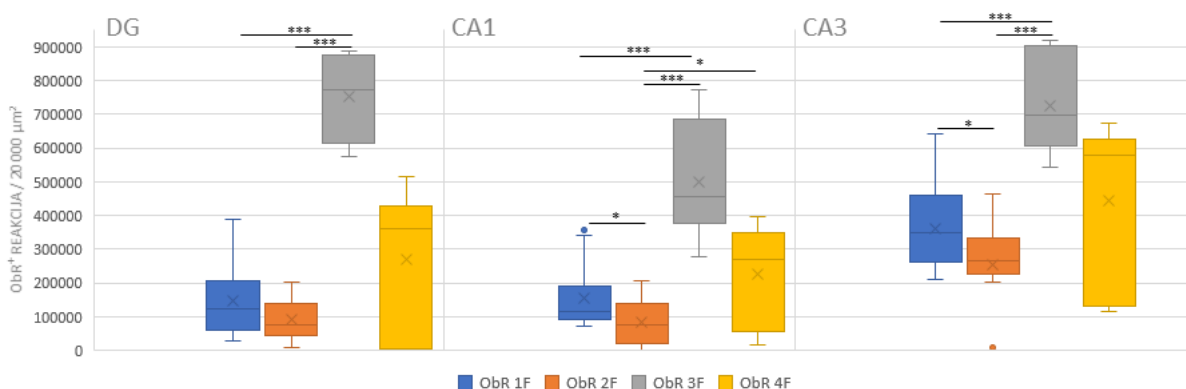
Izražaj ObR je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. ObR nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina ženki, što je za svako posebno analizirano područje hipokampusa prikazano slikom 4.14. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.10.

U ženki na HFHSD je ObR bio manje izražen u DG nego u ženki na SD. Ipak ovo smanjenje izražaja ObR nije bilo statistički značajno. Nakon tretmana ženki na HFHSD prehrani metforminom izražaj ObR se statistički značajno povećao u DG ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 25$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p < 0,001$ ). Liraglutid je u ženki na HFHSD povećao varijabilnost izražaja ObR u DG. Metformin nije utjecao na izražaj ObR u DG ženki tako da ga je spustio na razinu pri SD prehrani, nego ga je, naprotiv, statistički značajno povećao ( $U_{1/3} = 0$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p < 0,001$ ).

U CA1 području hipokampusa ženki je HFHSD prehrana statistički značajno smanjila izražaj ObR ( $U_{1/2} = 105$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p = 0,019$ ). Oba lijeka su u CA1 ženki na HFHSD statistički značajno povećala izražaj ObR ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p < 0,001$ ;  $U_{2/4} = 40$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,015$ ). U CA1 području hipokampusa ženki je kombinacija HFHSD i tretmana metforminom statistički značajno povećala izražaj ObR ( $U_{1/3} = 5$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p < 0,001$ ). Kombinacija HFHSD i liraglutida je u CA1 ženki povećala varijabilnost. Skupina ženki na HFHSD tretirana metforminom je imala statistički značajno veći izražaj ObR u CA1 od skupine ženki na HFHSD tretirane liraglutidom.

I u CA3 području hipokampusa ženki je izražaj ObR bio statistički značajno manji zbog HFHSD prehrane ( $U_{1/2} = 109$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p = 0,043$ ). Primjena metformina je u ženka na HFHSD statistički značajno povećala izražaj ObR u CA3 ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Liraglutid je ženka na HFHSD povećao izražaj ObR u CA3, ali je i varijabilnost izražaja bila veća pa promjena nije bila statistički značajna. U odnosu na kontrolnu skupinu 1F na SD prehrani, skupina 3M, koja je bila na HFHSD prehrani i tretirana metforminom, je imala statistički značajno veći izražaj ObR u CA3 ( $U_{1/3} = 4$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

Općenito, masna je prehrana bogata ugljikohidratima smanjila izražaj ObR u hipokampusu ženki. Metformin je djelovao suprotno od učinka HFHSD na izražaj ObR u svim analiziranim područjima hipokampusa ženki, tako što je izazvao izrazito povećanje izražaja ObR. Liraglutid je također povećao izražaj ObR, ali je ta promjena bila značajna samo u jednom od tri analizirana područja hipokampusa ženki.



Slika 4.14. Usporedba izražaja receptora ObR u hipokampusu ženki.

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), F - ženke, ObR - leptinski receptor, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



Tablica 4.10. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u hipokampusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA3	0,043	< 0,001	> 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA1	0,019	< 0,001	0,015	< 0,001	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HIPP-DG	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 25	N <sub>3</sub> = 6	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA3	N <sub>1</sub> = 17	N <sub>2</sub> = 21	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA1	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 21	N <sub>3</sub> = 12	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA IR- $\alpha$ U MOZGU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH SD ILI HFHSD PREHRANI S ILI BEZ TRETMANA METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM

Sljedeći analizirani receptor je IR putem izražaja njegove ekstracelularne  $\alpha$ -podjedinice. IR je neposredno uključen u nadzor energetske stanja organizma koje je u suficitu tijekom HFHSD prehrane. Ključno mjesto izražaja IR je hipotalamus koje je dobro opisano u literaturi. Međutim, analizirali smo izražaj IR i u svim drugim regijama mozga koje su neposredno ili posredno zadužene za hranjenje, sudjeluju u obradi podražaja koji stiže putem okusa, određuje razinu zadovoljstva ili su bitne za navigaciju i pamćenje podražaja.

##### 4.1.2.1. Analiza izražaja receptora IR- $\alpha$ u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je receptor IR- $\alpha$  u mozgovima svih analiziranih skupina mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni, što pokazuje da nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj IR- $\alpha$  nije bio u svim skupinama mužjaka jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.15).

Na slici 4.16. prikazane su apsolutne vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  receptora u mozgu mužjaka dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

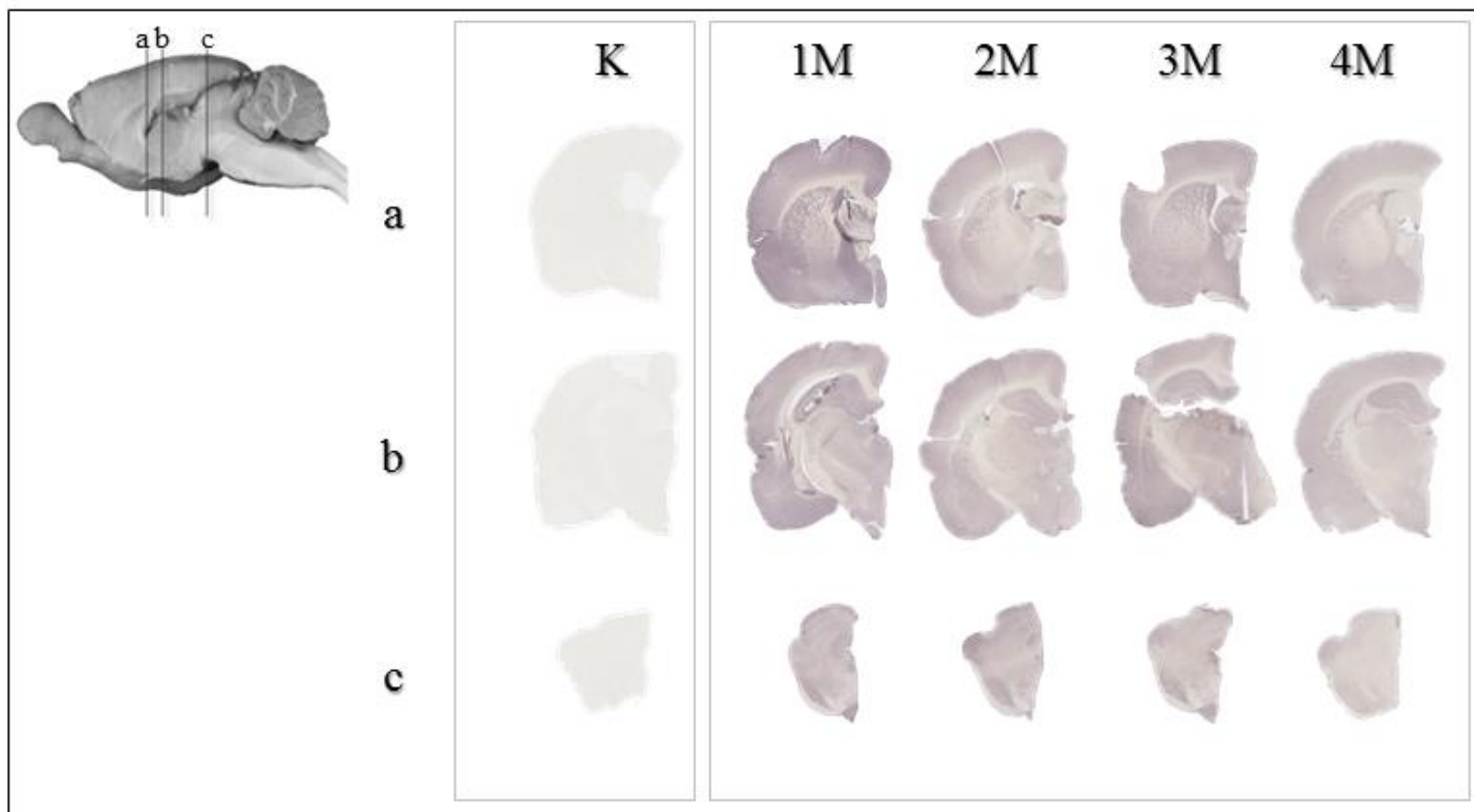
U skupini 1M je najveći izražaj IR- $\alpha$  bio u CA3 području hipokampusa, a zatim u VTA. Najmanje apsolutne vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  su uočene u ostalim područjima hipokampusa, DG i CA1 te u područjima kore mozga. U hipokampusu skupine 1M mužjaka je distribucija receptora IR- $\alpha$  nalik distribuciji receptora ObR – najviše u CA3 području te podjednako manje u DG i CA1.

U odnosu na mužjake na SD prehrani (skupina 1M), mužjaci na HFHSD prehrani (skupina 2M) su imali manju varijabilnost u izražaju IR- $\alpha$  u svim analiziranim područjima. Najveća vrijednost izražaja IR- $\alpha$  je uočena u ARC te u PE i CA3. Najmanji izražaj IR- $\alpha$  je bio u PIR području kore mozga te u hipokampalnim područjima CA1 i CA3. Distribucija IR- $\alpha$  receptora hipokampusa je opet ista kao u skupini 1M, ali je vrijednost izražaja manja, pogotovo u CA3 području. Odnos izražaja IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima 2M skupine je jednak kao u skupini 1M, ali je HFHSD smanjila izražaj.

Tretman mužjaka na HFHSD metforminom je uzrokovao povećanje izražaja IR- $\alpha$  u CA3 i ARC te su ta područja imala najveću vrijednost izražaja IR- $\alpha$ . Najmanji izražaj IR- $\alpha$  u skupni 3M je uočen u PIR području kore mozga te u DG i CA1 hipokampusa. U hipokampusu 3M mužjaka je distribucija IR- $\alpha$  bila poput distribucije u 1M i 2M skupinama. Metformin nije utjecao na vrijednost izražaja IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mužjaka na HFHSD. Dok je izražaj IR- $\alpha$  u LH hipotalamusa bio manji ili jednak izražaju IR- $\alpha$  u PA u prethodne dvije skupine mužjaka, u 3M skupini je veći.

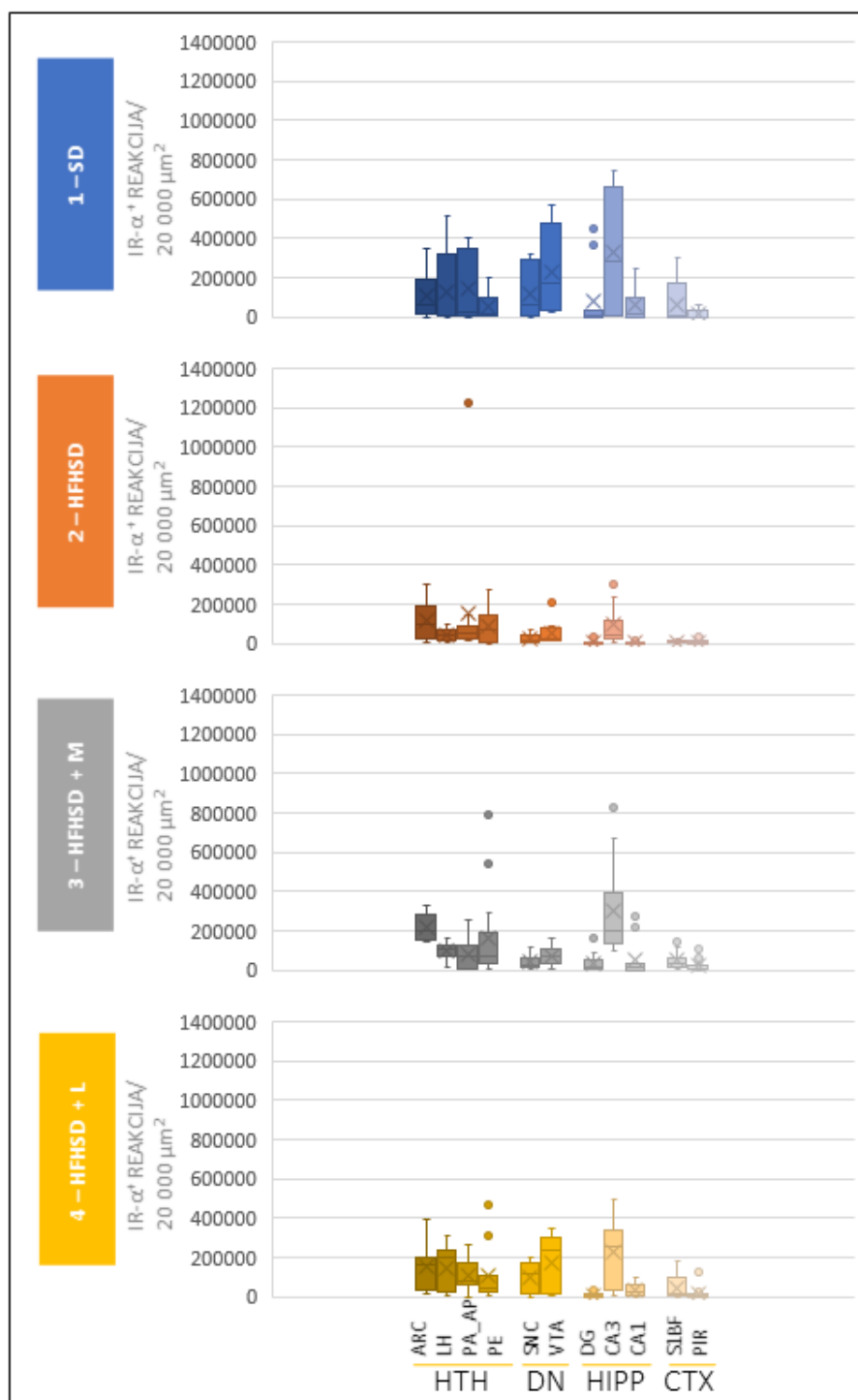
U skupini 4M je uočena najveća vrijednost izražaja IR- $\alpha$  u CA3 i VTA te u LH. Najmanja vrijednost izražaja IR- $\alpha$  je bila u PIR i DG. Liraglutid je mužjacima na HFHSD više povećao izražaj IR- $\alpha$  u LH nego metformin te je izražaj IR- $\alpha$  u LH bio veći od ARC i PA. Izražaj IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima 4M skupine je bio i veći od onog u 1M skupini. Distribucija IR- $\alpha$  u hipokampusu mužjaka iz 4M skupine je bila poput distribucije uočene u ostale tri skupine te je tretman liraglutidom vratio vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  na kontrolnu razinu.

Zaključno, CA3 područje hipokampusa i VTA u svim grupama mužjaka postižu najviše vrijednosti IR- $\alpha$ . HFHSD osobito djeluje na povećanje izražaja IR- $\alpha$  u ARC jezgri hipotalamusa. Niti jedan od dva tretmana nije doveo do općeg povećanja izražaja IR- $\alpha$ .



Slika 4.15. Imunohistokemijsko obojenje mozga mužjaka na IR- $\alpha$ . a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, PIR – piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktan dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** K - kontrola, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.



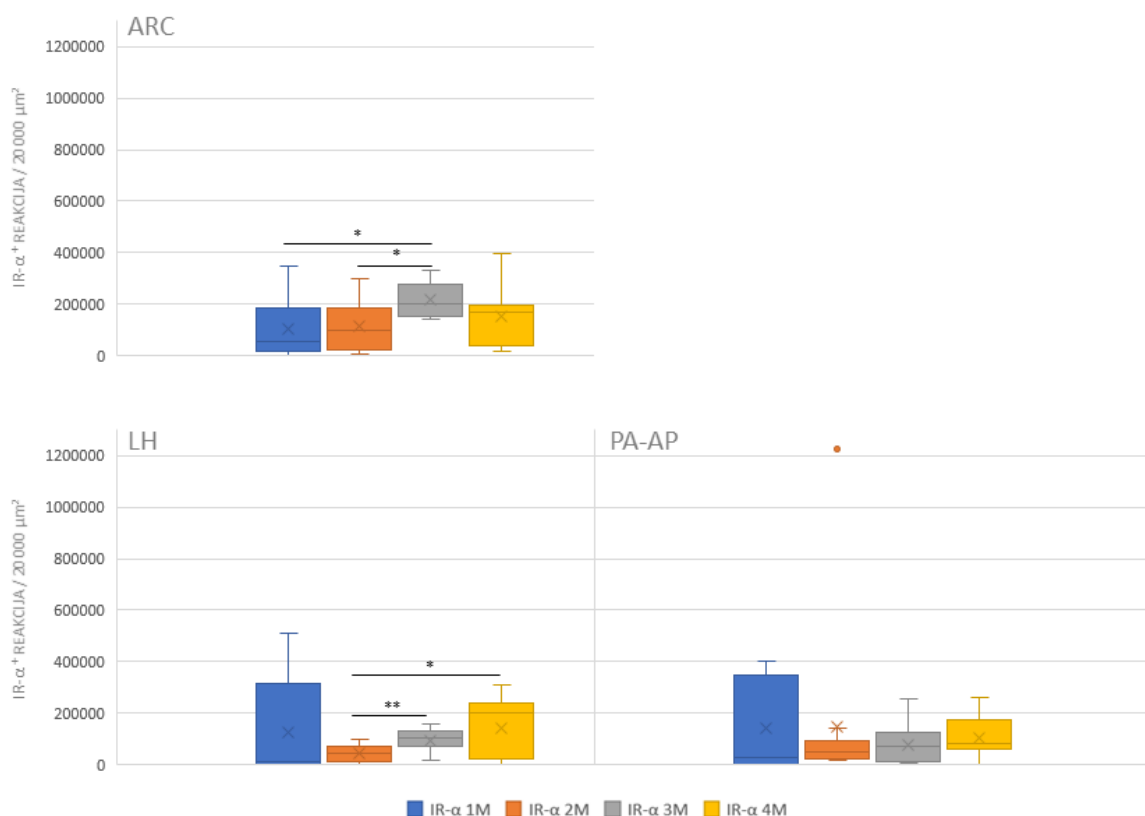
Slika 4.16. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora IR- $\alpha$  u analiziranim područjima mozga mužjaka dobivene računalnim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriori dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.2.1.1. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipotalamusa zaduženih za nadzor hranjenja i energetske stanja organizma. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u hipotalamusu svih skupina mužjaka, što je prikazano slikom 4.17. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.11.

HFHSD prehrana nije inducirala promjene u izražaju IR- $\alpha$  u ARC mužjaka, ali je metformin u mužjaka na HFHSD prehrani statistički značajno povećao izražaj IR- $\alpha$  u ARC ( $U_{2/3} = 17$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_3 = 8$ ,  $p = 0,019$ ). Tretman liraglutidom nije izazvao promjene u izražaju IR- $\alpha$  kako u ARC mužjaka na HFHSD, tako ni u ARC mužjaka na SD. Metformin je statistički značajno povećao izražaj u ARC mužjaka na HFHSD u odnosu na mužjake na SD ( $U_{1/3} = 17$ ,  $N_1 = 10$ ,  $N_3 = 8$ ,  $p = 0,046$ ).



Slika 4.17. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u područjima hipotalamusa mozga mužjaka.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, M - mužjaci, PA-AP - anteriori dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je u LH mužjaka smanjila varijabilnost izražaja IR- $\alpha$ . Mužjaci na HFHSD prehrani tretirani metforminom su imali statistički značajno veći izražaj IR- $\alpha$  u LH u odnosu na HFHSD kontrolnu skupinu (2M) ( $U_{2/3} = 37$ ,  $N_2 = N_3 = 15$ ,  $p = 0,002$ ). Tretman mužjaka na

HFHSD liraglutidom je također statistički značajno povećao izražaj IR- $\alpha$  u LH ( $U_{2/4} = 94$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 21$ ,  $p = 0,043$ ).

U PA području hipotalamusa nije bilo statistički značajnih promjena u izražaju IR- $\alpha$ .

Zaključno, HFHSD prehrana nije utjecala značajno na izražaj IR- $\alpha$  navedenih područja hipotalamusa mužjaka. Metformin je izazvao značajna povećanja izražaja IR- $\alpha$  u ARC, a liraglutid u H mužjaka, dok izražaj u PA području nije bio promijenjen.

Tablica 4.11. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u hipotalamusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	0,019	> 0,05	0,046	> 0,05	> 0,05
HTH-LH	> 0,05	0,002	0,043	> 0,05	> 0,05	> 0,05
HTH-PA-AP	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HTH-ARC	$N_1 = 10$	$N_2 = 12$	$N_3 = 8$	$N_4 = 15$		
HTH-LH	$N_1 = 12$	$N_2 = 15$	$N_3 = 15$	$N_4 = 21$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 8$	$N_2 = 12$	$N_3 = 12$	$N_4 = 17$		

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

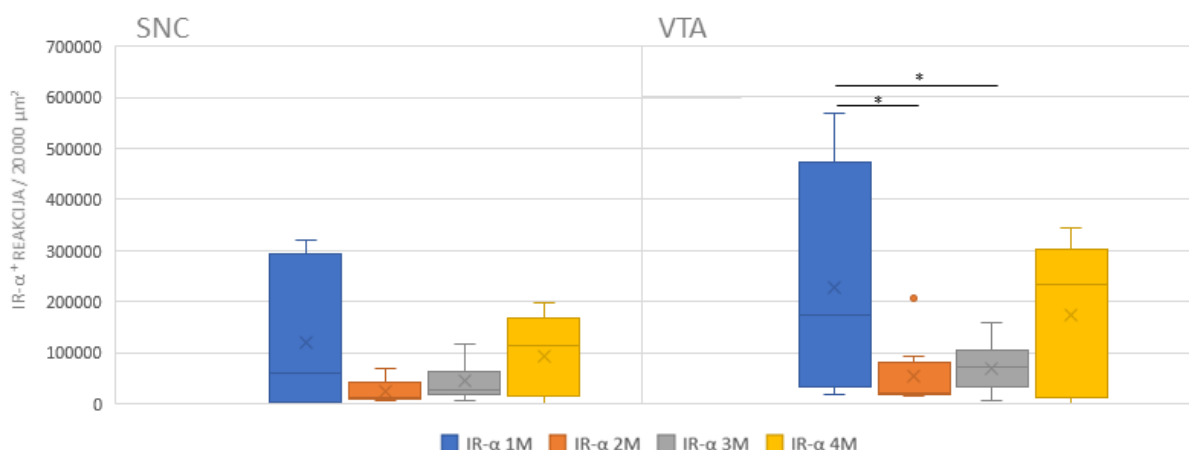
#### 4.1.2.1.2. Izražaj IR- $\alpha$ u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u analiziranim područjima svih skupina mužjaka, što je prikazano slikom 4.18. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.12.

U SNC području mužjaka se mijenjala samo varijabilnost izražaja ObR. Iako se može uočiti da je izražaj IR- $\alpha$ , u odnosu na 1M, bio manji u 2M skupini, nije bilo statistički značajnih razlika.

U VTA području mužjaka je primijećeno da je HFHSD prehrana statistički značajno smanjila izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{1/2} = 29$ ,  $N_1 = 16$ ,  $N_2 = 9$ ,  $p = 0,015$ ). Kombinacija HFHSD i tretmana metforminom je u mužjaka statistički značajno smanjio izražaj IR- $\alpha$  u VTA mužjaka ( $U_{1/3} = 69$ ,  $N_1 = 16$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,046$ ).

Zaključno, masna prehrana bogata ugljikohidratima je u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka izazvala smanjenje izražaja IR- $\alpha$ , osobito u VTA. Na smanjen izražaj IR- $\alpha$  uslijed HFHSD prehrane nije utjecao metformin, ali ga je liraglutid vratio u razinu pri SD prehrani.



Slika 4.18. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, SNC - kompaktni dio crne tvari mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.12. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
DN-VTA	0,015	> 0,05	> 0,05	0,046	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
DN-SNC	$N_1 = 18$	$N_2 = 9$	$N_3 = 15$	$N_4 = 15$		
DN-VTA	$N_1 = 16$	$N_2 = 9$	$N_3 = 15$	$N_4 = 15$		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

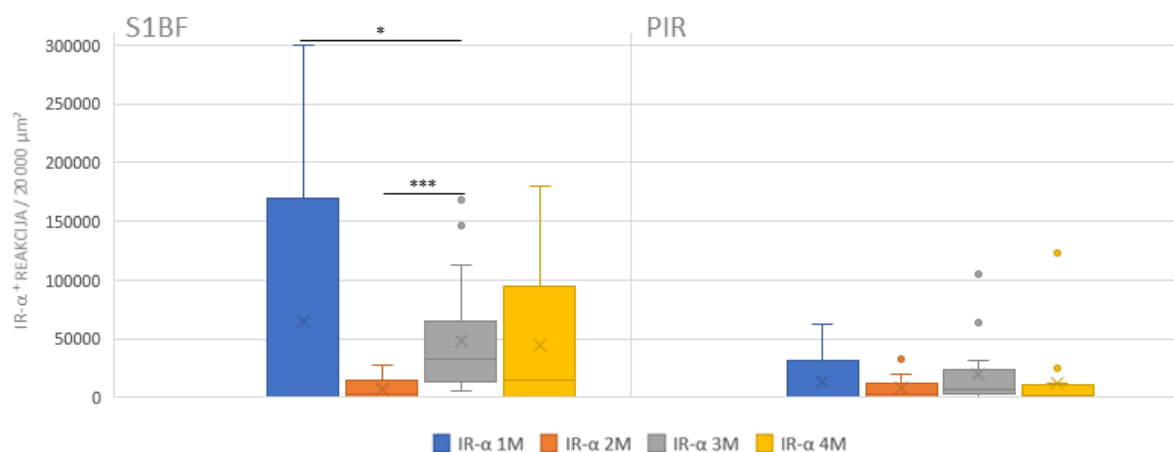
#### 4.1.2.1.3. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga mužjaka koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka, što je za svako posebno područje prikazano slikom 4.19. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.13.

HFHSD prehrana je smanjila varijabilnost izražaja IR- $\alpha$  u S1BF području kore mozga mužjaka. U S1BF mužjaka na HFHSD tretiranih metforminom je izražaj IR- $\alpha$  bio statistički značajno veći od izražaja IR- $\alpha$  S1BF netretiranih mužjaka na HFHSD ( $U_{2/3} = 21$ ,  $N_2 = 13$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p < 0,001$ ). Metformin je u S1BF 3M skupini mužjaka izazvao statistički značajno povećanje izražaja IR- $\alpha$  iznad razine izražaja IR- $\alpha$  pri SD prehrani ( $U_{1/3} = 46$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,034$ ).

U PIR mužjaka se nisu uočile statistički značajne razlike u izražaju IR- $\alpha$ .

Zaključno, tretman metforminom je izazvao promjene u S1BF području kora mozga, gdje je izražaj IR- $\alpha$  bio povećan u odnosu na kontrolne 1M i 2M skupine.



Slika 4.19. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u kori mozga mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.13. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u kori mozga mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
CTX-S1BF	> 0,05	< 0,001	> 0,05	0,034	> 0,05	> 0,05
CTX-PIR	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
CTX-S1BF	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 13	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 21		
CTX-PIR	N <sub>1</sub> = 9	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 18		

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

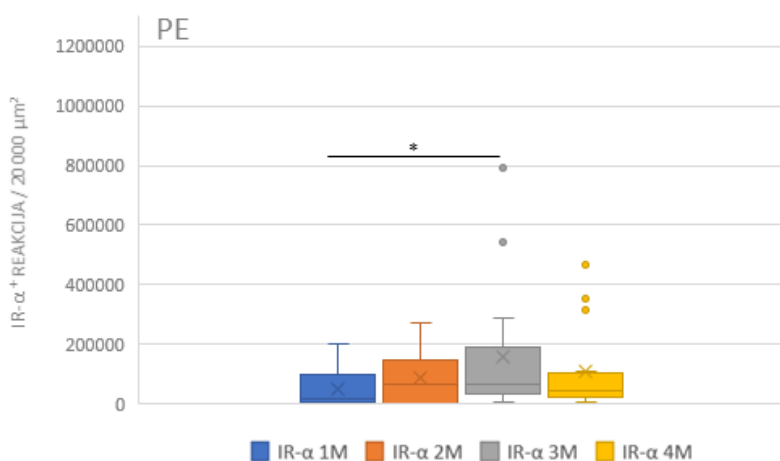
#### 4.1.2.1.4. Izražaj IR- $\alpha$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetskeg stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa mužjaka koja osim što je uključena u nadzor energetskeg stanja organizma ima i određenu ulogu u reprodukciji. Slika 4.20. prikazuje vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u PE svih skupina mužjaka koje nisu bile sve jednake u svim skupinama. Tablicom 4.14. su prikazane razine značajnosti u razlikama izražaja IR- $\alpha$  između skupina mužjaka.



U PE području hipotalamusa mužjaka HFHSD nije izazvala promjene u izražaju IR- $\alpha$ . Pri usporedbi izražaja IR- $\alpha$  u PIR 1M skupine, uočen je statistički značajno manji izražaj IR- $\alpha$  u PIR 3M skupine ( $U_{1/3} = 47$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,038$ ).

Općenito, u PE području mužjaka je tretman metforminom izazvao promjenu u izražaju IR- $\alpha$ .



Slika 4.20. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u PE području hipotalamusa mužjaka.

**Legenda:** M - mužjaci, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.14. Razine značajnosti razlika u izražaju ObR u PE području hipotalamusa mužjaka.

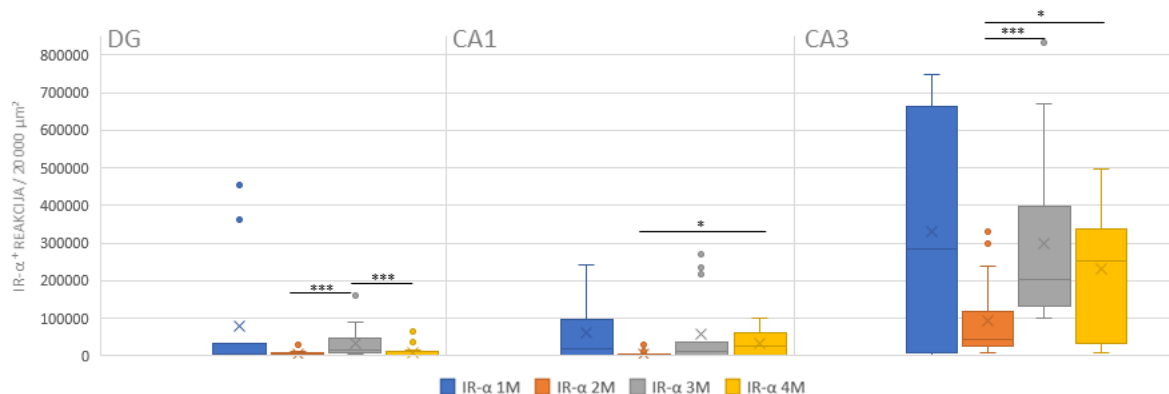
	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,038	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-PE	$N_1 = 12$	$N_2 = 15$	$N_3 = 15$	$N_4 = 17$		

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2.1.5. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipokampusu mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusu koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina mužjaka, što je za svako posebno analizirano područje hipokampusu prikazano slikom 4.21. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.15.

U DG području hipokampusu mužjaka masna prehrana bogata ugljikohidratima nije utjecala na izražaj IR- $\alpha$ . Uslijed tretmana metforminom je izražaj IR- $\alpha$  u DG mužjaka na HFHSD bio statistički značajno povećan ( $U_{2/3} = 30$ ,  $N_2 = N_3 = 15$ ,  $p = 0,001$ ). Skupine 3M i 4M su se međusobno razlikovale po razini izražaja IR- $\alpha$  u DG – 3M je imala statistički značajno veći izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{3/4} = 48$ ,  $N_3 = 15$ ,  $N_4 = 19$ ,  $p = 0,001$ ).



Slika 4.21. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u hipokampusu mužjaka.

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusu 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusu (engl. *dentate gyrus*), IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.15. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u hipokampusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	> 0,05	0,001	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,001
HIPP-CA3	> 0,05	0,001	0,047	> 0,05	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA1	> 0,05	> 0,05	0,018	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HIPP-DG	$N_1 = 18$	$N_2 = 15$	$N_3 = 15$	$N_4 = 19$		
HIPP-CA3	$N_1 = 12$	$N_2 = 15$	$N_3 = 14$	$N_4 = 21$		
HIPP-CA1	$N_1 = 18$	$N_2 = 15$	$N_3 = 15$	$N_4 = 18$		

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusu 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusu (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

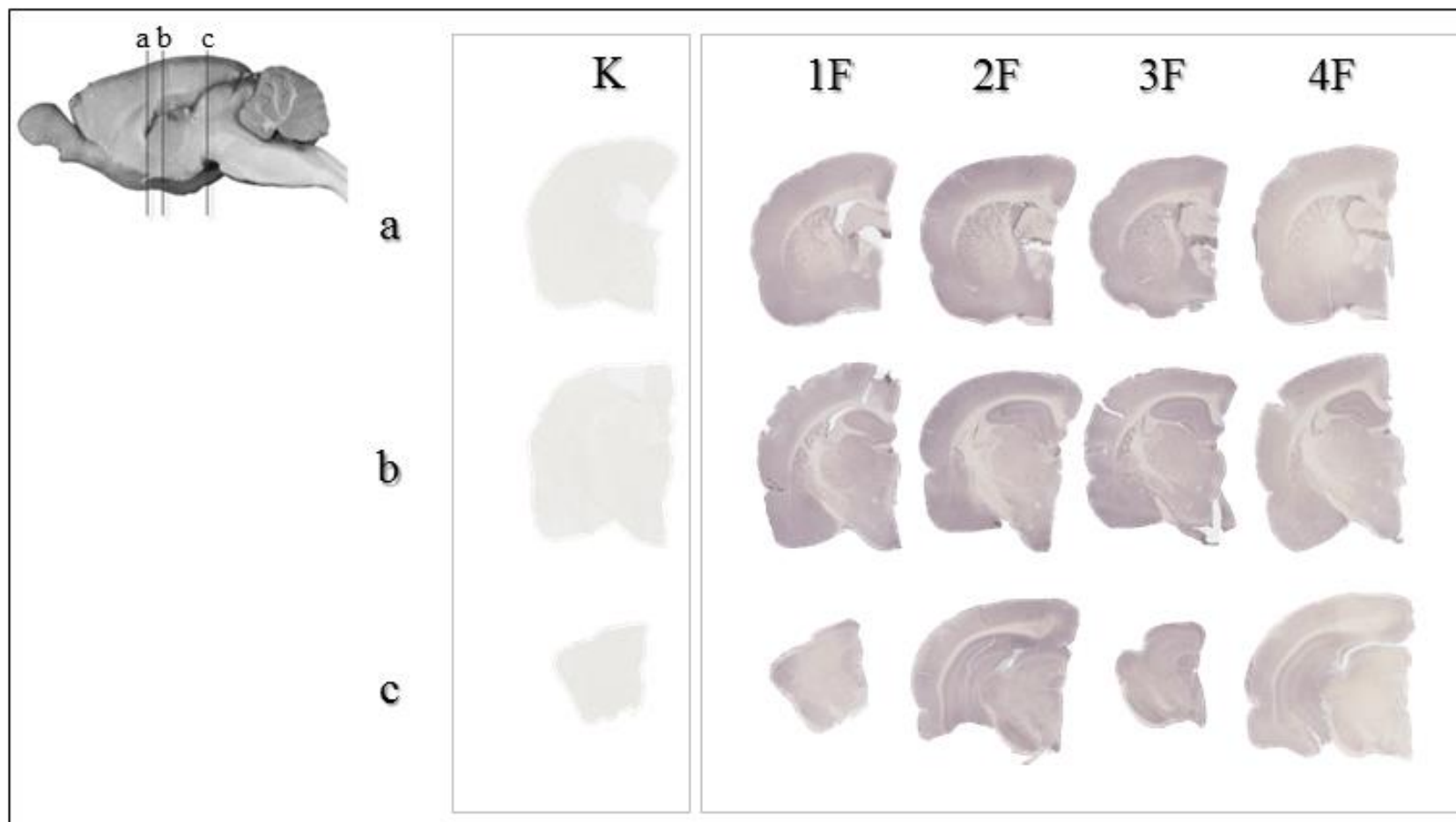
U CA1 mužjaka na HFHSD promatrano smanjenje izražaja IR- $\alpha$  nije bilo statistički značajno. Dok je tretman metforminom u DG području izazvao statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane mužjake na HFHSD prehrani, u CA1 je liraglutid statistički značajno smanjio izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{2/4} = 69$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,018$ ).

U CA3 području mužjaka je izražaj IR- $\alpha$  bio manji u skupini na HFHSD prehrani, međutim ta razlika nije bila statistički značajna. Oba tretmana su dovela do statistički značajnog povećanja izražaja IR- $\alpha$  u CA3 mužjaka u odnosu na kontrolnu skupinu na HFHSD (2M) ( $U_{2/3} = 31$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 14$ ,  $p = 0,001$ ;  $U_{2/4} = 95$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 21$ ,  $p = 0,047$ ).

Zaključno, može se uočiti smanjena varijabilnost izražaja IR- $\alpha$  u hipokampusu mužjaka uslijed HFHSD prehrane koja se značajno povećava tretmanom s metforminom ili liraglutidom.

