Promjene u ekspresiji inzulinskog i leptinskog receptora u centrima sitosti tijekom cirkadianog ritma

Mešin, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:470690

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij

Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Marko Mešin

PROMJENE U EKSPRESIJI INZULINSKOG I LEPTINSKOG RECEPTORA U CENTRIMA SITOSTI TIJEKOM CIRKADIJANOG RITMA

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij

Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Marko Mešin

PROMJENE U EKSPRESIJI INZULINSKOG I LEPTINSKOG RECEPTORA U CENTRIMA SITOSTI TIJEKOM CIRKADIJANOG RITMA

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 47 stranica i 17 slika.

Zahvaljujem se prije svega profesorici Mariji Heffer na tome što je još prije tri godine svojim jaw-dropping predavanjima i lakoćom prenošenja svog velikog znanja opravdala moju ljubav prema biologiji, a onda i prema genetici, čime mi je usadila želju da se na istu katedru vratim i krajem treće godine studija te se s tom ekipom i gradivom tih predmeta još bolje upoznam.

U toj ekipi je i Milorad Zjalić kojemu se posebno zahvaljujem na smirenosti, pristupačnosti i benignosti i onda kada bi to većini bilo teško biti. Hvala na tisuću i jednom odgovoru na tisuću pitanja i što ste mi pokazali na vlastitom primjeru kako bih predano i savjesno svoj posao jednog dana trebao obavljati i sam.

Hvala obitelji koja mi uvijek baterije napuni podrškom, a Tebi, Bože, hvala na svemu i svima do sad navedenima.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1 Neuronski sklop odgovoran za kontrolu sitosti 1
1.1.1 Značaj AgRP-a 1
1.1.2 Utjecaj leptina i inzulina na neuronski sklop kontrole sitosti 2
1.2 Leptin 3
1.2.1 Mehanizam djelovanja 4
1.2.2 Cirkadijani ritam leptina 5
1.2.3 Utjecaj leptina i patološke promjene 6
1.3 Inzulin i njegovi receptori 7
1.3.1 Mehanizam djelovanja 8
1.3.2 Cirkadijani ritam inzulina 8
1.4 Cirkadijani ritam 9
1.4.1 Mehanizam cirkadijanog sata 10
1.4.2 Održavanje sata 10
2. Hipoteza 12
3. Ciljevi 13
4. Materijali i metode 14
4.1 Materijali 14
4.2 Metode 14
4.2.1 Priprema tkiva 14
4.2.2 Imunohistokemija na POMC epitop 15
4.2.3 Dvostruka imunohistokemija na AgRP i inzulinske receptore 15
4.2.4 Dvostruka imunohistokemija na AgRP i leptinske receptore 16
4.3 Statističke metode 17
5. Rezultati 18
5.1 POMC receptor 18
5.1.1 Arkuatna jezgra 18
5.2 Leptinski receptor (OB-R) 22
5.2.1 Arkuatna jezgra 22
5.2.2 Periventrikularna jezgra 23
5.3 Inzulinski receptor (IR-α) 25
5.3.1 Arkuatna jezgra 25
5.4 Vizualizacija AgRP-a 28
6. Rasprava 29

7. Zaključci 33
8. Sažetak 34
9. Summary 35
10. Reference 36
11. Životopis 47

Popis kratica:

AF488	*Alexa Fluor 488* (fluorescentna boja)
AgRP	agouti srodni peptid (engl. *agouti-related peptide)*
ARC	regija arkuatusa (od lat. *arcuatus* – zavijen)
Bmal1/BMAL1	moždani i mišićni protein sličan ARNT (engl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) proteinima 1 (engl. *brain and muscle ARNT like protein 1*) (gen/protein)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (*engl. bovine serum albumin*)
CART	transkript reguliran kokainom i amfetaminom (engl. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)
CLOCK	poremećeni ciklički lokomotorni izlazni ciklusi (engl. *circadian locomotor output cycles kaput*)
CRH	liberin kortikotropina (engl. *corticotropin releasing hormone)*
*Cry1-2/*CRY1-2	Kriptokrom 1-2 (gen/protein)
Cy3	*Cyanine 3* (fluorescentna boja)
Fbxl3	protein s višestrukim ponavljanjima F i leucinske domene 3 (engl. *F-Box and leucine rich repeat protein 3*)
FoxO1	engl. *Forkhead box protein O1*
GABA	gama-aminobutirična kiselina (engl.*gamma-amino butyric acid*)
GIRK	ispravljač prema unutra G-proteinom nadzirani kalijski kanal (engl. *G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel)*
GLP-1	peptid sličan glukagonu 1 (engl. *glucagon-like peptide-1*)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)
IGF1R	receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1 (engl. *insulin-like growth factor receptor 1*)

IGF-I/II	faktor rasta sličan inzulinu 1 i 2 (engl. *insulin-like growth factor*)
IRS1	supstrat inzulinskog receptora (engl. *insulin receptor substrate protein*)
JAK	Jan kinaza (engl. *Janus kinase*)
KO	životinjski model s isključenim genom (engl. *knock-out*)
MCH	melanin koncentrirajući hormon (engl. *melanin-concentrating hormone*)
MC-R	melanokortinski receptor (engl. *melanocortin receptor)*
NIRKO	životinjski model s isključenim genom za inzulinski receptor specifičan za neurone (engl. *neuron-specific insulin receptor knock out*)
NPY	neuropeptid Y (engl. *neuropeptide Y)*
ob/OB-R	*ob* gen/OB receptor; leptinski gen i njegov receptor (engl. *obese* – pretio)
PBS	puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *Phosphate buffered saline*)
Per1-3/PER1-3	Period 1-3 (gen/protein)
PI3K	fosfoinozitol 3 kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)
POMC	proopiomelanokortin
PYY	peptid YY (engl. *peptide YY*)
ROR	retinoičnoj kiselini srodan receptor siročić (engl. *retinoic acid-related orphan receptor*)
RORE	ROR elementi (engl. *ROR elements*)
SCN	suprahijazmatska jezgra (eng. *suprachiasmatic nucleus*)
STAT	prenositelji signala i aktivatori transkripcije (engl. *Signal transducers and activators of transcription)*
SUMO	mali modifikator sličan ubikvitinu (engl. *Small Ubiquitin-like Modifier)*
TBS	puferirana otopina Tris-a (engl. *Tris-buffered saline*)

VEGF	čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor)*
VMH	ventromedijalni hipotalamus
α-MSH	alfa hormon koji stimulira melanocite (engl. *α-Melanocyte stimulating hormone)*

1. Uvod

1.1 Neuronski sklop odgovoran za kontrolu sitosti

Melanokortinski sustav u hipotalamusu glavni je regulator energetske homeostaze kod ljudi i životinja. Sastoji se od proopiomelanokortinskih (POMC) i agouti srodnih peptidergičkih (AgRP) neurona koji su smješteni, između ostalog, u *nucleus arcuatus* hipotalamusa – jezgri koju smatramo važnom za regulaciju sitosti. Peptidni produkti ove dvije skupine neurona bore se za vezno mjesto na melanokortinskim receptorima (MC-R) kako bi regulirali energetsku ravnotežu (1). POMC neuroni luče alfa hormon koji stimulira melanocite (α-MSH), peptid koji aktivira, tj. djeluje kao agonist MC4-R receptora koji djeluju u sprezi s G-proteinom. Aktivacija signalnog puta ovog receptora inhibira unos hrane i potiče potrošnju energije (2). S druge strane, AgRP djeluje kao antagonist melanokortinskih receptora i potiče pozitivni energetski balans odnosno hranjenje (3). Obje skupine neurona eksprimiraju receptore za inzulin i leptin koji im omogućavaju usklađivanje aktivnosti u skladu s trenutnim razinama ovih hormona. Obje skupine neurona dio su kompleksne neuronske mreže čija je svrha održavanje energetske homeostaze (1). Bitno je napomenuti i da melanokortinski sustav nije osjetljiv na nejednolik unos makronutrijenata, već općenito na količinu unesene hrane i promjene energetske homeostaze organizma (4). Neuroni s ekspresijom POMC, AgRP i melanokortinskih receptora čine okosnicu melanokortinskog sustava (5) koji igra vrlo važnu ulogu u kontroli metabolizma nutrijenata i tjelesne mase u glodavaca i ljudi (6).

1.1.1 Značaj AgRP-a

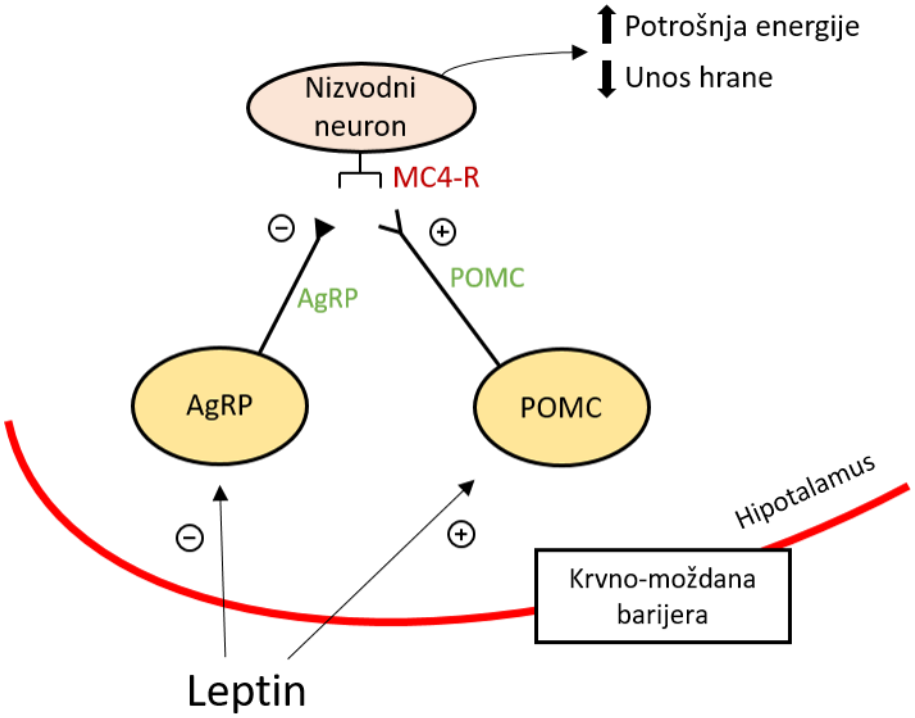
Ekspresija AgRP-a u arkuatnoj jezgri hipotalamusa povećana je, osim tijekom gladovanja, kod miševa s mutiranim genom za leptin (7)(8). Pojačana ekspresija AgRP-a povećava unos hrane poticanjem gladi, povećava težinu tijela i masnog tkiva te inhibira potrošnju energije (9), a može djelovati i preko endokrinog sustava na supresiju hipotalamusno-hipofizne osovine u reakciji na glad (10). Sukladno tome, smanjenje AgRP ekspresije RNA interferencijom dovodi do ubrzanja metabolizma i smanjenja tjelesne težine (11). Genetski uzrokovana delecija AgRP-a ima puno blaži utjecaj što implicira razvojnu kompenzaciju (12)(13). Do sada još nije otkriven farmakološki pripravak inhibitora AgRP proteina koji bi mogao biti korišten za dokazivanje opsega djelovanja AgRP-a na energetsku homeostazu i neuroendokrini odgovor na glad. Sam AgRP ima potencijal za korištenje u terapijske svrhe, primjerice kod ljudi s povišenim AgRP-om i posljedičnom pretilošću.

Primjenu kompliciraju nuspojave kao što je hipertenzija, vjerojatno zbog pojačane aktivnosti POMC neurona i MC-R receptora (14).

1.1.2 Utjecaj leptina i inzulina na neuronski sklop kontrole sitosti

Inzulin i leptin, dva vrlo važna hormona u supresiji gladi, mogu prijeći krvno-moždanu barijeru na razini hipotalamusa i zaustaviti unos hrane jer njihovo vezanje za receptore eksprimirane na arkuatusu dovodi do poticanja anoreksigenog signala (15). Osim njih, brojni gastrointestinalni hormoni koji se luče nakon obroka mogu potaknuti osjećaj sitosti. Kolecistokinin, GLP-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*) i PYY (engl. *peptide YY*) pripadaju ovim hormonima (16). Eksperimenti prekidanja perifernog živca koji osjet iz probavnih organa dovodi do središnjeg živčanog sustava (vagotomija) dokazali su da se ovi peptidi mogu naći periferno i da se prenose do mozga gastrointestinalnim živčanim sustavom (17). Ipak, hipotalamus predstavlja glavno mjesto upravljanja što putem centralnih, što putem perifernih mehanizama hormonalne kontrole unosa hrane (15). Leptin potiče ekspresiju c-Fos protoonkogena i transkripciju u POMC neuronima što dovodi do ekscitacije ovih neurona (18), dok s druge strane, snižava frekvenciju akcijskih potencijala AgRP/GABA/NPY (engl. *gama-aminobutyric acid/neuropeptide Y*) neurona, dakle dovodi do inhibicije ovih neurona (19). To znači da gladovanje, stanje niske koncentracije leptina u cirkulaciji, vodi do suprotnog učinka na ove dvije populacije neurona (20)(21). Kod miševa s manjkom leptinskih receptora samo u populaciji POMC ili samo na AgRP neuronima dolazi do nakupljanja masnog tkiva, što je dokaz da su obje skupine neurona potrebne za održavanje normalne tjelesne težine (22). Aktivnost POMC neurona regulirana je nutrijentima, hormonalno i živčanim signalima (13). Ima više populacija POMC neurona pa su tako nutrijentima regulirani POMC neuroni oni potaknuti glukozom, odnosno zatvaranjem kalijevih ATP kanala (24). S druge strane, inzulin hiperpolarizira drugu skupinu POMC neurona aktivacijom ATP kanala PI3K (engl. *phosphoinositide 3-kinase*) signalnim putem (25). POMC neuroni također eksprimiraju opioid-μ receptore (26), a dinorfin-A direktno hiperpolarizira POMC neurone i snižava njihovu elektroaktivnost aktivacijom GIRK (engl. *G-protein-gated inwardly rectifying potassium*) kanala (27). Osim toga, hormonski, hranidbeni i živčani signali također reguliraju i sinaptički prijenos signala preko POMC neurona. Inhibitorni GABAnergični ulazni signali jači su u izgladnjelom stanju (28); pa stoga grelin, hormon gladi, pojačava inhibitorne ulazne signale, a smanjuje ekscitacijske ulazne signale glutamata na POMC neurone. S druge strane leptin radi suprotno, pojačava ekscitacijske ulazne signale, a smanjuje one GABAnergične. Štoviše, pretilost je izravno povezana s poremećajem u sinaptičkom

prijenosu neurotransmitera u hipotalamičkim POMC neuronima (29), što upućuje na to da reorganizacija sinapsi i remodeliranje može doprinijeti patogenezi pretilosti i drugim poremećajima povezanih s njom. Zato možemo reći da je pretilost posljedica plastičnosti neuronskog sklopa za glad i sitost koji se adaptirao, a ne isključivo izazvao patološki unos pretjeranih kalorija.