#### 4.1.2.2. *Analiza izražaja receptora IR- $\alpha$ u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom*

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je IR- $\alpha$  u mozgovima svih analiziranih skupina ženki izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni, dakle nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj ObR nije bio u svim skupinama ženki jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.22).



Slika 4.22. Imunohistokemijsko obojenje mozga ženki na IR- $\alpha$ . a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** F - ženke, K - kontrola, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom

Na slici 4.23. su prikazane apsolutne vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  receptora u mozgu ženki dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

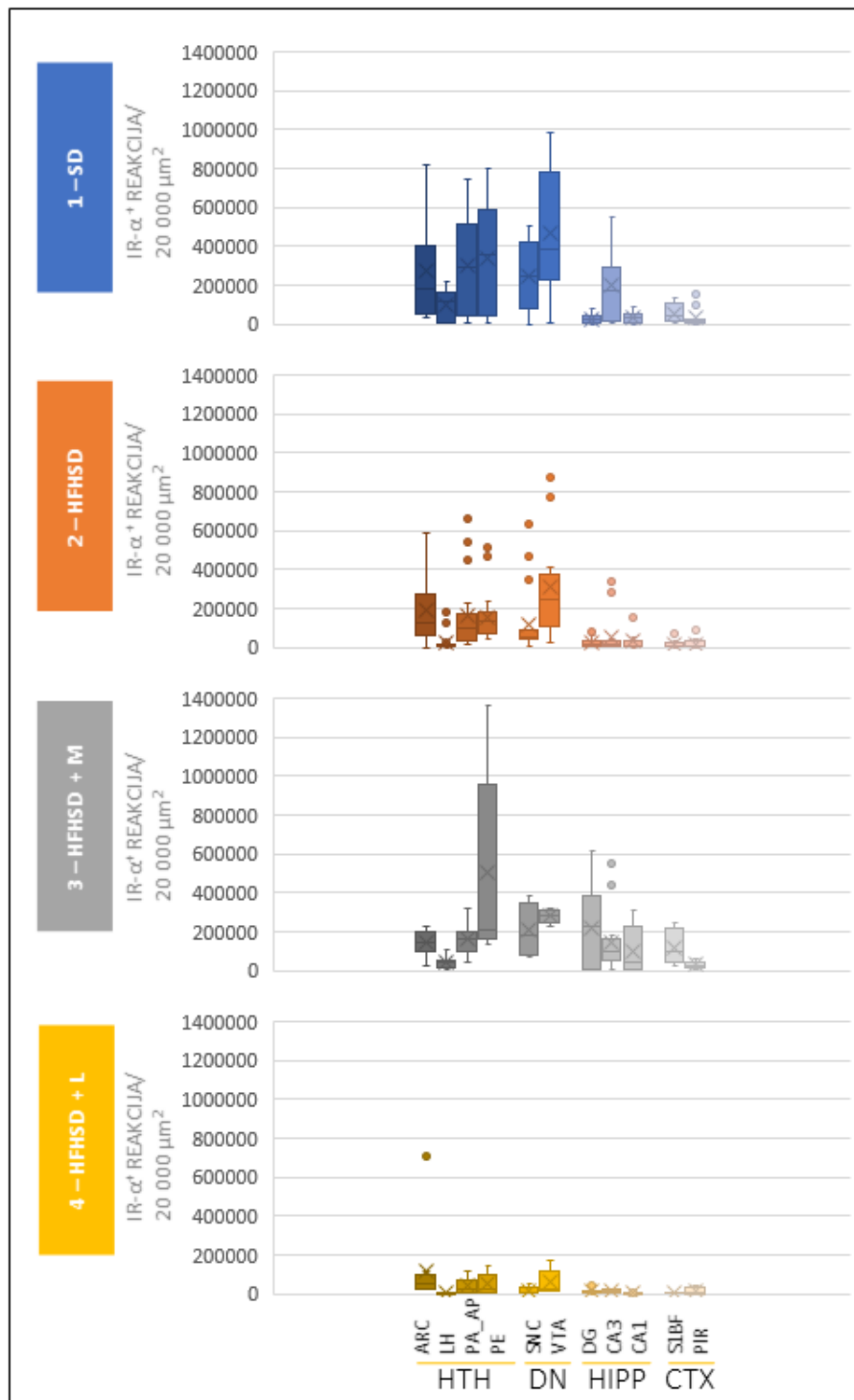
Ženke na SD prehrani (skupina 1F) su imale veći izražaj IR- $\alpha$  u hipotalamusu i dopaminergičkim područjima od mužjaka na istoj prehrani (1M). U ženkama 1F skupine je uočen najveći izražaj IR- $\alpha$  u VTA, a zatim u hipotalamičkom PE području. Najmanju vrijednost izražaja IR- $\alpha$  je imalo područje PIR te hipokampalna područja DG i CA1. U hipokampusu ženki na SD je distribucija receptora IR- $\alpha$  slijedila isti obrazac kao u mužjacima – izražaj IR- $\alpha$  u CA3 je bio najveći te podjednako manji u DG i CA1. U hipotalamusu ženki 1M skupine je izražaj IR- $\alpha$  bio najmanji u LH, a najveći u PE. Istovremeno je izražaj IR- $\alpha$  u PA bio veći od izražaja IR- $\alpha$  u ARC.

HFHSD prehrana je ženkama smanjila izražaj IR- $\alpha$  u svim analiziranim područjima mozga. Uz prisutnost više slučajeva vrijednosti koje odskoču od distribucije ostalih podataka, najveća vrijednost izražaja IR- $\alpha$  u mozgu 2F skupine ženki je bila u VTA, a najmanja u sva tri područja hipokampusa, u analiziranim područjima kore mozga te u LH. U hipokampusu ženki na HFHSD prehrani se izgubila uobičajena distribucija IR- $\alpha$  te su sva područja imala slične vrijednosti izražaja. Hipotalamus ženki 2F skupine je imao istu distribuciju IR- $\alpha$  kao u 1F, ali su vrijednosti bile manje.

Najveće vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u mozgu ženki skupine 3F su bile u VTA, a zatim u DG te PE. Najmanje vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  su opažene u PIR i LH. Iz podataka je vidljivo da je tretman metforminom najviše utjecao na izražaj IR- $\alpha$  u hipokampusu ženki na masnoj prehrani bogatoj ugljikohidratima, ali je i povećao varijabilnost PE području prema maksimumu. Također, povećao je vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u S1BF području kore mozga.

Tretman ženki na HFHSD liraglutidom je drastično smanjio vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u svim analiziranim područjima mozga. Najveća vrijednost izražaja IR- $\alpha$  u ovim ženkama je uočena u ARC, a najmanja u LH, CA1 i S1BF.

Zaključno, ženke najviše vrijednosti IR- $\alpha$  imaju u VTA području, neovisno o prehrani. HFHSD smanjuje izražaj IR- $\alpha$  u svim regijama mozga, a osobito u cijelom hipokampusu. Metformin najviše popravljiva smanjenje izražaja IR- $\alpha$  uzrokovanog masnom prehranom bogatom ugljikohidratima u hipokampusu i u PE. Liraglutid dodatno drastično smanjuje izražaj IR- $\alpha$  u svim analiziranim područjima mozga ženki.



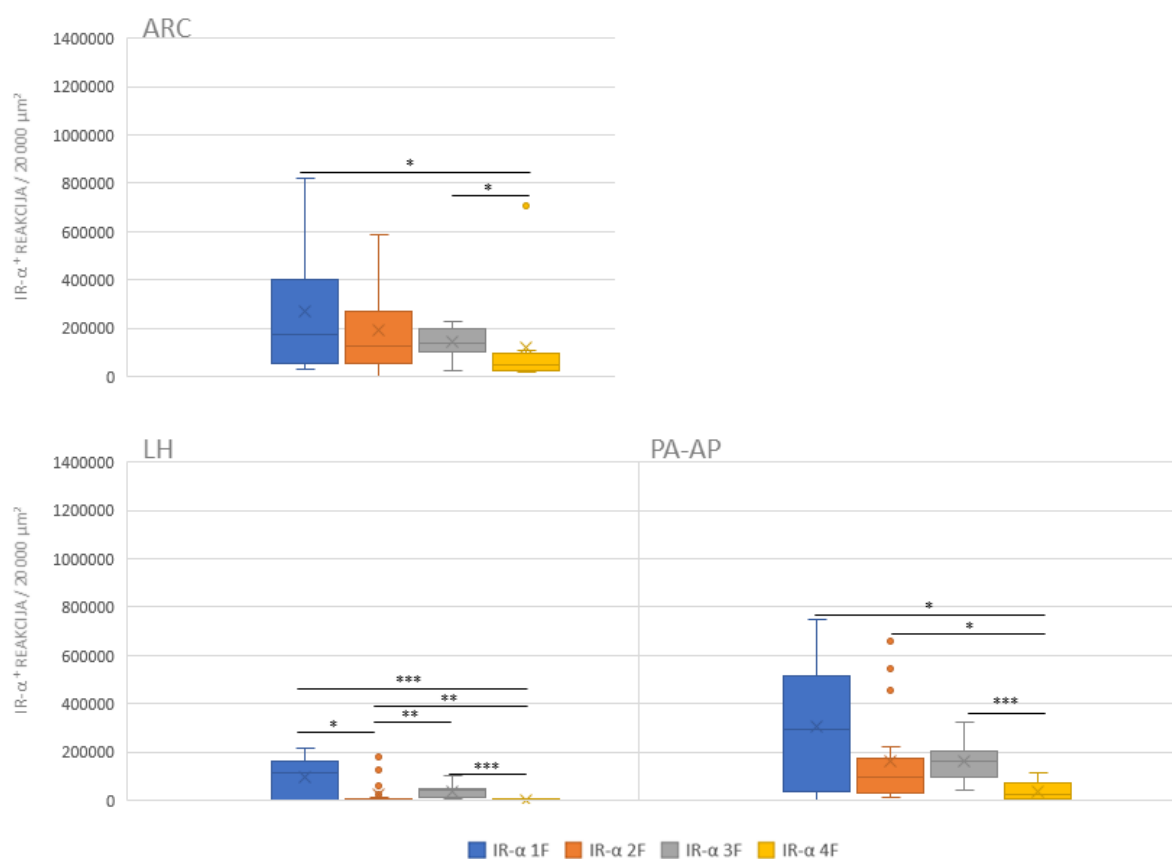
Slika 4.23. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora IR- $\alpha$  u analiziranim područjima mozga ženki dobivene računalnim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriori dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.2.2.1. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipotalamusa zaduženih za nadzor hranjenja i energetske stanja organizma. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u hipotalamusu svih skupina ženki što je prikazano slikom 4.24. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.16.

U odnosu na 1F skupinu na SD prehrani, u 2F skupini je zbog HFHSD prehrane uočen trend smanjenja izražaja IR- $\alpha$  u ARC koji je pojačala primjena liraglutida te je izražaj IR- $\alpha$  u ARC 4M skupine bio statistički značajno manji ( $U_{1/4} = 26$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 10$ ,  $p = 0,027$ ). Metformin nije utjecao na izražaj IR- $\alpha$  u ARC. U odnosu na kontrolnu 2F skupinu, 4F skupina je imala manji izražaj IR- $\alpha$  u ARC. U odnosu na skupinu ženki na HFHSD tretiranih metforminom, ženke na HFHSD tretirane liraglutidom su imale statistički značajno manji izražaj IR- $\alpha$  u ARC ( $U_{3/4} = 23$ ,  $N_3 = 12$ ,  $N_4 = 10$ ,  $p = 0,016$ ).



Slika 4.24. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u područjima hipotalamusa mozga ženki.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, F - ženke, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriori dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

U LH ženki je HFHSD statistički značajno smanjila izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{1/2} = 83$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p = 0,017$ ). Dok metformin statistički značajno povećava izražaj IR- $\alpha$  u LH ženki u odnosu na kontrolnu 2F grupu samo na HFHSD ( $U_{2/3} = 51$ ,  $N_2 = 26$ ,  $N_3 = 10$ ,  $p = 0,006$ ), liraglutid ga statistički značajno

smanjuje ( $U_{1/4} = 11$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ). Kombinacija HFHSD i tretmana liraglutidom je dovela do statistički značajnog smanjenja izražaja IR- $\alpha$  u odnosu na kontrolnu 1F skupinu na SD prehrani ( $U_{2/4} = 47$ ,  $N_2 = 26$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,009$ ). Pri usporedbi izražaja IR- $\alpha$  u LH skupine 3F i 4F uočen je statistički značajno manji izražaj u 4F skupini ( $U_{3/4} = 2$ ,  $N_3 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

U 2F skupini na HFHSD prehrani je uočen manji izražaj IR- $\alpha$  u PA u odnosu na kontrolnu skupinu 1F, koji je primjena liraglutida dodatno smanjila i promjena je bila statistički značajna, ne samo u odnosu na kontrolnu skupinu 1F nego i u odnosu na 2F ( $U_{1/4} = 28$ ,  $N_1 = 14$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,030$ ;  $U_{2/4} = 35$ ,  $N_2 = 19$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,014$ ). 4F skupina ženki je imala statistički manji izražaj IR- $\alpha$  u PA od 3F skupine ( $U_{3/4} = 11$ ,  $N_3 = 18$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

Zaključno, HFHSD prehrana smanjuje varijabilnost čak i izražaj IR- $\alpha$  u hipotalamusu ženki te ju lijekovi nisu mogli vratiti na razinu karakterističnu pri SD prehrani.

Tablica 4.16. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u hipotalamusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,027	0,016
HTH-LH	0,017	0,006	0,009	> 0,05	0,001	< 0,001
HTH-PA-AP	> 0,05	> 0,05	0,014	> 0,05	0,030	< 0,001
VELIČINA UZORKA						
HTH-ARC	$N_1 = 12$	$N_2 = 24$	$N_3 = 12$	$N_4 = 10$		
HTH-LH	$N_1 = 15$	$N_2 = 26$	$N_3 = 12$	$N_4 = 9$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 14$	$N_2 = 19$	$N_3 = 18$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2.2.2. Izražaj IR- $\alpha$ u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

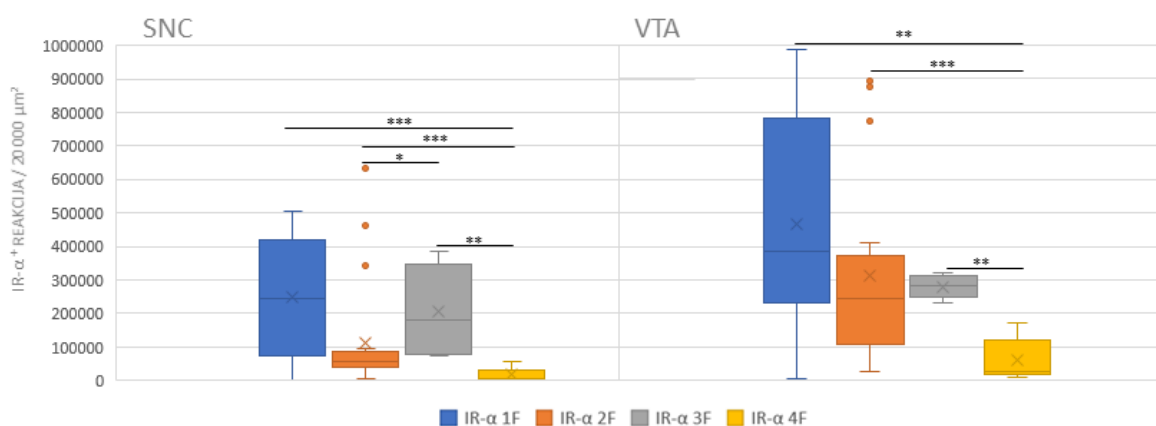
Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u dopaminergičkim područjima mozga ženki. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u analiziranim područjima svih skupina ženki što je prikazano slikom 4.25. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.17.



HFHSD prehrana smanjuje izražaj IR- $\alpha$  u SNC ženki. Nakon tretmana ženki na HFHSD liraglutidom, izražaj IR- $\alpha$  u SNC se statistički značajno smanjio u odnosu na HFHSD kontrolnu skupinu ( $U_{2/4} = 21$ ,  $N_2 = 20$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ). Suprotno, tretman ženki na HFHSD metforminom je statistički značajno povećao izražaj IR- $\alpha$  u SNC ( $U_{2/3} = 25$ ,  $N_2 = 20$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p = 0,036$ ). U odnosu na kontrolnu 1F skupinu na SD, ženke skupine 3M su imale nepromijenjen izražaj IR- $\alpha$  u SNC, dok su ženke iz 4F skupine imale statistički značajno manji ( $U_{1/4} = 21$ ,  $N_1 = 20$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ). Ženke 3F skupine su imale statistički značajno veći izražaj IR- $\alpha$  od ženki iz 4F skupine ( $U_{3/4} = 0$ ,  $N_3 = 6$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,002$ ).

Naizgled smanjen izražaj IR- $\alpha$  u VTA području ženki na HFHSD prehrani nije bio statistički značajan u odnosu na 1F kontrolnu skupinu. Trend uočen u SNC području da metformin povećava izražaj IR- $\alpha$  u ženki na HFHSD, a liraglutid smanjuje, uočen je i u VTA području, premda je povećanje uzrokovano liraglutidom statistički značajno ( $U_{2/4} = 16$ ,  $N_2 = 17$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ). U odnosu na kontrolnu skupinu ženki na SD prehrani, ženke na HFHSD tretirane liraglutidom su imale značajno manji izražaj IR- $\alpha$  u VTA ( $U_{1/4} = 23$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,003$ ). U usporedbi 3F i 4F skupine ženki uočeno je da je skupina 3F imala značajno veći izražaj IR- $\alpha$  u VTA ( $U_{3/4} = 0$ ,  $N_3 = 6$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,002$ ).

Zaključno, HFHSD u dopaminergičkim područjima smanjuje izražaj IR- $\alpha$ , ali ne značajno. Lijekovi pri HFHSD prehrani u ženkama imaju suprotne učinke na izražaj IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima ženki – tretman metforminom povećava, a liraglutidom izrazito smanjuje izražaj IR- $\alpha$ .



Slika 4.25. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.17. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	> 0,05	0,036	0,001	> 0,05	0,001	0,002
DN-VTA	> 0,05	> 0,05	0,001	> 0,05	0,003	0,002
VELIČINA UZORKA						
DN-SNC	N <sub>1</sub> = 19	N <sub>2</sub> = 20	N <sub>3</sub> = 6	N <sub>4</sub> = 9		
DN-VTA	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 17	N <sub>3</sub> = 6	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

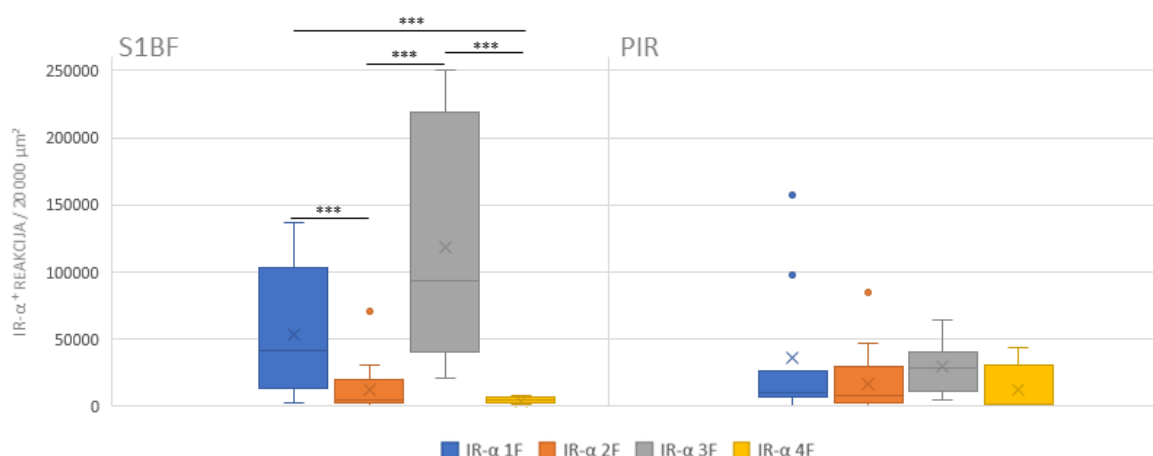
#### 4.1.2.2.3. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga ženki koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki, što je za svako posebno područje prikazano slikom 4.26. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.18.

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je u S1BF ženki statistički značajno smanjila izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{1/2} = 37$ ,  $N_1 = 13$ ,  $N_2 = 18$ ,  $p = 0,001$ ). Tretman ženki na HFHSD metforminom je značajno povećao izražaj IR- $\alpha$  u S1BF ( $U_{2/3} = 5$ ,  $N_2 = 18$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p < 0,001$ ), dok liraglutid nije uzrokovao promjene izražaja IR- $\alpha$ . U odnosu na kontrolnu skupinu 1F, skupina 4F je imala statistički značajno manji izražaj IR- $\alpha$  ( $U_{1/4} = 8$ ,  $N_1 = 13$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ). 4F skupina tretirana liraglutidom je imala statistički značajno manji izražaj IR- $\alpha$  u S1BF ( $U_{3/4} = 0$ ,  $N_3 = N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

U PIR području kore mozga ženki nisu uočene značajne promjene u izražaju IR- $\alpha$ .

Općenito, masna prehrana bogata ugljikohidratima je utjecala na S1BF područje kore mozga ženki, ali ne i na PIR. Smanjeni izražaj IR- $\alpha$  u S1BF uslijed HFHSD prehrane je korigirao metformin, dok ga je liraglutid dodatno smanjio.

Slika 4.26. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u kori mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.18. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u kori mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
CTX-S1BF	0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05	0,001	< 0,001
CTX-PIR	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
CTX-S1BF	$N_1 = 13$	$N_2 = 18$	$N_3 = 9$	$N_4 = 9$		
CTX-PIR	$N_1 = 15$	$N_2 = 21$	$N_3 = 9$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

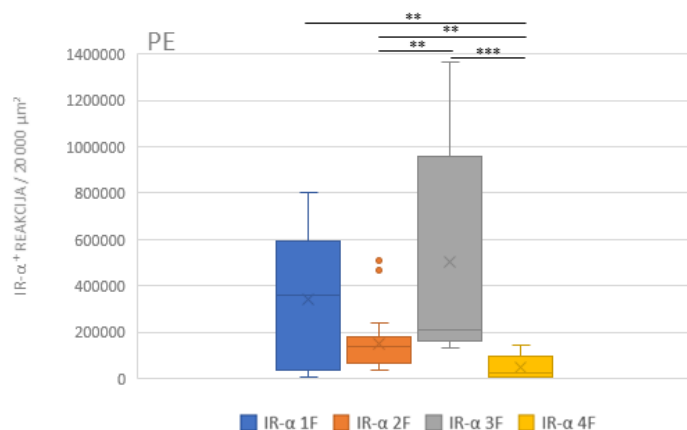
#### 4.1.2.2.4. Izražaj IR- $\alpha$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetskeg stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa koja osim što je uključena u nadzor energetskeg stanja organizma ima i određenu ulogu u reprodukciji. Slika 4.27. prikazuje vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u PE svih skupina ženki. Tablicom 4.19 su prikazane razine značajnosti u razlikama izražaja IR- $\alpha$  između skupina ženki.

HFHSD prehrana je u PE ženki smanjila varijabilnost izražaja IR- $\alpha$ . Izražaj IR- $\alpha$  je i manji u odnosu na kontrolnu 1F skupinu, no ne i značajno manji. Osim u slučaju primjene liraglutida – tada je izražaj IR- $\alpha$  u PE značajno manji u odnosu na obje kontrolne skupine ( $U_{1/4} = 24$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,005$ ;  $U_{2/4} = 36$ ,  $N_2 = 24$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,004$ ). Tretman ženki na HFHSD metforminom je doveo do

značajno većeg izražaja IR- $\alpha$  u PE ( $U_{2/3} = 51$ ,  $N_2 = 24$ ,  $N_3 = 12$ ,  $p = 0,002$ ). Skupina 3F tretirana metforminom je imala značajno veći izražaj IR- $\alpha$  u PE od skupine 4F tretirane liraglutidom ( $U_{3/4} = 2$ ,  $N_3 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

Zaključno, učinak HFHSD prehrane da smanjuje izražaj IR- $\alpha$  u PE dodatno podupire tretman liraglutidom, ali tretman metforminom vraća izražaj IR- $\alpha$  na razinu pri SD.



Slika 4.27. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u PE području hipotalamusa ženki.

**Legenda:** F - ženke, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.19. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u PE području hipotalamusa ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	> 0,05	0,002	0,004	> 0,05	0,005	< 0,001
VELIČINA UZORKA						
HTH-PE		$N_1 = 17$	$N_2 = 24$	$N_3 = 12$	$N_4 = 9$	

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2.2.5. Izražaj IR- $\alpha$ u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

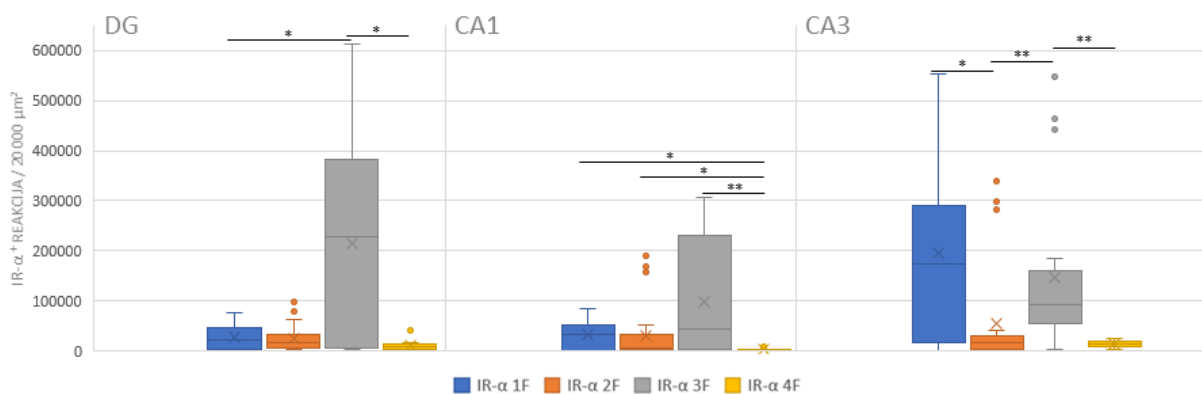
Izražaj IR- $\alpha$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina ženki, što je za svako posebno analizirano područje hipokampusa prikazano slikom 4.28. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.20.

HFHSD prehrana nije uzrokovala promjenu u izražaju IR- $\alpha$  u DG ženki. Tretman metforminom je pri HFHSD prehrani izrazito povećao varijabilnost izražaja IR- $\alpha$  u DG, a ta promjena izazvana metforminom je u kombinaciji s HFHSD bila značajna u odnosu na kontrolnu 1F skupinu ( $U_{1/3} = 78$ ,  $N_1 = 19$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,026$ ). U DG 3F ženki tretiranih metforminom je izražaj IR- $\alpha$  bio statistički značajno veći u odnosu na 4F skupinu ( $U_{3/4} = 31$ ,  $N_3 = 15$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,032$ ).

Smanjenje izražaja IR- $\alpha$  uslijed HFHSD je primijećen i u CA1 području hipokampusa ženki, međutim promjena nije bila značajna. Ali je smanjenje IR- $\alpha$  dodatno pojačao tretman liraglutidom, te je ono statistički značajno manje od obje kontrolne skupine ( $U_{1/4} = 50$ ,  $N_1 = 22$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,033$ ;  $U_{2/4} = 50$ ,  $N_2 = 25$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,015$ ). Značajno manje IR- $\alpha$  u DG ženki je bilo u 4F skupini u odnosu na 3F skupinu ( $U_{3/4} = 10$ ,  $N_3 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,002$ ).

U CA3 području hipokampusa ženki smo konačno mogli vidjeti statistički značajno smanjenje izražaja IR- $\alpha$  uslijed HFHSD prehrane ( $U_{1/2} = 95$ ,  $N_1 = N_2 = 18$ ,  $p = 0,034$ ). Kada su se ženke 2F skupine na HFHSD tretirale metforminom, izražaj IR- $\alpha$  u CA3 je bio značajno povećan ( $U_{2/3} = 69$ ,  $N_2 = 22$ ,  $N_3 = 14$ ,  $p = 0,006$ ). Značajno manje IR- $\alpha$  u CA3 ženki je bilo u 4F skupini u odnosu na 3F skupinu ( $U_{3/4} = 21$ ,  $N_3 = 18$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,002$ ).

Zaključno, HFHSD je uzrokovala trend smanjenja izražaja IR- $\alpha$  u hipokampusu ženki i to značajno u CA3 području. Dok je metformin povećao izražaj IR- $\alpha$  u hipokampusu ženki, smanjivao ga je na kontrolnu razinu pri SD prehrani, osim u slučaju u CA1 području – tu je smanjenje uslijed tretmana liraglutidom u kombinaciji sa HFHSD bilo i značajno manje od kontrolne razine pri SD.



Slika 4.28. Usporedba izražaja receptora IR- $\alpha$  u hipokampusu ženki.

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), F - ženke, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.20. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u hipokampusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,026	> 0,05	0,032
HIPP-CA3	0,034	0,006	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,002
HIPP-CA1	> 0,05	> 0,05	0,015	> 0,05	0,033	0,002
VELIČINA UZORKA						
HIPP-DG	N <sub>1</sub> = 19	N <sub>2</sub> = 24	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA3	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 22	N <sub>3</sub> = 18	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA1	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 25	N <sub>3</sub> = 12	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA IGF-1R $\beta$ U MOZGU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH SD ILI HFHSD PREHRANI S ILI BEZ TRETMANA METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM

Receptor IGF-1R $\beta$  je bio izražen u istraživanim područjima mozga. Analiziran je njegov izražaj, jer je pokazano da može s podjedinicama inzulinskog receptora stvarati funkcionalne miješane receptore s afinitetom za inzulin i IGF. IGF inače putem svog receptora signalizira stanični rast i proliferaciju, a ima mogućnost pokrenuti signalnu kaskadu putem IR. Kao očekivano ključno mjesto izražaja IGF-1R $\beta$  je hipokampus, gdje je dokazana neurogeneza i gdje je za pamćenje ključan opstanak stanica. Dodatno smo analizirali izražaj IGF-1R $\beta$  u područjima mozga koja su neposredno ili posredno zadužena za hranjenje, obradu podražaja putem okusa te određivanje razine ugone.

##### 4.1.3.1. Analiza izražaja receptora IGF-1R $\beta$ u mozgu mužjaka izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je IGF-1R $\beta$  u mozgovima svih analiziranih skupina mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni što pokazuje da nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj IGF-1R $\beta$  nije bio u svim skupinama mužjaka jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.29).

Na slici 4.30. prikazane su apsolutne vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  receptora u mozgu mužjaka dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

U mozgu svih skupina mužjaka je izrazito najveća vrijednost izražaja IGF-1R $\beta$  bila u CA3 području hipokampusa.

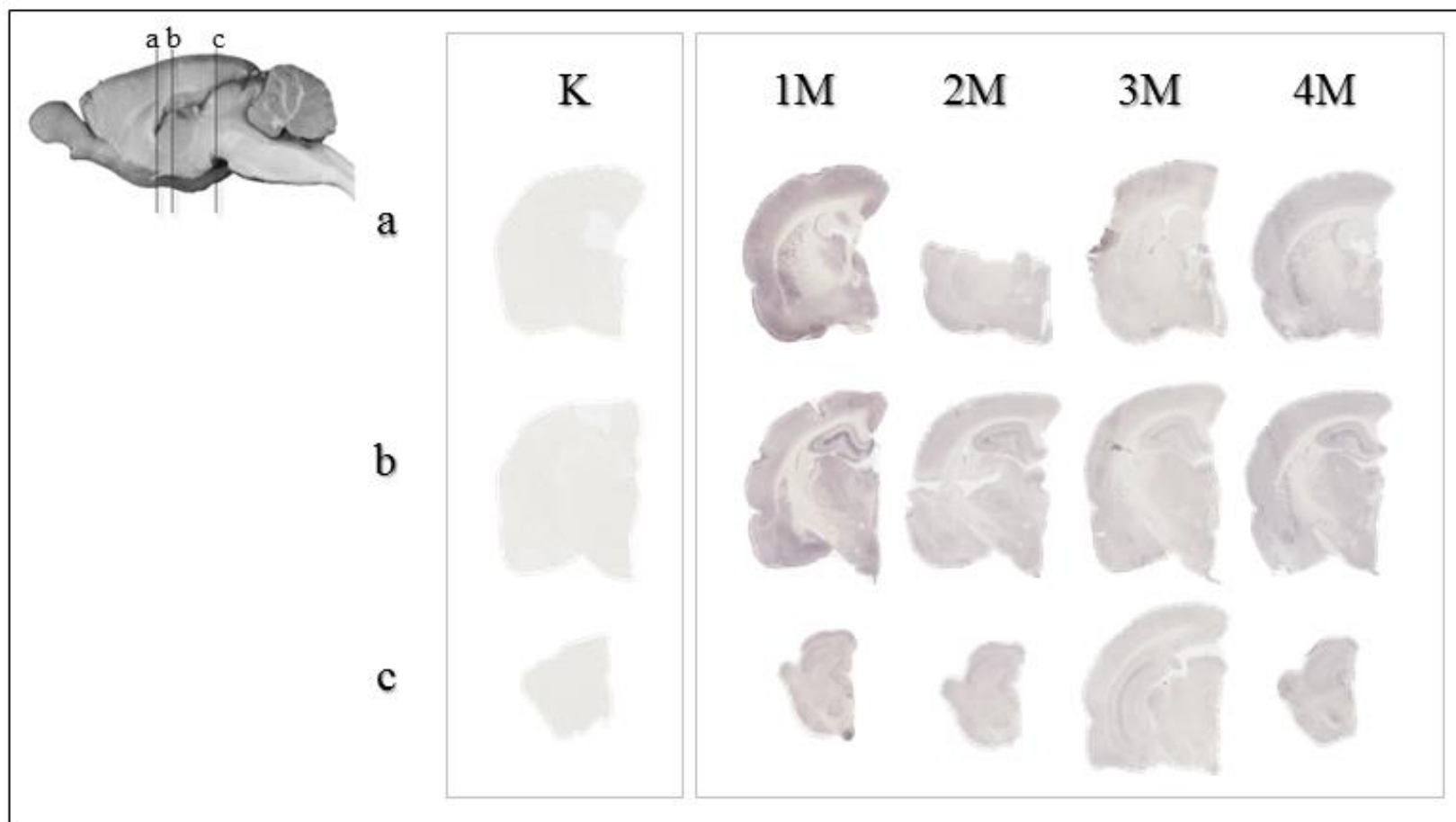
Najmanju vrijednost izražaja IGF-1R $\beta$  u mozgu mužjaka 1M skupine se uočilo u kori mozga, DG području hipokampusa, dopaminergičkom SNC području te u LH hipotalamusa. U hipotalamusu 1M mužjaka je najveći izražaj IGF-1R $\beta$  bio u ARC. Distribucija IGF-1R $\beta$  u hipokampusu mužjaka 1M skupine je pratila već uočenu distribuciju u slučaju receptora ObR i IR- $\alpha$  – najviše IGF-1R $\beta$  je bilo u CA3, a manje u DG i CA1.

U mozgu mužjaka 2M skupine su najmanje vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  bile u PIR te u DG i CA1. Uslijed HFHSD prehrane se povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u LH i PA hipotalamusa mužjaka te u dopaminergičkim područjima. Također je porast iz istog razloga uočen u S1BF.

3M skupina mužjaka je najmanje vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  imala u PIR, a kao i u 2M skupini, među najmanjim vrijednostima u izražaju IGF-1R $\beta$  su bila DG i CA1 područja hipokampusa. U hipotalamusu se promijenila distribucija IGF-1R $\beta$  uslijed tretmana mužjaka na HFHSD metforminom – u LH je IGF-1R $\beta$  bio najviše izražen.

U 4M skupini su najmanje vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  bile opet u PIR, DG i CA1. Također su najmanje vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  imala dopaminergička područja. U hipotalamusu je distribucija IGF-1R $\beta$  bila kao u 1M skupini.

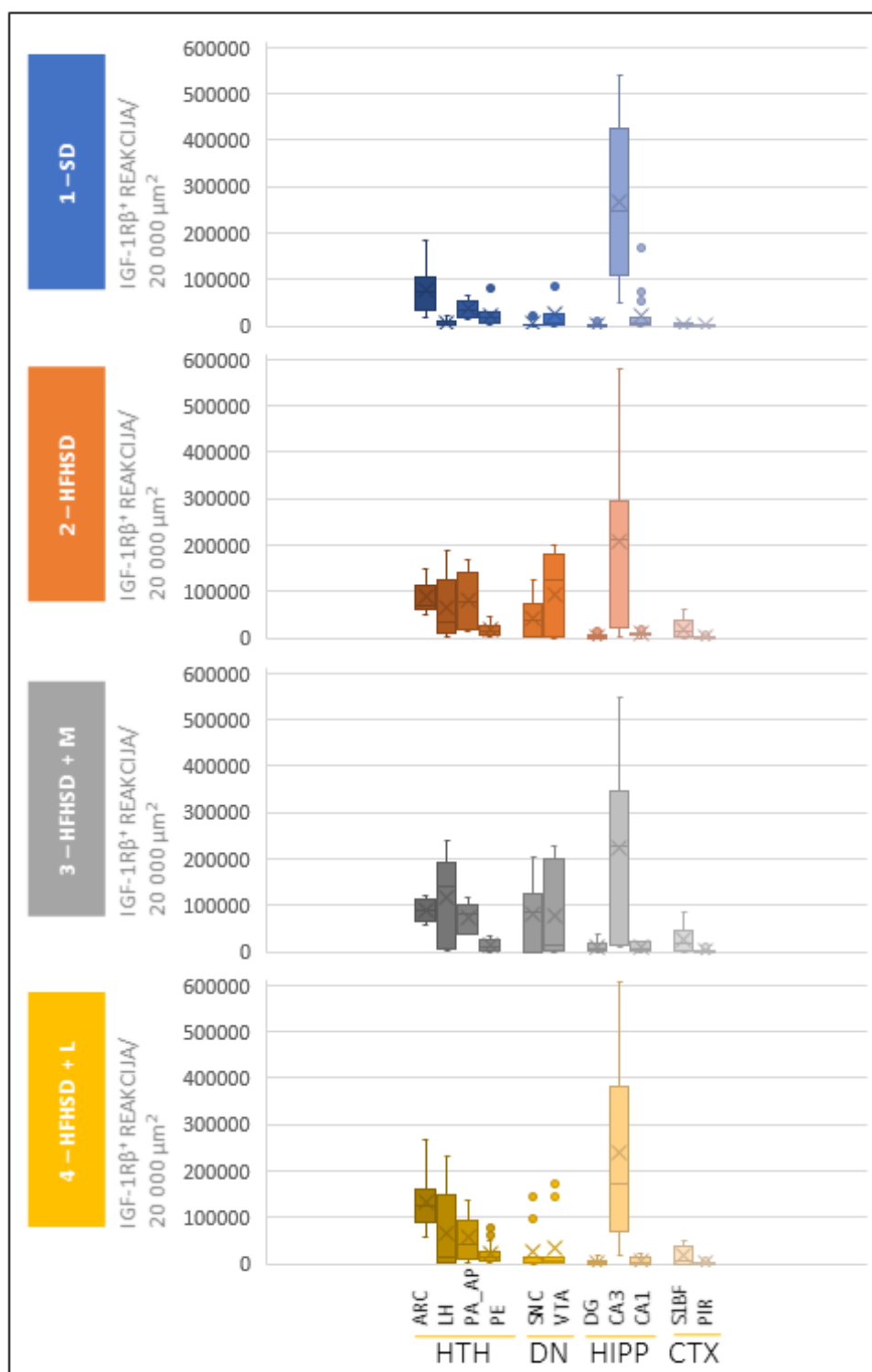
Zaključno, CA3 područje hipokampusa ima najviši izražaj IGF-1R $\beta$ , neovisno o tipu prehrane ili tretmanu. Od svih hipotalamičkih jezgara ARC ima najviši izričaj IGF-1R $\beta$ , osim u slučaju tretmana s metforminom, Liraglutid drastično smanjuje izričaj IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim jezgrama VTA i SNC.



Slika 4.29. Imunohistokemijsko obojenje mozga mužjaka na IGF-1R $\beta$ . a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR – piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktan dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** K - kontrola, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.





Slika 4.30. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u analiziranim područjima mozga mužjaka dobivene računalnim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

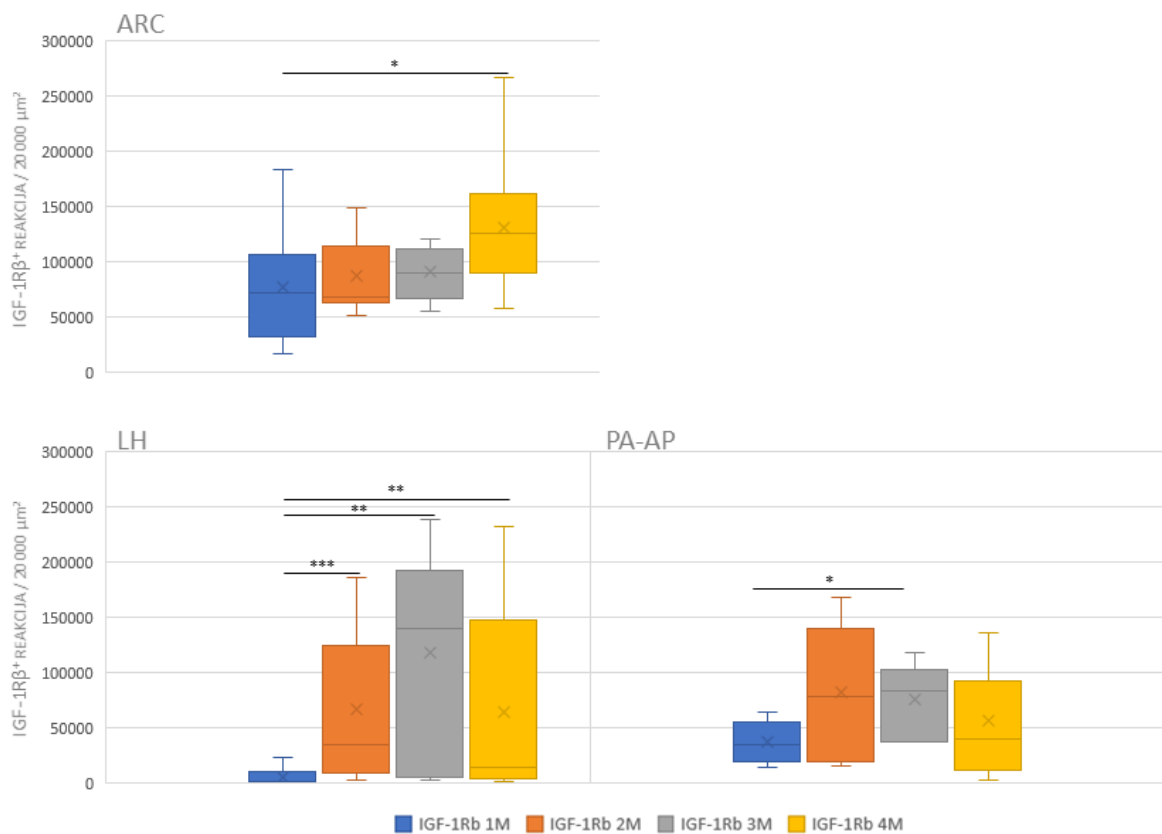
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriori dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.3.1.1. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipotalamusa mužjaka koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetske stanje organizma

Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipotalamusa zaduženih za nadzor hranjenja i energetske stanja organizma. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina mužjaka što je prikazano slikom 4.31. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.21.

HFHSD prehrana nije promijenila izražaj IGF-1R $\beta$  u ARC mužjaka niti tretman metforminom. Međutim, liraglutid je povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u ARC mužjaka, a u kombinaciji s HFHSD je povećanje bilo statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu skupinu 1M ( $U_{1/4} = 28$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 10$ ,  $p = 0,038$ ).

U LH području hipotalamusa mužjaka je HFHSD izazvala značajno povećanje izražaja IR- $\alpha$  u odnosu na LH mužjaka hranjenih sa SD ( $U_{1/2} = 19$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 14$ ,  $p = 0,001$ ). Kombinacija HFHSD i lijekova je rezultirala značajno povećanim izražajem IGF-1R $\beta$  u LH skupina 3M i 4M u odnosu na kontrolnu skupinu 1M ( $U_{1/3} = 13$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,004$ ;  $U_{1/4} = 44$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 18$ ,  $p = 0,007$ ).



Slika 4.31. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u područjima hipotalamusa mozga mužjaka.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, M - mužjaci, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

U PA području hipotalamusa mužjaka je varijabilnost izražaja IGF-1R $\beta$  bila povećana, tako da promatrano povećanje izražaja IGF-1R $\beta$  uslijed HFHSD prehrane nije bilo značajno. Primjena metformina na mužjake na HFHSD je pojačala trend povećanja izražaja IGF-1R $\beta$  uslijed masne prehrane bogate ugljikohidratima pa je povećanje u 3M skupini bilo statistički značajno veće u odnosu na 1M skupinu ( $U_{1/3} = 9, N_1 = 6, N_3 = 9, p = 0,039$ ). Pri usporedbi s kontrolnom 1M skupinom se može uočiti da tretman liraglutidom uz HFHSD nije mijenjao razinu izražaja IGF-1R $\beta$  u PA području hipotalamusa mužjaka.

Zaključno, HFHSD prehrana izaziva trend povećanja izražaja IGF-1R $\beta$  u hipotalamusu mužjaka, koji primjena metformina podupire, ali i liraglutid u slučaju ARC područja. U LH i PA liraglutid vraća razinu izražaja IGF-1R $\beta$  na kontrolnu pri SD prehrani.

Tablica 4.21. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u hipotalamusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,038	> 0,05
HTH-LH	0,001	> 0,05	> 0,05	0,004	0,007	> 0,05
HTH-PA-AP	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,039	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-ARC	$N_1 = 12$	$N_2 = 9$	$N_3 = 10$	$N_4 = 10$		
HTH-LH	$N_1 = 12$	$N_2 = 15$	$N_3 = 9$	$N_4 = 18$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 6$	$N_2 = 12$	$N_3 = 9$	$N_4 = 15$		

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.1.2. Izražaj IGF-1R $\beta$ u dopaminergičkim područjima mužjaka koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

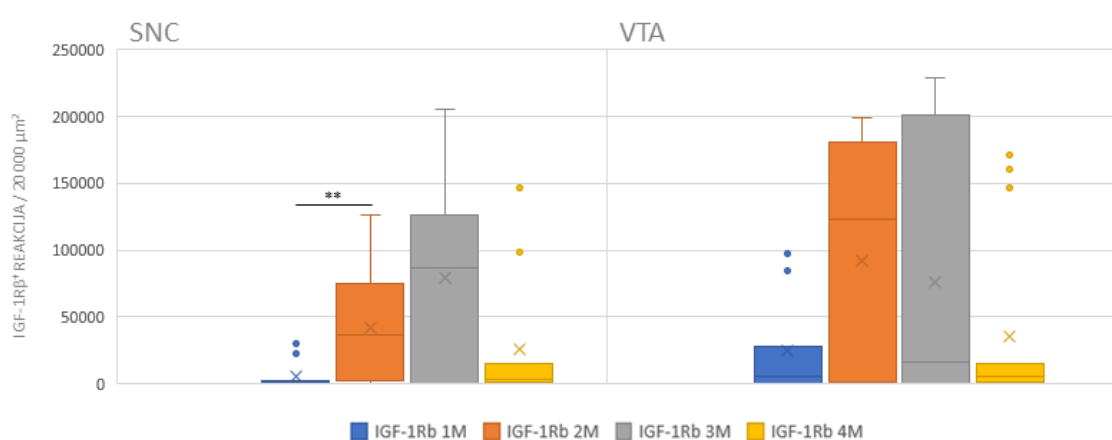
Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u analiziranim područjima svih skupina mužjaka što je prikazano slikom 4.32. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.22.

HFHSD prehrana statistički značajno povećava izražaj IGF-1R $\beta$  u SNC području mužjaka ( $U_{1/2} = 37, N_1 = 15, N_2 = 12, p = 0,010$ ). Uz HFHSD je metformin povećao varijabilnost izražaja IGF-1R $\beta$  u SNC mužjaka u odnosu na obje kontrolne skupine. Terapija liraglutidom je rezultirala manjom

varijabilnošću izražaja IGF-1R $\beta$  u odnosu na kontrolnu skupinu 2M, no u odnosu na kontrolnu skupinu 1M povećanom.

Iako je uočeno povećanje izražaja IGF-1R $\beta$  u VTA području uslijed masne prehrane bogate ugljikohidratima, promjena nije bila statistički značajna. Metformin i liraglutid su u odnosu na kontrolnu 1M skupinu imali podjednak izražaj IGF-1R $\beta$  uz veliku varijabilnost izražaja IGF-1R $\beta$  uslijed kombinacije HFHSD i metformina.

Zaključno, HFHSD prehrana uzrokuje promjenu izražaja IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mužjaka, koju u SNC području podržava i pojačava metformin, dok u VTA području oba ispitivana lijeka vraćaju na kontrolnu razinu pri SD prehrani.



Slika 4.32. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

**Legenda:** IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, M - mužjaci, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.22. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mozga mužjaka.

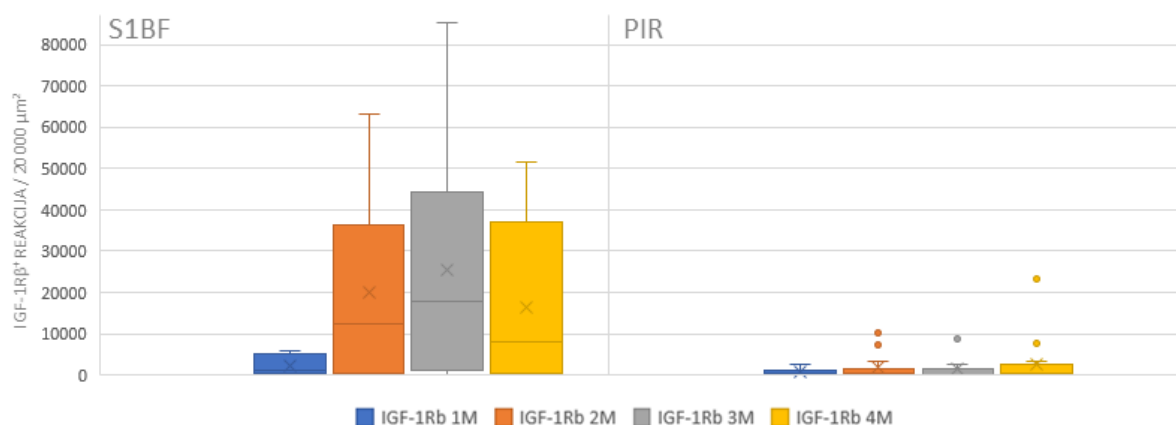
	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	0,010	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
DN-VTA	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
DN-SNC	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 12	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 15		
DN-VTA	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 11	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 15		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.1.3. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima kore mozga mužjaka koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga mužjaka koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane.

S obzirom da nije bilo statistički značajnih promjena u izražaju IGF-1R $\beta$  u kori mozga mužjaka, možemo reći da HFHSD sama ili u kombinaciji s lijekovima nije izazvala promjene u tom području mozga. Slika 4.33. prikazuje izražaj IGF-1R $\beta$  u oba područja kore mozga mužjaka. Razine značajnosti iz kojih možemo izvući gore naveden zaključak su prikazane u tablici 4.23.



Slika 4.33. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u kori mozga mužjaka.

**Legenda:** IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.23. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u kori mozga mužjaka.

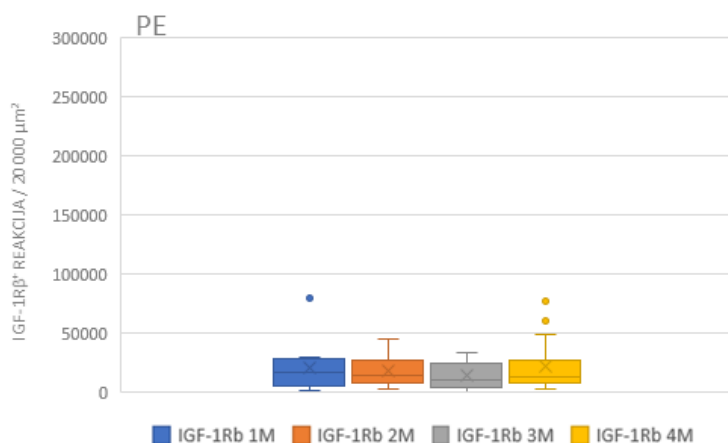
	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
CTX-S1BF	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
CTX-PIR	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
CTX-S1BF	N <sub>1</sub> = 9	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 12	N <sub>4</sub> = 18		
CTX-PIR	N <sub>1</sub> = 9	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 18		

**Legenda:** IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, M - mužjaci, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.1.4. Izražaj IGF-1R $\beta$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa mužjaka koja je uz nadzor energetskeg stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa, koja osim što je uključena u nadzor energetskeg stanja organizma, ima i određenu ulogu u reprodukciji.

S obzirom da nije bilo statistički značajnih promjena u izražaju IGF-1R $\beta$  u PE jezgri hipotalamusa mužjaka, možemo reći da HFHSD sama ili u kombinaciji s lijekovima nije izazvala promjene u tom području mozga. Slika 4.34. prikazuje izražaj IGF-1R $\beta$  u PE jezgri hipotalamusa mužjaka. Razine značajnosti iz kojih možemo izvući gore naveden zaključak su prikazane u tablici 4.24.



Slika 4.34. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u PE području hipotalamusa mužjaka.

**Legenda:** IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, M - mužjaci, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.24. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u PE području hipotalamusa mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-PE	N <sub>1</sub> = 13	N <sub>2</sub> = 16	N <sub>3</sub> = 8	N <sub>4</sub> = 18		

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.1.5. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

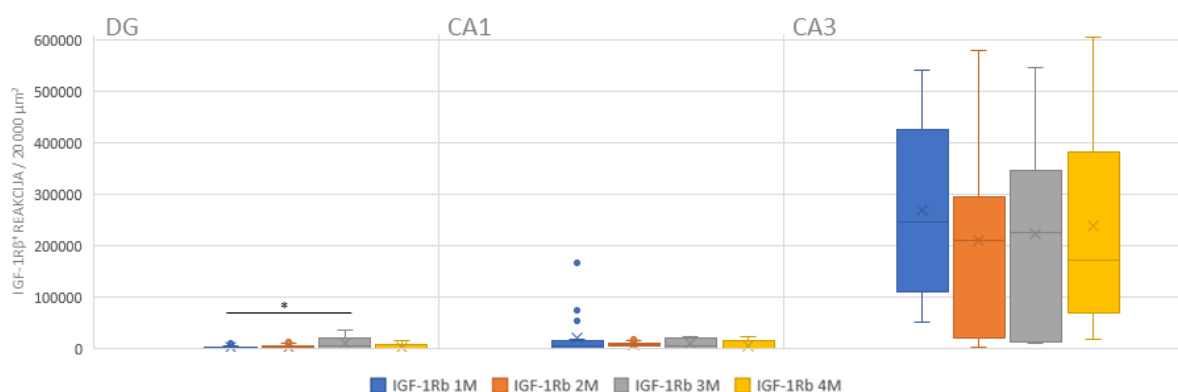
Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina mužjaka što je za svako posebno analizirano područje hipokampusa prikazano slikom 4.35. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.25.

U DG području hipokampusa mužjaka IGF-1R $\beta$  nije imao veliku razinu izraženosti u gotovo svim skupinama mužjaka. Skupina 3M na HFHSD tretirana metforminom je imala statistički značajno veći izražaj IGF-1R $\beta$  u odnosu na skupinu 1M ( $U_{1/3} = 81$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_3 = 14$ ,  $p = 0,027$ ).

U CA1 području mužjaka također nije bilo izrazito puno IGF-1R $\beta$  te se njegova razina nije mijenjala uslijed HFHSD same ili u kombinaciji s lijekovima.

U CA3 području mužjaka je, s druge strane, izražaj IGF-1R $\beta$  bio veći, ali se također njegova razina nije mijenjala.

Zaključno, izražaj IGF-1R $\beta$  je u hipokampusu mužjaka reagirao na HFHSD i tretman metforminom samo unutar DG područja, i to s povećanjem.



Slika 4.35. Usporedba izražaja receptora ObR u hipokampusu mužjaka.

**Legenda:** IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.25. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u hipokampusu mužjaka.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,027	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA3	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
HIPP-CA1	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
VELIČINA UZORKA						
HIPP-DG	N <sub>1</sub> = 21	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 14	N <sub>4</sub> = 22		
HIPP-CA3	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 16	N <sub>3</sub> = 10	N <sub>4</sub> = 21		
HIPP-CA1	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 12	N <sub>4</sub> = 18		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.2. Analiza izražaja receptora IGF-1R $\beta$ u mozgu ženki izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je IGF-1R $\beta$  u mozgovima svih analiziranih skupina ženki izražen. Kontrolni rezovi obojani samo sekundarnim protutijelom su u potpunosti imunonegativni, dakle nije bilo nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Izražaj ObR nije bio u svim skupinama ženki jednak, kao ni u analiziranim područjima. Obojana su bila samo tijela stanica. Nije bilo imunopozitivnog bojanja u vlaknima (Slika 4.32).

Na slici 4.33. prikazane su apsolutne vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  receptora u mozgu ženki dobivene pomoću Fiji računalnog programa.

U skupini ženki na SD prehrani je najveća razina izražaja IGF-1R $\beta$  bila u CA3 i ARC. Najmanji izražaj IGF-1R $\beta$  u mozgu navedenih ženki je bio u PIR, zatim DG i CA1 te u LH. Najveću varijabilnost u izražaju IGF-1R $\beta$  je imalo VTA područje. I u ženki se mogla primijetiti kod mužjaka uočena distribucija IGF-1R $\beta$  – najveći izražaj IGF-1R $\beta$  u CA3, a manji u DG i CA1.

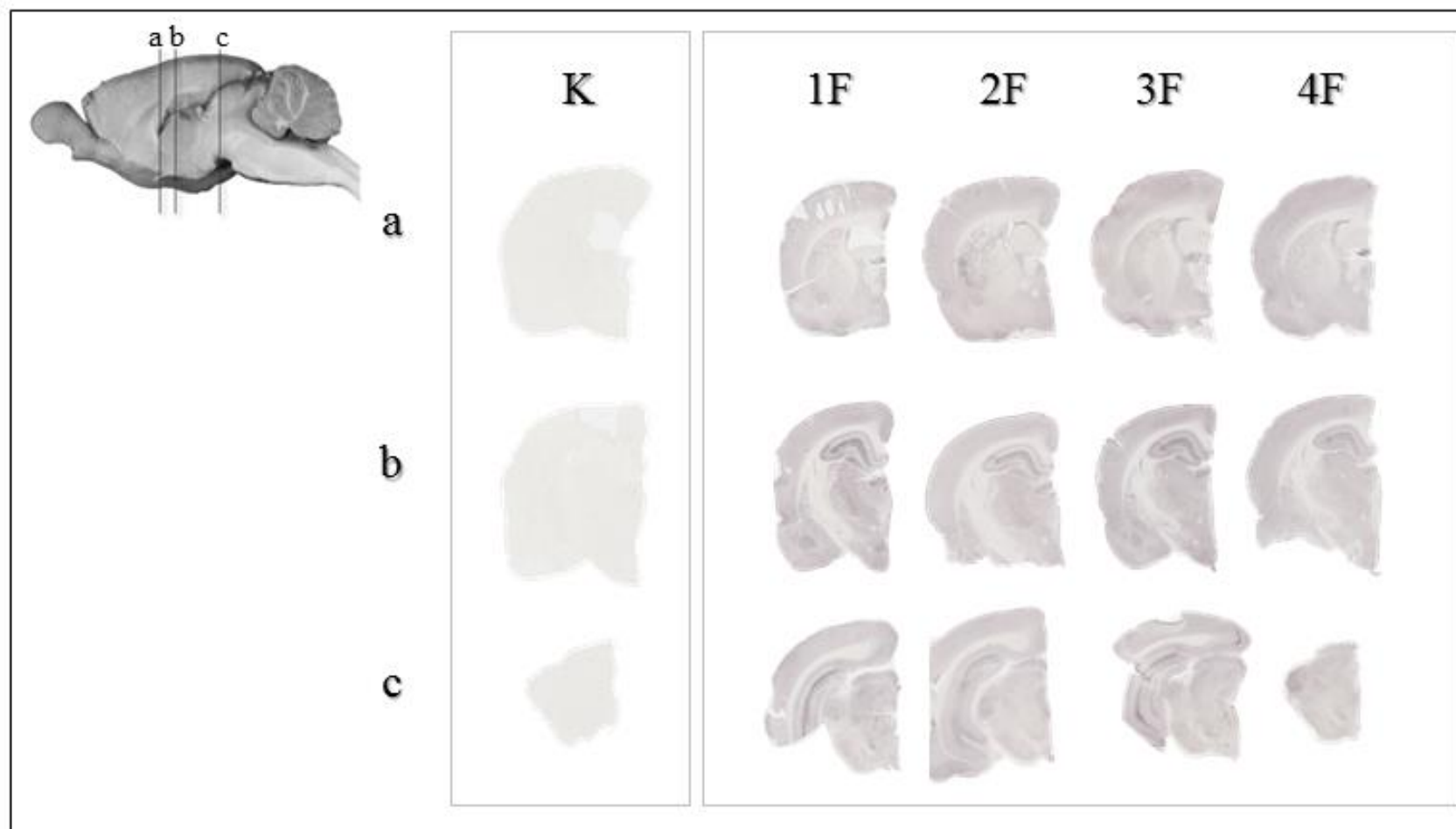
HFHSD prehrana je smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u svim analiziranim područjima mozga ženki. Najveći je izražaj IGF-1R $\beta$  u mozgu ženki na HFHSD prehrani uočen u ARC. Većina područja je imala minimalni izražaj IGF-1R $\beta$ , osim PA, PE, VTA i CA3. IGF-1R $\beta$  je u hipokampusu imao sličnu distribuciju promatranoj u 1F skupini, samo je izraženost IGF-1R $\beta$  bila manja.

U 3F skupini ženki je najveći izražaj IGF-1R $\beta$  bio u PA, a zatim u VTA. Najmanje vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$  u 3F ženki je uočen u kori mozga, hipokampalnom DG području te u hipotalamičkom LH području. Distribucija IGF-1R $\beta$  u hipokampusu 3F ženki je bila takva da CA3 ima najveće vrijednosti izražaja IGF-1R $\beta$ , a DG i CA1 manje, pri čemu je DG imala najmanju vrijednost izražaja.



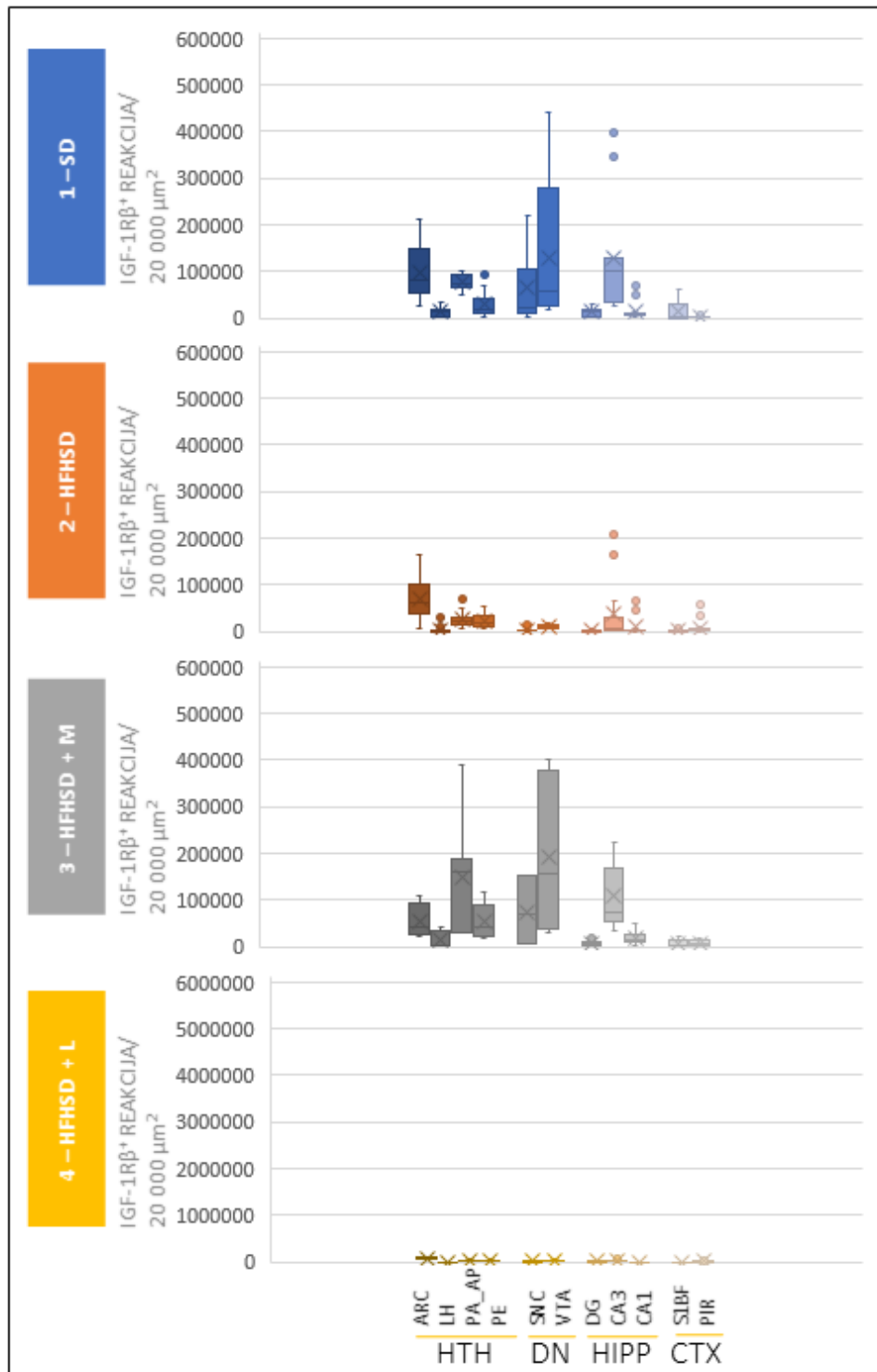
Nakon primjene liraglutida na ženama na HFHSD prehrani došlo je do drastičnog smanjenja izražaja IGF-1R $\beta$  u svim analiziranim područjima mozga. Učinak liraglutida izgleda kao dodatno pojačanje učinka HFHSD prehrane.

Zaključno, najveći izražaj IGF-1R $\beta$  u mozgu ženki je uočen u dopaminergičkom području VTA, CA3 području hipokampusa te u nešto manjoj mjeri u ARC i PA jezgrama hipotalamusa. HFHSD prehrana je drastično smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u mozgu ženki. Dok je metformin podigao razinu izražaja IGF-1R $\beta$  na kontrolnu karakterističnu pri SD prehrani, liraglutid je dodatno spustio razinu izražaja IGF-1R $\beta$  na minimalnu.



Slika 4.36. Imunohistokemijsko obojenje mozga ženki na IGF-1R $\beta$ . a, b i c - odabrane razine koronarnih rezova u kojima se prepoznaju područja mozga za analizu: **a** - PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa; **b** - ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), K - kontrola, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“; **c** - SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma.

**Legenda:** F - ženke, K - kontrola, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom



Slika 4.37. Apsolutne vrijednosti izražaja receptora IGF-1Rβ u analiziranim područjima mozga ženki dobivene računanim programom Fiji. Grafovi vrste „kutija s brkovima“ prikazuju sljedeće podatke: median - crtica u kutiji, gornja kvartila - gornji rub kutije, donja kvartila - donji rub kutije, maksimum - vrh gornjeg brka, minimum - donja granica donjeg brka, srednja vrijednost - znak „X“.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, CTX - kora mozga, DN - dopaminergičko područje, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HIPP - hipokampus, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, PIR - piriformni korteks, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L).

#### 4.1.3.2.1. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipotalamusa ženki koji direktno stimuliraju ili inhibiraju hranjenje te nadziru energetska stanje organizma

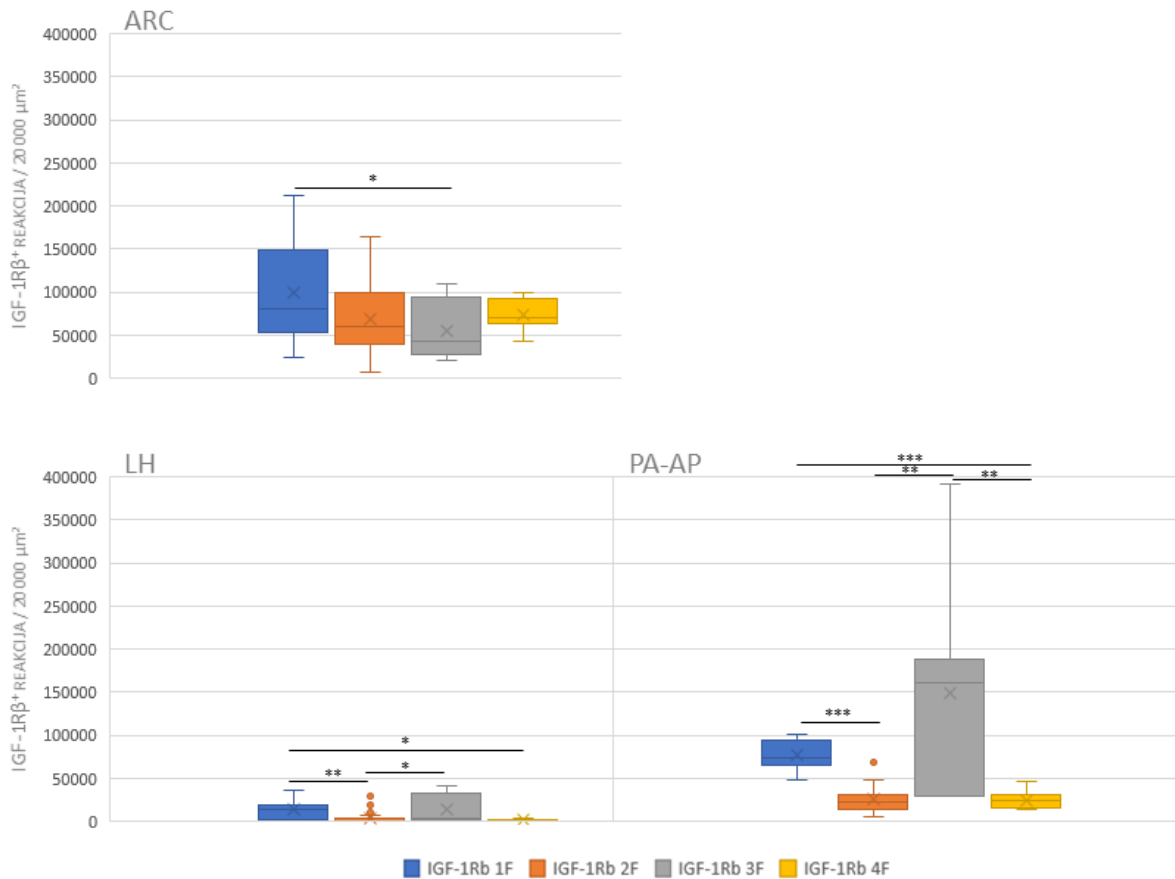
Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipotalamusa zaduženih za nadzor hranjenja i energetske stanja organizma. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina ženki što je prikazano slikom 4.38. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.26.

U ARC ženki je uslijed HFHSD prehrane izražaj IGF-1R $\beta$  bio manji u odnosu na kontrolnu skupinu na SD (1F). Nakon primjene metformina u ženka na HFHSD izražaj IGF-1R $\beta$  je bio dodatno manji što je bilo i statistički značajno manje u odnosu na 1F skupinu ( $U_{1/3} = 30$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_3 = 8$ ,  $p = 0,029$ ). Kombinacija HFHSD i liraglutida nije promijenila izražaj IGF-1R $\beta$  karakterističan za ženke na SD prehrani.

U LH području ženki je HFHSD značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  ( $U_{1/2} = 80$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p = 0,002$ ). Izražaj IGF-1R $\beta$  u LH je u ženki na HFHSD dodatno, i značajno u odnosu na skupinu 1F, smanjila terapija liraglutidom ( $U_{1/4} = 32$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,013$ ). Suprotno terapiji liraglutidom, terapija metforminom je u odnosu na 2F skupinu ženki na HFHSD značajno povećala izražaj IGF-1R $\beta$  u LH području hipotalamusa ženki ( $U_{2/3} = 47$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,033$ ).

HFHSD prehrana je statistički značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u PA području hipotalamusa ženki ( $U_{1/2} = 4$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 15$ ,  $p < 0,001$ ). Tretman metforminom je u PA području ženki na HFHSD statistički značajno povećao izražaj IGF-1R $\beta$  ( $U_{2/3} = 14$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,002$ ), dok tretman liraglutidom nije izazvao promjenu u izražaju IGF-1R $\beta$  u PA zbog HFHSD prehrane. Tako je izražaj IGF-1R $\beta$  u PA hipotalamusa 4F ženki na HFHSD nakon tretmana liraglutidom, slično izražaju IGF-1R $\beta$  u istom području netretiranih ženki na HFHSD, bio statistički značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu 1F ( $U_{1/4} = 0$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Skupina 4F je imala značajno manji izražaj IGF-1R $\beta$  u PA u odnosu na skupinu 3F ( $U_{3/4} = 6$ ,  $N_3 = N_4 = 9$ ,  $p = 0,003$ ).

Zaključno, masna prehrana bogata ugljikohidratima je dovela do smanjenja izražaja IGF-1R $\beta$  u analiziranim područjima hipotalamusa ženki. Dok je tretman metforminom dodatno smanjio izražaj IGF-1R $\beta$  u ARC, koji je već bio smanjen uslijed HFHSD, u LH i PA područjima ga je povećao. Liraglutid je djelovao suprotno od metformina.



Slika 4.38. Usporedba izražaja receptora IGF-1Rβ u područjima hipotalamusa mozga ženki.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, F - ženke, IGF-1Rβ – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.26. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1Rβ u hipotalamusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,029	> 0,05	> 0,05
HTH-LH	0,002	0,033	> 0,05	> 0,05	0,013	> 0,05
HTH-PA-AP	< 0,001	0,002	> 0,05	> 0,05	< 0,001	0,003
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-ARC	$N_1 = 17$	$N_2 = 14$	$N_3 = 8$	$N_4 = 9$		
HTH-LH	$N_1 = 18$	$N_2 = 21$	$N_3 = 9$	$N_4 = 9$		
HTH-PA-AP	$N_1 = 12$	$N_2 = 15$	$N_3 = 9$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, IGF-1Rβ – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

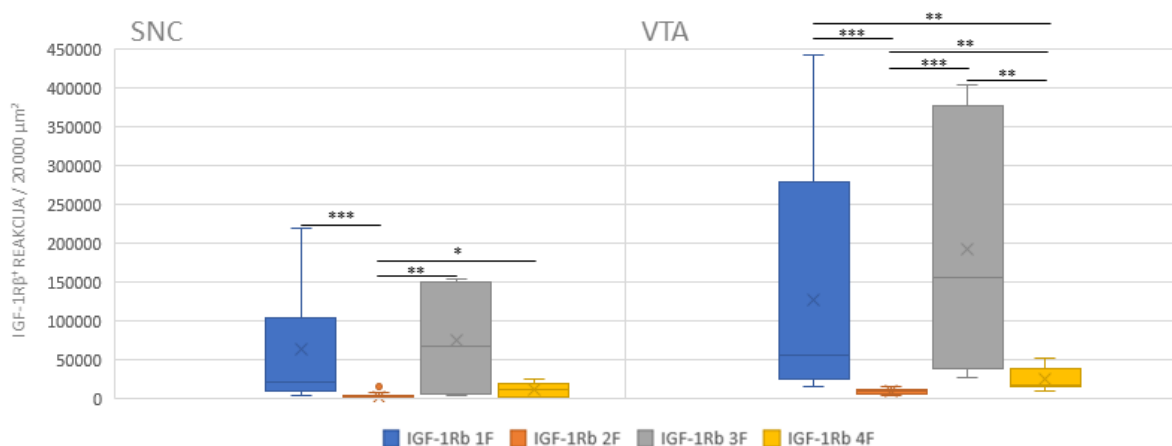
#### 4.1.3.2.2. Izražaj IGF-1R $\beta$ u dopaminergičkim područjima ženki koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u dopaminergičkim područjima mozga ženki. Rezultati analize su prikazani posebno za svako područje. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u analiziranim područjima svih skupina ženki što je prikazano slikom 4.39. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.27.