Slika 1. Leptinski krug – dvojako djelovanje leptina na dvije glavne skupine neurona melanokortinskog sustava te njihova nizvodna uloga. POMC neuroni putem svojih neuropeptida (zeleno) stvaraju anoreksigeni signal koji potiče potrošnju energije, a inhibira unos hrane, dok AgRP neuroni stvaraju oreksigeni signal koji čini suprotno. Napravljeno po uzoru (30).

1.2 Leptin

1994. godine otkriven je 16 kD velik protein – leptin. Naziv dolazi od grčkog *leptos*, što znači tanak, a produkt je ekspresije *ob* (engl. *obese*) gena. Najviše ga izlučuju adipociti bijelog masnog tkiva zajedno s brojnim drugim citokinima, a ključan je u regulaciji unosa i utroška energije (31). Normalni plazmatski raspon koncentracija leptina u zdravih ljudi je 3-5 ng/ml. Kod pretilih osoba ta je koncentracija u rasponu 8-90 ng/ml (32). Prisutnost ekstremne pretilosti kod ljudi i životinja koje su posljedica mutacije *ob* gena ili leptinskog receptora u

brojnim studijama dokazuju da je normalna proizvodnja leptina i aktivnost ključna za održavanje energetske ravnoteže (33). Posjeduje velike strukturalne sličnosti s obitelji dugolančanih citokina s uzvojnicama, koja obuhvaća i cilijarni neurotropni faktor, inhibitorni faktor leukemije, onkostatin-M i kardiotropin-1, kao i interleukine 6, 11 i 12 (34). Translatira se u 167-aminokiselinski slijed s kojeg se 21 aminokiselina odcjepljuje kao signalni peptid (35). Leptin humanog porijekla se sastoji od 146 aminokiselina koje čine 4 antiparalelne α-uzvojnice, od kojih je svaka zavijena 5-6 puta. A uzvojnica spojena je s uzvojnicom B, a C uzvojnica s D uzvojnicom dugim lancima aminokiselina, a B uzvojnica s C kratkim lancem aminokiselina (36).

1.2.1 Mehanizam djelovanja

Leptin djeluje putem transmembranskog leptinskog receptora (OB-R), produkta *Ob-R* gena smještenog na lokusu 1p31 (37). OB-R receptor zastupljen je na stanicama živčanog sustava, skeletnih mišića, β-stanicama gušterače i stanicama jetre iz čega vidimo da leptin ima i parakrinu ulogu u navedenim tkivima i autokrinu u adipoznom tkivu. Ova ubikvitarnost OB-R receptora temelj je različitim ulogama leptina (38). OB-R se sintetizira u nekoliko različitih oblika: OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd i OB-Rf (39), kojima je zajednička izvanstanična domena od preko 800 aminokiselina, transmembranska domena od 34 aminokiseline, a varijabilna je intracelularna domena, karakteristična za svaku izoformu (40)(41). OB-Rb oblik sadrži intracelularne slijedove potrebne za aktivaciju JAK (engl. *Janus kinase*) i STAT (engl. *Signal transducers and activators of transcription)* signalnog puta. OB-Rb je veoma zastupljen u određenim moždanim jezgrama glodavaca i ljudi. Unutar hipotalamusa jaka je ekspresija ovog receptora zabilježena u dorzomedijalnom hipotalamusu, arkuatusu (ARC), ventromedijalnom hipotalamusu (VMH) i ventralnoj premamilarnoj jezgri; srednje jaka u periventrikularnom hipotalamusu i lateralnom hipotalamusu, a slaba ekspresija je zabilježena u paraventrikularnoj jezgri (42)(43). Iako je ekspresija ovog receptora otkrivena i u nekim drugim dijelovima mozga (talamus, mali mozak), dijelovi mozga zaduženi za kontrolu energetske ravnoteže su ciljna mjesta leptina (44). Zbog homologije OB-R-a s citokinskim receptorima, pretpostavlja se da bi vezanje leptina moglo djelovati putem signalne kaskade slične onoj vezanja citokina, uključujući JAK i STAT (45). OB-Rb receptor nakon vezanja leptina započinje signalizaciju aktivacijom nekovalentno pridružene JAK2 kinaze koja autofosforilira brojne tirozinske ostatke, u isto vrijeme fosforilirajući OB-Rb tirozinske ostatke za vrijeme stimulacije leptinom. Fosforilacijom Tyr_{1138} oslobađa se STAT3, latentni transkripcijski faktor koji se dimerizira u STAT3 kompleks (46). Fosforilirani STAT3

kompleks potom odlazi u jezgru gdje se veže za specifična mjesta na DNA molekuli te aktivira ciljne gene zadužene za energetsku homeostazu (47). Veže se za promotor gena za POMC gdje potiče njegovu transkripciju i promotor gena za AgRP inhibirajući njegovu transkripciju (48)(49). Indukcija JAK2 također može stimulirati fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) kroz fosforilaciju određenih supstrata inzulinskog receptora i njegove signalne kaskade (IRS1/IRS2). Na toj nizvodnoj molekuli se udružuju signalni putevi inzulina i leptina. Naime, aktivacija PI3K koju potaknu inzulin i leptin vezanjem za svoje receptore vodi fosforilaciji i tako inaktivaciji te naposljetku izbacivanju iz jezgre FoxO1 (engl. *Forkhead box protein O1*) – signalne molekule koja aktivna ima s jedne strane funkciju represora *pomc* gena jer ne dopušta vezanje STAT3 na promotor navedenog gena, a s druge strane potiče ekspresiju *agrp* gena te se aktivna veže za promotor *agrp* gena. Izbačena, međutim, omogućuje vezanje STAT3 na promotor istoga, koja ponovno inhibira njegovu ekspresiju (50).

1.2.2 Cirkadijani ritam leptina

Koncentracija cirkulirajućeg leptina usko je povezana s indeksom tjelesne mase (BMI) i ukupnom količinom masnog tkiva (51). Leptin je isprva istaknut kao pokazatelj sitosti – hormon koji je signalizirao mozgu koliko se masnog tkiva stvara i koji je regulirao unos hrane. Prisutnost OB receptora u perifernim tkivima govori pak da leptin utječe na svako pojedino tkivo putem regulacije staničnih metaboličkih procesa. Leptin djeluje na način da ubrzava metabolizam lipida i glukoze neovisno o ulozi regulacije sitosti. Kod ljudi koncentracija leptina u krvi i njegovo izlučivanje varira tijekom dana. Cirkadijani ritam sekrecije karakterizira bazalna koncentracija između 8:00 i 12:00 sati, progresivni rast sve do vrhunca između 00:00 i 4:00 sata i lagano opadanje do 12:00 sati (52). Leptin se regulira dvojno kod ljudi. U vremenu održavanja težine, kad je unos energije izjednačen s potrošenom, koncentracija leptina odražava masu masnog tkiva. S druge strane, u uvjetima negativnog (gubitak tjelesne mase) i pozitivnog (dobivanje tjelesne mase) energetskog balansa, brze promjene u koncentraciji plazmatskog leptina senzor su energetske neravnoteže i utječu na eferentne metaboličke puteve (53). Visoke koncentracije leptina signaliziraju mozgu da se pohranjuje previše energije, a mozak odgovara na način da smanjuje apetit i potiče potrošnju energije izbjegavajući na taj način nakupljanje masnog tkiva i pretilost (54). Fiziološki efekti snižene razine leptina znatno su primjetniji nego oni povišene koncentracije istoga. Osjetljivost na leptin je vrlo visoka kod fizioloških koncentracija i zdravih pojedinaca, dok je kod pretilih ljudi ona značajno niža sve dok naposljetku ne postanu rezistentni na njega. Kod ljudi, uzrok noćnom porastu leptinske sekrecije koji traje sve do vremena hranjenja,

vjerojatno je ukupni učinak izlučenog inzulina tijelom cijelog dana. Inzulin stimulira lučenje leptina iz adipocita, ali s odgodom (55).

1.2.3 Utjecaj leptina i patološke promjene

Uz to što je bitan u inhibiciji unosa hrane, dokazano je i da leptin regulira energetsku ravnotežu utječući na utrošak energije. Studije izvedene na grupama životinja pokazale su da je smanjenje tjelesne mase potaknuto kroničnim unosom leptina veće nego u one grupe koja je samo uzimala manje hrane (56). Leptin regulira energetsku homeostazu najviše putem prevencije pada potrošnje energije tijekom stanja ograničenja unosa energije. Efekti leptina u tom slučaju su posredovani aktivacijom simpatičkih živaca koji inerviraju termoaktivno smeđe masno tkivo, što rezultira rasipanjem energije putem topline (57). U štakora s vrlo malo masnog tkiva infuzija leptinom dovodi do brze redistribucije toka glukoze u jetru sa sporom stimulacijom glukoneogeneze povezane sa gotovo istom takvom inhibicijom glikogenolize (58). Utjecaj leptina na glukoneogenezu (ali ne i na glikogenolizu) ovisan je o aktivaciji melanokortinskih receptora (59). Pretili ljudi imaju značajnu rezistenciju na inzulin koja je praćena s visokim koncentracijama inzulina i leptina (60). Uzevši u obzir rečeno, nemogućnost visokih koncentracija leptina da povrate normalnu energetsku i metaboličku homeostazu često se tumači kao dokaz leptinske rezistencije. U arkuatusu hipotalamusa nalaze se neuroni osjetljivi na leptin (61). POMC neuroni koji produciraju α-MSH djeluju putem melanokortinskih receptora i glavni su medijatori učinaka leptina (62). Nakon vezanja na OB-Rb receptor u hipotalamusu, leptin putem signalne kaskade inhibira nekoliko oreksigenih peptida dok u isto vrijeme stimulira nekoliko anoreksigenih. Oreksigeni neuropeptidi nizvodno regulirani leptinom su NPY, MCH, oreksini i AgRP. Anorektični neuropeptidi uzvodno regulirani leptinom su α-MSH, CART (engl. *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) i CRH (63).

U ljudi, kao i kod glodavaca, mutacija gena za leptin ili disfunkcija leptinskog receptora (64) rezultira hiperfagijom i pretilošću. Krvno-moždana barijera je aktivno uključena u regulaciju dostupnosti leptina u središnjem živčanom sustavu putem regulacije transportnog sustava na membrani. Ovaj je princip regulacije prisutan i kod miševa (65) i kod štakora (66). Leptin na ovaj način signalizacijski povezuje periferno tkivo i živčani sustav (67), odnosno svaku masnu stanicu periferije s moždanim tkivom. Inhibicija unosa hrane leptinom posredovana je i PI3K (68) inzulinskom signalnom kaskadom. Ovaj signalni put stoga posreduje i u zajedničkim učincima leptina i inzulina, kao perifernih signala središnjem

živčanom sustavu (hipotalamusu), koji rukovodi regulacijom metaboličke homeostaze i unosa hrane (69)(70). Porast koncentracije leptina može dovesti do smanjene sekrecije inzulina (71). Leptin inhibitorno djeluje na sekreciju inzulina otvaranjem kalijevih kanala, inhibicijom protein fosfataze-1 i posljedično redukcijom unutarstaničnog kalcija te naposljetku redukcijom cAMP-a unutar stanice (72). S druge strane, inzulin potiče lučenje i proizvodnju leptina (73). Kod pretilosti, zbog hiperinzulinemije može doći do rezistencije na inzulin što uzrokuje pojačanu proizvodnju leptina zbog velike količine masnog tkiva, a to opet dovodi do rezistencije na leptin i tu ulazimo u začarani krug koji vodi do sve veće pretilosti (74).