Izražaj IGF-1R $\beta$  u SNC skupine 2F na HFHSD prehrani je bio značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu 1F ( $U_{1/2} = 9$ ,  $N_1 = N_2 = 15$ ,  $p < 0,001$ ). Tretman ženki na HFHSD metforminom je značajno povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u SNC u odnosu na kontrolnu HFHSD skupinu ( $U_{2/3} = 6$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p = 0,003$ ). U isto vrijeme je tretman ženki na HFHSD liraglutidom djelovao slično na izražaj IGF-1R $\beta$  u SNC – značajno ga je povećao u odnosu na kontrolnu HFHSD skupinu ( $U_{2/4} = 29$ ,  $N_2 = 15$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,023$ ).

U dopaminergičkom VTA području ženki je HFHSD također značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  ( $U_{1/2} = 0$ ,  $N_1 = N_2 = 12$ ,  $p < 0,001$ ). U odnosu na netretirane ženke na HFHSD, značajno povećanje izražaja IGF-1R $\beta$  uslijed tretmana metforminom i liraglutidom je uočen i u VTA području ženki na HFHSD prehrani ( $U_{2/3} = 0$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p = 0,001$ ;  $U_{2/4} = 9$ ,  $N_2 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,002$ ). Ipak, 3F skupina tretirana metforminom je imala statistički značajno veći izražaj IGF-1R $\beta$  u VTA nego skupina 4F tretirana liraglutidom ( $U_{3/4} = 4$ ,  $N_3 = 6$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,008$ ). Kombinacija HFHSD i tretmana liraglutidom je u odnosu na kontrolnu skupinu 1F na SD prehrani, rezultirala značajnim smanjenjem izražaja IGF-1R $\beta$  u VTA ( $U_{1/4} = 17$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,009$ ).

Zaključno, HFHSD prehrana je značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mozga ženki. Metformin ga je povećao i iznad razine karakteristične u SD hranjenim ženkama. Liraglutid je u slučaju SNC vratio izražaj na kontrolnu razinu pri SD, no u slučaju VTA nije.



Slika 4.39. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.27. Razine značajnosti razlika u izražaju IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
DN-SNC	< 0,001	0,003	0,023	> 0,05	> 0,05	> 0,05
DN-VTA	< 0,001	0,001	0,002	> 0,05	0,009	0,008
VELIČINA UZORKA						
DN-SNC	N <sub>1</sub> = 15	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 6	N <sub>4</sub> = 9		
DN-VTA	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 12	N <sub>3</sub> = 6	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

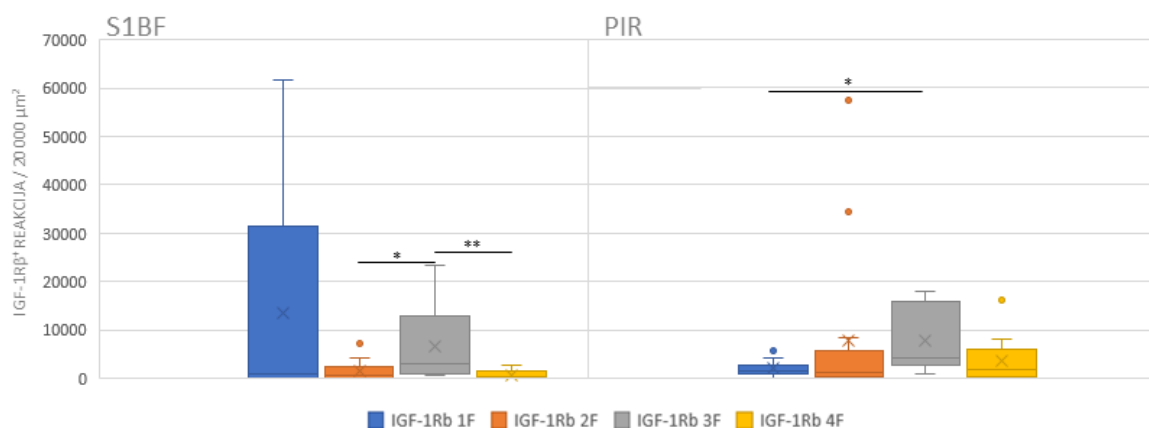
#### 4.1.3.2.3. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima kore mozga ženki koji indirektno utječu na motivaciju hranjenja

Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima kore mozga ženki koje indirektno utječu na odluku o unosu hrane. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki, što je za svako posebno područje prikazano slikom 4.40. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.28.

HFHSD je u S1BF ženki smanjila varijabilnost izražaja IGF-1R $\beta$  u odnosu na ženke na SD prehrani, ali ne i vrijednost. Skupina ženki na HFHSD tretiranih metforminom su imale statistički značajno veći izražaj IGF-1R $\beta$  u S1BF u odnosu na netretirane ženke na HFHSD prehrani ( $U_{2/3} = 38$ ,  $N_2 = 18$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,029$ ). U S1BF ženki skupine 3F je izražaj IGF-1R $\beta$  bio značajno manji u odnosu na ženke iz skupine 4F ( $U_{3/4} = 8$ ,  $N_3 = N_4 = 9$ ,  $p = 0,005$ ).

U PIR području kore mozga ženki HFHSD sama nije promijenila izražaj IGF-1R $\beta$ , ali u kombinaciji s metforminom je izražaj IGF-1R $\beta$  bio značajno veći u odnosu na kontrolnu 1F skupinu ( $U_{1/3} = 19$ ,  $N_1 = 15$ ,  $N_3 = 6$ ,  $p = 0,047$ ).

Zaključno, HFHSD nije izazvala promjenu u izražaju IGF-1R $\beta$  u kori mozga ženki, kao ni kombinacija HFHSD i liraglutida. Međutim, HFHSD i metformin su izazvali značajne promjene u izražaju IGF-1R $\beta$  u kori mozga ženki.



Slika 4.40. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u kori mozga ženki.

**Legenda:** F - ženke, IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Tablica 4.28. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u kori mozga ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,029	> 0,05	> 0,05
HTH-LH	0,002	0,033	> 0,05	> 0,05	0,013	> 0,05
HTH-PA-AP	< 0,001	0,002	> 0,05	> 0,05	< 0,001	0,003
<b>VELIČINA UZORKA</b>						
HTH-ARC	N <sub>1</sub> = 17	N <sub>2</sub> = 14	N <sub>3</sub> = 8	N <sub>4</sub> = 9		
HTH-LH	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 21	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 9		
HTH-PA-AP	N <sub>1</sub> = 12	N <sub>2</sub> = 15	N <sub>3</sub> = 9	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.2.4. Izražaj IGF-1R $\beta$ u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa ženki koja je uz nadzor energetskeg stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

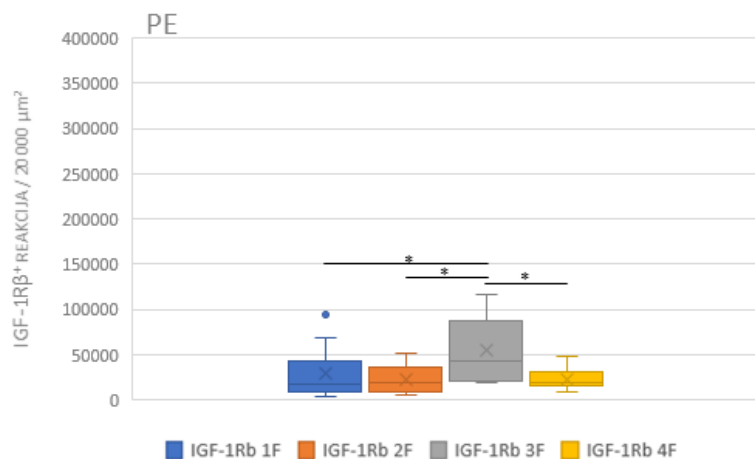
Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u PE jezgri hipotalamusa, koja osim što je uključena u nadzor energetskeg stanja organizma, ima i određenu ulogu u reprodukciji. Slika 4.41. prikazuje izražaj IGF-1R $\beta$  u PE svih skupina ženki. Tablicom 4.29. su prikazane razine značajnosti u razlikama izražaja IGF-1R $\beta$  između skupina ženki.

HFHSD prehrana nije promijenila izražaj IGF-1R $\beta$  u PE jezgri hipotalamusa ženki, kao ni kombinacija HFHSD i tretmana liraglutidom. Međutim, tretman ženki na HFHSD metforminom je doveo do statistički značajnijeg porasta u izražaju IGF-1R $\beta$  u odnosu na sve ostale promatrane skupine



( $U_{1/3} = 37$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,025$ ;  $U_{2/3} = 34$ ,  $N_2 = 19$ ,  $N_3 = 9$ ,  $p = 0,012$ ;  $U_{3/4} = 15$ ,  $N_3 = N_4 = 9$ ,  $p = 0,027$ ).

Dok samo HFHSD prehrana ne mijenja izražaj IGF-1R $\beta$  u PE jezgri hipotalamusa u ženki, metformin je u odnosu na obje kontrolne skupine značajno podiže. U isto vrijeme, liraglutid nije izazvao nikakve promjene u izražaju IGF-1R $\beta$  u PE.



Slika 4.41. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u PE području hipotalamusa ženki.

**Legenda:** F - ženke, IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.29. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u PE području hipotalamusa ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-PE	> 0,05	0,012	> 0,05	0,025	> 0,05	0,027
VELIČINA UZORKA						
HTH-PE	$N_1 = 18$	$N_2 = 19$	$N_3 = 9$	$N_4 = 9$		

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.2.5. Izražaj IGF-1R $\beta$ u područjima hipokampusa ženki čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

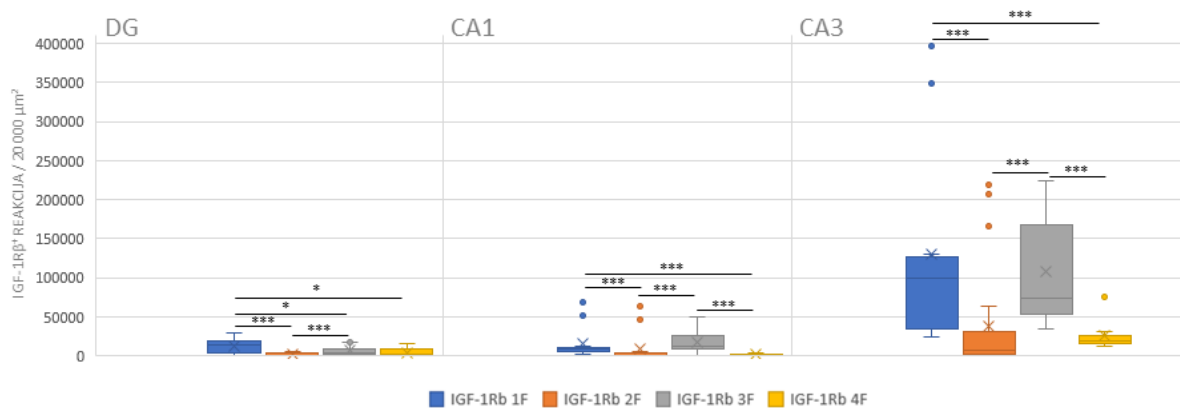
Izražaj IGF-1R $\beta$  je imunohistokemijski analiziran u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja te snalaženje u prostoru. IGF-1R $\beta$  nije bio jednako izražen u hipokampusu svih skupina ženki što je za svako posebno analizirano područje hipokampusa prikazano slikom 4.42. Razine značajnosti niže navedenih razlika su prikazane u tablici 4.30.

U DG području skupine 2F je izražaj IGF-1R $\beta$  bio značajno smanjen u odnosu na 1F skupinu ( $U_{1/2} = 55$ ,  $N_1 = 22$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p < 0,001$ ). Metformin je u DG ženki na HFHSD statistički značajno povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u odnosu na HFHSD kontrole ( $U_{2/3} = 55$ ,  $N_2 = 25$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p < 0,001$ ). Izražaj IGF-1R $\beta$  u DG području 3F i 4F skupine je bio značajno manji u odnosu na kontrolnu 1F skupinu ( $U_{1/3} = 100$ ,  $N_1 = 22$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,046$ ;  $U_{1/4} = 41$ ,  $N_1 = 22$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,012$ ).

U CA1 području ženki je uočeno značajno smanjenje u izražaju IGF-1R $\beta$  uslijed HFHSD prehrane ( $U_{1/2} = 60$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p < 0,001$ ). Kombinacija HFHSD i metformina u DG ženki na HFHSD je značajno povećala izražaj IGF-1R $\beta$  u odnosu na netretirane ženke ( $U_{2/3} = 58$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p = 0,001$ ). Za to vrijeme je kombinacija HFHSD i liraglutida rezultirala značajnim smanjenjem izražaja IGF-1R $\beta$  u DG ženki u odnosu na kontrolnu SD skupinu (1F) ( $U_{1/4} = 7$ ,  $N_1 = 18$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Skupina ženki 3F je imala značajno veći izražaj IGF-1R $\beta$  u DG području u odnosu na skupinu ženki 4M ( $U_{3/4} = 8$ ,  $N_3 = 15$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p = 0,001$ ).

HFHSD je i u CA3 području značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u odnosu na kontrolnu 1F skupinu ( $U_{1/2} = 55$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_2 = 21$ ,  $p < 0,001$ ). Metformin je u CA3 ženki na HFHSD značajno povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u odnosu na netretirane HFHSD ženke ( $U_{2/3} = 43$ ,  $N_2 = 21$ ,  $N_3 = 15$ ,  $p < 0,001$ ). Kombinacija liraglutida i HFHSD je u odnosu na kontrolnu skupinu 1F značajno smanjila izražaj IGF-1R $\beta$  u CA3 ( $U_{1/4} = 9$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Ženke na HFHSD tretirane metforminom su imale značajno veći izražaj IGF-1R $\beta$  u CA3 u odnosu na tretirane liraglutidom ( $U_{3/4} = 8$ ,  $N_3 = 15$ ,  $N_4 = 9$ ,  $p < 0,001$ ).

Zaključno, masna prehrana bogata ugljikohidratima je izazvala smanjenje izražaja IGF-1R $\beta$  u svim analiziranim područjima hipokampusu ženki. Dok je metformin uspio vratiti izražaj na razinu karakterističnu pri SD prehrani, osim u DG, liraglutid nije.



Slika 4.42. Usporedba izražaja receptora IGF-1R $\beta$  u hipokampusu ženki.

**Legenda:** CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusu 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusu (engl. *dentate gyrus*), F - ženke, IGF-1R $\beta$  – beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Tablica 4.30. Razine značajnosti razlika u izražaju IGF-1R $\beta$  u hipokampusu ženki.

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	< 0,001	< 0,001	> 0,05	0,046	0,012	> 0,05
HIPP-CA3	< 0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05	< 0,001	< 0,001
HIPP-CA1	< 0,001	0,001	> 0,05	> 0,05	< 0,001	0,001
VELIČINA UZORKA						
HIPP-DG	N <sub>1</sub> = 22	N <sub>2</sub> = 25	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA3	N <sub>1</sub> = 17	N <sub>2</sub> = 21	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 9		
HIPP-CA1	N <sub>1</sub> = 18	N <sub>2</sub> = 21	N <sub>3</sub> = 15	N <sub>4</sub> = 9		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

## 4.2. Analiza biljega glije – GFAP, Iba1 i Nestin u odabranim područjima hipotalamusa i hipokampusa

Korištenim protutijelima anti-GFAP i anti-Iba1 specifično su detektirani proteini biljezi astroglije (GFAP) te biljezi mikroglije (Iba1). Fluorescentna imunohistokemija s protutijelom anti-Nestin nije rezultirala specifičnim obojenjem.

Izražaji proteina GFAP i Iba1 su analizirani u područjima hipotalamusa zaduženim za nadzor energetske stanja organizma te u područjima hipokampusa koja su neposredno zadužena za stvaranje i održavanje pamćenja, kao i snalaženje u prostoru. Rezultati su prikazani najprije za GFAP, zatim za Iba1. Prvo su prikazani rezultati analize u hipotalamusu, a zatim u hipokampusu. Opisani rezultati se prvo odnose na mužjake, a zatim na ženke.

### 4.2.1. ANALIZA IZRAŽAJA GFAP, BILJEGA ASTROCITA, U MOZGU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH SD ILI HFHSD PREHRANI S ILI BEZ TRETMANA METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM

Astroцити су станце које подупиру рад неурона у мозгу. Услијед оштећења или упале, наведене станце посредују смиривању упале и поправку оштећења како би се функције мозга нормализирале, односно вратиле у хомеостазу. При нормалним увјетима астрoцити готово не изражавају GFAP, али у случају оштећења изражај GFAP се повећава.

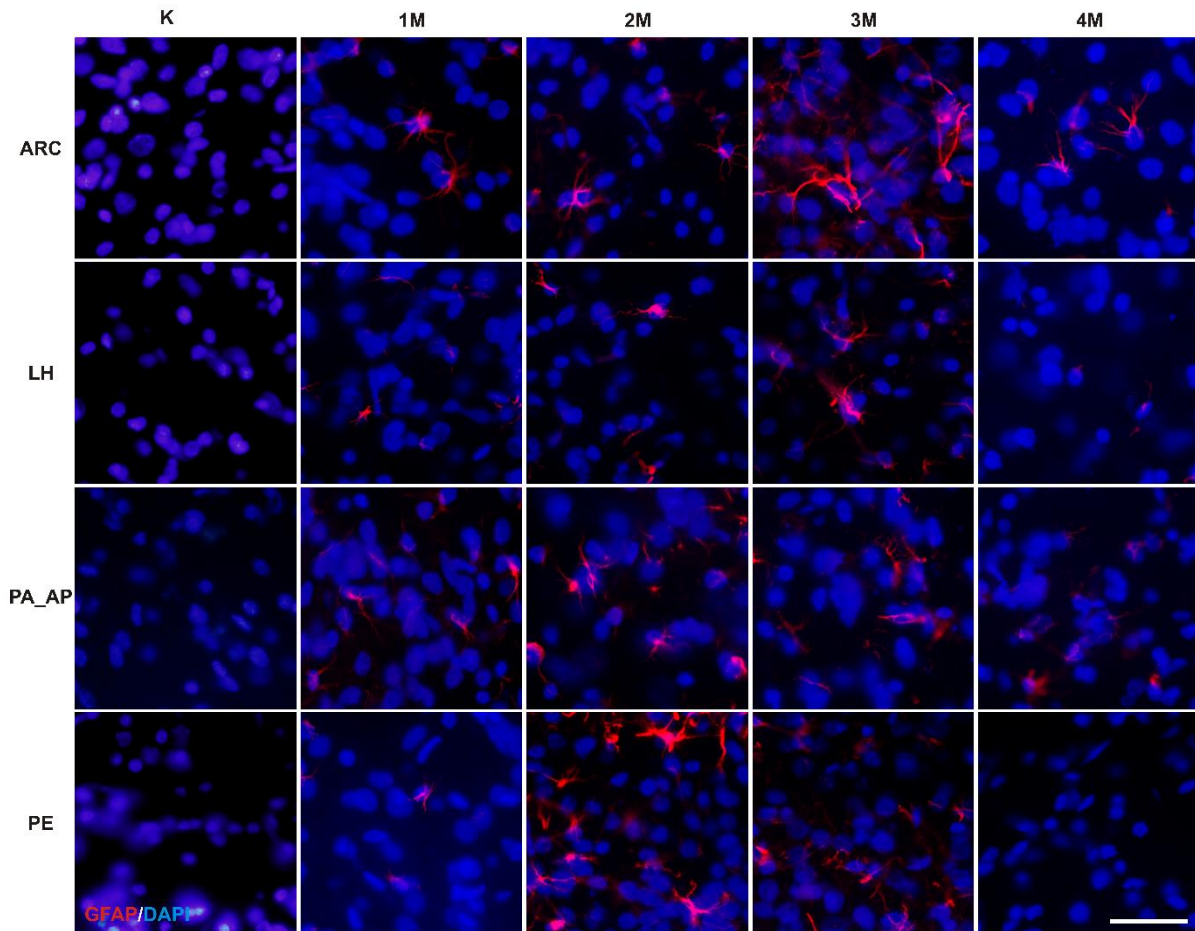
#### 4.2.1.1. *Analiza izražaja GFAP u hipotalamusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom*

Već pri akutnom izlaganju masnoj prehrani dokazano se razvija upala u hipotalamusu, što se očituje povećanim izražajem GFAP proteina. Prikazani rezultati pokazuju utjecaj kroničnog izlaganja hrani bogatoj ne samo mastima nego i ugljikohidratima, na astrogliju u područjima hipotalamusa mužjaka i ženki štakora. Analiziran je i utjecaj antidijabetika na astrogliju navedenog područja mozga.

##### 4.2.1.1.1. Izražaj GFAP u područjima hipotalamusa mužjaka

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je GFAP u hipotalamusu mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. GFAP nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka (slika 4.43).

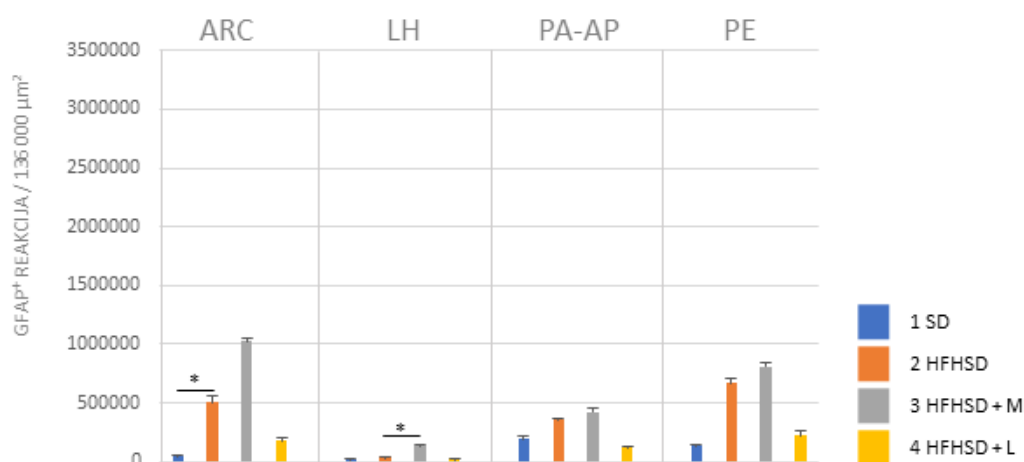
Slikom 4.44. prikazane su srednje vrijednosti izražaja GFAP u hipotalamusu mužjaka dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj GFAP je uočen u ARC 3M skupine mužjaka, a najmanji u LH području 1M i 4M skupina. PE jezgra je sljedeća nakon ARC u kojoj se povećao izražaj GFAP uslijed kroničnog izlaganja HFHSD prehrani.



Slika 4.43. Izražaj GFAP proteina u hipotalamusu mužjaka. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), GFAP - kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), K – negativna kontrola za sekundarno protutijelo, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, M - mužjaci, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Kvantifikacijom fluorescentnog imunohistokemijskog obojenja područja HTH, zaslužnih za kontrolu sitosti, s protutijelom anti-GFAP uočeno je veći izražaj GFAP u skupini 2M, koji je i statistički značajno veći u ARC ( $N_1 = 3, N_2 = 3, p = 0,049$ ), nego u hipotalamusu mužjaka iz 1M skupine. U odnosu na mužjake iz skupine 1M, mužjaci iz skupine 3M su imali veći izražaj GFAP u HTH, dok su 4M imali povećan izražaj GFAP u ARC i PE. Pri usporedbi s 2M skupinom mužjaci iz 3M skupine su imali povećan izražaj GFAP u svim analiziranim područjima HTH, pri čemu je povećanje statistički značajno u LH ( $N_2 = 3, N_3 = 3, p = 0,049$ ). S druge strane, 4M su u odnosu na 2M imali smanjen izražaj GFAP u svim analiziranim područjima HTH. Prilikom usporedbe učinaka metformina i liraglutida na izražaj GFAP u HTH pretilih i predijabetičnih mužjaka utvrđen je veći izražaj GFAP u mužjacima na HFHSD tretiranih metforminom (slika 4.44).



Slika 4.44 Usporedba izražaja GFAP u područjima hipotalamusa mužjaka.

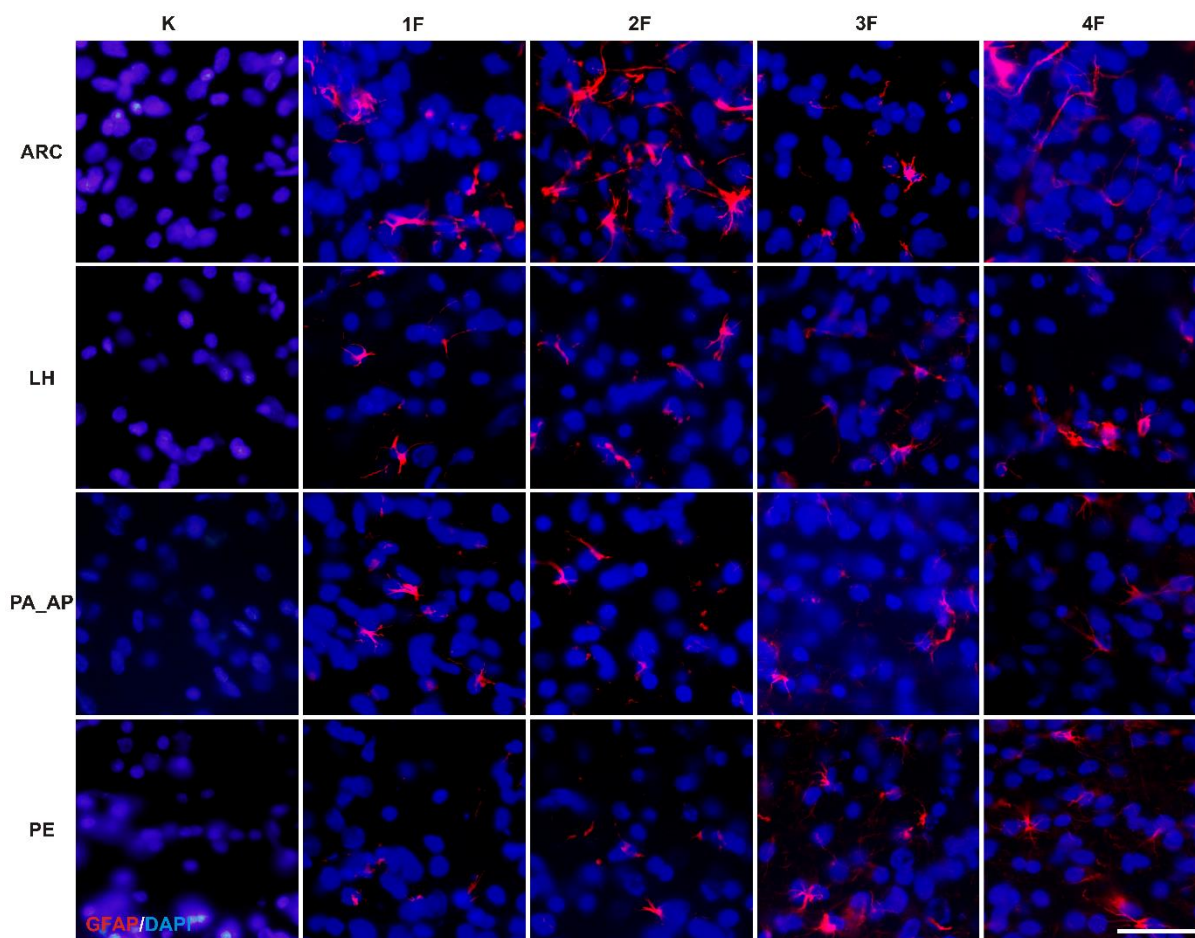
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriori dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.1.1.2. Izražaj GFAP u područjima hipotalamusa ženki

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je GFAP u hipotalamusu ženki doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, što znači da nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. GFAP nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki (slika 4.45).

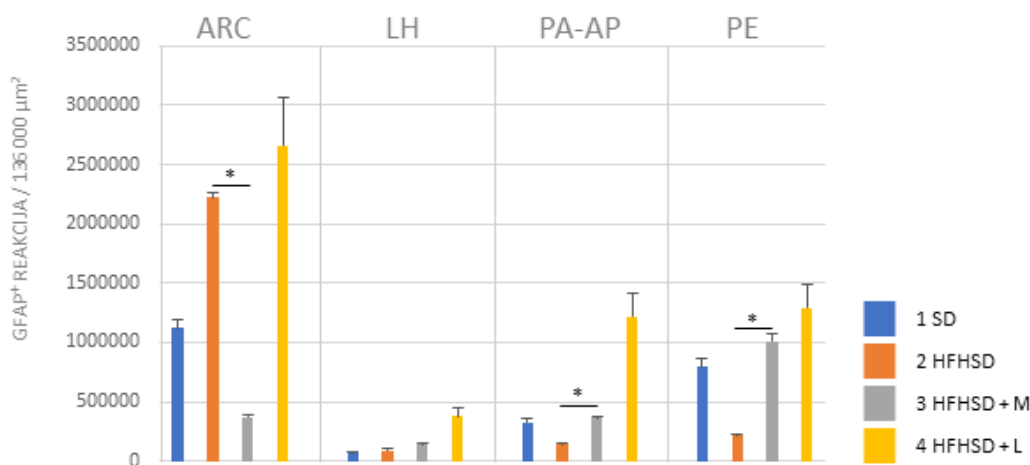
Slikom 4.46. prikazane su srednje vrijednosti izražaja GFAP u hipotalamusu ženki dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj GFAP je bio u ARC 4F skupine, a zatim 2F skupine. Najmanji izražaj GFAP je uočen u LH područjima 1F skupine.

Ženke iz skupine 2F su u odnosu na 1F imale veći izražaj GFAP samo u ARC, dok je izražaj GFAP u PA-AP i PE bio manji. Ženke 3F skupine su imale manji izražaj GFAP u ARC, a u ostalim područjima HTH veći u odnosu na 1F ženke. 4F ženke su u odnosu na 1F imale povećan izražaj GFAP u svim analiziranim regijama HTH. Pri usporedbi skupina 2F i 3F uočen je statistički značajno smanjen izražaj GFAP u ARC ( $N_2 = 3$ ,  $N_3 = 3$ ,  $p = 0,049$ ), dok je u ostalim područjima HTH izražaja GFAP bio povećan, pri čemu su povećanja u PA-AP i PE statistički značajna (u PA-AP i u PE:  $N_2 = 3$ ,  $N_3 = 3$ ,  $p = 0,049$ ). Ženke iz skupine 4F su u odnosu na 2F imale veći izražaj GFAP u svim analiziranim područjima HTH. Kada su se usporedili učinci metformina i liraglutida na izražaj GFAP u HTH pretilih i predijabetičnih ženki, uočen je veći izražaj GFAP u ženki na HFHSD tretiranih liraglutidom (slika 4.46).



Slika 4.45. Izražaj GFAP proteina u hipotalamusu ženki. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole), F - ženke, GFAP - kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.



Slika 4.46. Usporedba izražaja GFAP u područjima hipotalamusa ženki.

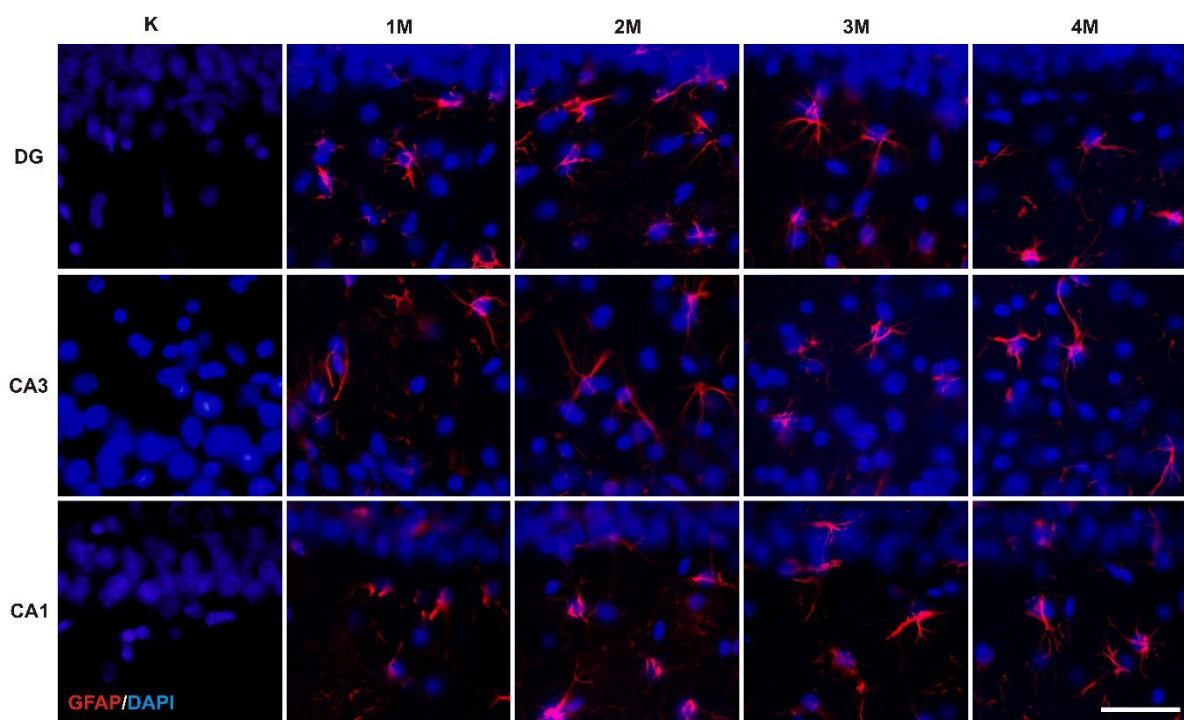
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.1.2. Analiza izražaja GFAP u hipokampusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Hipokampus je mjesto bitno za navigaciju i pamćenje podražaja, a te se sposobnosti narušavaju u slučaju oštećenja. Hipokampus je mjesto koje omogućuje organizmu ponašanje karakteristično za vrstu. Pokazalo se da kroničan unos prehrane bogate mastima oštećuje i ovu moždanu strukturu, što utječe na sposobnost rješavanja složenih zadataka i snalaženja u prostoru. Prikazani rezultati pokazuju utjecaj kroničnog izlaganja hrani bogatoj ne samo mastima nego i ugljikohidratima na astrogliju u područjima hipokampusa mužjaka i ženki štakora. Analiziran je i utjecaj antidijabetika na astrogliju navedenog područja mozga.

##### 4.2.1.2.1. Izražaj GFAP u područjima hipokampusa mužjaka

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je GFAP u hipokampusu mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipokampusu štakora. GFAP nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka (slika 4.47).



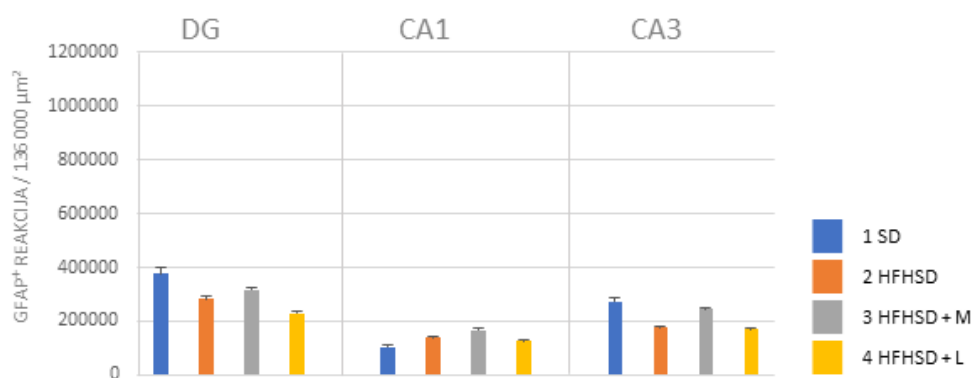
Slika 4.47. Izražaj GFAP proteina u hipokampusu mužjaka. Povećanje 400X, skala 50  $\mu$ m.

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), GFAP – kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.



Slikom 4.48. prikazane su srednje vrijednosti izražaja GFAP u hipokampusu mužjaka dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj GFAP je bio u DG području 1M skupine. Najmanji izražaj GFAP je uočen u CA1 području 1M skupine. Svi ostali izražaji su bili između navedene dvije vrijednosti.

U HIPP mužjaka iz 2M skupine GFAP je bio manje izražen u DG, a više u CA1 i CA3, u usporedbi s mužjacima iz 1M skupine. Pri usporedbi 3M ili 4M skupine mužjaka sa 1M skupinom nisu uočene promjene u izražaju GFAP u analiziranim područjima HIPP. Dok su 3M mužjaci u odnosu na 2M imali veći izražaj GFAP, 4M su imali manji u sva tri analizirana područja HIPP. Kada su se usporedili učinci metformina i liraglutida na izražaj GFAP u HIPP pretilih i predijabetičnih mužjaka utvrđeno je da su 4M mužjaci imali manji izražaj GFAP u analiziranim područjima HIPP.



Slika 4.48. Usporedba izražaja GFAP u područjima hipokampusa mužjaka.