1.3 Inzulin i njegovi receptori

Inzulin je mali globularni protein sastavljen od dva polipeptidna lanca, A (21 AK) i B (30AK), koji su povezani kovalentno dvama disulfidnim mostovima (75). Biološki učinci inzulina posredovani su inzulinskim receptorima, dimerima koji se sastoje od dvije vanstanične α podjedinice koje vežu inzulin i dvije β podjedinice koje su također povezane disulfidnim vezama u konformaciji β-α-α-β (76). Inzulinski receptor je prototip homolognih integralnih membranskih proteina koje čini izvanstanična domena koja veže inzulin i upravlja aktivnošću unutarstanične tirozin kinaze. Gen za pro-receptor inzulinskog receptora nalazi se na 19. kromosomu i čine ga, između ostalog, 22 egzona. Gen kodira sintezu dva izooblika ovog receptora – IRa i IRb. Izooblici se razlikuju prema tome što IRb ima 12-aminokiselinski slijed na C-terminalnom kraju α podjedinice (77), a on nedostaje kod IRa. Ekspresija ova dva izooblika regulirana je tkivnom specifičnošću koja je u manjoj ili većoj mjeri sačuvana među vrstama. Kod ljudi su obje izoforme prisutne u mišićima skeleta, masnom tkivu, bubrezima, posteljici i srcu; IRb je, međutim, više prisutan izooblik u tkivima osjetljivim na inzulin. Najviše ga je u jetri (>90-95 % IRb-a), dok je IRa dominantni oblik u slezeni, mozgu, fetalnom tkivu, te u nekoliko oblika raka (78)-(80). Odnos ekspresija ova dva oblika ovisi i o diferencijaciji stanice i njenoj razvojnoj fazi (81). Vidljive su i funkcionalne međusobne razlike, kao što je mala razlika u afinitetu za inzulin, kinetika internalizacije istoga, kao i kapacitet signalizacije i njena dinamika (82), ali jedna od najvećih je ona u afinitetu za IGF-I (engl. *insulin-like growth factor*) i IGF-II (84). U usporedbi s vezanjem inzulina, obje izoforme inzulinskog receptora pokazuju slab afinitet za IGF-I, ali IRa ima veći afinitet za oba IGF oblika nego IRb i može vezati IGF-II afinitetom sličnim onom za inzulin (84). IRb veže inzulin velikim afinitetom, dok IRa veže inzulin i IGF sličnim afinitetom. Uz to, hibridi receptora sastavljeni od IGF1R-a (engl. engl. *insulin-like growth factor receptor 1*) i IRb receptora isključivo vežu IGF-I, dok hibridi sastavljeni od IGF1R i IRa vežu IGF i inzulin

sličnim afinitetom. Krivo alternativno prekrajanje egzona 11 gena za inzulinski receptor koji pokreće sintezu dvije izoforme inzulinskog receptora i posttranslacijsko slaganje hibrida ova dva receptora, kao i hibride s homolognim IGF1R, utječe na fetalni razvoj i doprinosi rijetkim oblicima inzulinske rezistencije kod odraslih (85).

1.3.1 Mehanizam djelovanja

Inzulin se veže za α ekstracelularne podjedinice čime se aktivira tirozin kinaza na unutarstaničnom dijelu transmembranskih β podjedinica. Aktivirani receptor tako fosforilacijom pokreće signalni put. Većina inzulinskih signalnih molekula proizvodi se ili upravlja putem fosforilacije tirozina na IRS1 (engl. *insulin receptor substrate protein*) ili na njegovom izoobliku IRS2. IRS1 kontrolira rast tijela i periferne učinke inzulina, dok IRS2 upravlja rastom mozga, održavanjem tjelesne težine, homeostazom glukoze i ženskom plodnošću (85).

1.3.2 Cirkadijani ritam inzulina

Pošto je ritam plazmatske koncentracije glukoze i inzulina u fazi s ritmom hranjenja, a lučenje inzulina je najviše potaknuto povišenjem koncentracije glukoze kao odgovora na hranjenje, dugo se mislilo kako su ritam koncentracije glukoze i inzulina indirektno regulirani ritmom hranjenja. Prvi dokaz za direktnu uključenost suprahijazmatske jezgre u metabolizam glukoze dao je pokus na štakorima koji su bili na režimu prehrane sa 6 obroka na dan (svaka 4 sata hrana je bila dostupna na 10 minuta) u kojemu su životinje uvečer pokazale jači odgovor glukoze i inzulina na hranjenje (86). Prisutnost dnevnog ritma plazmatske koncentracije glukoze kod štakora koji su izgladnjivani ili su imali 6 obroka dnevno i odsutnost tog ritma kod lezije na suprahijazmatskoj jezgri kao središta koje regulira cirkadijani ritam dokazuju uključenost iste u regulaciju plazmatske koncentracije glukoze neovisno o hranjenju (87). S druge strane, plazmatske koncentracije inzulina i glukagona porastu jednako nakon svakog obroka tijekom režima sa 6 obroka dnevno, što upućuje na to da ne doprinose značajno ritmu plazmatske glukoze (88). U dnevnom ritmu plazmatske koncentracije glukoze kod štakora najviše su koncentracije vidljive pri kraju perioda svjetla (dana) zbog pojačane aktivnosti životinja tijekom faze mraka (noći) (89). Intravenozni test tolerancije na glukozu izveden u različite dijelove dana pokazuje da skladištenje glukoze također podliježe dnevnom ritmu te je najviše početkom faze mraka (90). Budući da je koncentracija glukoze u cirkulaciji rezultat odnosa proizvodnje glukoze i skladištenja, a zna se da su plazmatske koncentracije i skladištenje najviše početkom aktivnog perioda, proizvodnja glukoze bi također trebala biti na

visokom nivou u ovom periodu. Prema tome, kod noćnih životinja se proizvodnja i potrošnja glukoze povećavaju na početku aktivnog perioda i pokazuju pravilnu dnevnu ritmičnost (91).

Kod zdravih osoba unos hrane brzo rezultira porastom plazmatskog inzulina koji svoj maksimum doseže nakon 30 do 45 minuta. Koncentracija inzulina vraća se na onu početnu za 2 do 3 sata. Međutim, kod dijabetičara unos humanog inzulina putem igala ne slijedi u potpunosti ovo pravilo. Inzulin ima tendenciju vezanja u polimere te je nađen čak u heksamernom obliku nakon što je unesen subkutano. Inzulin se može apsorbirati jedino u monomernom obliku kroz zid kapilara te je zbog navedenog porast koncentracije inzulina u krvi odgođen (92)(93). Zbog fenomena stvaranja inzulinskih kompleksa može doći do postprandijalne hiperglikemije, kao i do hipoglikemije prije idućeg obroka. Inzulinski analozi (npr. glargin, detemir, aspart, lispro) koriste se kako bi imitirali normalne inzulinske koncentracije i nagli porast koncentracije postprandijalno. Međutim, neki analozi pokazuju mitogena i anti-apoptotična svojstva zbog čega ih se sve više povezuje s nekim oblicima raka (94)(95).

1.4 Cirkadijani ritam

Cirkadijani ritam označava približno 24-satni ciklus, koliko i traje jedan dan (lat. c*irca diem*), a koji potiče pokretač (engl. *pacemaker*) koji se nalazi u suprahijazmatskoj jezgri (SCN) u prednjem hipotalamusu sisavaca (odnosno u ventrolateralnim neuronima vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) (96). Njegova uloga je da prikuplja informacije o količini svjetla i sinkronizira fiziologiju organizma s izmjenama dana i noći, odnosno svjetla i tame (97). Ritam se očituje u procesima kao što su lokomotorna aktivnost, hranjenje, buđenje i san te brojni drugi fiziološki i metabolički putevi. Svi su regulirani središnjim pokretačem koji održava „kazaljku“ sata u pokretu. Primjerice, kod ljudi san karakterizira pad tjelesne temperature dok se krvni tlak i frekvencija rada srca povećavaju u kasnijoj fazi sna kako bi pripremili tijelo za buđenje. Uz to možemo reći da se kataboličke funkcije pokreću u budnoj fazi cirkadijanog ritma, a anaboličke u fazi sna. Ovi mehanizmi pomažu organizmu sudjelovati, prilagoditi se i optimizirati svoju metaboličku, hormonalnu i lokomotornu aktivnost oslanjajući se na predvidive dnevne prirodne promjene kao što su izlazak i zalazak sunca (98).

1.4.1 Mehanizam cirkadijanog sata

Kod sisavaca se cirkadijani ritam temelji na isprepletenoj mreži transkripcijskih faktora povezanih povratnim spregama pri čemu, primjerice, heterodimer transkripcijskih faktora CLOCK/Bmal1 (engl. *circadian locomotor output cycles kaput*/*brain and muscle ARNT like protein 1*) potiče transkripciju Period 1-3 (*Per1-3*) i Kriptokrom 1-2 (*Cry1-2*) gena preko cis-elemenata E-kutije. PER1-3 i CRY1-2 proteini, osim uloga u regulaciji ritma, imaju ulogu transkripcijskih inhibitora dimera CLOCK/BMAL1. Osim na transkripciju navedenih, ovaj dimer djeluje i na druge gene, kao što su *Ror α* ili *Rev-erb α.* Ovi geni također djeluju kao dijelovi cirkadijanog sata, dok neki drugi na koje djeluje isti transkripcijski dimer služe kao izlazni produkti cirkadijanog sustava koji reguliraju procese direktno u stanicama i tkivima (99)(100). Jezgrini receptori ROR (engl. *retinoic acid-related orphan receptor*) i REV-ERB porodice djeluju na DNA sekvence nazvane RORE (engl. *ROR elements*) kako bi kontrolirali transkripciju *Bmal1* gena djelujući represivno, i obrnuto (101)(102). Druge, pomoćne kaskade, kao što je utjecanje ROR i REV-ERB proteina na kontrolu transkripcije *Rev-erb α* gena (103), pridonose robusnosti samog sustava (104).

Dodatna petlja kojom CLOCK/Bmal1 djeluje na transkripciju ide putem jezgrinih receptora Rev-erb-α i ROR-α. CLOCK/Bmal1 potiče transkripciju Rev-erb-α omogućujući dnevnu fluktuaciju istoga, a on inhibira ekspresiju Bmal1 (105). ROR-α se, s druge strane, natječe s Rev-erb-α za vezno mjesto na Bmal1 promotoru (RORE) i aktivira transkripciju istoga ukoliko je vezan (106). Dakle, ova dva receptora predstavljaju regulatornu petlju transkripcije gena za spomenute receptore te je okupiranost Bmal1 promotora važna za pravovremeno djelovanje cirkadijanog sata (107).

1.4.2 Održavanje sata

Transkripcija posredovana faktorima cirkadijanog ritma i pravovremeno djelovanje (engl. *timing*) od približno 24 sata ovise o posttranslacijskim mehanizmima samog sata. Posttranslacijska obrada proteina uključuje fosforilaciju, sumoilaciju (SUMO proteini; engl. *Small Ubiquitin-like Modifier)* i acetilaciju, koji su najčešće potaknuti formacijom heterodimera i velikih proteinskih kompleksa. Ovi procesi kontroliraju promet unutarstaničnih proteina ritma, njihovu zadaću i naposljetku razgradnju. Pravovremena razgradnja proteina sata neophodna je za funkcioniranje sata kao što tome u prilog govori nedavno otkrivena uloga proteina F-kutije – Fbxl3 (engl. *F-Box and leucine rich repeat protein 3*). Obitelj proteina F-kutije čini oko 40 članova koji upravljaju ubikvitinacijom i razgradnjom određenih

proteina. Proteini F-kutije sudjeluju u proteasomskom putu razgradnje proteina putem SCF (Spk/Cullin/F-Box) E3 kompleksa ubikvitin ligaze (108)(109). Navedeni kompleks neposredno razgrađuje CRY 1 i 2 proteine, te posljedično mutacije u Fbxl13 uzrokuju usporavanje cirkadijanog sata kod miševa (110)(111). I neke druge posttranslacijske promjene i mutacije ključnih proteina dovode do produljenja ili skraćivanja cirkadijanog ritma. Tako primjerice fosforilacija proteina kazein kinazom (CK-1ε) (112) i CKII (113) utječu na Per i Cry, kao i na stabilnost i aktivnost Bmal1 proteina tijekom cirkadijanog perioda (114). Primjerice, besmislena mutacija CK-1ε rezultira cirkadijanim periodom skraćenim na 20 sati kod hrčaka s *tau* mutacijom (115). Kazein kinaza 1 epsilon regulira posttranskripcijske procese na tri načina: označuje PER monomere za razgradnju, promiče PER:PER i PER:CRY translokaciju u jezgru i sudjeluje u njihovoj degradaciji nakon što obave svoje uloge (116). Inhibicija kinaze glikogen sintaze (GSK-3β), koja fosforilira i tako stabilizira Rev-erb-α protein, vodi do brze proteasomske razgradnje navedenog proteina i posljedične aktivacije Bmal1. Stabilizacija Rev-erb-α uz pomoć GSK-3β važan je događaj u pokretanju, sinkronizaciji nakon serumskog šoka i održavanju cirkadijanog sata. Uz navedeno, sumoilacija također pokazuje utjecaj na Bmal1, ubikvitinaciju proteina i degradaciju te je kao takva također neophodna za održavanje ritmičnosti (117). Naposljetku, acetilacija histona i kompaktnost kromatina također sudjeluju u mašineriji ritma (118). CLOCK sam po sebi ima ulogu acetiltransferaze i djeluje na histone (119) i Bmal1 (120).

Budući da postoji jaka poveznica između cirkadijanog ritma i metabolizma, poremećaji u tom sustavu, bilo uzrokovani pomaknutim fazama svjetla i tame (radnici u noćnim smjenama), bilo genetičkim mutacijama ili polimorfizmima sastavnica sata, mogu dovesti do raznih metaboličkih poremećaja i kod ljudi i u mišjim modelima (121).

Iz navedenog je vidljivo da je velik učinak leptina i inzulina na ekspresiju inzulinskog (IRa/IRb) i leptinskog (OB-R) receptora u arkuatnim jezgrama, te se smanjena ekspresija ovih receptora povezuje sa smanjenom osjetljivosti na iste. Međutim, ne zna se kakva je dinamika ekspresije ovih receptora tijekom cijelog dana s obzirom na lučenje ovih hormona uslijed osjećaja gladi ili sitosti tijekom normalnog režima ishrane.

2. Hipoteza

Tijekom dnevnog ciklusa mijenja se ekspresija leptinskog i inzulinskog receptora na neuronima centara za sitost, a njihova ekspresija je veća nakon perioda gladovanja te se postepeno smanjuje tijekom perioda hranjenja.

3. Ciljevi

Napraviti imunohistokemiju i semikvantitativnu analizu rezova arkuatnih i periventrikularnih jezgri hipotalamusa protutijelima na inzulinski i leptinski receptor te markere neurona sitosti i gladi (POMC i AgRP) na arhivi mozgova miševa koji su žrtvovani u ponoć, u 6:00, 12:00 i 18:00 sati.