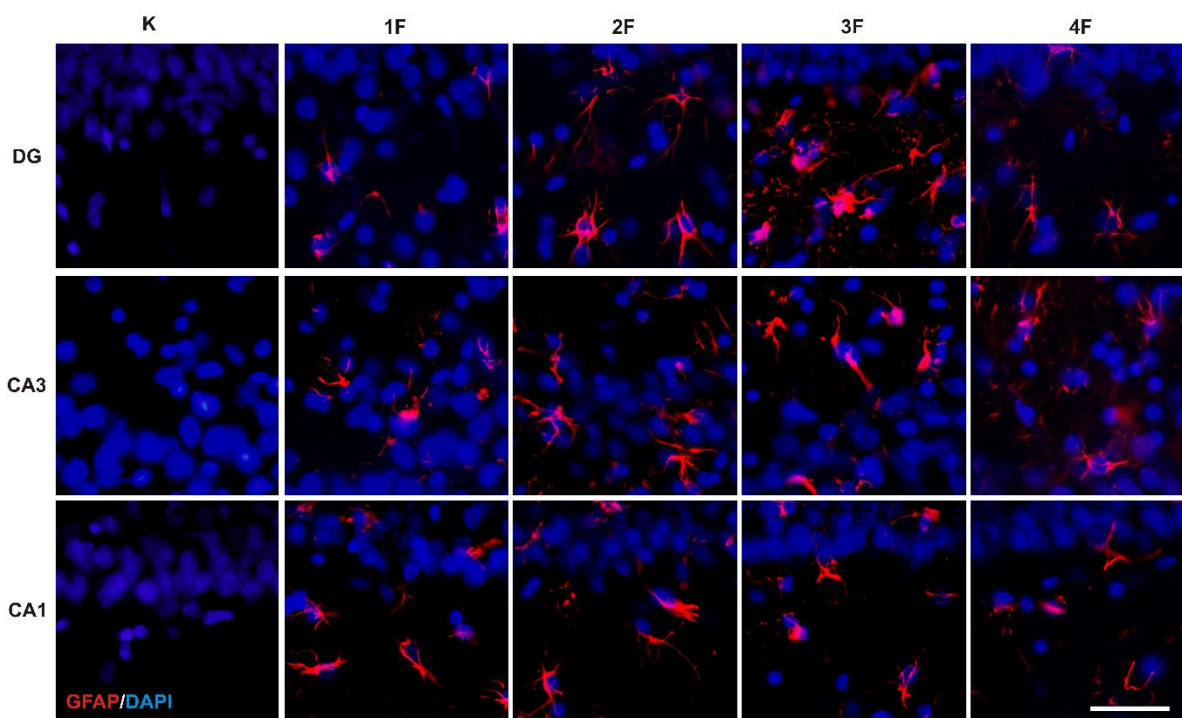
**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), GFAP – kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.1.2.2. Izražaj GFAP u područjima hipokampusa ženki

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je GFAP u hipokampusu ženki doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipokampusu štakora. GFAP nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka (slika 4.49).

Slikom 4.50. prikazane su srednje vrijednosti izražaja GFAP u hipokampusu ženki dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj GFAP je bio u CA3 području 4F skupine, a najmanji je uočen u istom području, ali ovaj puta u 1F skupini.

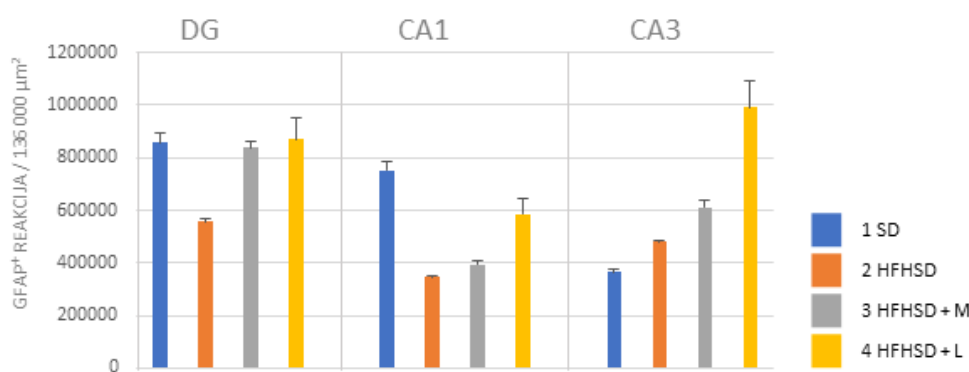
U ženki iz skupine 2F je uočen manji izražaj GFAP u DG i CA1, ali veći u CA3 području od ženki iz skupine 1F. Ženke iz skupine 3F su u odnosu na ženke iz skupine 1F imale manji izražaj GFAP u DG i CA1, ali ne i u CA3, gdje je izražaj GFAP bio povećan. Pri usporedbi 1F i 4F uočeno je povećanje izražaja GFAP u CA3 i smanjenja u CA1.



Slika 4.49. Izražaj GFAP proteina u hipokampusu ženki. Povećanje 400X, skala 50 µm.

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), F - ženke, GFAP – kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Kada su se usporedile skupine 2F i 3F, utvrđeno je da su ženke iz skupine 3F povećan izražaj GFAP u sva tri analizirana područja HIPP, kao i ženke iz skupine 4F. Usporedbom učinaka metformina i liraglutida na izražaj GFAP u HIPP pretilih i predijabetičnih ženki utvrđeno je da su ženke iz skupine 4F imale veći izražaj GFAP (slika 4.50).



Slika 4.50. Usporedba izražaja GFAP u područjima hipokampusa ženki.

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), GFAP – kiseli fibrilarni protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.2. ANALIZA IZRAŽAJA Iba1, BILJEGA MIKROGLIJE, U MOZGU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH SD ILI HFHSD PREHRANI S ILI BEZ TRETMANA METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM

Mikroglia su stanice mozga koje prve detekiraju oštećenje tkiva te na njega odgovaraju povećanjem svoje brojnosti i lučenjem pro-upalnih molekula. Iba1 je biljeg mikroglije te se protutijelom anti-Iba1 detektirala mikroglia u mozgu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom.

##### 4.2.2.1. *Analiza izražaja Iba1 u hipotalamusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom*

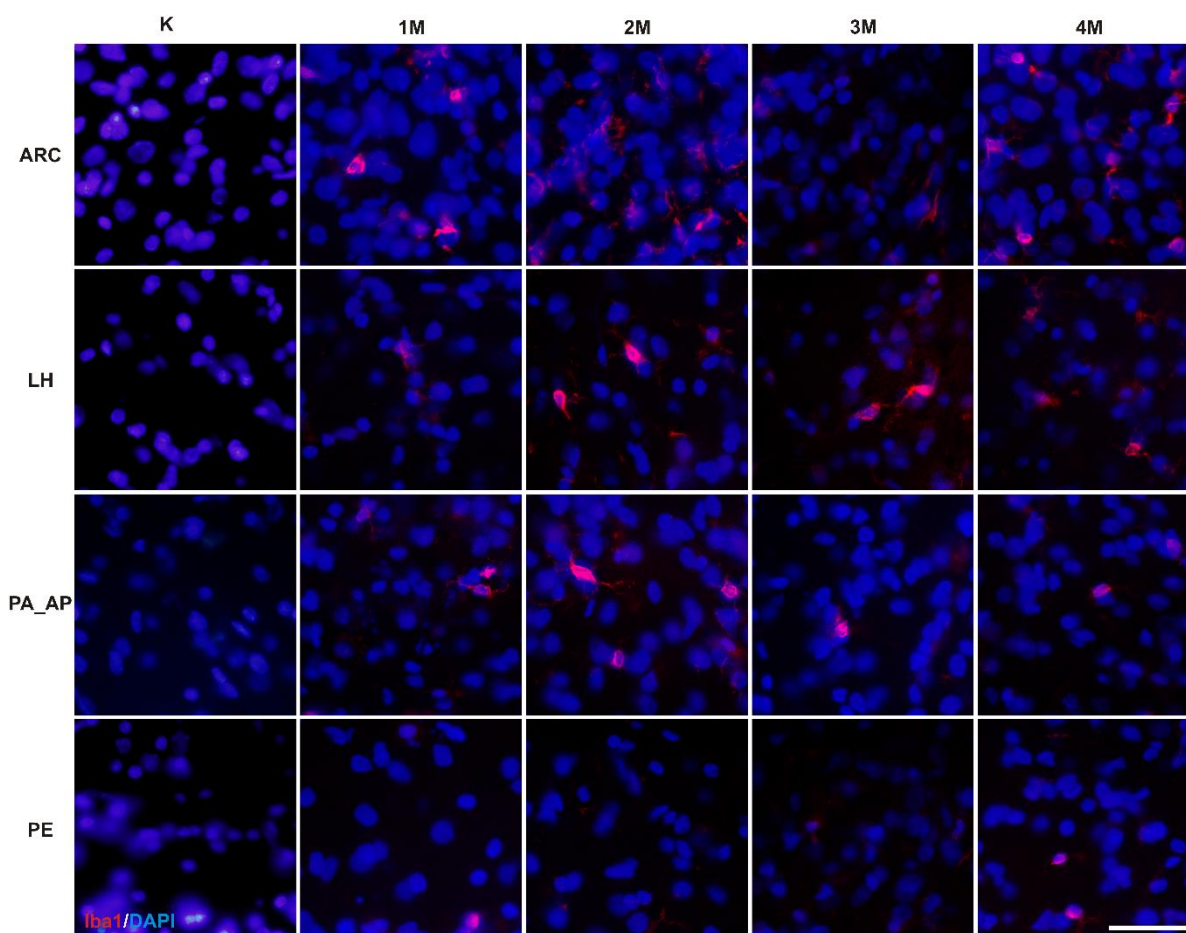
Pri kroničnom izlaganju masnoj prehrani dokazano se razvija upala u hipotalamusu, što se očituje povećanjem brojnosti mikroglijalnih stanica. Prikazani rezultati pokazuju utjecaj kroničnog izlaganja HFHSD prehrani na mikrogliju u odabranim područjima mozga mužjaka i ženki štakora.

##### 4.2.2.1.1. Izražaj Iba1 u područjima hipotalamusa mužjaka

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je protein Iba1 u hipotalamusu mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. Iba1 protein nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka (slika 4.51).

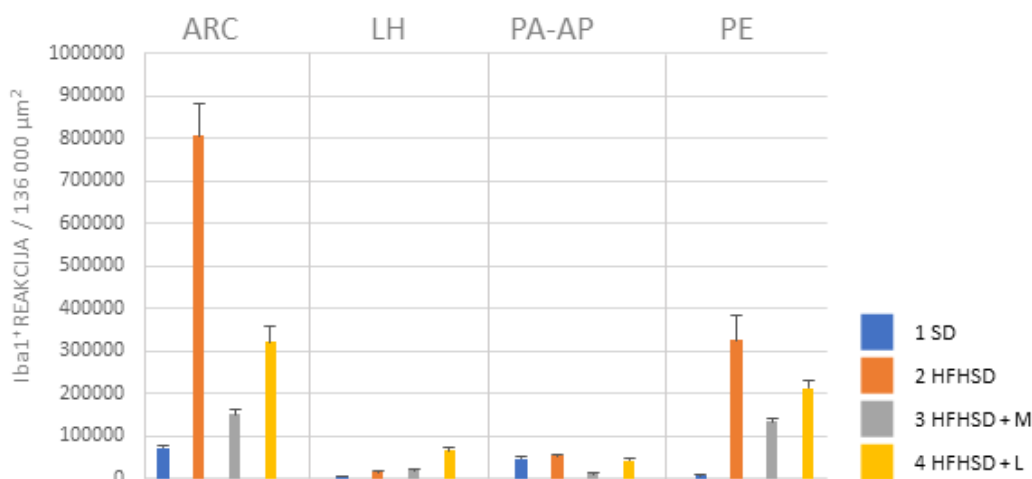
Slikom 4.52. prikazane su srednje vrijednosti izražaja Iba1 u hipotalamusu mužjaka dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj Iba1 je uočen u ARC 2M skupine, a najmanji u LH 1M skupine.

Unutar HTH mužjaka iz skupine 2M izražaj Iba1 je bio povećan u ARC i PE u odnosu na mužjake iz 1M skupine. I u ostalim područjima se u istoj usporedbi primijetio trend povećanja, ali ne u tolikoj mjeri. 3M mužjaci su u odnosu na 1M imali povećan izražaj Iba1 u svim analiziranim područjima HTH, osim u PA-AP gdje je utvrđeno smanjenje. U odnosu na 1M, mužjaci iz 4M skupine su imali povećan izražaj Iba1 u HTH, osim u PA-AP području. 3M skupina mužjaka je u odnosu na 2M imala smanjen izražaj Iba1 u analiziranim područjima HTH, kao i 4M skupina mužjaka. Pri usporedbi učinaka metformina i liraglutida na izražaj Iba1 u HTH pretilih i predijabetičnih mužjaka utvrđeno je da su mužjaci iz 3M imali manji izražaj Iba1 nego mužjaci iz 4M skupine (slika 4.52).



Slika 4.51. Izražaj Iba1 proteina u hipotalamusu mužjaka. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, M - mužjaci, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

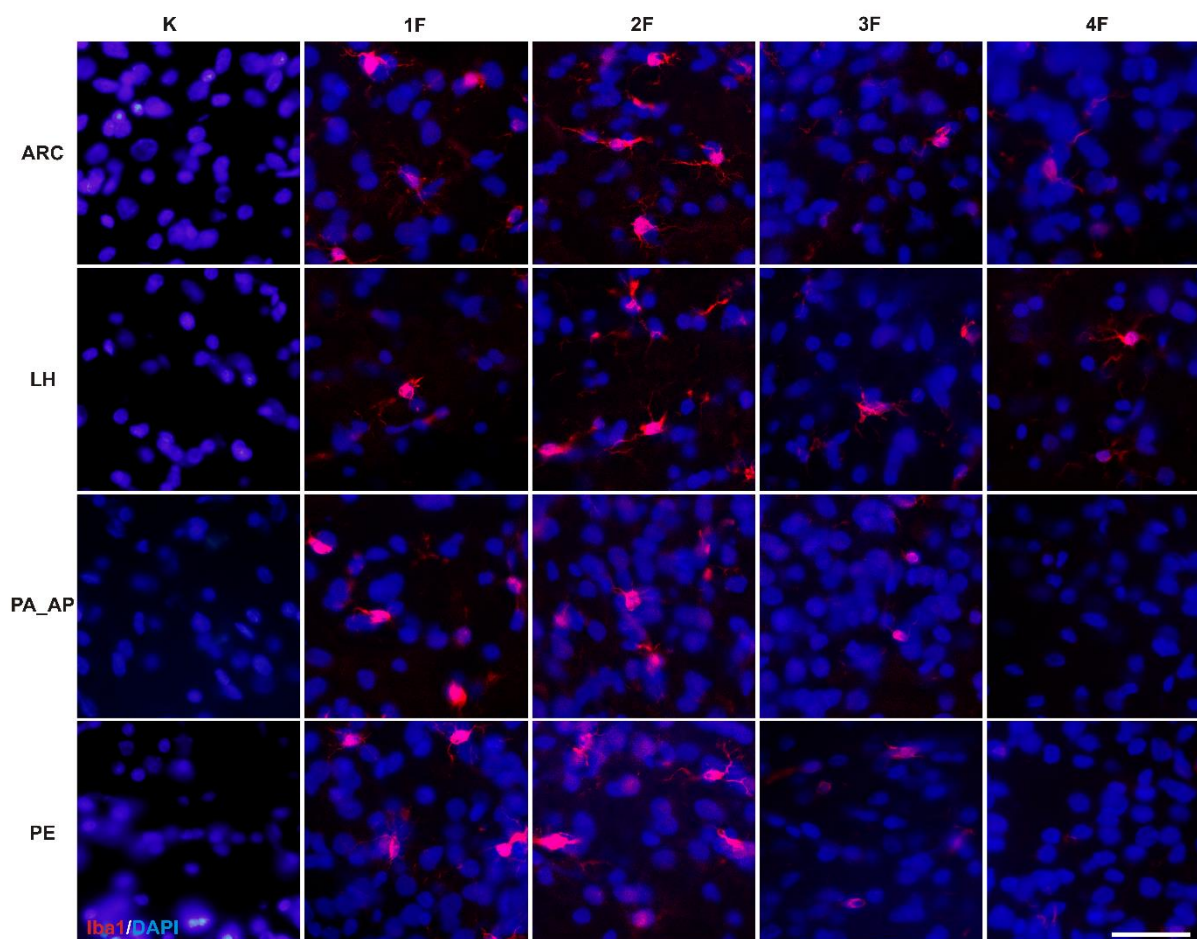


Slika 4.52. Usporedba izražaja Iba1 u područjima hipotalamusa mužjaka.

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

4.2.2.1.2. Izražaj Iba1 u područjima hipotalamusa ženki

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je protein Iba1 u hipotalamusu ženki doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. Iba1 protein nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki (slika 4.53).



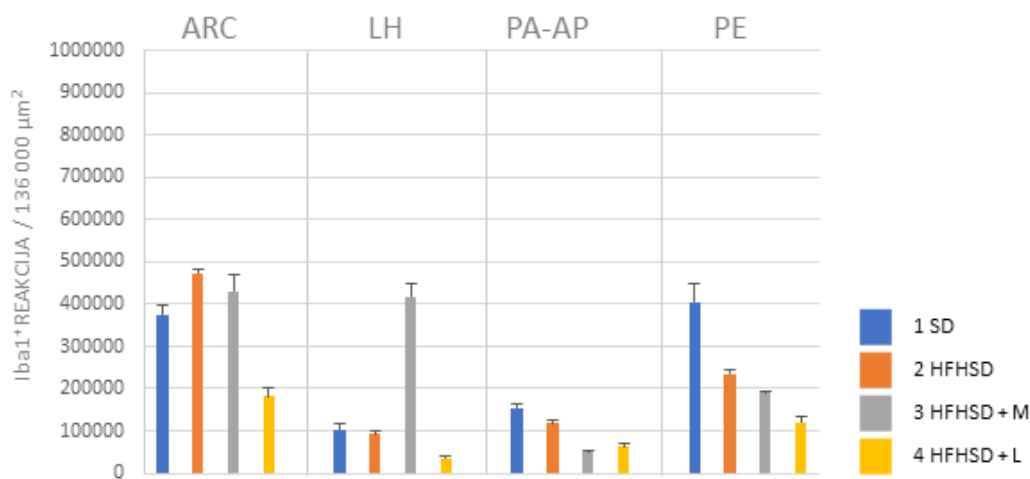
Slika 4.53. Izražaj Iba1 proteina u hipotalamusu ženki. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), F - ženke, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, PE - periventricularna jezgra hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Slikom 4.54. prikazane su srednje vrijednosti izražaja Iba1 u hipotalamusu ženki dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj Iba1 je uočen u ARC 2F skupine, a najmanji u LH 4F skupine.

Ženke iz 2F skupine su u odnosu na 1F skupinu imale povećan izražaj Iba1 u ARC, dok je u ostalim područjima HTH izražaj Iba1 bio smanjen. 3F ženke su imale veći izražaj Iba1 u ARC i LH i manji u PA-AP i PE nego 1F ženke. 4F ženke su u odnosu na 1F imale manji izražaj Iba1 u svim analiziranim područjima HTH. Kada su se usporedile 2F i 3F skupine, u skupini 3F je uočeno manje

Iba1 u svim analiziranim područjima HTH, osim u LH. 4F su u odnosu na 2F imale manji izražaj Iba1 u svim područjima HTH. Pri usporedbi 3F i 4F skupina utvrđen je manji izražaj Iba1 u HTH ženki iz 4F skupine.



Slika 4.54. Usporedba izražaja Iba1 u područjima hipotalamusa ženki.

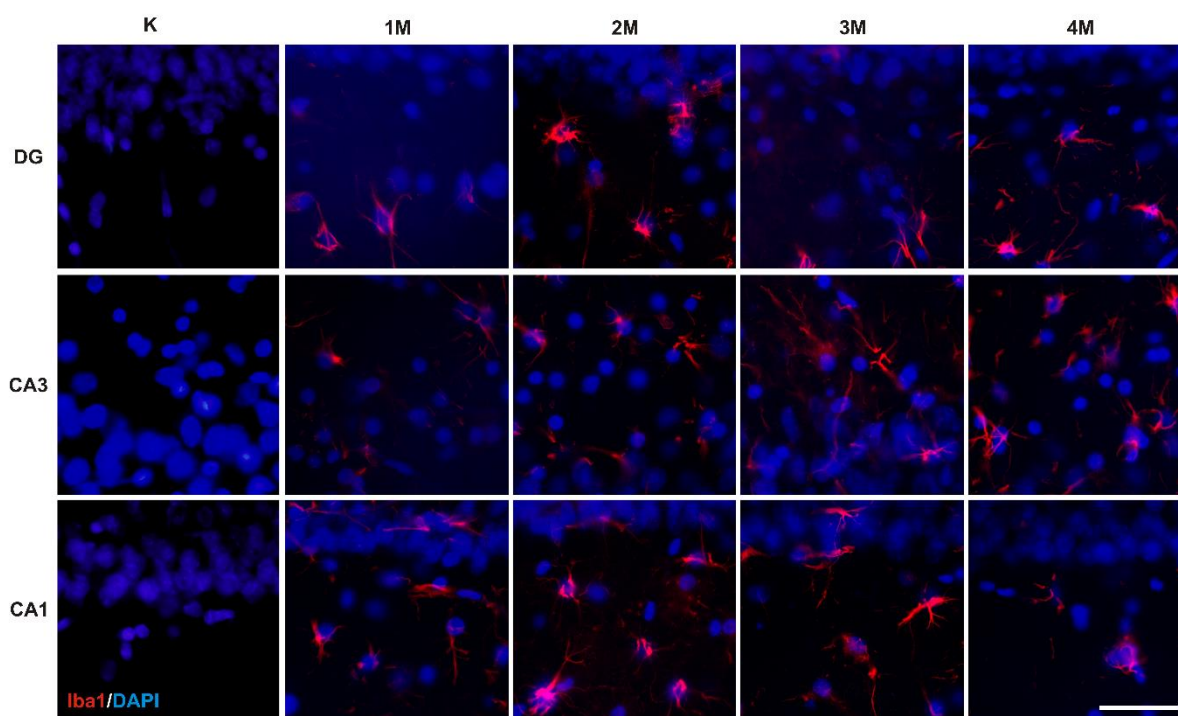
**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventrikularne jezgre hipotalamusa, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.2.2. Analiza izražaja Iba1 u hipokampusu životinja izloženih SD ili HFHSD prehrani s ili bez tretmana metforminom ili liraglutidom

Osim hipotalamusa, kroničan unos prehrane bogate mastima oštećuje hipokampus, moždanu strukturu zaduženu za snalaženje u prostoru i pamćenje. Kao i u drugim područjima mozga, i u hipokampusu se uslijed oštećenja povećava brojnost mikroglije koja dalje potiče upalu. Štetan utjecaj bilo kakvih čimbenika se očituje u nemogućnosti rješavanja složenih zadataka i snalaženja u prostoru. Prikazani rezultati pokazuju utjecaj kroničnog izlaganja HFHSD prehrani na mikrogliju u hipokampusu mužjaka i ženki štakora.

##### 4.2.2.2.1. Izražaj Iba1 u područjima hipokampusu mužjaka

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je protein Iba1 u hipokampusu mužjaka doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. Iba1 protein nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka (slika 4.55).

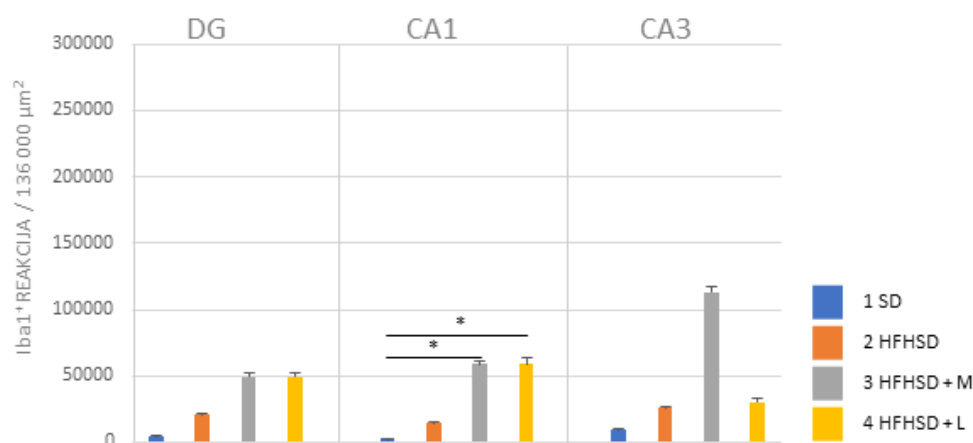


Slika 4.55. Izražaj Iba1 proteina u hipokampusu mužjaka. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, M - mužjaci, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Slikom 4.56. prikazane su srednje vrijednosti izražaja Iba1 u hipokampusu mužjaka dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj Iba1 je uočen u CA3 području 3M skupine. Najmanji izražaj Iba1 proteina je bio u CA1 1M skupine.

Mušjaci iz skupine 2M su u odnosu na mužjake iz skupine 1M imali više izražen protein Iba1 u sva tri analizirana područja HIPP. Kada su se usporedile skupine 1M i 3M te 1M i 4M uočeno je da su mužjaci iz 3M i 4M imali veći izražaj Iba1 svim analiziranim područjima HIPP, pri čemu su veći izražaji Iba1 u CA1 statistički značajni ( $N_1 = 4$ ,  $N_3 = 4$ ,  $p = 0,029$ ;  $N_1 = 4$ ,  $N_4 = 4$ ,  $p = 0,029$ ). Pri usporedbi 3M i 4M skupina s 2M skupinom, utvrđeno je da su 3M i 4M imali veći izražaj Iba1 u HIPP. 3M skupina mužjaka se po izražaju Iba1 u odnosu na 4M skupinu nije razlikovala osim u CA3 području, gdje je protein Iba1 bio više izražen.



Slika 4.56. Usporedba izražaja Iba1 u područjima hipokampusa mužjaka.

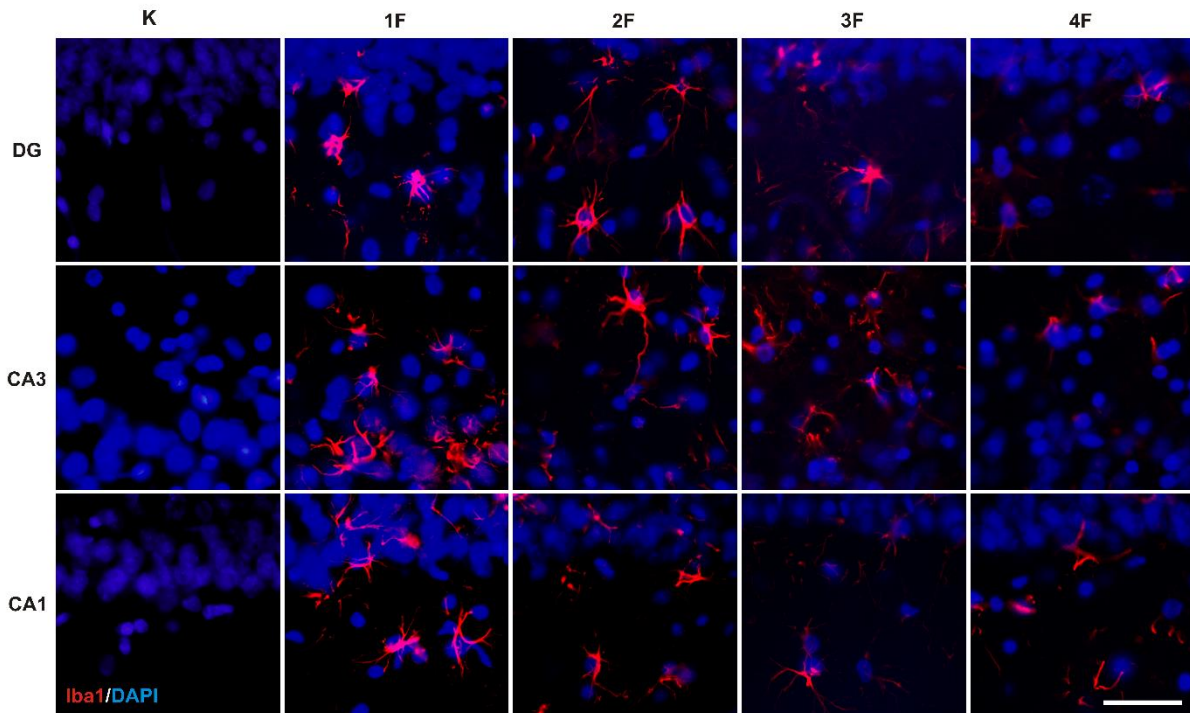
**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.2.2.2. Izražaj Iba1 u područjima hipokampusa ženki

Imunohistokemijska analiza je pokazala da je protein Iba1 u hipokampusu ženki doista izražen. Kontrolni rezovi bojani samo sekundarnim protutijelom nisu pokazali obojenje, dakle nije bilo nespecifičnih vezanja u hipotalamusu štakora. Iba1 protein nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki (slika 4.57).

Slikom 4.58. prikazane su srednje vrijednosti izražaja Iba1 u hipokampusu ženki dobivenih pomoću Fiji računalnog programa. Najveći izražaj Iba1 je uočen u CA3 području 1F skupine, a najmanji u DG 4F skupine.

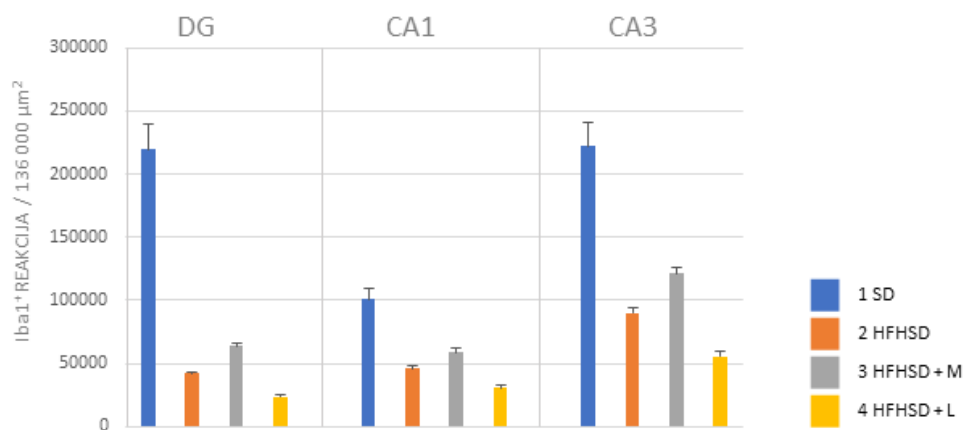




Slika 4.57. Izražaj Iba1 proteina u hipokampusu ženki. Povećanje 400X, skala 50  $\mu\text{m}$ .

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, nuklearna boja (engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole), F - ženke, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

U odnosu na ženke iz skupine 1F, ženke iz skupine 2F imale su manji izražaj Iba1 u HIPP. Ni 3F niti 4F skupine ženki nisu imale različitu razinu izražaja Iba1 u HIPP u odnosu na 1F skupinu. Kada su se usporedile skupine 2F i 3F te skupine 2F i 4F, uočeno je da je 3F skupina, za razliku od 4F skupine, imala veći izražaj Iba1 u sva tri analizirana područja HIPP od skupine 2F.



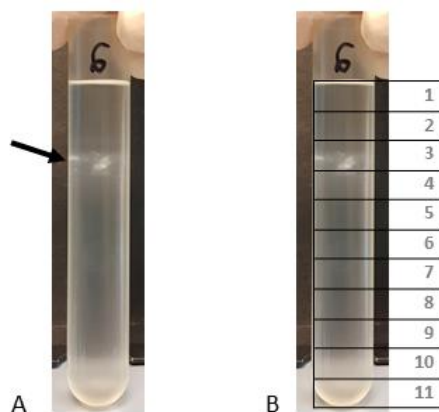
Slika 4.58. Usporedba izražaja Iba1 u područjima hipokampusa ženki.

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), 1 - životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M), 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L); Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

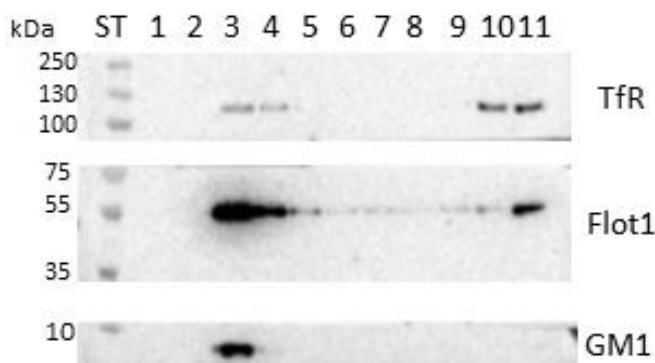
### 4.3. Analiza položaja receptora ObR i IR- $\alpha$ u lipidnim splavima hipokampusa

Lipidne splavi hipokampusa uspješno su izolirane prilagođenom metodom prema dr. sc. Kristini Mlinac-Jerković, Laboratorij za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Zagreb.

Iz početne mase tkiva hipokampusa 50 mg iz svih životinjskih skupina izolacijom su dobiveni izolati od kojih se izdvojilo ukupno 10 ili 11 frakcija. Lipidne splavi su bile u frakcijama 3 i 4. (Slika 4.59). Da se zaista radilo o frakcijama s lipidnim splavima, potvrđeno je metodom Western blot korištenjem protutijela na biljge lipidnih splavi Flot1 i GM1 te na biljeg ostatka stanične membrane TfR. U svim uzorcima je utvrđen jednak rezultat (Slika 4.60).



Slika 4.59. Izolat lipidnih splavi. A – lipidne splavi (označene strelicom), B – shema frakcioniranja izolata.

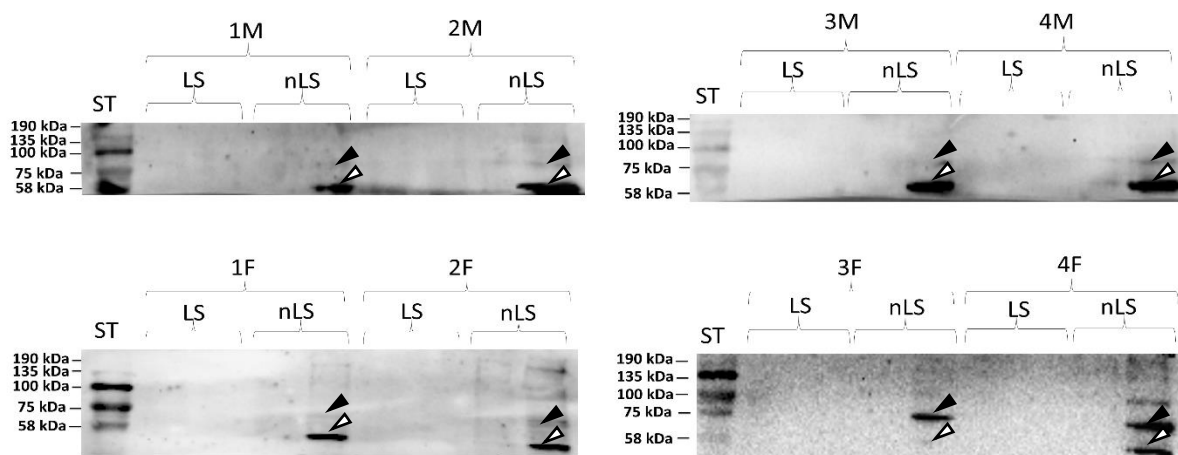


Slika 4.60. Potvrda uspješne izolacije lipidnih splavi provjerom izražaja proteina specifičnih za lipidne splavi metodom Western blot. Brojevi 1-11 označavaju broj frakcije izolata.

**Legenda:** GM1 – monosijalotetraheksosilgangliozid, biljeg lipidnih splavi, Flot1 – flotilin-1, biljeg lipidnih splavi, ST – standard, TfR – transferinski receptor, biljeg ostatka stanične membrane.

#### 4.3.1. ANALIZA RECEPTORA ObR U STANIČNOJ MEMBRANI STANICA HIPOKAMPUSA ISPITIVANIH ŽENKI I MUŽJAKA

Western blot metodom je analiziran izražaj ObR u frakcijama izolata lipidnih splavi. Za analizu nije korišteno svih 10 ili 11 frakcija, nego su odabrane one u kojima su bile lipidne splavi (LS), odnosno u frakcijama 3 i 4 te u frakcijama u kojima se biljeg ostatka stanične membrane, TfR, pojavio u najvećoj količini, tj. u dvije posljednje frakcije (9 i 10 ili 10 i 11) (nLS). Slika 4.61 prikazuje rezultat analize. Pokazalo se da je ObR u svim životinjskim skupinama smješten izvan lipidnih splavi, u nLS frakcijama. Detektirane su izoforme ObR u rasponu veličina od 135 kDa (očekivana veličina ObRb izoforme) pa do oko 58 kDa (kraće izoforme s manjim ili većim stupnjem glikoziliranosti). Densitometrijski su analizirane dvije najviše izražene izoforme, tzv. duga izoforma u razini veličine proteina od 75 kDa te kratka izoforma u razini veličine proteina od oko 58 kDa. Dobivene vrijednosti izražaja ObR su normalizirane u odnosu na izražaj TfR iz odgovarajuće životinjske skupine. TfR je odabran za normalizaciju, jer je prisutan u neuronima i gliji mozga. Prijeko je potreban za normalno funkcioniranje navedenih stanica, konkretno u signalizaciji neurotransmiterima, mijelinizaciji te proliferaciji (102).



Slika 4.61. Analiza izražaja ObR u frakcijama izolata lipidnih splavi. Detektirane su duga izoforma (u razini veličine proteina od 75 kDa; označeno crnom strelicom) i kratka izoforma (u razini veličine proteina do 58 kDa; označeno bijelom strelicom).

**Legenda:** F – ženke, LS – frakcije s lipidnim splavima, M – mužjaci, nLS – frakcija ostatka stanične membrane (tzv. ne-splavi), ST – standard, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Tablica 4.31. Relativne vrijednosti izražaja ObR izoformi u staničnoj membrani stanica hipokampusa ispitivanih ženki i mužjaka u odnosu na izražaj TfR.

n-LS	ObR	
	DUGA IZOFORMA	KRATKA IZOFORMA
1M	1,03	0,74
2M	0,43	0,86
3M	0,50	0,63
4M	2,73	3,18
1F	0,39	0,54
2F	0,64	0,69
3F	0,89	0,49
4F	0,91	1,12

**Legenda:** F – ženke, M – mužjaci, nLS – frakcija ostatka stanične membrane (tzv. ne-splavi), ObR – leptinski receptor, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

U mužjaka je utvrđeno da je duga izoforma ObR bila izražena u svim skupinama, u nLS frakcijama. Duga izoforma ObR nije bila jednako izražena u svim skupinama mužjaka. Utvrđeno da je najveći izražaj duge izoforme ObR bio u 4M skupini, a najmanji u 2M (tablica 4.31). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja duge izoforme u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1M skupina je imala veći izražaj duge izoforme ObR od 2M skupine.
- 2M skupina je imala manji izražaj duge izoforme ObR u odnosu na 3M i 4M skupine.
- 1M skupina je imala veći izražaj duge izoforme ObR u odnosu na 3M, ali manji od 4M skupine.
- 3M skupina je imala veći izražaj duge izoforme ObR u odnosu na 4M skupinu.