4. Materijali i metode

4.1 Materijali

Pokus kvantifikacije inzulinskih i leptinskih receptora kod miševa sastavni je dio HRZZ projekta pod nazivom „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“, odobrenog od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (Klasa: 602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16. prosinca 2016.) voditelja prof. dr. sc. Marije Heffer. Za dio studije koja je prikazana ovim završnim radom ishođena je dodatna dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku koja se vodi pod brojem 2158-61-07-18-106.

U studiju je uključena skupina od 12 C57black/6 mužjaka miševa starosti 3 mjeseca koji su žrtvovani u različito vrijeme tijekom cirkadianog ritma, točnije, u 6:00, 12:00, 18:00 i 00:00 h. Žrtvovanje su izveli za to obučeni djelatnici Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku. Životinje nisu bile izložene nikakvom drugom rukovanju, osim što su u točno određeno vrijeme dana bile žrtvovane. Tkiva su po žrtvovanju bila fiksirana u 4 % paraformaldehidu u trajanju od 24 sata na +4 °C, krioprotektirana u rastućem gradijentu otopina saharoze (10 %, 20 % i 30 %) (*Sigma-Aldrich*, St-Louis, MO, SAD) u PBS-u (engl. *Phosphate buffered saline*; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD) na +4 °C u trajanju potrebnom da rezovi potonu u pojedinoj otopini saharoze na dno posude. Potom su tkiva smrznuta u pothlađenom izopentanu (*Sigma-Aldrich*, St-Louis, MO, SAD) i stavljena u hladnjak na -80 °C do rezanja na kriostatu.

4.2 Metode

4.2.1 Priprema tkiva

Fiksirana, krioprotektirana i smrznuta tkiva mozgova miševa rezana su na kriostatu (Leica CM3050S), te su rezovi debljine 35 µm na razini centara sitosti i gladi (hipotalamus) bili stavljeni u 1 %-tnu otopinu peroksida (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) u PBS-u dva puta na 20 minuta kako bismo blokirali aktivnost endogenih peroksidaza. Nakon toga uronjeni su u otopinu za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (u nastavku blokirajuća otopina) na 4 sata. Blokirajuća otopina je sadržavala 1 % BSA (*engl. bovine serum albumin; Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD) i 5 % kozjeg seruma otopljenih u PBS-u.

4.2.2 Imunohistokemija na POMC epitop

Nakon blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela, rezove smo prebacili u primarno protutijelo anti-POMC (*Abcam*; Eugene, Oregon, USA) otopljeno u blokirajućoj otopini u omjeru 1: 1000. Inkubirali smo preko noći na tresilici u hladnjaku na +4 °C. Po inkubaciji smo rezove isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Potom smo rezove inkubirali u sekundarnom kozjem protu-zečjem biotiniliranom protutijelu (*Jackson Immuno Research Europe Ltd*, Cambridgeshire, UK) otopljenom u blokirajućoj otopini u omjeru 1:500, 4 sata na tresilici u hladnjaku na +4 °C. Rezovi su zatim isprani 3 puta u PBS-u i prebačeni u tercijarni kompleks s HRP-om (engl. *Horseradish peroxidase*; "VectaStain® abc Kit Elite", *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, SAD) koji sadržava avidin i biotin, oba u omjeru 1:250. Otopina tercijarnog kompleksa pripremljena je pola sata prije uranjanja rezova, a rezovi su ostavljeni u njoj 2 sata na +4 °C. Nakon inkubacije tercijarnog kompleksa rezovi su 3 puta po 10 minuta ispirani u TBS-u (engl. *Tris-buffered saline,* TBS). Naposljetku su rezovi razvijeni pomoću diaminobenzidina (DAB) ("Vector DAB Substrate Kit®", *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, SAD), priređenog prema uputama proizvođača. Rezovi su u toj otopini ostavljeni 1 minutu i 45 sekundi. Iz DAB otopine su uzorci prebačeni u TBS Naposljetku su rezovi navučeni na stakla, ostavljeni da se osuše i pokriveni *Vectamount* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, SAD) pokrivalom za imunohistokemijske preparate i pokrovnim stakalcem. Imunohistokemijska reakcija je slikana kamerom Olympus D70 na mikroskopu Carl Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju 400x, te je kvantifikacija napravljena u računalnom programu Fiji.

4.2.3 Dvostruka imunohistokemija na AgRP i inzulinske receptore

Na drugoj skupini skupini rezova iste regije imunohistokemijski smo prikazali položaj inzulinskih receptora. Rezovi su inkubirani 4 sata u blokirajućoj otopini kako bi se spriječilo nespecifično vezivanje sekundarnih protutijela. Nakon blokiranja rezovi inkubirani u primarnom protutijelu inzulinske receptore (IR-α; *Santa Cruz biotechnology;* Dallas, USA) 1:250 kroz dva dana na +4 °C na tresilici. Rezovi su isprani 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Potom su rezovi inkubirani u sekundarnom protutijelu (kozje protu-zečje biotinilirano protutijelo; *Jackson Immuno Research Europe,* Cambridgeshire, UK) otopljenom u blokirajućoj otopini u omjeru 1:500 kroz 4 sata na +4 °C na tresilici. Nakon inkubacije sekundarnog protutijela rezove smo isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Rezovi su potom inkubirani u otopini streptavidina na koji je vezana fluorescentna boja AF488 (engl. *Alexa Fluor; Biolegend,* San Diego, CA, USA) razrijeđen u omjeru 1:1000 u otopini za blokiranje, a

inkubacija je trajala 2 sata na + 4 °C. Nakon inkubacije rezove smo isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Nakon toga preparati su blokirani u blokirajućoj otopini koja je sadržavala konjski serum (*GIBCo*, Zagreb, Hrvatska) umjesto kozjeg jer je primarno protutijelo iz magarca. Nakon drugog blokiranja rezove smo do sutra stavili u otopinu primarnog anti-AgRP protutijela (*ThermoFisher scientific;* Waltham, MA, USA) razrijeđenog 1:1000 u blokirajućoj otopini na +4 °C. Ponovno smo ih isprali 3 puta po 10 min u PBS-u i stavili ih u otopinu sekundarnog protutijela iz magarca na hrčka (engl. Donkey *Anti-guinea pig; Jackson Immuno Research Europe,* Cambridgeshire, UK) označene s Cy3 fluorescentnom bojom na 4 sata i na 4 °C. Nakon toga smo ih isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u te navukli na stakla i pokrili *Vectashield* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, SAD) pokrivalom za preparate s fluorescencijom.

4.2.4 Dvostruka imunohistokemija na AgRP i leptinske receptore

Na drugoj skupini rezova iste regije imunohistokemijski smo prikazali položaj leptinskih receptora. Rezovi su inkubirani 4 sata u blokirajućoj otopini kako bi se spriječilo nespecifično vezivanje sekundarnih protutijela. Nakon blokiranja rezovi su inkubirani u primarnom protutijelu za leptinske receptore (Ob-R; *Santa Cruz biotechnology*; Dallas, USA) otopljenom u blokirajućoj otopini u omjeru 1:50 kroz dva dana na +4 °C na tresilici. Rezovi su isprani 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Potom su rezovi inkubirani u sekundarnom protutijelu – kozje protu-zečje biotinilirano protutijelo (*Jackson Immuno Research Europe,* Cambridgeshire, UK) otopljeno u blokirajućoj otopini u omjeru 1:500 kroz 4 sata na +4 °C na tresilici. Nakon inkubacije sekundarnog protutijela rezove smo isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u te su rezovi potom inkubirani u otopini streptavidin Cy3 (engl. *Cyanine*)fluorescentne boje (*Biolegend;* San Diego, CA, USA) otopljenim u blokirajućoj otopini u omjeru 1:1000 na 2 sata i na +4 °C. Nakon inkubacije rezove smo isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Nakon toga preparati su blokirani u blokirajućoj otopini koja je sadržavala konjski serum (*GIBCo*, Zagreb, Hrvatska) umjesto kozjeg jer je primarno protutijelo iz magarca. Nakon drugog blokiranja rezove smo do sutra stavili u otopinu primarnog anti-AgRP protutijela (*ThermoFisher scientific;* Waltham, MA, USA) razrijeđenog 1:1000 u blokirajućoj otopini na +4 °C. Ponovno smo ih isprali 3 puta po 10 min u PBS-u i stavili ih u otopinu sekundarnog protutijela iz magaraca na hrčka označenog s AF488 fluorescentnom bojom na 4 sata i na 4 °C. Nakon toga smo ih isprali 3 puta po 10 minuta u PBS-u te navukli na stakla i pokrili *Vectashield* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, SAD) pokrivalom za preparate s fluorescencijom.

4.3 Statističke metode

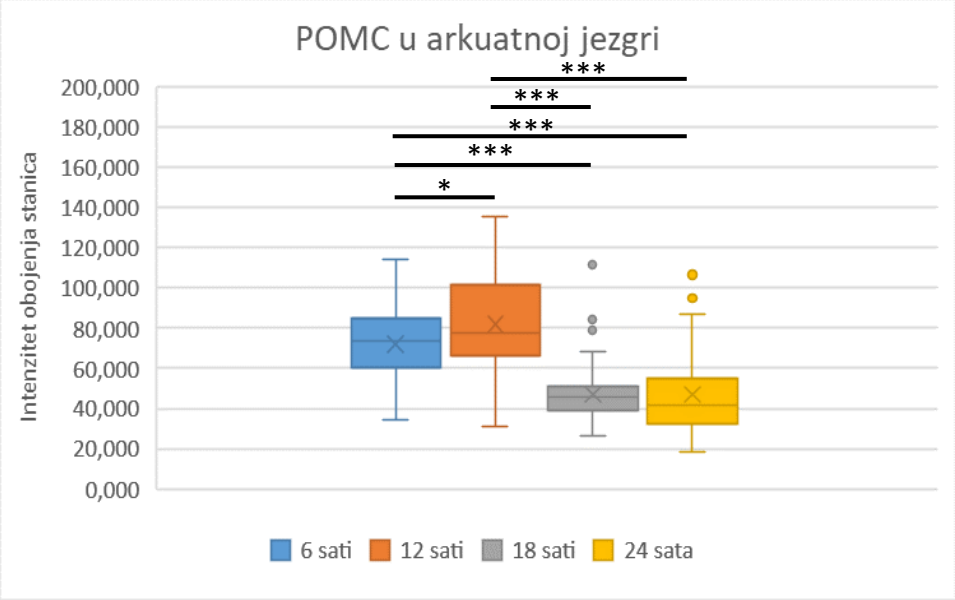
Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu distribuciju, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli koje odstupaju od normalne raspodjele analizirane su Mann-Whitney U testom, a one koje ne odstupaju analizirane su T-testom za nezavisne uzorke. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica12 (*Quest Software Inc*., Aliso Viejo, CA, SAD).

5. Rezultati

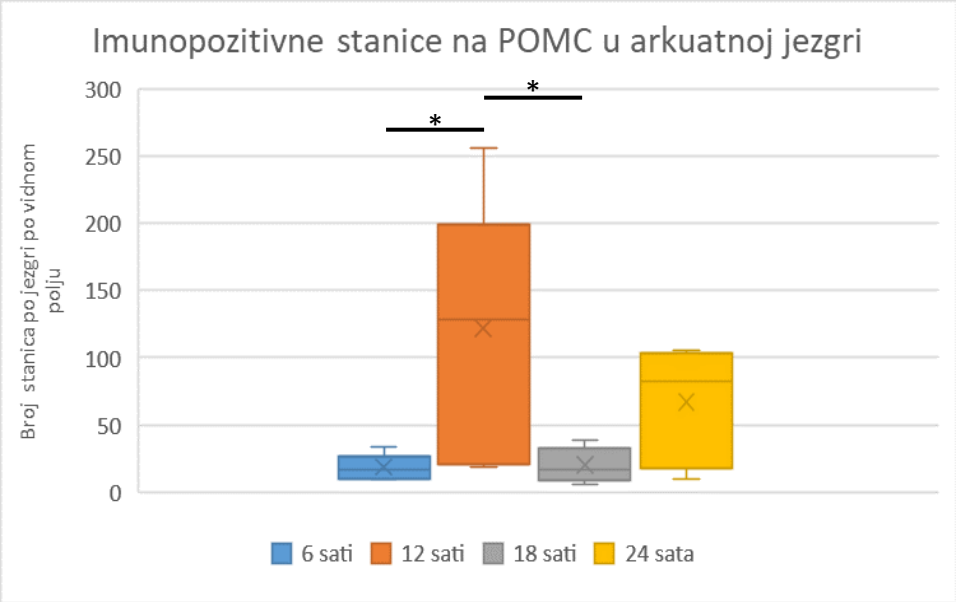
5.1 POMC receptor

5.1.1 Arkuatna jezgra

Ekspresija receptora za POMC u arkuatnoj jezgri ne slijedi normalnu distribuciju kod uspoređivanja niti jedne grupe životinja, kao ni broj imunopozitivnih stanica kod istih. Najvišu vrijednost ekspresije pokazuje grupa žrtvovana u 12:00 sati, a najnižu ona u ponoć. Broj imunopozitivnih stanica najveći je također u podne, a najniži je u 6:00 sati. Statistički značajnu razliku u ekspresiji vidimo između grupe žrtvovane u 6 sati i svih drugih skupina (s onom u 12:00 sati $p = 0,02$; 18:00 sati $p < 0,001$; u ponoć $p < 0,001$), te između skupine žrtvovane u 12:00 sati i svih drugih skupina (s onom u 18:00 sati $p < 0,001$; u ponoć $p < 0,001$). Što se tiče broja imunopozitivnih stanica, vidimo statistički značajnu razliku između prve i druge ($p = 0,04$) te druge i treće ($p = 0,05$) skupine životinja.



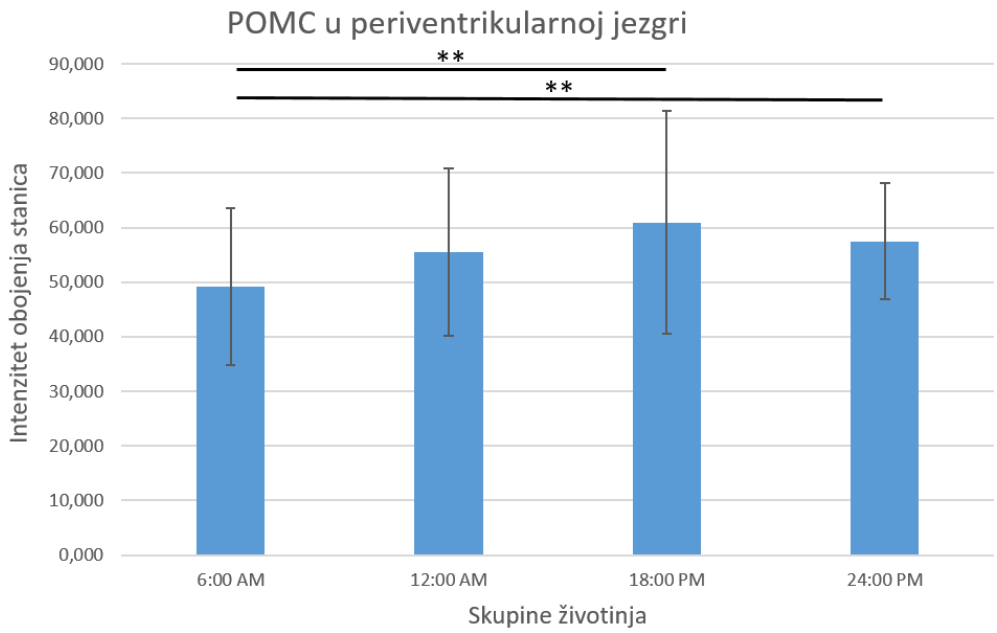
Slika 2. Razlike u ekspresiji POMC receptora na stanicama arkuatne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



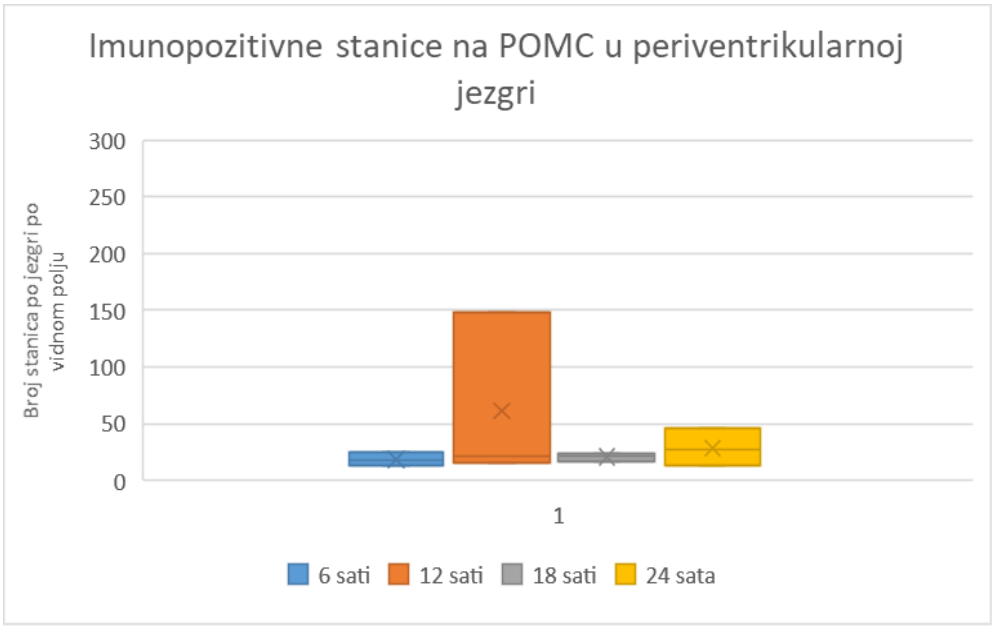
Slika 3. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na POMC receptore u arkuatnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)

5.1.2 Periventrikularna jezgra

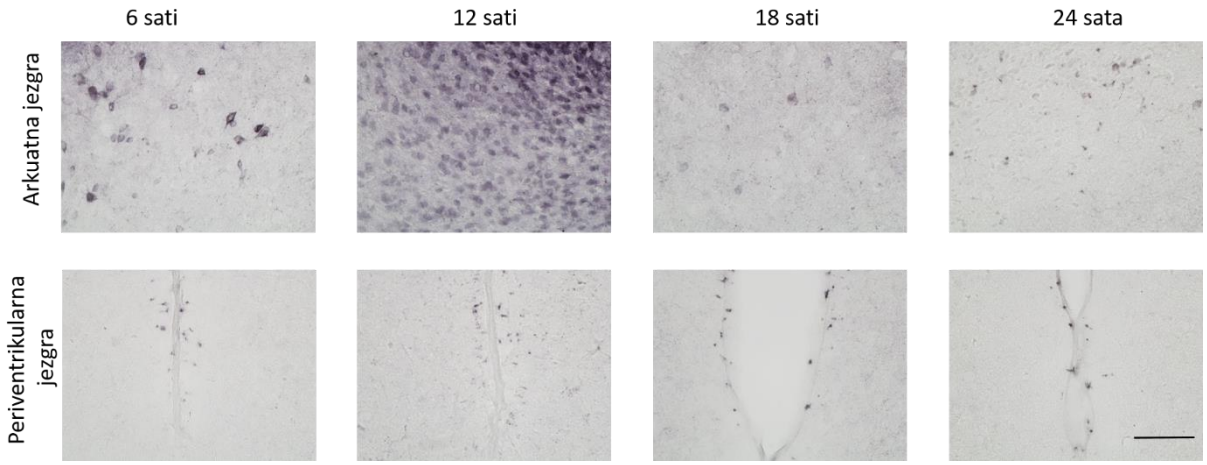
Kod uspoređivanja grupa životinja s ekspresijom POMC receptora u periventrikularnoj jezgri vidimo normalnu distribuciju između svih skupina, dok to ne vidimo kod usporedbe broja imunopozitivnih stanica u istoj regiji. Najviša vrijednost ekspresije je u grupi žrtvovanoj u 18:00 sati, a najniža u onoj u 6:00 sati, dok je broj stanica najveći u ponoć, a najmanji u 6:00. Statistički značajna razlika u ekspresiji izražena je između stanica životinja žrtvovanih u 6:00 sati i u 18:00 sati ($p = 0,004$) te između grupe žrtvovane u 6:00 sati i onih u ponoć ($p = 0,004$). Statistički značajne razlike između broja stanica među skupinama nema.



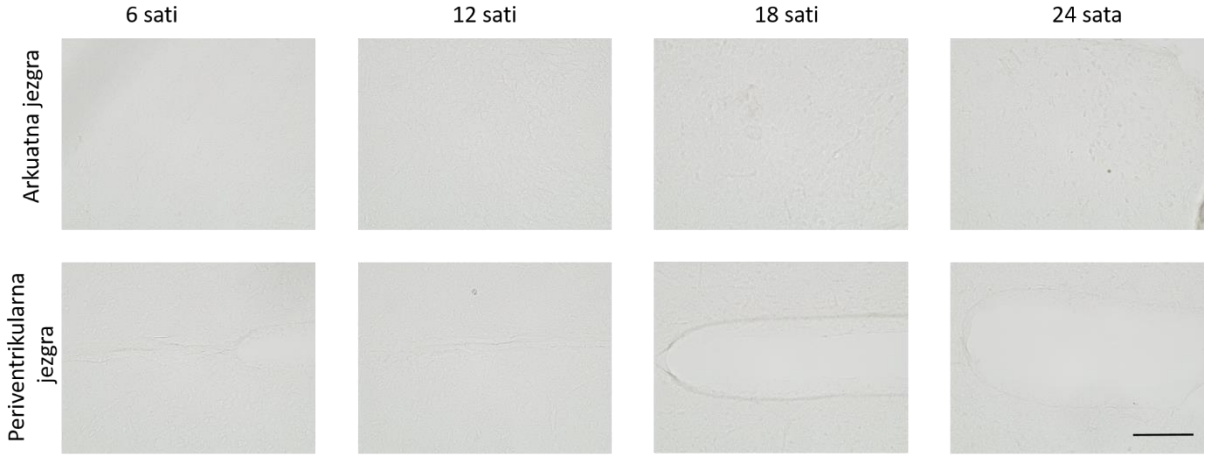
Slika 4. Razlike u ekspresiji POMC receptora na stanicama periventrikularne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. T-test za neovisne uzorke. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



Slika 5. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na POMC receptore u periventrikularnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



Slika 6. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja protutijelima za POMC u regijama arkuatne i periventrikularne jezgre kod skupina miševa žrtvovanih u 6:00, 12:00, 18:00 i 24:00 sata. Povećanje 400x, veličina skale 100 μm.

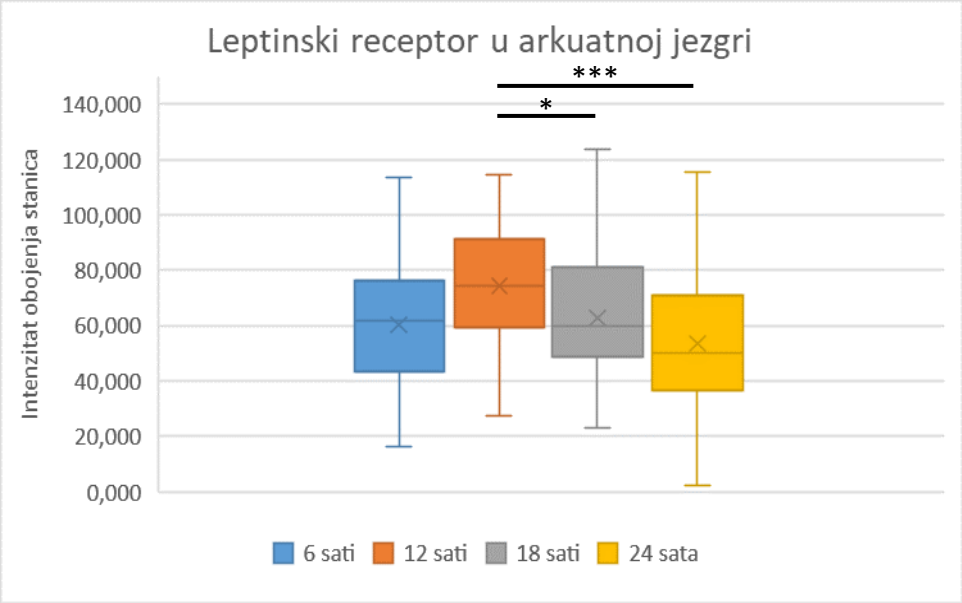


Slika 7. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja negativnih kontrola za POMC u regijama arkuatne i periventrikularne jezgre kod skupina miševa žrtvovanih u 6:00, 12:00, 18:00 i 24:00 sata. Povećanje 400x, veličina skale 100 μm.

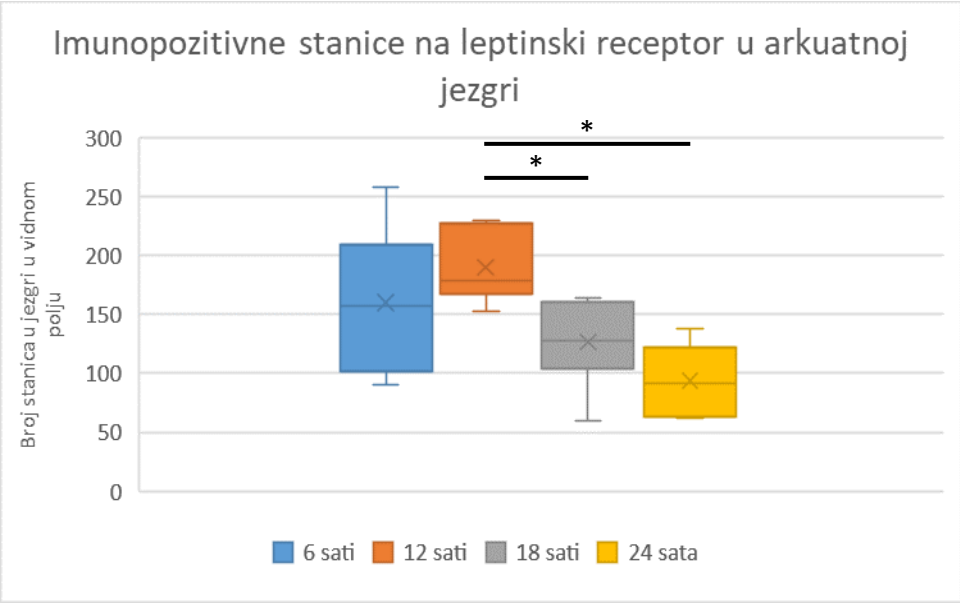
5.2 Leptinski receptor (OB-R)

5.2.1 Arkuatna jezgra

Ekspresija leptinskog receptora u arkuatnoj jezgri ne slijedi normalnu distribuciju ni kod jedne grupe životinja, kao ni broj imunopozitivnih stanica kod istih. Najjača ekspresija nađena je u mozgovima miševa žrtvovanih u 12:00 sati, a najslabija kod onih žrtvovanih u ponoć, a istu razliku vidimo i kod broja imunopozitivnih stanica. Statistički značajnu razliku u ekspresiji vidimo između grupe žrtvovane u 12:00 i one žrtvovane u 18:00 ($p = 0,04$) te one žrtvovane u ponoć ($p < 0,001$). Što se tiče broja imunopozitivnih stanica, vidimo statistički značajnu razliku između istih skupina, samo što je između 12:00 i 18:00 sati $p = 0,01$, a između 12:00 i 24:00 sati $p = 0,005$.