U mužjaka je utvrđeno da je kratka izoforma ObR bila izražena u svim skupinama, u nLS frakcijama. Kratka izoforma ObR nije bila jednako izražena u svim skupinama mužjaka. Analiza je pokazala da je najveći izražaj kratke izoforme ObR bio u 4M skupini, a najmanji u 3M (tablica 4.31). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja kratke izoforme u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1M skupina je imala manji izražaj kratke izoforme ObR u odnosu na 2M skupinu.
- 2M skupina je imala veći izražaj kratke izoforme ObR od 3M skupine, ali manji u odnosu na 4M skupinu.
- 1M skupina je imala veći izražaj kratke izoforme ObR od 3M skupine, ali manji u odnosu na 4M skupinu.
- 4M skupina je imala veći izražaj kratke izoforme ObR od 3M skupine.

U ženki je utvrđeno da je duga izoforma ObR bila izražena u svim skupinama, u nLS frakcijama. Duga izoforma ObR nije bila jednako izražena u svim skupinama ženki. Utvrđeno je da je najveći izražaj duge izoforme ObR bio u 4F skupini, a najmanji u 1F (tablica 4.31). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja duge izoforme u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

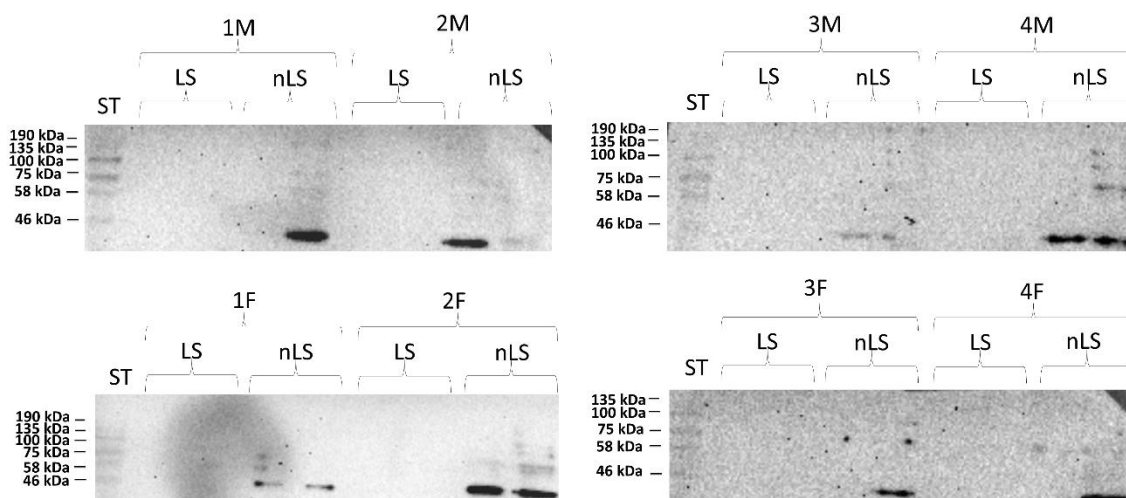
- 1F skupina je imala manji izražaj duge izoforme ObR od svih ostalih skupina ženki.
- 2F skupina je imala manji izražaj duge izoforme ObR od 3F i 4F skupine.
- 3F i 4F skupine su imale podjednak izražaj duge izoforme ObR.

U ženki je utvrđeno da je kratka izoforma ObR bila izražena u svim skupinama, u nLS frakcijama. Kratka izoforma ObR nije bila jednako izražena u svim skupinama ženki. Analiza je pokazala najveći izražaj kratke izoforme ObR u 2F skupini, a najmanji u 4F (tablica 4.31). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja kratke izoforme u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1F skupina je imala manji izražaj kratke izoforme ObR od 2F skupine.
- 2F skupina je imala veći izražaj kratke izoforme ObR od 3F skupine, ali manji u odnosu na 4F skupinu.
- 1F skupina je imala veći izražaj kratke izoforme ObR od 3F skupine, ali manji u odnosu na 4F skupinu.
- 4F skupina je imala veći izražaj duge izoforme ObR od 3F skupine.

#### 4.3.2. ANALIZA RECEPTORA IR- $\alpha$ U STANIČNOJ MEMBRANI STANICA HIPOKAMPUSA ISPITIVANIH ŽENKI I MUŽJAKA

Western blot metodom je analiziran izražaj IR- $\alpha$  u frakcijama izolata lipidnih splavi. Za analizu nije korišteno svih 10 ili 11 frakcija, nego su kao i u slučaju analize ObR odabrane LS i nLS. Slika 4.62 prikazuje rezultat analize. Pokazalo se da je IR- $\alpha$  u svim životinjskim skupinama smješten izvan lipidnih splavi, u nLS frakcijama. Najviše izražena izoforma je bila na razini veličine proteina od oko 46 kDa, koja je denzitometrijski analizirana. Dobivene vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  su normalizirane u odnosu na izražaj TfR iz odgovarajuće životinjske skupine.



Slika 4.62. Analiza izražaja IR- $\alpha$  u frakcijama izolata lipidnih splavi. IR- $\alpha$  je detektiran u razini veličine proteina 42 kDa.

**Legenda:** F – ženke, LS – frakcije s lipidnim splavima, M – mužjaci, nLS – frakcija ostatka stanične membrane (tzv. ne-splavi), ST – standard, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Tablica 4.32. Relativne vrijednosti izražaja IR- $\alpha$  u staničnoj membrani stanica hipokampusa ispitivanih ženki i mužjaka u odnosu na izražaj TfR.

n-LS	IR- $\alpha$
1M	0,99
2M	0,79
3M	0,33
4M	4,23
1F	0,39
2F	0,80
3F	0,95
4F	0,87

**Legenda:** F – ženke, M – mužjaci, nLS – frakcija ostatka stanične membrane (tzv. ne-splavi), ObR – leptinski receptor, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

U mužjaka je utvrđeno da je IR- $\alpha$  bio izražen u svim skupinama, u nLS frakcijama. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u svim skupinama mužjaka. Analizom izražaja IR- $\alpha$  je utvrđen najveći izražaj IR- $\alpha$  u 4M skupini, a najmanji u 3M (tablica 4.32). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja IR- $\alpha$  u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1M skupina je imala veći izražaj IR- $\alpha$  od 2M skupine.
- 2M skupina je imala veći izražaj IR- $\alpha$  od 3M skupine, ali manji u odnosu na 4M skupinu.
- 1M skupina je imala veći izražaj IR- $\alpha$  od 3M skupine, ali manji u odnosu na 4M skupinu.
- 3M skupina je imala manji izražaj IR- $\alpha$  od 4M skupine.

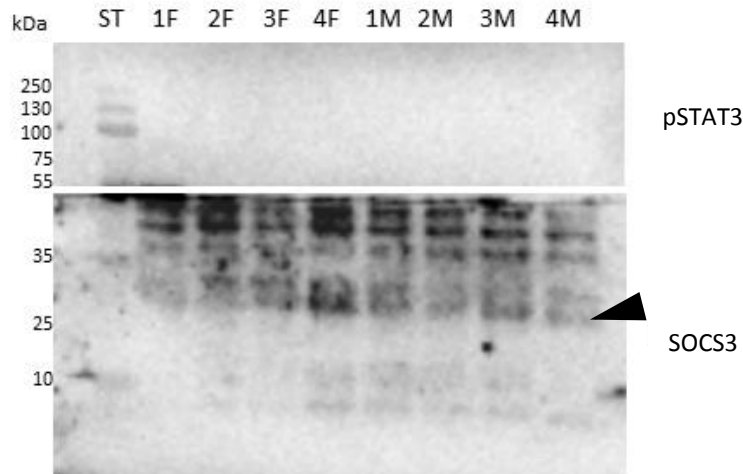
U ženki je utvrđeno da je IR- $\alpha$  bio izražen u svim skupinama, u nLS frakcijama. IR- $\alpha$  nije bio jednako izražen u svim skupinama ženki. Denzitometrijskom analizom je utvrđeno da je najveći izražaj IR- $\alpha$  bio u 2F skupini, a najmanji u 1F (tablica 4.32). Prema međusobnim usporedbama relativnog izražaja IR- $\alpha$  u nLS frakcijama svih skupina, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1F skupina je imala manji izražaj IR- $\alpha$  od svih ostalih skupina.
- 2F skupina je imala manji izražaj IR- $\alpha$  od 3F, dok je izražaj IR- $\alpha$  u 2M i 4F skupinama bio podjednak.
- 3F skupina je imala veći izražaj IR- $\alpha$  od 4F skupine.

Zaključno možemo reći da 4M skupina ima najveće vrijednosti ObR i IR- $\alpha$  u dijelovima membrane koji su izvan splavi od svih promatranih skupina.

#### 4.4. Analiza proteina pSTAT3 i SOCS3 Western blot metodom

Western blot metodom analiziran je izražaj citosolnih proteina pSTAT3 i SOCS3. Protutijelom anti-pSTAT3 nisu detektirani proteini. Budući da nismo raspolagali kontrolnim uzorkom u kojem nema izražaja pSTAT3 niti kontrolnim peptidom (koji bi prekonjugiran s protutijelom doveo do izostanka reakcije na membrani), nismo u mogućnosti zaključiti je li količina proteina ispod granice detekcije ili protutijelo nije specifično vezano za protein (slika 4.63.).



Slika 4.63. Analiza izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3 u citosolu stanica hipokampusa ispitivanih ženki i mužjaka Western blot metodom.

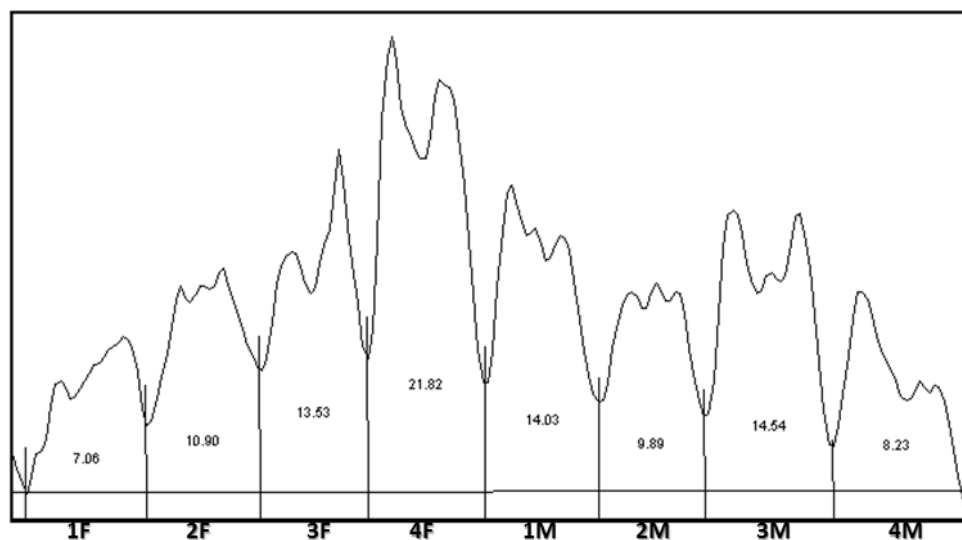
**Legenda:** F – ženke, M – mužjaci, pSTAT3 – fosforilirani protein STAT3, SOCS3 – supresor signalizacije citokinima, ST – standard, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Anti-SOCS3 protutijelom detektiran je protein SOCS3, čija vrpca na membrani odgovara molekularnoj masi od 27 kDa (prema uputama proizvođača se zaista radi o proteinu SOCS3) (Slika 4.63.). Budući da je iz svakog uzorka analizirana ista količina proteina, izražaj SOCS3 je analiziran denzitometrijski i uspoređen među skupinama.

Analizom izražaja proteina SOCS3 u skupinama mužjaka je utvrđeno da je najveći izražaj SOCS3 imala skupina 3M, a najmanji 4M (slika 4.64). Prema međusobnim usporedbama izražaja SOCS3 u hipokampusu mužjaka, odnosno udjela površina ispod krivulje, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1M skupina je imala veći izražaj SOCS3 od 2M skupine.
- 2M skupina je imala manji izražaj SOCS3 od 3M skupine, ali veći u odnosu na 4M skupinu.
- 1M i 3M skupina se nisu razlikovale u izražaju SOCS3 proteina.
- 1M skupina je imala veći izražaj SOCS3 od 4M skupine.
- 4M skupina je imala manji izražaj SOCS3 od 3M skupine.





Slika 4.64. Denzitometrijska analiza izražaja SOCS3 u citosolu stanica hipokampusa ispitanika ženki i mužjaka Western blot metodom. Naznačeni brojevi su udio površine koju zauzima svaki uzorak na membrane izražen kao postotak.

**Legenda:** F – ženke, M – mužjaci, 1 – životinje na standardnoj prehrani (SD), 2 – životinje na HFHSD prehrani, 3 – životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 – životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom.

Analizom izražaja proteina SOCS3 u skupinama ženki je utvrđeno da je najveći izražaj SOCS3 imala skupina 4F, a najmanji 1F (slika 4.64). Prema međusobnim usporedbama izražaja SOCS3 u hipokampusu ženki, odnosno udjela površina ispod krivulje, utvrđeni su sljedeći odnosi:

- 1F skupina je imala manji izražaj SOCS3 od svih ostalih skupina ženki.
- 2F skupina je imala manji izražaj SOCS3 od 3F i 4F skupina.
- 3F skupina je imala manji izražaj SOCS3 od 4F skupine.

Zaključno, od svih promatranih skupina životinja, najviše vrijednosti SOCS3 proteina pronađene su u skupini 4F.

## **5. RASPRAVA**

### 5.1. Analiza receptora uključenih u nadzor hranjenja i energetske stanja organizma

U istraživanju smo oponašali u našem društvu sve prisutniji „zapadni“ način života, koji uključuje slabo fizičko kretanje, puno sjedenja i prekomjeren unos kalorija te posljedično slabu potrošnju energije uskladištene u tijelu (10). Ovakav je način života uzrokovao epidemiju pretilosti uz koju se razvijaju patološka stanja, ponajprije dijabetes s pratećim komplikacijama poput kardiovaskularnih poremećaja, nefropatije i retinopatije, metabolički sindrom te neurodegenerativni poremećaji (103).

U 6 tjedana su se odrasli Sprague-Dawley štakori hranili masnom hranom bogatom ugljikohidratima (HFHSD). Zatim su se na 14 tjedana podvrgli tretmanima s danas najčešće propisivanim antidijabetičkim lijekovima, metforminom i liraglutidom. Štakori su bili stari 44 tjedna kada je eksperiment započeo, što je ekvivalentno ljudskoj dobi između 27 i 30 godina. Po završetku eksperimenta su bili stari 64 tjedna, što bi odgovaralo ljudskoj dobi između 35 i 38 godina (104). Tretmani antidijabeticima su primijenjeni u svrhu otkrivanja učinaka navedenih lijekova na mozak pri HFHSD prehrani koja je ove štakore odvela u predijabetično stanje. Tvrdnja o predijabetičnom stanju životinja je argumentirana rezultatima koje su istraživački partneri, s prof. dr. sc. Robertom Gasparom na čelu, prikupili: GTT testovi su bili lošiji uslijed HFHSD prehrane, jetra je bila masna te je masno tkivo pokazalo znakove upale (neobjavljeni podatci). Naglasak u istraživanju je bio na pitanju mogu li dva navedena antidijabetika, unatoč nepromijenjenom režimu prehrane, usporiti pojavu dijabetesa. Naime, učinkovitost i učinci navedenih lijekova u borbi s dijabetesom je provjerena i istražena na perifernim organima. Metformin povećava tkivnu osjetljivost na inzulin, dok liraglutid izaziva lučenje inzulina, a sve u svrhu rješavanja problema periferne hiperglikemije (95,98). Međutim, njihov učinak na mozak nije do kraja razjašnjen. Primijećeni su pozitivni učinci antidijabetika na kognitivne sposobnosti, no centri za nadzor energije nisu promatrani (96,98). Iz navedenih razloga svaki je doprinos u razjašnjavanju učinaka navedenih lijekova na centre za nadzor energetske stanja organizma dobrodošao.

U istraživanju su analizirani izražaji tri receptora uključena u nadzor hranjenja i energetske stanja organizma: ObR, IR- $\alpha$  i IGF-1R $\beta$ . U navedene uloge su direktno uključeni ObR i IR- $\alpha$ , dok je IGF-1R $\beta$  zaslužan za stanično preživljenje, rast i proliferaciju te je indirektno uključen u nadzor energetske stanja organizma (105,32,31). Izražaj receptora je promatran u hipotalamičkim područjima mozga koji direktno nadziru količinu energije te tu informaciju komuniciraju s nadzorima drugih vitalnih funkcija poput rasta, reprodukcije, normalnog funkcioniranja imunološkog sustava, stresnog odgovora, termogeneze, održanja koštane mase i regeneracije, a sve u svrhu održanja konstantnosti unutrašnjih uvjeta. Iz područja hipotalamusa se zasebno promatrala PE jezgra, upravo stoga što predstavlja mjesto u hipotalamusu gdje se povezuje informacija o količini raspoložive energije u tijelu i mogućnost reprodukcije (8). Dopaminergička područja mozga i odabrana područja kore mozga su indirektno uključena u nadzor energetske stanja organizma tako što motiviraju organizam na hranjenje, ali i na fizičku aktivnost. Za područja hipokampusa je vrlo bitna poruka o količini raspoložive energije kako bi

u tom području stanice preživljavale i kako bi došlo do proliferacije, što je bitno za održavanje pamćenja. Zauzvrat, pamćenje o svojstvima određene hrane će indirektno utjecati na odluku o hranjenju.

Iako je u trenutku eutanazije životinja na kraju eksperimenta moglo doći do vrlo brzih promjena koje možda nisu odražavale stanje tijekom svih 20 tjedana eksperimenta, kronično izlaganje HFHSD prehrani je najvjerojatnije izazvalo trajnije promjene na genomu promatranih stanica. Naime, kada je o receptorima riječ, njihovo smještanje u membranu ili povlačenje s membrane, internalizacijom u stanicu, promjene su koje se događaju u milisekundama (106), a promjene na genomu traju puno više od jedne milisekunde.

#### 5.1.1. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA U HIPOTALAMIČKIM CENTRIMA KOJI DIREKTNO NADZIRU HRANJENJE I ENERGETSKO STANJE ORGANIZMA

Masna prehrana bogata ugljikohidratima je u LH mužjaka značajno povećala izražaj ObR, dok u sva tri analizirana područja ženki nije izazvala promjene u izražaju ObR (tablica 5.1., usporedba „1 vs 2“). Mužjaci su u jezgri koja potiče hranjenje (LH) bili osjetljiviji na leptin i trebali su unositi manje hrane. Ženke skupine 2F su prema ovom izražaju ObR unosile jednako hrane kao i 1F. Neobjavljeni podaci istraživačkog partnera (Gaspar i sur., neobjavljeni podatci) o unosu hrane mužjaka i ženki odgovaraju ovom nalazu (podatci nisu prikazani).

Primjena antidijabetičkih lijekova uz HFHSD prehranu je promijenila izražaj ObR u LH i PA mužjaka, ali ne i u ARC, ključnoj jezgri koja interpretira signale sitosti (tablica 5.1., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“). Naime, pretili i predijabetični mužjaci tretirani metforminom liraglutidom su bili osjetljiviji na leptin zbog povećanog izražaja ObR, pri čemu su mužjaci tretirani liraglutidom imali puno manji izražaj ObR u LH (tablica 5.1., usporedba „3 vs 4“). Mužjaci 3F i 4F skupine su zbog veće osjetljivosti na leptin najvjerojatnije smanjili unos masne hrane bogate ugljikohidratima. No, izostanak povećanja osjetljivosti u ARC možda ipak ne smanjuje unos hrane, što bi bilo u skladu s nalazom Gaspara i sur. na kraju eksperimenta.

Pretilim i predijabetičnim ženkama je uz tretman metforminom izražaj ObR bio povećan u sva tri analizirana područja, dok je uz tretman liraglutidom izražaj ObR bio povećan samo u PA koja inhibira hranjenje (tablica 5.1., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“). Sve tri ključne jezgre uključene u hranjenje su u pretilih ženki postale osjetljivije na leptin nakon tretmana metforminom te su bile više osjetljive na leptin od 4F ženki. 3F ženke su najvjerojatnije smanjile unos hrane zbog povećane energetske rezerve. Zaista su se, prema podacima istraživačkog partnera (Gaspar i sur., neobjavljeni podatci), pretile ženke na tretmanu metforminom manje hranile od pretilih netretiranih ženki i tretiranih liraglutidom.

U pretilim i predijabetičnim mužjacima tretiranih lijekovima je izražaj ObR bio povećan u sva tri analizirana područja hipotalamusa pa je prirodno pretpostaviti da su imali povećanu osjetljivost na leptin (tablica 5.1., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“). Prema tome su 3M i 4M skupine unosile manje hrane od 1M skupine. S obzirom na 1F skupinu, pretile ženke tretirane metforminom (3F) su imale veći izražaj ObR u svim analiziranim područjima hipotalamusa, a ženke tretirane liraglutidom samo u PA (4F).

Pretpostavka je da su 3F ženke u odnosu na 1F i 4F unosile manje hrane. Oba nalaza, u mužjacima i ženkama, su uočena u podacima o unosu hrane istraživačkog partnera (Gaspar i sur., neobjavljeni podatci).

Tablica 5.1. Usporedbe izražaja ObR u hipotalamičkim jezgrama direktno uključenih u nadzor energetske stanja organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HTH-ARC				↑↑	↑↑	
	HTH-LH	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓
	HTH-PA-AP		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	
ženke	HTH-ARC		↑↑		↑↑		
	HTH-LH		↑↑		↑↑		
	HTH-PA-AP		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Masna prehrana bogata ugljikohidratima nije djelovala na izražaj IR- $\alpha$  u hipotalamusu mužjaka, dok je ženkama značajno smanjila izražaj IR- $\alpha$  u LH, jezgri hipotalamusa iz koje se otpuštaju signali za unos hrane (tablica 5.1., usporedba „1 vs 2“). Međutim, prema podacima o unosu hrane istraživačkog partnera (Gaspar i sur., neobjavljeni podatci), promjene u hranjenju nisu uočene vjerojatno jer je osjetljivost na leptin ostala nepromijenjena, kao i izražaj IR- $\alpha$  u ARC.

U stanju stalnog unosa suvišnih kalorija, u pretilih se mužjaka, tretiranih metforminom, povećao izražaj IR- $\alpha$  u ARC i LH jezgrama, a u tretiranih liraglutidom do povećanja je došlo samo u LH. Kod pretilih ženki, tretiranih metforminom, je u LH, kao i mužjacima, izražaj IR- $\alpha$  bio povećan. U hipotalamusu pretilih ženki tretiranih liraglutidom uočen je potpuno suprotan učinak na izražaj IR- $\alpha$  – značajno je bio smanjen u LH i PA (tablica 5.1., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“). Čini se da je učinak liraglutida spolno specifičan i pojačava inzulinsku rezistenciju u hipotalamusu pretilih i predijabetičnih ženki. Usprkos tome, ARC se opire promjenama razine IR- $\alpha$ .

U odnosu na kontrolnu razinu IR- $\alpha$  pri standardnoj prehrani, kombinacija masne prehrane bogate ugljikohidratima i metformina je značajno povećala izražaj IR- $\alpha$  u ARC pretilih mužjaka te su oni najvjerojatnije bili osjetljiviji na inzulin u odnosu na 1M kontrolnu skupinu. Pretili mužjaci tretirani liraglutidom su imali razinu izražaja IR- $\alpha$  poput kontrola na SD. Pretile ženke tretirane metforminom su imale izražaj IR- $\alpha$  kao i kontrolna skupina na SD (1F), a ženke tretirane liraglutidom su u analiziranim područjima hipotalamusa razvile inzulinsku rezistenciju, s obzirom na značajno smanjen izražaj IR- $\alpha$ ,

čak i ispod razine karakteristične pri SD prehrani (tablica 5.1., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“; slika 4.24.). Očito je tretman liraglutidom djelovao spolno specifično na izražaj IR- $\alpha$  u hipotalamusu.

Tablica 5.2. Usporedbe izražaja IR- $\alpha$  u hipotalamičkim jezgrama direktno uključenih u nadzor energetskog stanja organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HTH-ARC		↑↑		↑↑		
	HTH-LH		↑↑	↑↑			
	HTH-PA-AP						
ženke	HTH-ARC					↓↓	↓↓
	HTH-LH	↓↓	↑↑	↓↓		↓↓	↓↓
	HTH-PA-AP			↓↓		↓↓	↓↓

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, IR- $\alpha$  - alfa podjedinica receptora za inzulin, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Prema uočenom značajnom povećanju izražaja IGF-1R $\beta$  u LH mužjaka, HFHSD prehrana mužjacima povećava osjetljivost na čimbeniku rasta nalik inzulinu 1 (IGF-1) u navedenom području. Ženkama, s druge strane, smanjuje osjetljivost na IGF-1 u LH te u PA jezgri hipotalamusa (tablica 5.1., usporedba „1 vs 2“). U skupinama antidijabeticima tretiranih pretilih i predijabetičnih mužjaka je razina IGF-1R $\beta$  bila kao u netretiranoj kontrolnoj 2M skupini. Pretile i predijabetične ženke tretirane metforminom su imale povećan izražaj IGF-1R $\beta$  u LH i PA u odnosu na kontrolnu 2F skupinu, ali ne i ženke tretirane liraglutidom. Stoga je pretpostavka da su 2F bile osjetljivije na IGF-1 u navedenim područjima hipotalamusa od 2F i 4F skupina (tablica 5.1., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

S obzirom na povećan izražaj IGF-1R $\beta$  u LH i PA mužjaka 3M skupine te u ARC i LH mužjaka 4M skupine, a smanjen u ARC u 3F skupini te u LH i PA 4F skupine, možemo zaključiti da antidijabetici imaju spolno specifičan učinak na izražaj IGF-1R $\beta$  u uvjetima unosa masne hrane bogate ugljikohidratima u predijabetičan organizam (tablica 5.1., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Dok se u tretiranih antidijabeticima pretilih mužjaka nije uočila razlika između primjene metformina i liraglutida, u ženki tretiranih liraglutidom je bilo značajno manje izraženog IGF-1R $\beta$  u PA.

Tablica 5.3. Usporedbe izražaja IGF-1R $\beta$  u hipotalamičkim jezgrama direktno uključenih u nadzor energetske stanja organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mušjaci	HTH-ARC					↑↑	
	HTH-LH	↑↑			↑↑	↑↑	
	HTH-PA-AP				↑↑		
ženke	HTH-ARC				↓↓		
	HTH-LH	↓↓	↑↑			↓↓	
	HTH-PA-AP	↓↓	↑↑			↓↓	↓↓

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, ObR - leptinski receptor, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Zaključno, na HFHSD prehranu reagira samo LH jezgra hipotalamusa i to u mužjaka s povećanjem osjetljivost na leptin i IGF-1, a kod ženki s rezistencijom na inzulin i IGF-1. Očito IGF-1 ima različite uloge u LH mužjaka i ženki. U stanju pretilosti i predijabetesa, kod ženki dolazi do poremećaja u signalizaciji inzulinom i to u jednoj od važnijih jezgara za direktan nadzor energetske rezerve organizma, odnosno u LH koja bi trebala stimulirati organizam na hranjenje.

Mušjaci postaju osjetljiviji na leptin i inzulin uslijed kombinacije HFHSD i antidijabetika. Pretile ženke tretirane metforminom postaju osjetljivije na leptin u sva tri analizirana područja hipotalamusa te dodatno na inzulin i IGF-1 u LH. Pretile ženke tretirane liraglutidom razvijaju inzulinsku rezistenciju u LH i PA, ali su istovremeno osjetljivije na leptin u PA.

Uspijevaju li lijekovi unatoč HFHSD prehrani pretilim životinjama vratiti izražaj receptora na kontrolnu razinu pri SD prehrani? Mušnjacima oba antidijabetika ili vraćaju izražaj sva tri analizirana receptora na kontrolnu razinu ili povećavaju osjetljivost na njihove ligande. Metformin čini ženke rezistentnim na IGF-1 u ARC, a liraglutid ih čini rezistentnima na inzulin i IGF-1 u LH i PA. To znači da bi ženkama tretiranim s metforminom signalna mreža za reprodukciju bila poremećena, a s liraglutidom energetske nadzor.

#### 5.1.2. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA U DOPAMINERGIČKIM PODRUČJIMA KOJA INTERPRETIRAJU HRANJENJE KAO OSJEĆAJ ZADOVOLJSTVA

Unos HFHSD hrane je rezultirao povećanim izražajem ObR u dopaminergičkom SNC području mužjaka, a smanjenim u ženki (tablica 5.4., usporedba „1 vs 2“).

U pretilim i predijabetičnim mušnjacima tretiranim metforminom nije bilo promjena u izražaju ObR u oba analizirana dopaminergička područja. S druge strane, ženkama je u oba područja bio povećan

izražaj ObR, što znači da su bile osjetljivije na leptin (tablica 5.4., usporedba „2 vs 3“). Kod životinja na HFHSD tretiranih liraglutidom je uočeno suprotno – pretili mušjaci su imali povećan izražaj ObR u oba dopaminergička područja, dok se kod ženki nisu uočile značajne promjene (tablica 5.4., usporedba „2 vs 4“). Dakle, lijekovi su najvjerojatnije izazvali promjene na spolno-specifičan način – dok je metformin djelovao na dopaminergičke regije ženka, liraglutid je na mužjaka.

Isti obrazac se očitovao pri usporedbi učinaka tretmana na pretili i predijabetične životinje s kontrolnim skupinama 1M i 1F na SD prehrani (tablica 5.4., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“). Mušjaci 3M tretirani metforminom nisu imali promjene u izražaju ObR, dok su mušjaci 4M tretirani liraglutidom bili osjetljiviji na leptin. Obrnuto, ženke 3F tretirane metforminom su bile osjetljivije na leptin, dok ženke 4M tretirane liraglutidom nisu imale promijenjen izražaj ObR.

Tablica 5.4. Usporedbe izražaja ObR u dopaminergičkim područjima mozga koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mušjaci	DN-SNC	↑↑		↑↑		↑↑	
	DN-VTA			↑↑		↑↑	
ženke	DN-SNC	↓↓	↑↑		↑↑		
	DN-VTA		↑↑		↑↑		

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Mušjacima je uslijed HFHSD izražaj IR- $\alpha$  u VTA bio značajno smanjen, što znači da su u tom području razvili inzulinsku rezistenciju, dok kod ženki nije bilo promjena (tablica 5.5., usporedba „1 vs 2“).

U usporedbi s 2M kontrolnom skupinom, dopaminergička područja pretelih i predijabetičnih mužjaka tretiranih lijekovima nisu mijenjala izražaj IR- $\alpha$ . S druge strane, ženke su imale promijenjene izražaje IR- $\alpha$  – povećan u SNC kod ženki tretiranih metforminom, a smanjen u oba područja kod ženki tretiranih liraglutidom (tablica 5.5., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Pri usporedbi s 1M kontrolnom skupinom je vidljivo da je tretman liraglutidom mužjacima vratio izražaj IR- $\alpha$  u VTA na kontrolnu razinu, a metformin nije. Kod ženki je metformin vratio izražaj IR- $\alpha$  na kontrolnu razinu, a liraglutid nije (tablica 5.5., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Pri usporedbi učinaka metformina i liraglutida na dopaminergička područja uočeno je da liraglutid značajno smanjuje izražaj IR- $\alpha$  ženkama (tablica 5.5., usporedba „3 vs 4“).



Tablica 5.5. Usporedbe izražaja IR- $\alpha$  u dopaminergičkim područjima mozga koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	DN-SNC						
	DN-VTA	↓↓			↓↓		
ženke	DN-SNC		↑↑	↓↓		↓↓	↓↓
	DN-VTA			↓↓		↓↓	↓↓

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

HFHSD prehrana je mužjacima povećala izražaj IGF-1R $\beta$  u SNC, dok je ženka smanjila u oba (tablica 5.6., usporedba „1 vs 2“). To znači da su mužjaci u SNC postali osjetljiviji na IGF-1, a ženke rezistentne u oba dopaminergička područja.

U pretilim i predijabetičnim mužjacima uz HFHSD prehranu tretmani antidijabeticima ne izazivaju promjene u izražaju IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima. Međutim, ženke postaju osjetljivije na IGF-1, neovisno o vrsti tretmana (tablica 5.6., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Metformin u oba spola vraća razine IGF-1R $\beta$  na kontrolne razine pri SD. Liraglutid samo mužjacima vraća razine IGF-1R $\beta$  na kontrolnu pri SD te SNC području ženki, dok u VTA području ženke ostaju rezistentne na IGF-1 (tablica 5.6., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Ženke tretirane liraglutidom su imale značajno manji izražaj IGF-1R $\beta$  u VTA području u odnosu na metformin (tablica 5.6., usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.6. Usporedbe izražaja IGF-1R $\beta$  u dopaminergičkim područjima mozga koja interpretiraju hranjenje kao osjećaj zadovoljstva

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	DN-SNC	↑↑					
	DN-VTA						
ženke	DN-SNC	↓↓	↑↑	↑↑			
	DN-VTA	↓↓	↑↑	↑↑		↓↓	↓↓

**Legenda:** DN - dopaminergičko područje, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, SD - standardna prehrana, SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*), VTA - ventralno područje tegmentuma, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Zaključno, u SNC mužjaka HFHSD prehrana čini mužjake osjetljivijima na leptin i IGF-1, ali u VTA rezistentnim na inzulin. Ženke uslijed HFHSD postaju rezistentne na leptin i IGF-1 u SNC i na IGF-1 u VTA.

U dopaminergičkim područjima pretilih i predijabetičnih mužjaka liraglutid povećava osjetljivost na leptin. Kod ženki u istom stanju metformin također povećava osjetljivost na leptin te dodatno na inzulin i IGF-1 u SNC, a zatim i na leptin i IGF-1 u VTA. Liraglutid čini pretile ženke rezistentne na inzulin, a istovremeno povećava osjetljivost na IGF-1 u oba DN područja.

Uspijevaju li lijekovi unatoč HFHSD prehrani pretilim životinjama vratiti izražaj receptora na kontrolnu razinu pri SD prehrani? Kod mužjaka tretman metforminom izaziva rezistenciju na inzulin u VTA, a liraglutid povećava osjetljivost na leptin, dok su razine IR- $\alpha$  i IGF-1R $\beta$  kao i u kontrolama. Kod ženki je obrnuto, liraglutid dovodi do inzulinske rezistencije te rezistencije na IGF-1 u VTA, a metformin povećava osjetljivost na leptin, dok su razine IR- $\alpha$  i IGF-1R $\beta$  kao i u kontrolama.

### 5.1.3. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA U PODRUČJIMA KORE MOZGA KOJA POSREDNO UTJEČU NA MOTIVACIJU HRANJENJA

Dok HFHSD prehrana mužjacima povećava izražaj ObR u oba analizirana područja kore mozga, ženkama smanjuje. Dakle, mužjaci postaju osjetljiviji na leptin, a ženke rezistentne (tablica 5.7., usporedba „1 vs 2“).

Na pretile i predijabetične životinje koje unose suvišak kalorija, tretman metforminom rezultira povećanjem osjetljivosti na leptin, a čini se da liraglutid ne utječe na izražaj ObR (tablica 5.7., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Tablica 5.7. Usporedbe izražaja ObR u područjima kore mozga koja indirektno utječu na motivaciju hranjenja

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	CTX-S1BF	↑↑	↑↑		↑↑	↑↑	↓↓
	CTX-PIR	↑↑			↑↑	↑↑	
ženke	CTX-S1BF	↓↓	↑↑		↑↑		
	CTX-PIR	↓↓	↑↑		↑↑		

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Oba antidijabetika su povećala osjetljivost na leptin stanicama u kori mozga mužjaka (pri čemu je liraglutid izazvao veće smanjenje izražaja ObR o odnosu na metformin tablica (5.7., usporedba „3 vs

4<sup>o</sup>), dok na ženka isti učinak izaziva samo metformin. Ženke na HFHSD tretirane liraglutidom nisu imale promijenjen izražaj ObR u odnosu na kontrolnu 1F skupinu, tj. najvjerojatnije je vratio izražaj ObR na kontrolnu razinu pri SD (tablica 5.7., usporedbe „1 vs 3<sup>o</sup>“ i „1 vs 4<sup>o</sup>“).

HFHSD prehrana sama ili u kombinaciji s antidijabeticima nije utjecala na izražaj IR- $\alpha$  u PIR području (tablica 5.8).

Sama HFHSD prehrana je u S1BF području ženki dovela do smanjenja IR- $\alpha$  u S1BF ženki, što znači da su ženke u tom dijelu kore mozga razvile inzulinsku rezistenciju (tablica 5.8., usporedba „1 vs 2<sup>o</sup>“).

Kombinacija HFHSD i metformina uzrokuje i u mužjaka i u ženki povećan izražaj IR- $\alpha$  u S1BF u odnosu na pretila netretirane kontrole, tj. tretirane životinje postaju osjetljivije na inzulin u S1BF (tablica 5.8., usporedba „2 vs 3<sup>o</sup>“). Uz HFHSD i tretman liraglutidom životinje oba spola imaju razinu IR- $\alpha$  kao u kontrolnoj skupini 2M, odnosno 2F (tablica 5.8., usporedba „2 vs 4<sup>o</sup>“).

U usporedbi s kontrolnom skupinom na SD prehrani, HFHSD mužjaci tretirani metforminom su rezistentni na inzulin u S1BF području, no ženke nisu – imaju razinu IR- $\alpha$  kao i kontrolna 1F skupina. S druge strane, HFHSD mužjaci tretirani liraglutidom imaju razinu IR- $\alpha$  kao i kontrolna 1M skupina, dok su ženke rezistentne na inzulin (tablica 5.8., usporedbe „1 vs 3<sup>o</sup>“ i „1 vs 4<sup>o</sup>“). Čini se da je metformin uspio ženka u S1BF vratiti izražaj IR- $\alpha$  na kontrolnu razinu karakterističnu pri SD, dok je mužjake gurnuo u stanje inzulinske rezistencije. U isto vrijeme liraglutid ženka ne uspijeva vratiti izražaj IR- $\alpha$  u S1BF području na kontrolnu razinu pri SD te su one kao i ženke samo na HFHSD rezistentne na inzulin.

Usporedba učinaka metformina i liraglutida na S1BF ženki pokazuje da je, u odnosu na tretman metforminom, tretman liraglutidom rezultirao s manjim izražajem IR- $\alpha$  u tom području (tablica 5.8., usporedba „3 vs 4<sup>o</sup>“).