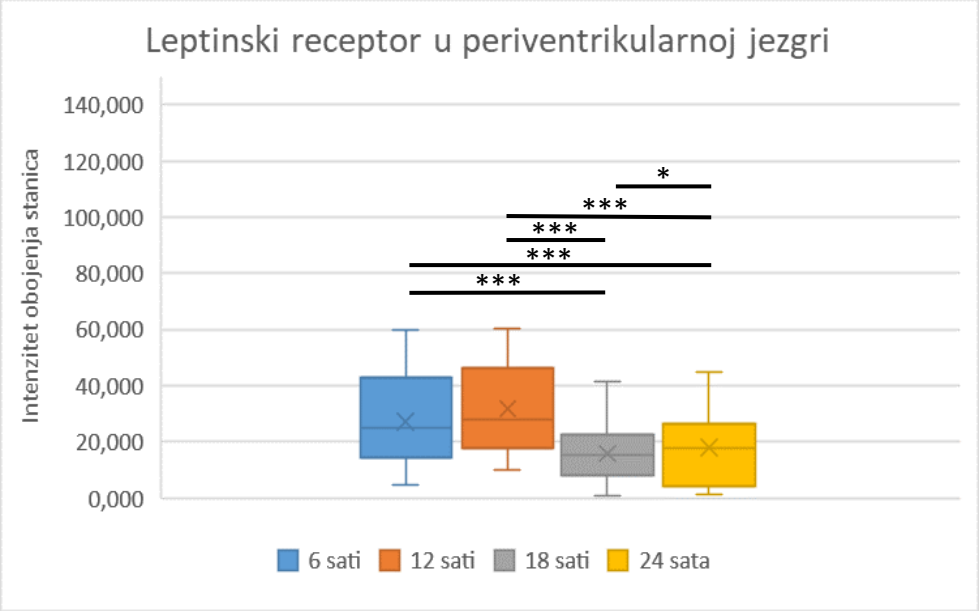
Slika 8. Razlike u ekspresiji leptinskog receptora na stanicama arkuatne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



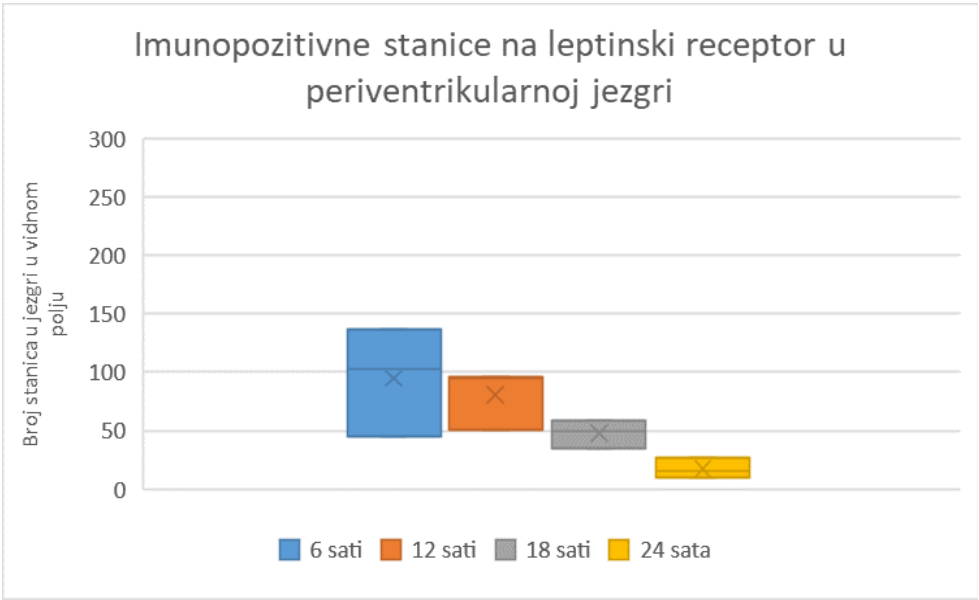
Slika 9. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na leptinski receptor u arkuatnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)

5.2.2 Periventrikularna jezgra

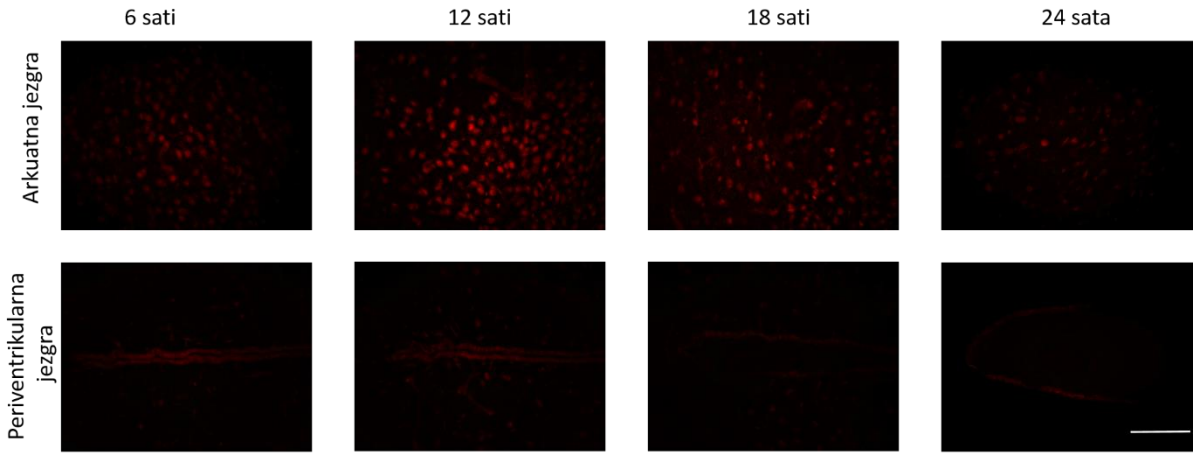
Kod uspoređivanja grupa životinja s ekspresijom leptinskog receptora u periventrikularnoj jezgri ne vidimo normalnu distribuciju između niti jedne skupine, kao ni kod razlike u broju imunopozitivnih stanica. Najvišu vrijednost ekspresije vidimo kod grupe žrtvovane u podne, a najnižu kod one u 18:00 sati, a najviše imunopozitivnih stanica ima grupa žrtvovana u 6:00, a najmanje ona u ponoć. Statistički značajna razlika u ekspresiji izražena je između stanica životinja žrtvovanih u 6:00 sati i u 18:00 sati ($p < 0,001$) te između grupe žrtvovane u 6:00 sati i one u 24:00 sata ($p < 0,001$). Nadalje, između grupe žrtvovane u 12:00 sati i grupa žrtvovanih u 18:00 ($p < 0,001$) i 24:00 sata ($p < 0,001$) te između grupe žrtvovane u 18:00 sati i 24:00 sata ($p = 0,05$). Statistički značajne razlike između broja imunopozitivnih stanica na ovaj receptor među skupinama nema.



Slika 10. Razlike u ekspresiji leptinskog receptora na stanicama periventrikularne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



Slika 11. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na leptinski receptor u periventrikularnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)

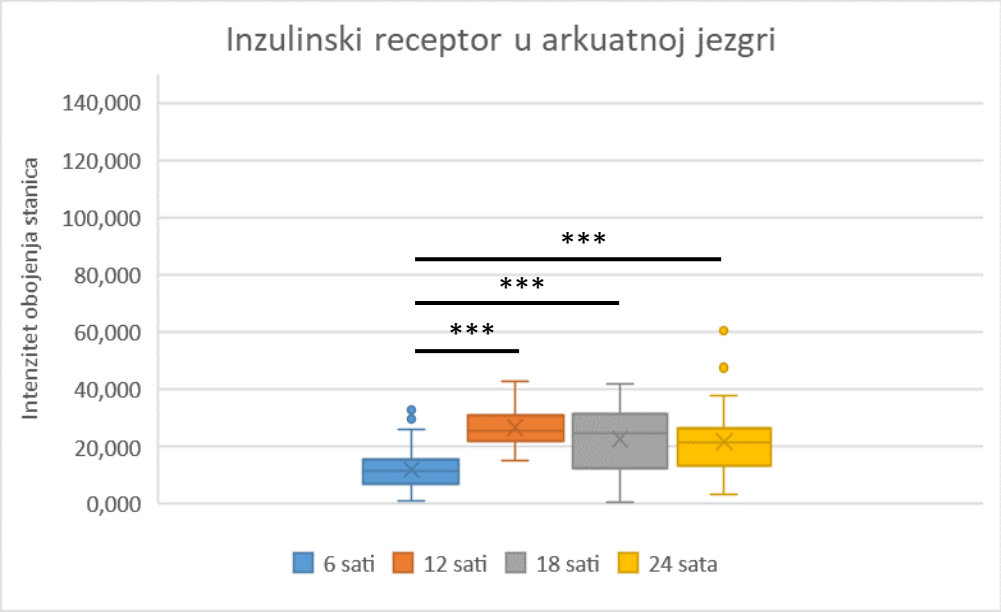


Slika 12. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja protutijelima za leptinske receptore u regijama arkuatne i periventrikularne jezgre kod skupina miševa žrtvovanih u 6:00, 12:00, 18:00 i 24:00 sata. Povećanje 400x, veličina skale 100μm.

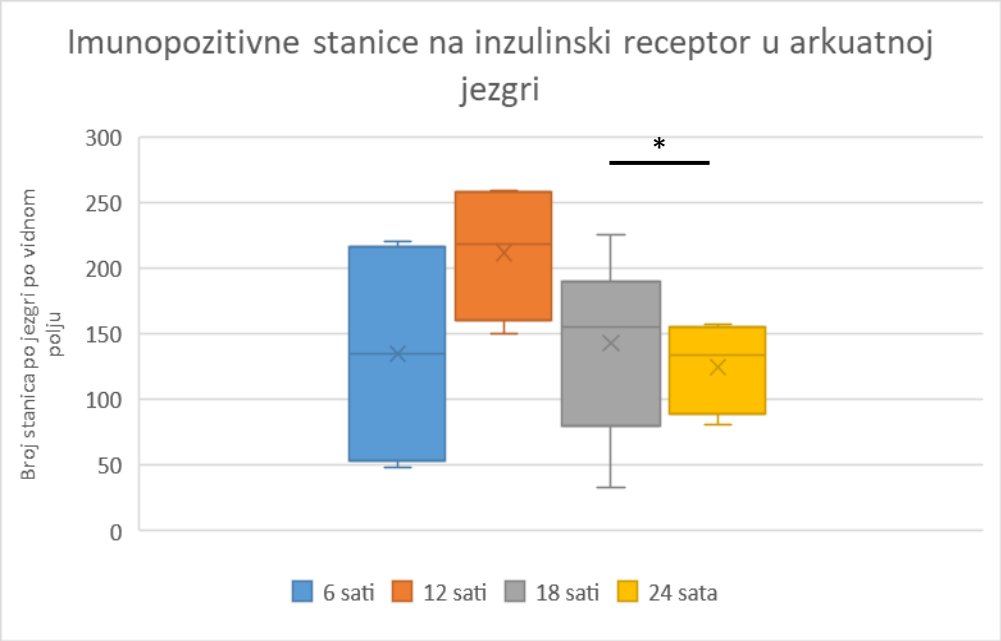
5.3 Inzulinski receptor (IR-α)

5.3.1 Arkuatna jezgra

Ekspresija inzulinskog receptora u arkuatnoj jezgri ne slijedi normalnu distribuciju ni kod jedne grupe životinja, kao ni razlike u broju imunopozitivnih stanica kod istih. Najjače je eksprimirana stanicama životinja žrtvovanih u podne, a najmanje kod onih u 6:00, a isto je i s brojem imunopozitivnih stanica. Statistički značajnu razliku u ekspresiji vidimo između grupe žrtvovane u 6:00 sati te svih ostalih grupa (između 6:00 i 12:00 sati $p < 0,001$; između 6:00 i 18:00 sati – $p < 0,001$; između 6:00 sati i 24:00 sata – $p < 0,001$). Što se tiče broja imunopozitivnih stanica, vidimo statistički značajnu razliku između skupine žrtvovane u 18:00 i one u 24:00 sata ($p = 0,04$).



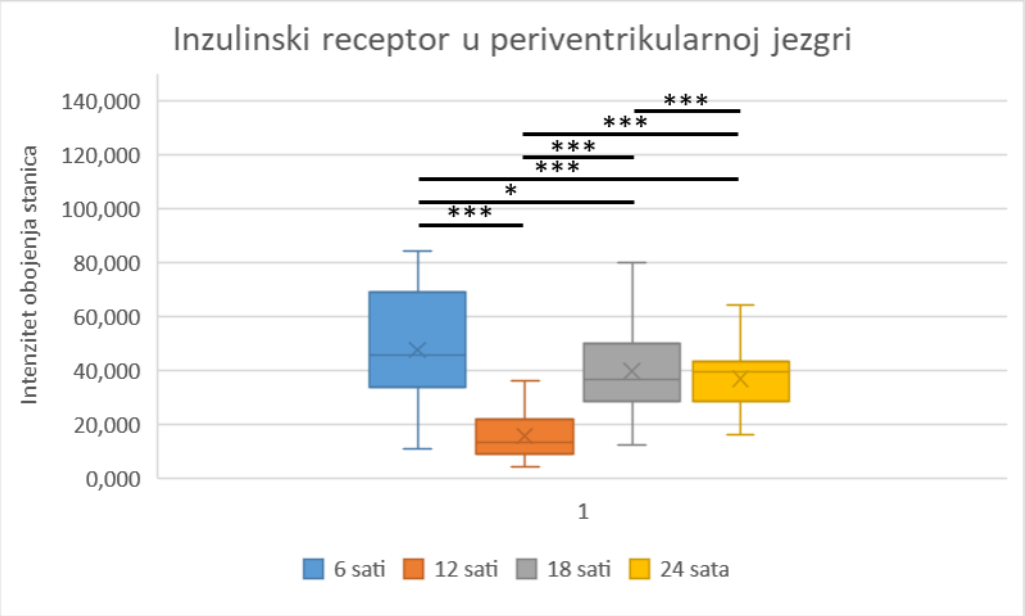
Slika 13. Razlike u ekspresiji inzulinskog receptora na stanicama arkuatne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



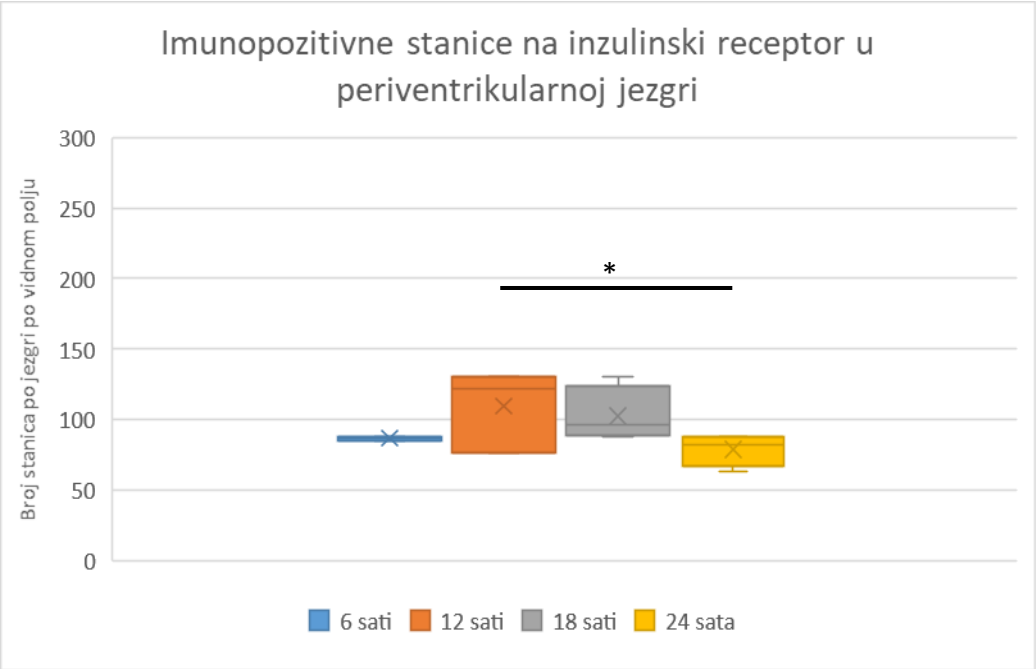
Slika 14. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na inzulinski receptor u arkuatnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)

5.3.2 Periventrikularna jezgra

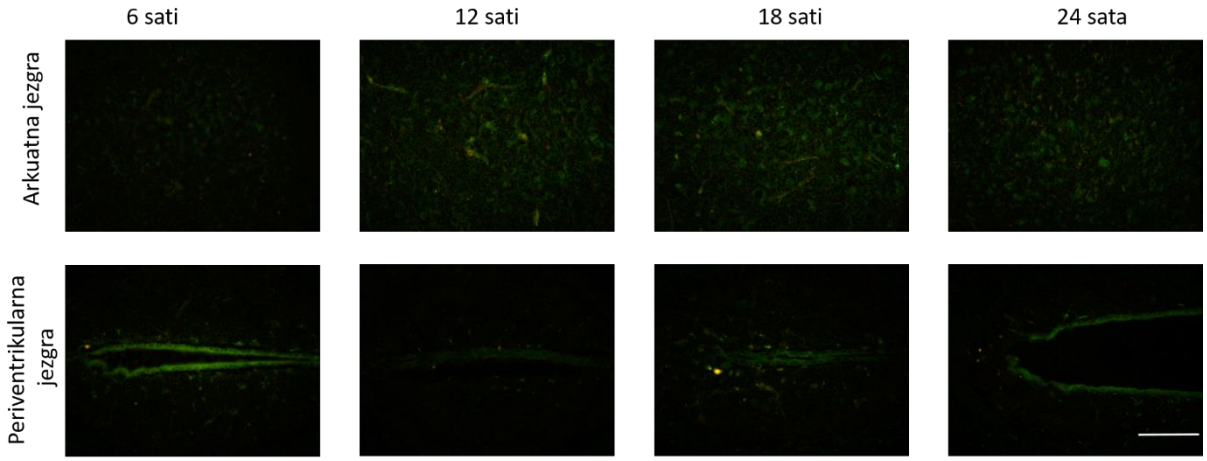
Kod uspoređivanja grupa životinja s ekspresijom inzulinskog receptora u periventrikularnoj jezgri ne vidimo normalnu distribuciju između niti jedne skupine, kao ni kod razlike u broju imunopozitivnih stanica. Najviša je vrijednost ekspresije ovog receptora kod grupe žrtvovane u 6:00 sati, a najniža kod one u podne. Što se pozitivnih stanica tiče, najviše ih je kod grupe žrtvovane u 6:00, a najmanje kod one u ponoć. Statistički značajna razlika u ekspresiji izražena je između stanica životinja žrtvovanih u 6:00 sati i onih u 12:00 ($p < 0,001$), onih u 18:00 sati ($p = 0,02$) te 24:00 sata ($p < 0,001$). Nadalje, između grupe žrtvovane u 12:00 sati i grupa žrtvovanih u 18:00 ($p < 0,001$) i 24:00 sata ($p < 0,001$) te između grupe žrtvovane u 18:00 sati i 24:00 sata ($p < 0,001$). Statistički značajna razlika između broja imunopozitivnih stanica na ovaj receptor postoji između grupe žrtvovane u 12:00 te one žrtvovane u 24:00 sata ($p = 0,008$).



Slika 15. Razlike u ekspresiji inzulinskog receptora na stanicama periventrikularne jezgre kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



Slika 16. Razlike u broju imunopozitivnih stanica na inzulinski receptor u periventrikularnoj jezgri kod 4 skupine životinja označenih prema vremenu žrtvovanja. Mann-Whitney U test. (* – statistička značajnost $p < 0,05$; ** – statistička značajnost $p < 0,005$; *** – statistička značajnost $p < 0,001$)



Slika 17. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja protutijelima za inzulinske receptore u regijama arkuatne i periventrikularne jezgre kod skupina miševa žrtvovanih u 6:00, 12:00, 18:00 i 24:00 sata. Povećanje 400x, veličina skale 100µm.

5.4 Vizualizacija AgRP-a

Nije bilo mjerljive reakcije.

6. Rasprava

Kako bismo razumjeli molekularnu razinu pretilosti, studije su sve više usredotočene na hipotalamus kao glavni regulator energetske distribucije i njegovu modulaciju uz pomoć perifernih signala. Prvi dokazi važnosti hipotalamusa u kontroli hranjenja dolaze od studija koje su pokazale da lezije u nekim njegovim dijelovima uzrokuju promjene u unosu hrane i tjelesnoj masi (122)(123)(124). U bazalnom hipotalamusu nalazi se arkuatna jezgra koja posjeduje modificiranu krvno-moždanu barijeru kroz koju prolaze nutrijenti, hormoni i ostale krvne molekule te je ona prvi senzor perifernih signala (125). Unutar arkuatne jezgre dvije su populacije neurona od kojih svaka luči specifične neuropeptide koji utječu na energetsku ravnotežu. Jednu populaciju čine POMC i CART neuroni koji putem svojih neuropeptida koje luče pokazuju snažni anoreksigeni učinak smanjenja unosa hrane i povećanja potrošnje energije. Drugu skupinu čine AgRP i NPY neuroni koji pokazuju suprotan, oreksigeni učinak (2)(3)(Slika 1). Prema tome, kod negativnog energetskog balansa kao što je situacija kod gladovanja ekspresija AgRP-a je pojačana, a POMC-a snižena, a kod pozitivnog energetskog balansa obrnuto.

U arkuatusu naših miševa ekspresija POMC neuropeptida je značajno niža tijekom aktivne faze (od 18:00 do 6:00 sati) u odnosu na onu u fazi mirovanja (od 6:00 do 18:00 sati) budući da u aktivnoj fazi nema potrebe za anoreksigenim podražajem jer se energija svakako troši kretanjem. U fazi mirovanja je značajno viša (s maksimumom u 12:00 sati), kako ne bi podraživala životinje na unos hrane za vrijeme odmora. Osim toga, anoreksogeni podražaji se poništavaju stalnim unosom energije, a unos je stalan budući da je miševima hrana cijelo vrijeme dostupna dok su budni. Broj imunopozitivnih stanica, kao i ekspresija ovog neuropeptida raste značajno između 6:00 i 12:00 te značajno pada između 12:00 i 18:00 budući da se tijelo priprema na buđenje i prvi jutarnji obrok. U periventrikularnoj jezgri razina POMC neuropeptida statistički značajno raste između 6:00 i 18:00, odnosno 00:00, ali pokazuje puno tromiji odgovor s obzirom na izmjenu svjetla i mraka te nema tako naglog pada nakon 12:00, nego blagog i to tek nakon 18:00. Iz toga se može zaključiti da je arkuatna jezgra primarno središte regulacije unosa energije putem POMC neuropeptida.

Leptin luči bijelo masno tkivo te je njegova razina proporcionalna količini istoga. Inzulin luče beta stanice gušterače ovisno o razini glukoze u krvi kratkoročno i o adipozitetu tijela dugoročno. Oba hormona pokazuju anoreksigeni učinak (126) i receptori za oba hormona eksprimirani su i na POMC, i na AgRP neuronima arkuatne jezgre, što znači da

zajedno s njima imaju značajnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže i homeostaze glukoze. Zna se da su POMC neuroni glavni posrednici leptinskih učinaka u mozgu. Nekoliko je studija pokazalo da delecija gena za leptinski receptor u ovim neuronima uzrokuje pretilost, bez promjene u unosu hrane i potrošnji energije (127)-(130). Druge studije su pak pokazale da inducirana, jaka ekspresija ovog receptora isključivo u POMC neuronima u KO miševima za ovaj receptor, a koji su izrazito pretili te imaju dijabetes, dovodi do značajnog smanjenja unosa hrane i blagog smanjenja tjelesne mase. Iznenađujuće je i da se razina glukoze potpuno normalizirala neovisno o promjenama u unosu hrane i tjelesnoj težini. Uz to je i fizička aktivnost značajno porasla unatoč pretilosti. Zaključeno je da je leptinska signalizacija isključivo preko POMC neurona neophodna za stimulaciju kretanja i prevenciju dijabetesa u slabo aktivnih i hiperglikemičnih KO miševa za ObR (129). Međutim, ovdje se radilo o indukciji ekspresije leptinskog receptora u svim POMC neuronima, a ne samo u skupini koja inače eksprimira taj receptor, kao što je to bilo izvedeno drugoj studiji (131). Unatoč tome, oba su istraživanja pokazala da inducirana ekspresija ovog receptora u KO miševa dovodi do poboljšanja razina glukoze i osjetljivosti na inzulin neovisno o tjelesnoj masi te da POMC neuroni imaju ključnu ulogu u regulaciji homeostaze glukoze.

Poznato je da su ekspresija receptora na membrani stanice i izlučivanje hormona za taj receptor, konkretno inzulina i leptina, obrnuto proporcionalni zbog mehanizma negativne povratne sprege. Neuroni arkuatusa naših miševa pokazuju značajan pad u ekspresiji receptora za leptin, kao i u broju imunopozitivnih stanica nakon 12:00 sati te najnižu ekspresiju vidimo u 00:00. Tomu je tako jer kod miševa razina glukoze, pa tako i inzulina, raste predvečer, odnosno pred njihovo buđenje, a inzulin potiče izlučivanje leptina (55)(73). Osim toga, leptin se nakuplja tijekom dana zbog pojačanog unosa hrane te vrhunac doseže pred kraj aktivne faze (00:00 sati), a iz toga slijedi da je ekspresija njegovog receptora tada najslabija. U periventrikularnoj jezgri vidimo da je vrhunac ekspresije leptinskog receptora također u podne, ali ekspresija još značajnije pada nakon toga te ekspresija kreće značajno rasti već od 18:00 sati (za razliku od arkuatusa gdje pada sve do ponoći, a tek onda počinje rasti). To je zato što periventrikularnu jezgru oplahuje likvor te je ona stoga prvi senzor razlike u razini leptina, odnosno energije u tijelu i kao takva je osjetljivija na promjene nego arkuatna koja je dublje u moždanom tkivu.