Tablica 5.8. Usporedbe izražaja IR- $\alpha$  u područjima kore mozga koja indirektno utječu na motivaciju hranjenja

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	CTX-S1BF		↑↑		↓↓		
	CTX-PIR						
ženke	CTX-S1BF	↓↓	↑↑			↓↓	↓↓
	CTX-PIR						

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

HFHSD prehrana sama ili u kombinaciji s antidijabeticima nije utjecala na izražaj IGF-1R $\beta$  u kori mozga mužjaka (tablica 5.9).

HFHSD prehrana sama ne utječe na razinu izražaja IGF-1R $\beta$  u kori mozga ženki (tablica 5.9., usporedba „1 vs 2“).

Primjena metformina je u pretilim i predijabetičnim ženkama povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u S1BF u odnosu na kontrolnu skupinu na HFHSD (tablica 5.9., usporedba „2 vs 3“) te je u usporedbi s kontrolnom skupinom na SD uzrokovala povećanje izražaja IGF-1R $\beta$  u PIR (tablica 5.9., usporedba „1 vs 3“). Povećan izražaj IGF-1R $\beta$  znači da su ženke postale osjetljivije na IGF-1.

Tretman liraglutidom je, u usporebi s tretmanom metforminom, rezultirao smanjenjem u S1BF području kore mozga ženki (tablica 5.9., usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.9. Usporedbe izražaja IGF-1R $\beta$  u područjima kore mozga koja indirektno utječu na motivaciju hranjenja

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	CTX-S1BF						
	CTX-PIR						
ženke	CTX-S1BF		↑↑				↓↓
	CTX-PIR				↑↑		

**Legenda:** CTX - kora mozga, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, PIR - piriformna kora mozga, S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „Barrel field“, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Zaključno, u kori mozga zapažamo da se mužjacima uslijed HFHSD povećava osjetljivost na leptin, a ženkama se razvija rezistencija na leptin u kori mozga te na inzulin u S1BF.

Učinak antidijabetika u pretilom i predijabetičnom organizmu je samo povećana osjetljivost na ligande ili nepromijenjen izražaj sva tri analizirana receptora.

Uspijevaju li lijekovi unatoč HFHSD prehrani pretilim životinjama vratiti izražaj receptora na kontrolnu razinu pri SD prehrani? Dok je liraglutid uspješan u održavanju razine receptora pri kontrolnoj ili nešto iznad (povećana osjetljivost), metformin mužjacima izaziva rezistenciju na inzulin u S1BF. Liraglutid neće u ženkama spriječiti rezistenciju na inzulin koja je nastala uslijed HFHSD, dok će metformin održavati razinu receptora pri kontrolnoj ili nešto iznad (povećana osjetljivost).

#### 5.1.4. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA U PERIVENTRIKULARNOJ JEZGRI HIPOTALAMUSA KOJA JE DIO SIGNALNE MREŽE U NADZORU ENERGETSKOG STANJA ORGANIZMA I SIGNALNE MREŽE ZA REPRODUKCIJU

HFHSD sama ili u kombinaciji s antidijabeticima nije mijenjala izražaj ObR u PE jezgri hipotalamusa mužjaka. U ženkama je ObR imao veći izražaj uslijed HFHSD prehrane (tablica 5.10., usporedba „1 vs 2“).

U pretilih i predijabetičnih ženki je tretman metforminom izazvao povećanje izražaja ObR, a liraglutid smanjenje (tablica 5.10., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“). Dakle, HFHSD ženke tretirane metforminom su bile osjetljivije na leptin od netretiranih na HFHSD, a tretirane liraglutidom su bile rezistentne na leptin.

U odnosu na kontrolnu 1F skupinu na SD, metformin nije uspio vratiti izražaj ObR u PE ženki na kontrolnu razinu, dok je liraglutid uspio (tablica 5.10., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Pri usporedbi učinka metformina i liraglutida na PE pretilih i predijabetičnih ženki, uočeno je smanjenje izražaja ObR uslijed tretmana liraglutidom (tablica 5.10., usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.10. Usporedba izražaja ObR u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa koja je uz nadzor energetskog stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HTH-PE						
ženke	HTH-PE	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑		↓↓

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Kao ni izražaj ObR ni izražaj IR- $\alpha$  se nije promijenio u PE mužjaka uslijed HFHSD. HFHSD nije mijenjala izražaj IR- $\alpha$  ni u PE ženki (tablica 5.11., usporedba „1 vs 2“).

U PE pretilih i predijabetičnih ženki je metformin povećao osjetljivost na inzulin, dok je kombinacija HFHSD i liraglutida ženke odvela u inzulinsku rezistenciju unutar tog područja (tablica 5.11., usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Tretman metforminom je pretilim mužjacima, kojima HFHSD sama ne mijenja razinu IR- $\alpha$ , povećao izražaj IR- $\alpha$  u PE, što znači da su postali osjetljiviji na inzulin u PE hipotalamusa od mužjaka na SD. Liraglutid je pretilim ženkama smanjio izražaj IR- $\alpha$  u PE, što znači da su uslijed tretmana ovim antidijabeticom ženke postale rezistentne na inzulin (tablica 5.11., usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

U PE ženki je liraglutid u odnosu na metformin smanjio izražaj IR- $\alpha$  u PE (tablica 5.11., usporedbe „2 vs 3“).

Tablica 5.11. Usporedba izražaja IR- $\alpha$  u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mušjaci	HTH-PE				↑↑		
ženke	HTH-PE		↑↑	↓↓		↓↓	↓↓

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Kao i u slučaju izražaja Obr, ni izražaj IGF-1R $\beta$  u PE mušjaka se nije mijenjao uslijed HFHSD same ili u kombinaciji s antidijabeticima (tablica 5.12., usporedba „1 vs 2“).

HFHSD ni u PE ženki nije mijenjala izražaj IGF-1R $\beta$ . Tek je kombinacija HFHSD i tretmana metforminom izazvala povećanje izražaja IGF-1R $\beta$  u PE ženki, tj. ženke su u tom području postale osjetljivije na IGF-1 uslijed navedene kombinacije (tablica 5.12., usporedba „2 vs 3“).

U usporedbi s kontrolnom skupinom na SD prehrani, metformin je povećao izražaj IGF-1R $\beta$  u PE pretilih ženki (tablica 5.12., usporedba „1 vs 3“).

U usporedbi s tretmanom pretilih ženki liraglutidom, tretman metforminom je rezultirao povećanjem izražaja IGF-1R $\beta$  u PE ženki (tablica 5.12., usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.12. Usporedba izražaja IGF-1R $\beta$  u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa koja je uz nadzor energetske stanja organizma uključena i u nadzor reprodukcije

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mušjaci	HTH-PE						
ženke	HTH-PE		↑↑		↑↑		↓↓

**Legenda:** HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Zaključno, PE mušjaka uglavnom ne mijenja razinu izražaja sva tri analizirana receptora kao odgovor na HFHSD ili tretiranje predijabetičnog stanja antidijabeticima. Međutim, kod ženki je druga situacija. HFHSD čini ženke osjetljivijima na leptin u PE. Tretman pretilih i predijabetičnih ženki liraglutidom izaziva rezistenciju na leptin i inzulin u PE. Uspijevaju li antidijabetici u vraćanju razina

receptora na kontrolnu pri SD? Metformin ženka ili vraća razinu receptora na kontrolnu ili na nešto višu (povećana osjetljivost), dok liraglutid ne liječi inzulinsku rezistenciju te se ona zadržava u PE ženki.

#### 5.1.5. ANALIZA IZRAŽAJA RECEPTORA U PODRUČJIMA HIPOKAMPUSA ČIJA UKLJUČENOST U ODRŽAVANJE PAMĆENJA OVISI O ENERGETSKOM STANJU ORGANIZMA

HFHSD prehrana je utjecala na izražaj ObR u hipokampusu mužjaka i ženki – mužjacima je smanjila ObR u DG. Istovremeno je mužjacima povećala u CA1 i CA3 područjima, dok je ženka smanjila izražaj ObR u navedenim područjima (tablica 5.13, usporedba „1 vs 2“).

U pretilim i predijabetičnim mužjacima tretmani antidijabeticima dovode do povećanja osjetljivosti na leptin u CA1 području. Tako je i u slučaju ženki na HFHSD tretiranih liraglutidom – izražaj CA1 je bio povećan u odnosu na netretirane HFHSD kontrole. Međutim, HFHSD ženke tretirane metforminom su imale povećan izražaj ObR u svim analiziranim područjima hipokampusa (tablica 5.13, usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Tretman metforminom je u pretilih životinja oba spola rezultirao većom osjetljivošću na leptin u sva tri analizirana područja hipokampusa u odnosu na netretirane kontrole pri SD. Liraglutid je u CA1 i CA3 mužjaka povećao izražaj ObR u odnosu na 1M kontrolnu skupinu, dok je kod ženki vratio razinu izražaja na kontrolnu razinu karakterističnu za SD (tablica 5.13, usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Tablica 5.13. Usporedba izražaja ObR u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HIPP-DG	↓↓			↑↑		
	HIPP-CA1	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	
	HIPP-CA3	↑↑			↑↑	↑↑	
ženke	HIPP-DG		↑↑		↑↑		
	HIPP-CA1	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑		
	HIPP-CA3	↓↓	↑↑		↑↑		

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

HFHSD prehrana mužjacima nije mijenjala izražaj IR- $\alpha$  u hipokampusu. Ženkama je u CA3 području smanjila izražaj IR- $\alpha$  te su stoga ženke bile rezistentne na inzulin u tom području hipokampusa (tablica 5.14, usporedba „1 vs 2“).

Primjena antidijabetika uz HFHSD je promijenila izražaj IR- $\alpha$  u hipokampusu mužjaka i ženki u odnosu na njihove HFHSD netretirane kontrole. Razina IR- $\alpha$  je bila veća u DG i CA1 mužjaka tretiranih metforminom te u CA1 i CA3 mužjaka tretiranih liraglutidom. Kod pretilih ženki je tretman metforminom povećao izražaj IR- $\alpha$  u CA3, a liraglutidom smanjio u CA1 (tablica 5.14, usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).

Nepromijenjena razina izražaja IR- $\alpha$  u hipokampusu pretilih mužjaka tretiranih metforminom ili liraglutidom bi mogla značiti da su antidijabetici uspješno održali razinu IR- $\alpha$  na kontrolnoj razini karakterističnoj pri SD prehrani. Kod ženki to nije bio slučaj – u usporedbi s 1F kontrolnom skupinom na SD, pretile ženke tretirane metforminom su imale veći izražaj IR- $\alpha$  u DG (znak povećane osjetljivosti na inzulin), a tretirane liraglutidom smanjen u CA1 (znak inzulinske rezistencije) (tablica 5.14, usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Pri usporedbi učinaka metformina i liraglutida u pretilom i predijabetičnom organizmu, uočeno je da liraglutid smanjuje razinu IR- $\alpha$  kod mužjaka u DG području te u ženki u sva tri analizirana područja hipokampusa (tablica 5.14, usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.14. Usporedba izražaja IR- $\alpha$  u područjima hipokampusa mužjaka čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HIPP-DG		↑↑				↓↓
	HIPP-CA1			↑↑			
	HIPP-CA3		↑↑	↑↑			
ženke	HIPP-DG				↑↑		↓↓
	HIPP-CA1			↓↓		↓↓	↓↓
	HIPP-CA3	↓↓	↑↑				↓↓

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Dok je izražaj IGF-1R $\beta$  u hipokampusu mužjaka uslijed HFHSD prehrane bio nepromijenjen, u ženki je došlo do rezistencije na IGF-1, sudeći prema smanjenju izražaja njegovog receptora (tablica 5.15, usporedba „1 vs 2“).

U hipokampusu pretilih i predijabetičnih mužjaka tretmani antidijabeticima nisu izazvali značajne promjene u izražaju IGF-1R $\beta$ , kao ni liraglutid u ženki. Međutim, tretman metforminom je doveo do povećanog izražaja IGF-1R $\beta$  u sva tri analizirana područja hipokampusa ženki (tablica 5.15, usporedbe „2 vs 3“ i „2 vs 4“).



U usporedbi s kontrolama na SD prehrani, tretman metforminom je u hipokampusu pretilih životinja izazvao promjene u izražaju IGF-1R $\beta$  u DG području – u mužjaka je povećao, a u ženki smanjio njegov izražaj, odnosno, mužjaci su u DG postali osjetljiviji na IGF-1, a ženke rezistentne. U hipokampusu pretilih ženki tretiranih liraglutidom je uočeno smanjenje izražaja IGF-1R $\beta$  u sva tri analizirana područja hipokampusa, dok je hipokampus pretilih mužjaka tretiranih istim antidijabetikom imao nepromijenjen izražaj IGF-1R $\beta$  (tablica 5.15, usporedbe „1 vs 3“ i „1 vs 4“).

Tretman liraglutidom je u odnosu na tretman metforminom smanjio izražaj IGF-1R $\beta$  u CA1 i CA3 područjima hipokampusa ženki (tablica 5.15, usporedba „3 vs 4“).

Tablica 5.15. Usporedba izražaja IGF-1R $\beta$  u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

		Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
		1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
mužjaci	HIPP-DG				↑↑		
	HIPP-CA1						
	HIPP-CA3						
ženke	HIPP-DG	↓↓	↑↑		↓↓	↓↓	
	HIPP-CA1	↓↓	↑↑			↓↓	↓↓
	HIPP-CA3	↓↓	↑↑			↓↓	↓↓

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Zaključno, u hipokampusu mužjaka uslijed HFHSD dolazi do rezistencije na leptin u DG, ali povećane osjetljivosti na njega u CA1 i CA3. U hipokampusu ženki se razvija rezistencija na leptin, inzulin i IGF-1.

Tretmani pretilih i predijabetičnih mužjaka antidijabeticima djeluju pozitivno na hipokampus – ili su razine receptora nepromijenjene ili povećane, što znači da su osjetljiviji na ligande analiziranih receptora. Kod ženki u istom stanju metformin djeluje pozitivno. Međutim, liraglutid dovodi do pojave inzulinske rezistencije u CA1 ženki, uz istovremenu povećanu osjetljivost na leptin.

Uspijevaju li antidijabetici u vraćanju razina receptora na kontrolnu pri SD? Oba antidijabetika mužjacima ne mijenjaju razine analiziranih receptora ili ih povećavaju, što znači da su mužjaci u hipokampusu povećane osjetljivosti na ligande. Metformin će ženke činiti rezistentnim na IGF-1 u DG, a liraglutid će ih činiti rezistentne na inzulin u CA1 te na IGF-1 u sva tri analizirana područja hipokampusa. Od navedena dva antidijabetika liraglutid se čini lošijim za ženke.

## 5.2. Analiza biljega aktiviranih astrocita i reaktivne glioze

Već pri akutnom izlaganju unosa previše kalorija, konzumacijom prehrane poput HFHSD, u mozgu je zapažena pojava upale i to u prvoj jezgri hipotalamusa koja prima signale adipoznosti i signale sitosti kako bi prikladno odgovorila na njih (71). Navedena akutna upala se smiruje kroz nekoliko tjedana. Ukoliko je organizam kronično izložen prekaloričnoj prehrani, u hipotalamusu će se razviti kronična upala koja ima potencijal širenja po svim područjima mozga. Posljedično će se narušiti mehanizam nadzora energetske stanja organizma, ali i druge funkcije mozga. Stoga možemo očekivati u životinjama kronično izloženim HFHSD simptome poput pretilosti (što je prema neobjavljenim podacima prof. Gaspara i sur. i potvrđeno) i obilježja koja ju prate, a koja su karakteristična za metabolički sindrom i dijabetes. Npr. prema neobjavljenim podacima prof. Gaspara i sur. iz GTT profila uočen je razvoj hiperglikemije u životinja na HFHSD prehrani. Osim navedenih metaboličkih poremećaja, očekivani su i neurološki poremećaji, poput nemogućnost izvršenja složenih zadataka vezanih uz snalaženje u prostoru i pamćenje, i neurodegeneracija.

Upala se u mozgu očituje povećanom brojnošću mikroglialnih stanica i aktiviranim astrocitima, čija je morfologija u odnosu na zdravo stanje promijenjena (63,64). U područjima mozga u direktnom nadzoru energetske stanja organizma, odnosno hipotalamusa, i područjima bitnim za navigaciju i pamćenje podražaja te čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetske stanju organizma, odnosno hipokampus, analiziran je izražaj biljega glije. GFAP je biljeg astrocita, a Iba1 mikroglije. Budući da je u navedenim područjima otkriven proces neurogeneze, pri čemu je hipokampus dobro opisan kao takav, a za hipotalamus se tek nedavno saznalo (6,34), navedena područja su imunohistokemijski bojana s anti-nestin protutijelom kako bi se detektirao biljeg matičnih stanica (nestin) u proliferaciji. Nažalost, protutijelo nije bilo funkcionalno. Iz tog razloga će se na otvoreno pitanje što se događa s matičnim stanicama u hipotalamusu i hipokampusu uslijed kroničnog izlaganja HFHSD prehrani, nastojati odgovoriti u budućnosti.

### 5.2.1. IZRAŽAJ BILJEGA GLIJE U HIPOTALAMIČKIM CENTRIMA KOJI DIREKTNO NADZIRU HRANJENJE I ENERGETSKO STANJE ORGANIZMA

U hipotalamusu mužjaka je uočeno povećanje izražaja GFAP uslijed kroničnog unosa HFHSD prehrane (tablica 5.16, usporedba „1 vs 2“). Možemo zaključiti da je došlo do ozljede mozga uslijed HFHSD. Najveći izražaj GFAP je imala jezgra ARC koja je prva u primanju signala adipoznosti, uslijed čije prevelike koncentracije može doći do upale. Dodatno je ARC osjetljivija od ostalih analiziranih jezgara na čimbenike upale iz periferije.

Tablica 5.16. Usporedbe izražaja GFAP u hipotalamičkim jezgrama mužjaka, koje su direktno uključene u nadzor energetske stanja organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	↑↑	↑	↓	↑	↑	↓
HTH-LH	↑	↑↑	↓	↑	-	↓
HTH-PA-AP	↑	↑	↓	↑	↓	↓
HTH-PE	↑	↑	↓	↑	↑	↓

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

U izražaju Iba1 nisu primijećene značajne promjene. Tablica 5.17. prikazuje trendove promjena, ali ograničenje u eksperimentu je bio mali uzorak za analizu uslijed same veličine hipotalamusa u odnosu na mozak.

Tablica 5.17. Usporedbe izražaja Iba1 u hipotalamičkim jezgrama mužjaka, koje su direktno uključene u nadzor energetske stanja organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	↑	↓	↓	↑	↑	↑
HTH-LH	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HTH-PA-AP	-	↓	↓	↓	-	↑
HTH-PE	↑	↓	↓	↑	↑	↑

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

U ženki HFHSD prehrana nije rezultirala značajnijom upalom (tablica 5.18). Kombinacija HFHSD i metformina je ženka u ARC značajno smanjila izražaj GFAP. Međutim, u isto vrijeme su navedene ženke imale povećan izražaj GFAP u ostalim analiziranim jezgrama hipotalamusa, osim u najudaljenijoj od 3. moždane komore LH.

Tablica 5.18. Usporedbe izražaja GFAP u hipotalamičkim jezgrama direktno uključenih u nadzor energetske stanja organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	↑	↓↓	↑	↓	↑	↑
HTH-LH	-	↑	↑	↑	↑	↑
HTH-PA-AP	↓	↑↑	↑	↑	↑	↑
HTH-PE	↓	↑↑	↑	↑	↑	↑

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

U ženki na HFHSD prehrani nije došlo do značajnih promjena u izražaju Iba1 (tablica 5.19).

Tablica 5.19. Usporedbe izražaja Iba1 u hipotalamičkim jezgrama direktno uključenih u nadzor energetske stanja organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HTH-ARC	↑	↓	↓	↑	↓	↓
HTH-LH	↓	↑	↓	↑	↓	↓
HTH-PA-AP	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HTH-PE	↓	↓	↓	↓	↓	↓

**Legenda:** ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa, HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HTH - hipotalamus, Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), LH - lateralna jezgra hipotalamusa, PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa, SD - standardna prehrana 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.2. IZRAŽAJ BILJEGA GLIJE U HIPOKAMPUSU ČIJA UKLJUČENOST U ODRŽAVANJE PAMĆENJA OVISI O ENERGETSKOM STANJU ORGANIZMA

Usljed HFHSD prehrane izražaj GFAP se nije značajno mijenjao (tablica 5.20).

Tablica 5.20. Usporedbe izražaja GFAP u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	↓	↑	↓	↓	↓	↓
HIPP-CA3	↓	↑	↓	↓	↓	↓
HIPP-CA1	↑	↑	↓	↑	↑	↓

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Oba lijeka djeluju na CA1 područje hipokampusa mužjaka, u smislu povećanja izražaja GFAP u odnosu na SD kontrolu (tablica 5.21).

Tablica 5.21. Usporedbe izražaja Iba1 u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	↑	↑	↑	↑	↑	-
HIPP-CA3	↑	↑	↑	↑	↑	↓
HIPP-CA1	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	-

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Kod ženki na HFHSD prehrani nije bilo značajnih promjena u izražaju GFAP u hipokampusu (tablica 5.22).

Tablica 5.22. Usporedbe izražaja GFAP u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	↓	↑	↑	↓	↑	↑
HIPP-CA3	↑	↑	↑	↑	↑	↑
HIPP-CA1	↓	↑	↑	↓	↓	↑

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↑↑ - statistički značajno povećanje, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

Isti fenomen vrijedi i za biljeg Iba1 (tablica 5.23).

Tablica 5.23. Usporedbe izražaja Iba1 u područjima hipokampusa čija uključenost u održavanje pamćenja ovisi o energetsom stanju organizma

	Učinak HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 vs 2	2 vs 3	2 vs 4	1 vs 3	1 vs 4	3 vs 4
HIPP-DG	↓	↑	↓	↓	↓	↓
HIPP-CA3	↓	↑	↓	↓	↓	↓
HIPP-CA1	↓	↑	↓	↓	↓	↓

**Legenda:** CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3, DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*), HFHSD - prehrana obogaćena mastima i ugljikohidratima, HIPP - hipokampus, SD - standardna prehrana, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↓ - smanjenje izražaja, ↓↓ - statistički značajno smanjenje; Mann-Whitney-U test uz Bonferronijevu korekciju,  $p \leq 0,05$ .

### 5.3. Analiza receptora ObR i IR- $\alpha$ u staničnoj membrani stanica hipokampusa

Stanična membrana nije homogena građe, nego u sebi sadrži diskretne odjeljke uređenije strukture ili lipidne splavi u kojima je osiguran prikladan okoliš za staničnu signalizaciju. Zahvaljujući kaveolinu, proteinu nalik ukosnici, neke od lipidnih splavi su invaginacije u membrani te se nazivaju kaveolama. U kaveole su na periferiji smješteni ObR i IR te se isto očekuje u središnjem živčanom sustavu (75,78). Osim interakcija s kaveolinom, navedeni su receptori u interakciji s gangliozidima, koji, čini se, posreduju funkcionalnosti receptora (80,107). U slučaju patoloških promjena interakcije ObR i IR s kaveolinom će se izgubiti, a brojnost gangliozida se može povećati u staničnoj membrani. Posljedično bi se ObR i IR izmjestili iz kaveola te bi stanica s takvim receptorima bila neosjetljiva na ligande, leptin i inzulin. U slučaju neosjetljivosti na leptin i inzulin, stanice hipokampusa ne bi mogle

normalno funkcionirati. Disfunkcionalan hipokampus se očituje nemogućnošću snalaženja u prostoru i rješavanju složenih zadataka.

Analizom lipidnih splavi hipokampusa mužjaka i ženki izloženih kroničnoj HFHSD prehrani pokazalo se da receptori ObR i IR nisu smješteni u splavima. Naprotiv, i u mužjaka i u ženki su detektirani u n-LS frakciji u kojoj se nalazi ostatak stanične membrane, i u kontrolnim skupinama, 1 i 2 te u skupinama tretiranim antidijabeticima, 3 i 4. Navedeni rezultat je prvi koji bi pokazao da ObR i IR nisu smješteni u centralnom živčanom sustavu kao na periferiji. Na periferiji je drugačiji sastav gangliozida pa bi to moglo biti u vezi s drugačijim smještajem ObR i IR (108). Karakterizacija sastava lipidnih splavi s obzirom na gangliozide bi mogla doprinijeti razumijevanju smještaja ObR i IR u staničnoj membrani stanica hipokampusa. Karakterizacija bi se mogla napraviti na primarnim staničnim kulturama stanica hipokampusa.

Iako je jasno vidljivo da dolazi do kvantitativnih promjena u izražaju ObR i IR, teško je zaključiti na što se on odnosi, posebice na koju vrstu stanica. Zato mislimo da se studija mora napraviti na staničnim kulturama hipokampalnih neurona ili glija stanica kako bi se to moglo razlučiti. Dodatno, ObR je bio izražen u nekoliko izoformi. Smatramo da se radilo o jednoj izoformi – ObRb koja je različito deglikozilirana tijekom procesa izolacije lipidnih splavi. Naime, ObR je vrlo glikozilirani receptor, a ugljikohidratne skupine doprinose molekularnoj masi ObRb od 30-70 kDa. Također doprinose funkcionalnosti receptora (48,49). Prema uputama proizvođača (Santa Cruz Inc., Texas, DA, SAD) očekivali smo jednu vrpce na membrani molekularne mase 132 kDa. Na membrani su se pojavile vrpce u odgovarajućem rasponu od 58-132 kDa. Dakle, najvjerojatnije se radi o deglikozilaciji ObRb. Dvije najizraženije vrpce ObR su analizirane, nazvali smo ih „duga izoforma“ i „kratka izoforma“. Kako bi zaista mogli utvrditi radi li se samo o ObRb izoformi, a ne i drugim izoformama (ima ih 7 ukupno), potrebno je napraviti ekstrakciju ObR iz stanične membrane stanica hipokampusa, npr. tehnikom tankoslojne kromatografije i susljednu karakterizaciju. Tablicama 5.24. i 5.25. prikazani su opaženi trendovi u izražaju ObR kod mužjaka, odnosno ženki.

Tablica 5.24. Usporedba izražaja ObR u n-LS frakciji stanične membrane hipokampusa mužjaka.

ObR	Učinak HFHSD	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 VS 2	2 VS 3	2 VS 4	1 VS 3	1 VS 4	3 VS 4
DUGA IZOFORMA	↓	↑	↑	↓	↑	↑
KRATKA IZOFORMA	↑	↓	↑	↓	↑	↑

**Legenda:** ObR – leptinski receptor, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↓ - smanjenje izražaja.

Tablica 5.25. Usporedba izražaja ObR u n-LS frakciji stanične membrane hipokampusa ženki.

ObR	Učinak HFHSD	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 VS 2	2 VS 3	2 VS 4	1 VS 3	1 VS 4	3 VS 4
DUGA IZOFORMA	↑	↑	↑	↑	↑	-
KRATKA IZOFORMA	↑	↓	↑	↓	↑	↑

**Legenda:** ObR – leptinski receptor, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↓ - smanjenje izražaja.

Tablicama 5.26. i 5.27. prikazani su opaženi trendovi u izražaju IR- $\alpha$  kod mužjaka, odnosno ženki.

Tablica 5.26. Usporedba izražaja IR- $\alpha$  u n-LS frakciji stanične membrane hipokampusa mužjaka.

IR- $\alpha$	Učinak HFHSD	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 VS 2	2 VS 3	2 VS 4	1 VS 3	1 VS 4	3 VS 4
MUŽJACI	↓	↓	↑	↓	↑	↑

**Legenda:** IR- $\alpha$  – alfa podjedinica inzulinskog receptora, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↓ - smanjenje izražaja.

Tablica 5.27. Usporedba izražaja IR- $\alpha$  u n-LS frakciji stanične membrane hipokampusa ženki.

IR- $\alpha$	Učinak HFHSD	Učinak metformina pri HFHSD	Učinak liraglutida pri HFHSD	Učinak metformina u pretilosti i predijabetesu	Učinak liraglutida u pretilosti i predijabetesu	Usporedba učinaka metformina i liraglutida
	1 VS 2	2 VS 3	2 VS 4	1 VS 3	1 VS 4	3 VS 4
ŽENKE	↑	↑	↑	↑	↑	↓

**Legenda:** IR- $\alpha$  – alfa podjedinica inzulinskog receptora, 1 - životinje na SD prehrani, 2 - životinje na HFHSD prehrani, 3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom, 4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom, ↑ - povećanje izražaja, ↓ - smanjenje izražaja.

#### 5.4. Analiza izražaja proteina pSTAT3 i SOCS3

pSTAT3 i SOCS3 su molekule uključene u leptinsku signalizaciju. U slučaju povezivanja s leptinom ObR postaje aktivan, što uzrokuje fosforilaciju STAT3 proteina od strane JAK2 kinaze pridružene receptoru ObR. pSTAT3 posreduje signalizaciji koja na kraju dovodi do izražaja proteina SOCS3. SOCS3 je inhibitor aktivnosti ObR, a opisani mehanizam je klasična povratna sprega kao način



kontrole aktivnosti ObR (47). Osim u leptinskom signalnom putu, SOCS3 može biti aktiviran i od strane receptora za upalne čimbenike poput TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ili IL-6 (56). Stoga se u slučaju upale može očekivati neosjetljivost ObR na leptin. Budući da se leptinski i inzulinski signalni putovi, tako reći, susreću u svojim nizvodnim putovima, narušena signalizacija leptinom dovodi i do narušene signalizacije inzulinom.

Koristeći se protutijelima na navedena dva proteina, anti-pSTAT3 i anti-SOCS3, analiziran je sadržaj citosola stanica hipokampusa štakora kronično izloženih HFHSD prehrani. Nažalost, protutijelo anti-pSTAT3 nije dalo imunoobojenje na membrani. Ograničenje u korištenju anti-pSTAT3 protutijela je bio izostanak korištenja kontrolnog uzorka i blokirajućeg peptida. Stoga nismo u mogućnosti zaključiti je li bilo fosforiliranog proteina, je li korištena koncentracija bila u granicama detekcije ili je li specifično vezanje protutijela za protein izostalo.

Anti-SOCS3 protutijelo je bilo specifično vezano za SOCS3 protein. Uočeno je da je SOCS3 različito izražen u životinjskim skupinama. Od svih promatranih skupina životinja, najviše vrijednosti SOCS3 proteina pronađene su u skupini 4F. Međutim, taj rezultat moramo uzeti s rezervom jer nije normaliziran prema unutrašnjoj kontroli. I u ovom slučaju nismo sigurni kojoj vrsti stanica se može pripisati obujam opaženih promjena pa bi dodatni eksperimenti na staničnim kulturama mogli razjasniti ove nedoumice.

## **6. ZAKLJUČCI**

Stalan unos suviška kalorija izaziva spolno specifične promjene izražaja ObR, IR i IGF-1R u odraslih Sprague-Dawley štakora koji su starošću ekvivalentni srednjoj ljudskoj dobi. Promjena količine promatranih receptora odnosi se na promjenu u osjetljivosti za njihove ligande. Kod mužjaka se povećava osjetljivost na ObR i IGF-1R u LH, jezgri koja potiče na hranjenje, a kod ženki se smanjuje osjetljivost na IR i IGF-1R u istoj jezgri. Kod mužjaka regije zadužene za pamćenje reagiraju na HFHSD prehranu povećanjem osjetljivosti leptinskog receptora, dok se kod ženki smanjuje osjetljivost istih regija na sva tri receptora.

Metformin i liraglutid izazivaju spolno specifične promjene izražaja promatranih receptora. Oba antidijabetika povećavaju osjetljivost na leptin i inzulin u mužjaka. U ženki metformin djeluje slično kao kod mužjaka, ali liraglutid ima suprotan učinak i snižava osjetljivost prije svega na inzulin, a zatim i na leptin, osobito u jezgri zaduženoj za reprodukciju. Metformin i liraglutid imaju suprotno djelovanje na hipotalamičke jezgre ženki. Također, oba antidijabetika povećavaju osjetljivost na leptin i inzulin u hipokampusu mužjaka. Metformin djeluje slično kao kod mužjaka na hipokampusu ženki, dok liraglutid smanjuje osjetljivost, osobito na inzulin. Zaključno, metformin i liraglutid imaju suprotno djelovanje na hipokampusu ženki.

HFHSD povećava izražaj oba biljega upale u hipotalamusu mužjaka i ženki i to počevši s najvećim izražajem biljega upale u ARC, a najmanje u najudaljenijoj jezgri od treće moždane komore, LH. Istovremeno, u hipokampusu nije došlo do pojave reaktivne glioze i povećanja brojnosti mikroglije. Pod utjecajem antidijabetika metformina u hipotalamusu mužjaka dolazi do značajnog povećanja astroglioze samo u LH. Oba antidijabetika povećavaju izražaj Iba1 biljega upale u CA1 području hipokampusa mužjaka. U ženki metformin smanjuje astrogliozu u hipotalamičkoj jezgri ARC, ali u isto vrijeme povećava u dvije susjedne jezgre PA i PE. U hipokampusu ženki antidijabetici nisu uzrokovali promjene u izražaju biljega upale.

Izolacija lipidnih splavi pokazala je da su ObR i IR u svim skupinama životinja izvan lipidnih splavi te da niti u jednoj skupini životinja nije došlo do razvoja leptinske i inzulinske rezistencije ili centralni razvoj rezistencije nije popraćen premještanjem receptora izvan splavi. Za ObR receptor su detektirane dvije izoforme, duga i kratka. Skupine su se međusobno razlikovale s obzirom na količinu receptora, a najviše oba receptora ObR i IR je detektirano u mužjaka na HFHSD tretiranih liraglutidom.

SOCS3 kao nizvodni cilj signalizacije putem citokinskih receptora ima najveći izražaj u ženki na HFHSD tretiranih liraglutidom iz čega možemo zaključiti da u ovoj skupini životinja dolazi do interakcije leptinskog i citokinskog signalnog puta.

## **7. LITERATURA**

1. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661–71.
2. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*. 2012 Nov 13;13(12):1079–86.
3. Myers MG, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The Geometry of Leptin Action in the Brain: More Complicated Than a Simple ARC. *Cell Metab*. 2009 Feb;9(2):117–23.
4. Kandel ER, editor. *Principles of neural science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2013. 1709 p.
5. Norsted E, Gömüç B, Meister B. Protein components of the blood–brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat*. 2008 Oct;36(2):107–21.
6. Rizzoti K, Lovell-Badge R. Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Apr;445:7–13.
7. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2000 Oct;16(10):894–902.
8. Semaan SJ, Dhamija S, Kim J, Ku EC, Kauffman AS. Assessment of Epigenetic Contributions to Sexually-Dimorphic *Kiss1* Expression in the Anteroventral Periventricular Nucleus of Mice. *Endocrinology*. 2012 Apr;153(4):1875–86.
9. Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014 May 20;15(6):367–78.
10. Williams KJ, Wu X. Imbalanced insulin action in chronic over nutrition: Clinical harm, molecular mechanisms, and a way forward. *Atherosclerosis*. 2016 Apr;247:225–82.
11. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego [u.a.: Acad. Press; 2004.
12. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging Dis*. 2010 Oct;1(2):147–57.
13. Beneit N, Fernández-García CE, Martín-Ventura JL, Perdomo L, Escribano ó., Michel JB, et al. Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2016 Dec [citirano 2016 Mar 24];15(1). Dostupno na poveznici: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0477-3>

14. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou M-Z, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature*. 2006 Sep 6;443(7108):218–21.
15. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan 1;6(1):a009191–a009191.
16. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93:S52–9.
17. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr;490(1–3):5–12.
18. Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1316–38.
19. Battelino T, Omladič JŠ, Phillip M. Closed loop insulin delivery in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jun;29(3):315–25.
20. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185–200.
21. Turnpenny PD, Ellard S. Emery’s elements of medical genetics. 14th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Churchill Livingstone; 2012. 445 p.
22. Gray SM, Meijer RI, Barrett EJ. Insulin Regulates Brain Function, but How Does It Get There? *Diabetes*. 2014 Dec 1;63(12):3992–7.
23. Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer’s Disease. *Front Endocrinol [Internet]*. 2014 Oct 9 [citirano 2016 Mar 24];5. Dostupno na poveznici:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00161/abstract>
24. Woods S, Seeley R, Baskin D, Schwartz M. Insulin and the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des*. 2003 Apr 1;9(10):795–800.
25. Begg DP. Insulin Transport into the Brain and Cerebrospinal Fluid. In: *Vitamins & Hormones [Internet]*. Elsevier; 2015 [citirano 2016 Mar 24]. p. 229–48. Dostupno na poveznici:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008367291400020X>

26. de la Monte SM. Relationships Between Diabetes and Cognitive Impairment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014 Mar;43(1):245–67.
27. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol.* 2012;3:34.
28. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5527–41.
29. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 2003 Jan 9;421(6919):182–7.
30. Dyer AH, Vahdatpour C, Sanfeliu A, Tropea D. The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience.* 2016 Jun;325:89–99.
31. Supeno NE, Pati S, Hadi RA, Ghani ARI, Mustafa Z, Abdullah JM, et al. IGF-1 Acts as Controlling Switch for Long-term Proliferation and Maintenance of EGF/FGF-responsive Striatal Neural Stem Cells. *Int J Med Sci.* 2013;10(5):522–31.
32. Forbes BE. Two years in IGF research. *Growth Horm IGF Res.* 2016 Oct;30–31:70–4.
33. Chaker Z, George C, Petrovska M, Caron J-B, Lacube P, Caillé I, et al. Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiol Aging.* 2016 May;41:64–72.
34. Kokoeva MV. Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Mice: Potential Role in Energy Balance. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):679–83.
35. Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, et al. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci.* 2012 Mar 25;15(5):700–2.
36. Huffman DM, Farias Quipildor G, Mao K, Zhang X, Wan J, Apontes P, et al. Central insulin-like growth factor-1 (IGF-1) restores whole-body insulin action in a model of age-related insulin resistance and IGF-1 decline. *Aging Cell.* 2016 Feb;15(1):181–6.
37. Benyoucef S, Surinya KH, Hadaschik D, Siddle K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J.* 2007 May 1;403(3):603–13.

38. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The Link between the Metabolic Syndrome and Cancer. *Int J Biol Sci.* 2011;7(7):1003–15.
39. Zhang F, Chen Y, Heiman M, DiMarchi R. *Leptin: Structure, Function and Biology*. U: *Vitamins & Hormones* [Internet]. Elsevier; 2005 [citirano 2016 Mar 30]. p. 345–72. Dostupno na poveznici: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672905710128>
40. Iikuni N, Kwan Lam Q, Lu L, Matarese G, Cava A. Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev.* 2008 May 1;4(2):70–9.
41. Roubos EW, Dahmen M, Kozicz T, Xu L. Leptin and the hypothalamo-pituitary–adrenal stress axis. *Gen Comp Endocrinol.* 2012 May;177(1):28–36.
42. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Mar 15;174(6):3137–42.
43. Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. *Pituitary.* 2001 Apr;4(1–2):87–92.
44. Chow VTK, Phoon MC. Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive elisa reveals correlations with body mass index and sex. *AJP Adv Physiol Educ.* 2003 Jun 1;27(2):70–7.
45. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Müller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Sep;82(9):2904–10.
46. Kwon O, Kim KW, Kim M-S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Apr;73(7):1457–77.
47. Peelman F, Zabeau L, Moharana K, Savvides SN, Tavernier J. 20 years of leptin: Insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J Endocrinol.* 2014 Sep 17;223(1):T9–23.
48. Haniu M, Arakawa T, Bures EJ, Young Y, Hui JO, Rohde MF, et al. Human Leptin Receptor: determination of disulfide structure and n-glycosylation sites of the extracellular domain. *J Biol Chem.* 1998 Oct 30;273(44):28691–9.
49. Kamikubo Y, Dellas C, Loskutoff DJ, Quigley JP, Ruggeri ZM. Contribution of leptin receptor N-linked glycans to leptin binding. *Biochem J.* 2008 Mar 15;410(3):595–604.



50. Harvey J. Leptin and Alzheimer's Disease. In: Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline [Internet]. Elsevier; 2015 [citirano 2016 Mar 24]. p. 457–67. Dostupno na poveznici: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124078246000410>
51. Wauman J, Zabeau L, Tavernier J. The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Front Endocrinol* [Internet]. 2017 Feb 21 [citirano 2016 Mar 24];8. Dostupno na poveznici: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00030/full>
52. Myers MG. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:287–304.
53. Boerma JT, World Health Organization. Health in 2015: from MDGS, millennium development goals, to SDGS, sustainable development goals. 2015.
54. Manzel A, Muller DN, Hafler DA, Erdman SE, Linker RA, Kleinewietfeld M. Role of “Western Diet” in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2014 Jan [citirano 2016 Mar 24];14(1). Dostupno na poveznici: <http://link.springer.com/10.1007/s11882-013-0404-6>
55. Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014 Feb;10(1):S76–83.
56. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr 23;29(1):415–45.
57. Maldonado-Ruiz R, Montalvo-Martínez L, Fuentes-Mera L, Camacho A. Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes. *Nutr Diabetes*. 2017 Mar 20;7(3):e254.
58. Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*. 2005 Dec;54 Suppl 2:S73-78.
59. Choi K, Kim Y-B. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010;25(2):119.
60. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4854–8.
61. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):971–6.

62. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367–77.
63. Purves D, editor. *Neuroscience*. 5th ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 2012. 1 p.
64. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 2010 Jan;119(1):7–35.
65. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009 Aug;32(8):421–31.
66. Chowen JA, Argente-Arizón P, Freire-Regatillo A, Frago LM, Horvath TL, Argente J. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. *Prog Neurobiol.* 2016 Sep;144:68–87.
67. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 2004 Jun;89(5):1092–100.
68. Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, et al. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun.* 2016 May 3;7:11499.
69. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010 Apr;6(4):193–201.
70. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014 Apr;565:30–8.
71. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):153–62.
72. Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2017 Jan 3;127(1):24–32.
73. Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 2006 Nov;17(9):365–71.
74. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature [Internet].* 2015 Jun 1 [citirano 2015 Jun 15]; advance online publication. Dostupno na poveznici: <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature14432.html>

75. Frühbeck G, López M, Diéguez C. Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Jul;18(5):177–82.
76. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Oct;3(10):a004697.
77. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 2002 Aug;25(8):412–7.
78. Pike LJ. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: An evolving story. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2005 Dec;1746(3):260–73.
79. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):673–7.
80. Lopez PHH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):549–57.
81. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, et al. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Aug 21;104(34):13678–83.
82. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, et al. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Mar 18;100(6):3445–9.
83. Lipina C, Hundal HS. Ganglioside GM3 as a gatekeeper of obesity-associated insulin resistance: Evidence and mechanisms. *FEBS Lett.* 2015 Oct 24;589(21):3221–7.
84. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat.* 2005 Sep;207(3):271–82.
85. Harvey J. Leptin regulation of neuronal morphology and hippocampal synaptic function. *Front Synaptic Neurosci* [Internet]. 2013 [citirano 2016 Mar 24];5. Dostupno na poveznici: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2013.00003/abstract>
86. Irving AJ, Harvey J. Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2013 Dec 2;369(1633):20130155–20130155.
87. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. Leptin-mediated Cell Survival Signaling in Hippocampal Neurons Mediated by JAK STAT3 and Mitochondrial Stabilization. *J Biol Chem.* 2008 Jan 18;283(3):1754–63.

88. Zhang F, Wang S, Signore AP, Chen J. Neuroprotective Effects of Leptin Against Ischemic Injury Induced by Oxygen-Glucose Deprivation and Transient Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2007 Aug 1;38(8):2329–36.
89. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr;490(1–3):13–24.
90. McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem*. 2010 May;93(4):546–53.
91. De Felice FG, Benedict C. A Key Role of Insulin Receptors in Memory: Figure 1. *Diabetes*. 2015 Nov;64(11):3653–5.
92. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wrighten SA, Green AJ, Wilson SP, et al. Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes*. 2015 Nov;64(11):3927–36.
93. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer’s disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Jun;101(4):564–74.
94. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C. The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci*. 2011 Apr 27;31(17):6587–94.
95. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996 Feb 29;334(9):574–9.
96. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer’s disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Jun;101(4):564–74.
97. Gonzalez-Campoy JM, St Jeor ST, Castorino K, Ebrahim A, Hurley D, Jovanovic L, et al. Clinical practice guidelines for healthy eating for the prevention and treatment of metabolic and endocrine diseases in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists/the American College of Endocrinology and the Obesity Society. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol*. 2013 Oct;19 Suppl 3:1–82.
98. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C. The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci*. 2011 Apr 27;31(17):6587–94.

- 
99. Sjöholm Å. Liraglutide Therapy for Type 2 Diabetes: Overcoming Unmet Needs. *Pharmaceuticals*. 2010 Mar 22;3(3):764–81.
  100. Watson RE, Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides*. 1986 Feb;7(1):155–9.
  101. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676–82.
  102. Moos T, Nielsen TR, Skjørringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem*. 2007 Dec;103(5):1730–40.
  103. Manzel A, Muller DN, Hafler DA, Erdman SE, Linker RA, Kleinewietfeld M. Role of “Western Diet” in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep [Internet]*. 2014 Jan [citirano 2016 Mar 24];14(1). Dostupno na poveznici: <http://link.springer.com/10.1007/s11882-013-0404-6>
  104. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624–30.
  105. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*. 2012 Nov 13;13(12):1079–86.
  106. Bramshuber M, Weghuber J, Ruprecht V, Gombos I, Horvath I, Vigh L, et al. Imaging of Mobile Long-lived Nanoparticles in the Live Cell Plasma Membrane. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41765–71.
  107. Prendergast J, Umanah GKE, Yoo S-W, Lagerlof O, Motari MG, Cole RN, et al. Ganglioside Regulation of AMPA Receptor Trafficking. *J Neurosci*. 2014 Sep 24;34(39):13246–58.
  108. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev*. 2014 Apr;94(2):461–518.

## **8. SAŽETAK**

**UVOD.** Energetsko stanje organizma je kontrolirano centrima sitosti u hipotalamusu, dijelu mozga kojim se održava homeostaza organizma. Hormoni inzulin i leptin su dvije glavne molekule koje odražavaju količinu uskladištene ili trenutno dostupne energije u obliku masnog tkiva i glikogena, te tu informaciju prenose centrima sitosti. Oni zauzvrat potiču prikladan odgovor organizma (potraga za hranom i hranjenje ili odbijanje hrane). U slučaju narušene kontrole energetskog stanja organizma dolazi do poremećaja poput metaboličkog sindroma praćenog pretilošću, dijabetesom, problemima u kardiovaskularnom sustavu, te može doći do opadanja kognitivnih sposobnosti i neurodegenerativnih poremećaja. Nabrojani poremećaji prevladavaju u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju te predstavljaju velik problem zdravstvu navedenih zemalja. Kontrola energetskog stanja organizma biva narušena uslijed kroničnog unosa suviška kalorija i posljedičnog razvoja upale niskog stupnja u perifernim tkivima te upale u centralnom živčanom sustavu (koja se očituje promjenom morfologije astrocita i povećanjem brojnosti mikroglije). Upalno stanje doprinosi narušavanju signalnih putova upravljanih inzulinskim i leptinskim receptorima. Jedan od mehanizama koji bi doveo do centralne inzulinske i leptinske rezistencije mogao bi uključivati promjene u sastavu lipidnih splavi stanica mozga. Metformin i liraglutid su najčešće korišteni antidijabetički lijekovi koji su pokazali obećavajuće rezultate u terapiji ranih znakova neurodegeneracije. Istraživanja utjecaja ova dva antidijabetika razjasnila bi mehanizam njihovog djelovanja na centralni živčani sustav. **METODE.** U istraživanje su bila uključena 64 odrasla Sprague-Dawley štakora oba spola, starosti 44 tjedna. Bili su podijeljeni u 4 skupine; (1) - kontrolna skupina na standardnoj prehrani (SD), (2) - kontrolna skupina na prehrani bogatoj mastima i ugljikohidratima (HFHSD), (3) - skupina na HFHSD tretirana metforminom i (4) - skupina na HFHSD tretirana liraglutidom. Nakon 6 tjedana indukcije pretilosti uslijedilo je 14 tjedana primjene tretmana skupina 3 i 4 navedenim antidijabeticima. Kada su štakori navršili 64 tjedna eutanazirani su i mozgovi su prikupljeni za analizu. Polovica mozga je imunohistokemijski obojana specifičnim protutijelima na receptore za leptin (ObR), inzulin (IR) i čimbenik rasta nalik inzulinu 1 (IGF-1R), te na proteine Nestin (biljeg matičnih stanica), GFAP (biljeg astrocita i centralne upale) i Iba1 (biljeg mikroglije i centralne upale). Hipokampus druge polovice mozga je bio iskorišten za izolaciju lipidnih splavi i određivanje položaja ObR i IR u odnosu na njih metodom Western blot te za kvantifikaciju proteina iz signalnog puta upravljanog s ObR – pSTAT3 i SOCS3 također metodom Western blot. **REZULTATI.** Suvišak kalorija je izazvao spolno specifične promjene izražaja ObR, IR i IGF-1R u mozgu odraslih Sprague-Dawley štakora. Dok su metformin i liraglutid imali slične učinke na izražaj ObR, IR i IGF-1R u mozgu mužjaka, u mozgu ženki su djelovali suprotno – metformin je povećavao izražaj navedenih receptora, a liraglutid smanjivao. HFHSD je povećao izražaj oba biljega upale u hipotalamusu mužjaka i ženki (GFAP i Iba1), dok u hipokampusu nije došlo do statistički značajne pojave reaktivne glioze i povećanja brojnosti mikroglije. Antidijabetici su samo u lateralnoj jezgri hipotalamusa (LH) mužjaka povećali izražaj GFAP. Na hipotalamusu ženki je metformin djelovao tako što je smanjio izražaj GFAP u arkuatnoj jezgri (ARC), no povećao u dvije susjedne jezgre paraventrikularnoj (PA) i periventrikularnoj (PE). Izolacija lipidnih splavi pokazala je da su ObR i IR u svim skupinama životinja izvan lipidnih splavi. Protein supresor signalizacije citokinima SOCS3, nizvodni cilj citokinske i leptinske signalizacije imao je najveći izražaj u ženki na HFHSD tretiranih liraglutidom. **ZAKLJUČCI.** Stalan unos suviška kalorija izazvao je pretilost u odraslih Sprague-Dawley štakora. HFHSD prehrana je na spolno specifičan način mijenjala osjetljivost receptora ObR, IR i IGF-1R za njihove ligande te je tako utjecala na signalne putove upravljane navedenim receptorima (u mozgu mužjaka povećala osjetljivost za leptin, u mozgu ženki smanjila osjetljivost na leptin, inzulin i IGF-1). Najznačajniji nalaz je da liraglutid u mozgu ženki smanjuje osjetljivost na inzulin i IGF-1, odnosno doprinosi razvoju rezistencije na navedene ligande, dok u mozgu mužjaka ovaj fenomen nije bio zapažen. Uslijed HFHSD prehrane razvila se upala u hipotalamusu odraslog mozga mužjaka i ženki. Čini se da metformin pojačava upalu u mozgu mužjaka, a smanjuje u mozgu ženki, dok liraglutid djeluje suprotno. Budući da je u hipokampusu svih skupina životinja utvrđen položaj ObR i IR izvan lipidnih splavi, možemo reći da ni u jednoj skupini životinja nije došlo do razvoja leptinske i inzulinske rezistencije ili hipokampalni razvoj rezistencije nije popraćen premještanjem receptora izvan splavi. Prema izražaju SOCS3 proteina možemo zaključiti da u ženkama na HFHSD tretiranih liraglutidom dolazi do interakcije leptinskog i citokinskog signalnog puta. Zaključno, dva istraživana antidijabetika imaju suprotno djelovanje na mozak mužjaka i ženki te ovisno o spolu njihova primjena nije jednako sigurna. Svakako bi trebalo istražiti potencijal njihove neurotoksičnosti.

## **9. SUMMARY**



**INTRODUCTION.** Body energy status is controlled by the hypothalamic (HTH) satiety centers, the part of the brain that maintains homeostasis. Insulin and leptin are two major hormones which reflect the amount of stored or currently available energy in the form of fatty tissue and glycogen to the satiety centers. They in turn facilitate a suitable body response (search for food and feeding or food refusal). In case of impaired control of the energy state, disorders such as metabolic syndrome accompanied with obesity, diabetes, cardiovascular system disorders, cognitive impairment and neurodegenerative disorders may occur. The listed disorders prevail in western countries and are a major problem for the public health. Chronic overnutrition and consequential peripheral or central low grade inflammation (which is manifested by morphological changes in astrocytes and increased number of microglia) affect control of the energy status of the body. The inflammatory state contributes to the disruption of signaling pathways controlled by insulin and leptin receptors. One of the mechanisms that could lead to central insulin and leptin resistance may include changes in the lipid rafts of the brain cells. Commonly used antidiabetic drugs nowadays, metformin and liraglutide, have shown promising results in the treatment of early signs of neurodegeneration. The research of the effects of these two antidiabetics would clarify the mechanism of their action on the central nervous system.

**METHODS.** The study included 64 adult Sprague-Dawley rats of both sexes aged 44 weeks. They were divided into 4 groups; (1) - control group on standard diet (SD), (2) - control group on high-fat high-sugar diet (HFHSD), (3) - HFHSD group on metformin treatment and (4) - HFHSD group on liraglutide treatment. Six-week-long obesity induction was followed by 14-week-long treatment of groups 3 and 4 with antidiabetics. When the rats turned 64 weeks they were euthanized and the brains were collected for analysis. One brain hemisphere was immunohistochemically stained with specific antibodies to receptors for leptin (ObR), insulin (IR) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1R), Nestin protein (marker of stem cells), GFAP (marker of astrocytes and central inflammation) and Iba1 (marker of microglia and central inflammation). Hippocampus (HIPP) from the other brain hemisphere was used for lipid raft (LR) isolation and ObR and IR position determination relative to the LR by the Western blot. Also, the same tissue was used for the quantification of pSTAT3 and SOCS3 proteins involved in the ObR signaling pathway by the Western blot.

**RESULTS.** HFHSD caused sex-specific changes in expression of ObR, IR and IGF-1R in the adult rat brain. While metformin and liraglutide had similar effects to the expression of ObR, IR and IGF-1R in the male brain, in the female brain they had opposite effects - metformin upregulated expression of mentioned receptors while liraglutide downregulated them. HFHSD caused inflammation in the male and female HTH (upregulation of GFAP and Iba1), while the HIPP was not affected. Antidiabetics increased the expression level of GFAP only in the male lateral nucleus of HTH (LH). Metformin reduced expression level of GFAP in the female HTH arcuate nucleus (ARC), but increased it in two adjacent nuclei - paraventricular (PA) and periventricular (PE). It has been found in all animal groups that ObR and IR are not parts of the lipid rafts. Suppressor of cytokine signaling SOCS3, the downstream target for cytokine and leptin signaling was most expressed in HFHSD females treated with liraglutide.

**CONCLUSIONS.** Chronic overnutrition caused obesity in adult Sprague-Dawley rats. HFHSD changed the susceptibility of ObR, IR and IGF-1R receptors to their ligands in a sex-specific manner and thus affected signaling pathways controlled by mentioned receptors (in the male brain increased susceptibility to leptin, in the female brain decreased susceptibility to leptin, insulin, and IGF -1). The most significant finding is that liraglutide in the female brain contributes to the development of insulin and IGF-1 resistance, while this phenomenon was not observed in the males. HFHSD caused inflammation in the male and female HTH. Metformin appears to contribute to inflammation in the male brain, but it diminishes it in the female brain. The liraglutide acted oppositely. Finding that ObR and IR are not in the lipid rafts of HIPP cells suggests that neither animal group developed leptin and insulin resistance or development of these resistances in HIPP are not accompanied by the displacement of the ObR and IR from the rafts. According to the expression of SOCS3 it can be concluded that in HFHSD females treated with liraglutide leptin and cytokine signaling pathways interacted. In conclusion, the two investigated antidiabetics had the opposite effects on the male and female brain and sex matters when it comes to safety of their application. The neurotoxicity of metformin and liraglutide should be further explored.

## **10. PRILOZI**

**10.1. Recepti korištenih pufera**

U ovom poglavlju su navedeni recepti za pripremu otopina korištenih u istraživanju, osim pufera korištenih pri izolaciji lipidnih splavi iz razloga što su detalji navedene metode u pripremi za publikaciju.

10xPBS:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina (g) za 500 mL otopine</b>
NaCl	45
KCl	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
dH <sub>2</sub> O	do razine od 500 mL

1xPBS:

<b>Otopina</b>	<b>Količina (mL) za 500 mL otopine</b>
10xPBS	50
dH <sub>2</sub> O	450

1xPBST:

<b>Kemikalija ili otopina</b>	<b>Količina (mL) za 500 mL otopine</b>
10xPBS	50
dH <sub>2</sub> O	450
Tween 20	0,5

4% paraformaldehid (pH=7.4):

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina (g) ili otopina (mL) za 500 mL otopine</b>
Paraformaldehid	20 g
NaOH	5 granula
10XPBS	50 mL
dH <sub>2</sub> O	do razine od 500 mL

DeOlmos otopina za pohranu kriorezova:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina (g) ili otopina (mL) za 1L otopine</b>
1XPBS	500 mL
Saharoza	300 g
Polivinilpirolidon (PVP-40, Sigma)	10 g
Etilen glikol (30%)	300 mL
dH <sub>2</sub> O	do razine od 1L

Sudan black B u 70% -tnom etanolu:

<b>Kemikalija ili otopina</b>	<b>Količina (g) ili otopina (mL) za 500 mL otopine</b>
Sudan black B	0,3 g
Etanol (70%), pothlađeni	100 mL

1,5xTBS (0,05M Tris, pH=7,6):

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina (g) ili otopina (mL) za 2L otopine</b>
0,2 M Tris	500 mL
0,2M HCl	384 mL
NaCl	30 g
dH <sub>2</sub> O	do razine od 2L

1,5xTBST:

<b>Kemikalija ili otopina</b>	<b>Količina (mL) za 500 mL otopine</b>
1,5xTBS	50
dH <sub>2</sub> O	450
Tween 20	0,5

## **11. POPIS KRATICA**

1 - životinje na standardnoj prehrani (SD),  
1xPBST - 0,1%-tna otopina detergenta Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u 1xPBS puferu,  
1xTBST - 0,1%-tna otopina detergenta Tween 20 u 1xTris-HCl puferu,  
2 - životinje na HFHSD prehrani,  
3 - životinje na HFHSD prehrani tretirane metforminom (HFHSD + M),  
4 - životinje na HFHSD prehrani tretirane liraglutidom (HFHSD + L),  
A - apsorbancija,  
AD - Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*),  
AF488 - fluorokrom Alexa fluor 488™,  
*agrp* - gen za protein vezan za agouti peptid,  
AgRP - peptid u vezi sa agouti peptidom,  
AKT - protein kinaza B,  
ARC - arkuatna jezgra hipotalamusa,  
BSA - albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*),  
CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja hipokampusa 1 i 3,  
CART - transkript povezan s kokainom i amfetaminom (engl. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*),  
CCL - ligand kemokina,  
*c-fos* – gen čiji transkript nadzire staničnu proliferaciju i diferencijaciju,  
CRP - C-reaktivni protein,  
CT - temperatura kriokomore u kriostatu,  
CTB - podjedinica B toksina kolere konjugirane s HRP,  
CTB2 - podjedinica B toksina kolere 2,  
CTX - kora mozga,  
Cy3 - fluorokrom cijanin 3,  
DAB - 3,3'-diaminobenzidin,  
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol,  
DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*),  
dH<sub>2</sub>O - destilirana voda,  
DMH - dorzomedijalna,  
DN - dopaminergičko područje,  
ERK – proteinska kinaza regulirana ekstracelularnim signalima,  
Flot1 - protein flotilin1,  
FoxO - „forkhead box“ protein O1,  
GABA - gama-aminobutirična kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*),  
GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial acidic fibrillary protein*), biljeg aktivirane glije,  
GH - hormon rasta (engl. *growth hormone*),

GH - hormon rasta (engl. *growth hormone*),  
GLP-1 - peptid nalik glukagonu 1 (engl. *glucagon-like peptide-1*),  
GLUT - transporter za glukozu,  
GM1 - monosijalotetraheksosilgangliosid,  
GnRH - hormon koji potiče lučenje gonadotropina (engl. *gonadotropin-releasing hormone*),  
GRB2 - protein 2 vezan uz receptor za čimbenike rasta (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*),  
GSK3 - glikogen-sintaza-kinaza 3,  
GTT - test tolerancije na glukozu  
h - sat,  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodikov peroksid,  
HIPP - hipokampus,  
HRP - peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*),  
HTH - hipotalamus,  
Iba1 - biljeg mikroglije - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*),  
IGF-1 - čimbenik rasta nalik inzulinu (engl. *insulin like growth factor*),  
IGF-1Rβ - beta podjedinica receptora za čimbenik rasta nalik inzulinu,  
IKKβ - kinaza beta podjedinice inhibitora kapa-B čimbenika (engl. *kinase subunit beta factor kappa-B inhibitor*),  
IL – interleukin,  
IR-α - alfa podjedinica receptora za inzulin,  
JAK2 - kinaza iz obitelji janus povezana s citokinskom signalizacijom, protein kinaze aktivirane mitogenima (MAPK)  
K - kontrola (kriorez mozga koje je služio kao negativna kontrola u imunohistokemijskom bojanju),  
LH - lateralna jezgra hipotalamusa,  
MEK - proteinska kinaza regulirana mitogenim signalima,  
min - minuta,  
min – minuta,  
mTORC1 - kompleks 1 ciljnih proteina rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*),  
NF-κB – jezgri čimbenik kapa-B (engl. *nuclear factor kappa-B*),  
NPY -uropeptid Y,  
NTS - jezgra solitarnog trakta (engl. *nucleus of solitary tract*),  
ObR - receptor za leptin,  
OT - temperatura pri nožu, odnosno objektu rezanja u kriostatu,  
P - fosfatna skupina,  
PA-AP - anteriorni dio paraventricularne jezgre hipotalamusa,

PAGE - poliakrilamidna elektroforeza,  
PBS - fosfatni pufer,  
PDK - kinaza ovisna o 3-fosfoinozitudu (engl. *phosphoinositide-dependent kinase*),  
PE - periventrikularna jezgra hipotalamusa,  
PFA - paraformaldehid,  
PI3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza,  
PIR - piriformna kora mozga,  
PKC - proteinska kinaza C,  
*pomc* - gen za pro-opiomelanokortin,  
POMC - pro-opiomelanokortin,  
PPAR $\gamma$  - receptor aktiviran proliferacijskim signalom iz peroksisoma gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*),  
PPAR $\gamma$  – receptor aktiviran proliferacijskim signalom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*),  
pSTAT3 - fosforilirani protein signalne transdukcije i transkripcije 3 (engl. *signal transduction and transcription protein*),  
PTEN - fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat-3-fosfataza (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*),  
PTP - protein-tirozin-fosfataza (engl. *protein tyrosine phosphatase*),  
PVDF - polivinildifluorid,  
Raf – proteinska serin/treonin kinaza prvi puta pronađena u tkivu fibrosarkoma (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*),  
Ras – GTPaza pronađena prvi puta u tkivu sarkoma,  
RH - Republika Hrvatska,  
RT – sobna temperatura (engl. *room temperature*, RT),  
s.c. - subkutano,  
S1 - primarno osjetno područje kore mozga,  
S1BF - dio primarnog osjetnog područja kore mozga, tzv. „*Barrel field*“,  
S<sub>2</sub> - supernatant dobiven nakon drugog ultracentrifugiranja pri izolaciji lipidnih splavi,  
SHP2 - vrsta protein-tirozin fosfataze,  
SNC - kompaktni dio crne jezgre mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*),  
SOCS3 - supresor signalizacije citokinima 3 (engl., *suppressor of cytokine signaling 3*),  
SREBP - protein koji se veže na element reguliran sterolom (engl. *sterolregulatory-element-binding protein*),  
St3Gal5 - sintaza gangliozida GM3 (engl. *ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase*),  
Sur. - suradnici  
T1DM - dijabetes mellitus tip 3



T2DM - dijabetes mellitus tip 2

T3DM - dijabetes mellitus tip 3, predloženo ime za neurodegenerativne poremećaje obilježene inzulinskom rezistencijom,

TF – čimbenik transkripcije,

TfR1 – receptor za transferin 1,

Usp. – usporediti,

V - volt,

V - volumen,

VMH - ventromedijalna jezgra hipotalamusa,

VTA - ventralno područje tegmentuma,

WHO – svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*),

Y – aminokiselina tirozin,

$\alpha$ -MSH - hormon stimulacije melanocita- $\alpha$  (engl.  *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone*).

## **12. ŽIVOTOPIS**

**VEDRANA IVIĆ (r. PERKOV)**

Osobni broj znanstvenika: 319462, ORCID broj: 0000-0002-8185-1960;

Poveznica na CROSBİ profil: <https://bib.irb.hr/lista-radova?autor=319462>;

Vedrana Ivić rođena je 29. kolovoza, 1984. u Osijeku, gdje se školovala. 2003. godine završila je srednjoškolsko obrazovanje u III. Gimnaziji Osijek, prirodoslovno-matematički smjer. Iste godine se upisala na studij Biologije i kemije na tadašnjem Pedagoškom, odnosno Filozofskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, iz kojega su se, između ostalih, izdvojili Odjel za biologiju i Odjel za kemiju. Diplomirala je 2008. na Odjelu za biologiju i Odjelu za kemiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku i stekla zvanje profesor biologije i kemije. Kao studentica je u akademskoj godini 2006./2007. primila Rektorovu nagradu te nagradu Lions Club-a za izniman uspjeh na studiju.

Od 2009. radi kao znanstveni novak-asistent u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Osim što sudjeluje u izvođenju nacionalnih i međunarodnih projekata Laboratorija, sudjeluje u organizaciji i izvođenju nastave Katedre za medicinsku biologiju i genetiku na studijima Medicina, Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Dentalna medicina i Dentalna higijena (kolegiji: Medicinska biologija, Biologija, Humana genetika, Molekularna genetika, izborni predmeti) te sudjeluje u manifestacijama popularizacije znanosti poput Tjedna mozga i Festivala znanosti.

2010. godine upisala je Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, modul Biomedicina. Iste godine dobila je stipendiju Nacionalne zaklade za znanost za šestomjesečni boravak i usavršavanje na Odjelu za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Yale. Članica je Hrvatskih društava za Neuroznanost (HDN), Biologiju (HDB), Biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Humanu genetiku (HDHG) te znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA).

Tijekom obrazovanja, usavršavanja i rada u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek usvojila je vještine i tehnike kao što su: rukovanje laboratorijskim životinjama (2014. stekla certifikat za rukovanje laboratorijskim životinjama Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, certifikat ekvivalent Felasa C kategorije), genotipizacija, bihevioralni testovi (Rotarod, "Open field" test u Activity cage), lezija leđne moždine; imunohistokemijske metode; elektroforeza, Western blot; PCR i real time PCR; svjetlosna i fluorescentna mikroskopija, mikrodisekcija, metode izdvajanja nukleinskih kiselina i lipidnih splavi; priprema projektne dokumentacije i menadžment istraživačkog laboratorija.

Udana je i majka dvoje djece.

Sudjelovanja na projektima:

- ❖ 2015. – danas (do 2019.): HRZZ istraživački projekt „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ (RaffTuning, IP-09-2014-2324), pod vodstvom prof. dr. sc. Marije Heffer;
- ❖ 2014. – danas (do 2018.): HRZZ istraživački projekt “Liječenje neuropatske boli stimulacijom spinalnog ganglija (NeuroMod)”, pod vodstvom prof. dr. sc. Damira Sapunara;
- ❖ 2009. – 2014. nacionalni projekt „Lipidne splavi i glikokonjugati u razvoju i regeneraciji živčanog sustava“ (MZOS #219-0061194-2158), pod vodstvom prof. dr. sc. Marije Heffer;
- ❖ međunarodni projekti Istraživačkog i inovacijskog programa u medicini Medicinskog centra Cedars-Sinai i Udruženja za regionalnu suradnju u zdravstvu, znanosti i tehnologiji (RECOOP

HST Association) (tekući projekt: 2015. – danas: “Usporedba učinaka liraglutida (Victoza) i metformina na starije pretila mužjake i ženke štakora“).

#### Sažetak publikacija

Znanstveni radovi – 4

Kongresni sažeci – 15

Predavanja na skupovima – 2

Međunarodna škola - instruktor – 1

#### Citiranost radova Vedrane Ivić prema bazi podataka Knjižnice Instituta Ruđer Bošković “Web of Science”

Ukupno citata: 19

Ukupno citata bez samocitiranja: 18

h-indeks: 2

#### Popis publikacija

##### *Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima*

1. **Ivić, Vedrana**; Blažetić, Senka; Labak, Irena; Balog, Marta; Vondrak, Luka; Blažeković, Robert; Vari, Sandor G.; Heffer, Marija. Ovariectomy and chronic stress lead toward leptin resistance in the satiety centers and insulin resistance in the hippocampus of Sprague-dawley rats. // Croatian medical journal. 57 (2016), 2; 194-206 (članak, znanstveni).

2. Pitha, Jan; Lesna, Ivana Kralova; Hubacek, Jaroslav A.; Sekerkova, Alena; Lanska, Vera; Adamkova, Vera; Dorobantu, Maria; Nicolescu, Rodica; Steiner, Robert; **Ivić, Vedrana**; Borbely, Attila; Papp, Zoltan; Vari, Sandor G. Smoking impairs and circulating stem cells favour the protective effect of the T allele of the connexin37 gene in ischemic heart disease - A multinational study. // Atherosclerosis (Amsterdam). 244 (2016); 73-78 (članak, znanstveni).

3. Balog, Marta; Miljanović, Milan; Blažetić, Senka; Labak, Irena; **Ivić, Vedrana**; Viljetić, Barbara; Borbely, Attila; Papp, Zoltán; Blažeković, Robert; Vari, Sandor G; Fagyas, Miklós; Heffer, Marija. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. // Croatian medical journal. 56 (2015), 2; 104-113 (članak, znanstveni).

##### *Znanstveni radovi u drugim časopisima*

1. Fertuzinhos, Sofia; Li, Mingfeng; Imamura Kawasawa, Yuka; **Ivić, Vedrana**; Franjić, Daniel; Singh, Darshani; Crair, Michael; Šestan, Nenad. Laminar and Temporal Expression Dynamics of Coding and Noncoding RNAs in the Mouse Neocortex. // Cell Reports. 6 (2014), 5; 938-950 (članak, znanstveni).

##### *Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu*

1. **Ivić, Vedrana**; Blažetić, Senka; Labak, Irena; Balog, Marta; Vondrak, Luka; Vari, Sandor G.; Heffer, Marija. Ovariectomy and chronic stress lead toward leptin resistance in the satiety centers and insulin resistance in the hippocampus of Sprague-Dawley rats // The Ukrainian Biochemical Journal - Special Issue / Vari, Sandor G. (ur.). Prague, Czech Republic: RECOOP HST Association, 2016. 57-57 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

*Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima*

1. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; Majić, Senka; **Perkov, Vedrana**; Bogdanović, Tomislav; Jelić, Dušan; Dragun, Dario; Heffer, Marija. Distribucija kompleksnih gangliozida u mozgu *Vipera ammodytes* i *Vipera berus bosniensis* // 11. Hrvatski biološki kongres: zbornik sažetaka / Jelaska, Sven; Klobučar, Goran ; Šerić Jelaska, Lucija ; Leljak Levanić, Dunja ; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 2012. 134-135 (poster,sažetak,znanstveni).

*Sažeci u zbornicima skupova*

1. Ćosić, Anita; Vuković, Rosemary; Heffer, Marija; Balog, Marta; **Ivić, Vedrana**; Gaspar, Robert; Vari, Sandor V. Sex Differences in the Oxidative Stress Level and Antioxidative Enzymes Activity in Obese Pre-Diabetic Elderly Rats Treated with Metformin or Liraglutide // 7th TriNet Meeting - Annual Project Review Meeting Abstract Book. 2016. (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

2. **Ivić, Vedrana**; Labak, Irena; Balog, Marta; Blažetić, Senka; Gaspar, Robert; Tabi, Tamas; Vari, Sandor G; Heffer, Marija. Adiponectin receptors in the brain of rats on HFHS diet // 7th TriNet Meeting - RECOOP Annual Project Review Meeting Abstract Book / Vari, SG (ur.). 2016. 65-66 (predavanje,sažetak,znanstveni).

3. Heffer, Marija; Balog, Marta; **Ivić, Vedrana**; Labak, Irena; Blažetić, Senka; Zelen, Ada. How adrenal gland takes hit by chronic stress? // GlowBrain Final Conference "Stem cell and biomaterial applications for brain repair". Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015. 11-11 (pozvano predavanje,sažetak,znanstveni).

4. **Ivić, Vedrana**; Balog, Marta; Labak, Irena; Blažetić, Senka; Heffer, Marija. Influence of chronic stress on ObR expression in stem cell zone of adult Sprague-Dawley rat adrenal gland // Ninth ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine / Kayser, M., Ordog, T., Vuk-Pavlović, S., Primorac, D., Schanfield, M. (ur.). Zagreb: ISABS, 2015. 230-230 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

5. **Ivić, Vedrana**; Balog, Marta; Labak, Irena; Blažetić, Senka; Viljetić, Barbara; Heffer, Marija. OBR in stem cells in rat adrenal gland // Visualization of molecular markers in the brain. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet, 2015. 52-52 (predavanje,sažetak,znanstveni).

6. **Ivić, Vedrana**; Labak, Irena; Balog, Marta; Blažetić, Senka; Vondrak, Luka; Heffer, Marija. Alteration of ObR expression in the Sprague-Dawley rat brain as a consequence of acute and chronic stress // Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference / Sandor G. Vari (ur.). 2015. 33-33 (poster,sažetak,znanstveni).

7. **Ivić, Vedrana**; Labak, Irena; Balog, Marta; Blažetić, Senka; Vondrak, Luka; Vari, Sandor; Heffer, Marija. Chronic stress influences level of ObR and ER-beta in the brain of adult female Sprague-Dawley rats // 5th Croatian Neuroscience Congress - Book of Abstracts / Zoran Đogaš (ur.). Split: Croatian Society for Neuroscience, 2015. 46-46 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

8. **Ivić, Vedrana**; Balog, Marta; Blažetić, Senka; Labak, Irena; Heffer, Marija. Acute and chronic stress model in Sprague-Dawley rats // Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima (Experimental animals in scientific research). Zagreb: Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama, 2014. 54-55 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

9. Viljetić, Barbara; **Ivić, Vedrana**; Labak, Irena; Blažetić, Senka; Heffer, Marija. Distribution of PSA-NCAM in brains of two venomous species: *Vipera ammodytes* and *Vipera berus bosniensis* // Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research. Zagreb: University of Zagreb School of Medicine, 2014. 70 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

10. Blažetić, Senka; Viljetić, Barbara; Labak Irena; Balog Marta; **Ivić Vedrana**; Schnaar Ronald L.; Heffer Marija. Alternations in number of calcium-binding striatal and hippocampal parvalbumin and calbindin D28k interneurons in the brain of St3Gal2, St3Gal3 and double knockout mice // Book of

Abstracts; 4.Croatian Congress of Neuroscience / Croatian Society for Neuroscience (CSfN) (ur.). Zagreb, 2013. 44-45 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

11. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; Blažetić, Senka; **Ivić, Vedrana**; Heffer, Marija. Distribution of complex gangliosides in brains of catfish and perch // Book of Abstracts 4th Croatian Congress of Neuroscience /. Zagreb: Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research, 2013. 34-34 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

12. Labak, Irena; Viljetić, Barbara; **Perkov, Vedrana**; Majić, Senka; Heffer, Marija. Distribution Of Migratory Zones In Optic Tectum Of Teleostea Mice / Book of Abstracts 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain, 14-18/07/2012 //(poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

13. Majić S.; Krajina V.; Labak I.; Viljetić B.; **Perkov V.**; Schnaar R.L.; Heffer M. Alteration in Number of Calbindin D28k And Parvalbumin Expressing Neurons in Cortical Regions of *St3gal2*, *St3gal3* And Double Knockout Mice / Book of Abstracts 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain, 14-18/07/2012 // (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

#### *Druge vrste radova*

1. **Ivić, Vedrana**. Estrogen u sjećanju moje mame. *Priroda* 106 (2016.),1049. (popularan rad).

2. **Perkov, Vedrana**; Heffer-Lauc, Marija. Laboratory exercise: "Spinal Cord Injury". EMBO Practical Course: "Anatomy and Embriology of Mouse", Split, Croatia, July 29th - August 4th 2010. (edukacijska cjelina).