Inzulinski receptori i signalne molekule inzulina široko su rasprostranjeni u središnjem živčanom sustavu. Kako bi proučili fiziološki učinak inzulinske signalizacije u mozgu, u jednoj su studiji uzgojili miševe s KO genom za inzulinski receptor specifičan za neurone

(NIRKO; engl. *neuron-specific insulin receptor knock out*). Inaktivacija ovog gena nije imala utjecaj na razvoj mozga i neurona. Međutim, ženski NIRKO miševi pokazali su pojačan unos hrane, a i u mužjaka i u ženki razvila se pretilost s visokom razinom leptina, blagom inzulinskom rezistencijom, povišenim razinama inzulina u krvi i hipertrigliceridemijom, što nam govori da utjecaj leptina na unos hrane i potrošnju energije podrazumijeva funkcionalnost inzulina i njegove signalizacije (132). Kao i kod leptina, POMC i AgRP neuroni su važne mete inzulinske signalizacije. Dokazano je da inzulin djeluje na ove grupe neurona hiperpolarizacijom obje skupine (133)(134). Zanimljivo je i da, za razliku od leptina, manjak inzulinskih receptora u POMC ili AgRP neuronima ne utječe na tjelesnu težinu i unos hrane. Međutim, delecija gena za inzulinski receptor na POMC i AgRP neuronima utječe na metabolizam glukoze. Konkretno, miševi bez receptora na AgRP neuronima (ali ne i na POMC neuronima) pokazuju smanjenu supresiju jetrene produkcije glukoze (glukoneogeneze) (133), što pokazuje važnost ovih receptora na AgRP neuronima u održavanju razina glukoze. Jedna studija je analizirala i učinke inducirane ekspresije inzulinskih receptora isključivo na POMC i AgRP neuronima u mozgu KO miševa za taj receptor u arkuatnoj jezgri. takvi miševi su pokazali jaku supresiju glukoneogeneze u jetri samo kad je inzulinski receptor inducirano eksprimiran u AgRP neuronima. S druge strane, indukcija ekspresije u POMC neuronima pojačala je glukoneogenezu i ovi su miševi pokazali pojačan unos hrane i pojačanu aktivnost u odnosu na KO skupinu, dakle, i POMC neuroni igraju ulogu u homeostazi kroz inzulinsku regulaciju, a obje skupine neurona posreduju inzulinskom utjecaju na razine glukoze (135). Cirkulirajući inzulin inhibira glukoneogenezu u jetri, pa promjene u signalizaciji unutar hipotalamusa utječu na proizvodnju glukoze. Infuzijom inzulina ili molekule koja oponaša inzulin u treću moždanu komoru suprimira se glukoneogeneza neovisno o razini cirkulirajućeg hormona i o drugim hormonima za regulaciju glukoze. S druge strane, centralni antagonizam inzulinske signalizacije umanjio je sposobnost inhibicije glukoneogeneze cirkulirajućeg inzulina, što nam govori da hipotalamička inzulinska rezistencija može doprinijeti hiperglikemiji dijabetesa tipa 2 (136).

Tijekom aktivne faze miševa ekspresija inzulinskog receptora u arkuatnoj jezgri blago pada s početkom već u 12:00 sati te značajno između 00:00 i 6:00 sati budući da se inzulin kod miševa akumulira tijekom aktivne faze (54). Kad uđu u fazu mirovanja (6:00 sati), dolazi do značajnog porasta već do 12:00 sati budući da se razine glukoze, pa tako i inzulina, tijekom mirovanja sve više smanjuju. Istu petlju slijedi i broj imunopozitivnih stanica, samo što do značajnog pada dolazi između 18:00 i 00:00. U periventrikularnoj jezgri ekspresija

ponovno ne slijedi petlju one u arkuatnoj jezgri budući da je najniža ekspresija ovog receptora u neuronima ove jezgre u podne (za razliku od one u arkuatusu koja je u 6:00), a najviša u 6:00, obrnuto od one u arkuatusu. Osim toga, značajnost razlika između svih skupina postoji i veća je od one u arkuatusu. Vidljivo je da je utjecaj inzulina na ovu regiju hipotalamusa duži nego kod arkuatne jezgre. Ekspresija raste značajnije i brže od 12:00 sati pa nadalje s većom razlikom između 12:00 i 18:00 kad je buđenje budući da su razine glukoze najviše pred buđenje, odnosno pred ulazak u aktivnu fazu, pa su tako i razine inzulina najviše u ovom razdoblju. Ekspresija u arkuatusu pokazuje pad od 12:00 sati pa nadalje koji je sporiji i manje značajan opet zbog samog smještaja arkuatusa dublje u moždanom tkivu nego periventrikularna jezgra te zbog veće osjetljivosti potonje na promjene u razini inzulina.

7. Zaključci

- u arkuatnoj i periventrikularnoj jezgri miševa ekspresija POMC neuropeptida je značajno niža tijekom aktivne faze u odnosu na onu tijekom faze mirovanja
- u arkuatnoj jezgri miševa ekspresija leptinskog receptora značajno pada nakon 12:00 sati pa sve do ponoći
- u periventrikularnoj jezgri je vrhunac ekspresije leptinskog receptora u podne, ali ne pada do ponoći, nego do 18:00 sati budući da je osjetljivija na promjene nego arkuatna jezgra
- tijekom aktivne faze miševa ekspresija inzulinskog receptora u arkuatnoj jezgri blago pada s početkom u fazi mirovanja, odnosno u 12:00 kada je njen vrhunac. Kada uđu u fazu mirovanja (6:00 sati), dolazi do značajnog porasta već do podne jer fiziološki se koncentracija glukoze tijekom mirovanja sve više smanjuje
- u periventrikularnoj jezgri ekspresija inzulinskog receptora suprotna je onoj u arkuatnoj jezgri te je najniža ekspresija u podne, a najviša u 6:00 sati

8. Sažetak

Uvod: leptin i inzulin glavni su hormonski posrednici kontrole sitosti i gladi kojom upravlja melanokortinski sustav u hipotalamusu. Čine ga POMC (potiču potrošnju energije i inhibiraju unos hrane) i AgRP (potiču pozitivni energetski balans i unos hrane) neuroni na koje ova dva hormona različito djeluju.

Ciljevi: napraviti imunohistokemiju i semikvantitativnu analizu rezova arkuatnih i periventrikularnih jezgri hipotalamusa protutijelima na inzulinski i leptinski receptor te markere neurona sitosti i gladi (POMC i AgRP) na arhivi mozgova miševa koji su žrtvovani u ponoć, u 6:00, 12:00 i 18:00 sati.

Materijali i metode: u studiju su uključene 4 grupe mužjaka C57black/6 miševa starosti 3 mjeseca koji su živjeli u istim uvjetima, samo su žrtvovani u različito vrijeme tijekom dana. Imunohistokemijskom analizom rezova mozga s pripadajućim regijama hipotalamusa u kojemu su centri gladi i sitosti vizualizirani su POMC, AgRP, leptinski i inzulinski receptori.

Rezultati: kod svih je markera u svim regijama značajnije izražena ekspresija za vrijeme mirovanja nego u aktivnom periodu, osim kod inzulinskog receptora u kojemu dolazi do izmjene minimuma i maksimuma ekspresije između grupe žrtvovane u 6:00 i one u 12:00 sati

Zaključak: arkuatna jezgra je primarno središte regulacije unosa energije putem POMC neurona, a periventrikularna je osjetljivija na promjene u koncentracijama inzulina i leptina

Ključne riječi: leptin, inzulin, POMC, arkuatna jezgra, periventrikularna jezgra

9. Summary

Changes in expression of insulin and leptin receptors in satiety centers of mice during circadian rhythm

Introduction: leptin and insulin are main hormone mediators of satiety and hunger control which is managed by melanocortin system in hypothalamus. It's consisted of POMC (that promote energy expenditure and inhibit food intake) and AgRP (which promote positive energy balance and food intake) neurons on which these two hormones act differently.

Goals: to do immunohistochemical and semiquantitive analyses of arcuate and periventricular hypothalamic nuclei with antibodies for insulin and leptin receptors and markers of satiety and hunger neurons (POMC and AgRP) on the brain archive of the mice that were executed at midnight, 6:00 AM, 12:00 AM and 6:00 PM.

Materials and methods: this study includes 4 groups of male C57black/6 mice that are 3 months old and lived in the same conditions, only were put to death in different times throughout the day. POMC and AgRP neuropeptides, as well as leptin and insulin receptors with associated hypothalamus satiety and hunger center containing regions were visualized with immunohistochemical analyses.

Results: expression of every marker in every region is significantly higher in resting phase than in the active period, except for insulin receptor which showed transition of minimum and maximum expression between 6 AM and 12 AM groups

Conclusion: arcuate nucleus is primary regulating center of energy intake, and periventricular nucleus is more sensitive to changes in insulin and leptin levels

Key words: leptin, insulin, POMC, arcuate nucleus, periventricular nucleus

10. Reference

1. Lee M, Wardlaw SL. The central melanocortin system and the regulation of energy balance. Front Biosci. 2007; 12: 3994–4010.
2. McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000; 279: R695–703.
3. Tolle V, Low MJ. In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. Diabetes. 2008; 57: 86–94.
4. Pillot B, Duraffourd C, Bégeot M, Joly A, Luquet S, Houberdon I, et al. Role of Hypothalamic Melanocortin System in Adaptation of Food Intake to Food Protein Increase in Mice. PLoS ONE. 2011; 6(4): e19107.
5. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nat Neurosci. 2005; 8:571–578.
6. Mercer AJ, Hentges ST, Meshul CK, Low MJ. Unravelling the central proopiomelanocortin neural circuits. Front Neurosci. 2013; 7: 19.
7. Alou M, Sanchez J, Rodriguez AM, Priego T, Pico C, et al. Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. Cell Physiol Biochem. 2009; 23: 115–124.
8. Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, et al. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. Genes Dev. 1997; 11: 593–602.
9. Goto K, Inui A, Takimoto Y, Yuzuriha H, Asakawa A, et al. Acute intracerebroventricular administration of either carboxyl-terminal or amino-terminal fragments of agouti-related peptide produces a long-term decrease in energy expenditure in rats. Int J Mol Med. 2003; 12: 379–383.
10. Wortley KE, Anderson KD, Yasenchak J, Murphy A, Valenzuela D, et al. Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. Cell Metab. 2005; 2: 421–427.

11. Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. BMC Neurosci. 2002; 3: 18.
12. Wortley KE, Anderson KD, Yasenchak J, Murphy A, Valenzuela D, et al. Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. Cell Metab. 2005; 2: 421–427.
13. Qian S, Chen H, Weingarth D, Trumbauer ME, Novi DE, et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. Mol Cell Biol. 2002; 22: 5027–5035.
14. Hadley ME, Dorr RT. Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization. Peptides. 2006; 27: 921–930.
15. Flier JS. Obesity Wars: Molecular Progress Review. Confronts an Expanding Epidemic. Cell. 2004; 116: 337–350.
16. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, et al. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3–36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. Brain Res. 2005; 1044: 127–131.
17. Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. Endocrinology. 2005; 146: 2369–2375.
18. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. Neuron. 1999; 23: 775-786.
19. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. Nat Neurosci. 2004; 7: 493-494.
20. Takahashi KA, Cone RD. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. Endocrinology. 2005; 146: 1043-1047.
21. Liu T, Kong D, Shah BP, Ye C, Koda S et al. Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone. Neuron. 2012; 73: 511-522

22. Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE et al. Leptin receptor signalling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. Neuron. 2004; 42: 983-991.
23. Mercer AJ, Hentges ST, Meshul CK, Low MJ. Unravelling the central proopiomelanocortin neural circuits. Front Neurosci. 2013; 7: 19.
24. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. Nature. 2007; 449: 228–232.
25. Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, et al. Acute effects of leptin require PI3K signalling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. J Clin Invest. 2008; 118: 1796–1805.
26. Kelly MJ, Loose MD, Ronnekleiv OK. Opioids hyperpolarize beta-endorphin neurons via mu-receptor activation of a potassium conductance. Neuroendocrinology. 1990; 52: 268–275.
27. Plum L, Ma X, Hampel B, Balthasar N, Coppari R, et al. Enhanced PIP3 signalling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. J Clin Invest. 2006; 116: 1886–1901.
28. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, et al. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. Neuron. 2011; 71: 142–154.
29. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. Science. 2004; 304: 110–115.
30. Wisse BE, Schwartz MW. Role of melanocortin in control of obesity. The Lancet. 2001; 358: 857-859.
31. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide gene expression in mice. Diabetes 1996; 45: 531–535.
32. Klein S, Fontana L, Young VL et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. N Engl J Med. 2004; 350: 2549–2557
33. Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. Proc Nutr Soc. 2000; 59: 359–371.
34. Prolo P, Wong M, Licinio J. Leptin. Int J Biochem Cell Biol. 1998; 30: 1285–1290.

35. John A, Bart S. Leptin. Lancet. 1998; 351: 737–741.
36. Fruhbeck G. A heliocentric view of leptin. Proc Nutr Soc. 2001; 60: 301–318.
37. Thompson DB, Janssen RC, Ossowski VM, Prochazka M, Knowler WC, Bogardus C. Evidence for linkage between a region on chromosome 1p and the acute insulin response in Pima Indians. Diabetes. 1995; 44: 478–481.
38. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. Biochem J. 2006; 393: 7–20.
39. Lee G-H, Proenca R, Montez JM et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature (London). 1996; 379: 632–635.
40. Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem. 1997; 272: 6093–6096.
41. Heshka JT, Jones PJ. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. Life Sci. 2001; 69: 987–1003.
42. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett. 1996; 387: 113–116.
43. Elmquist JK, Bjørbæk C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. J Comp Neurol. 1998; 395: 535–547.
44. Mercer JG, Moar KM, Hoggard N. Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. Endocrinology. 1998; 139: 29–34.
45. Baumann H, Morella KK, White DW et al. The full-length leptin receptor has signalling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 8374–8378.
46. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem. 2000; 275: 14563–14572.
47. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and mice but not mice. Nat Genet. 1996; 14: 95–97.
48. Mesaros A et al. Activation of Stat3 signalling in AgRP neurons promotes locomotor activity. Cell Metab. 2008; 7: 236–248
49. Ernst MB et al. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signalling in obesity. Neurosci J. 2009; 29: 11582–11593

50. Morrison CD et al. Leptin inhibits hypothalamic *Npy* and *Agrp* gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signalling. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005; 289: E1051–E1057
51. Banks WA. The many lives of leptin. Peptides. 2004; 25: 331–338.
52. Sinha M, Sturis J, Ohannesian J et al. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 228: 733–738
53. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clin Chem. 2004; 50: 1511–1525.
54. Sinha MK, Caro JF. Clinical aspects of leptin. Vitam Horm. 1998; 54: 1–30.
55. Liu L, Karkanias GB, Morales JC et al. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. J Biol Chem. 1998; 273: 31160–31167.
56. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de Sauvage F. Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93: 1726–1730
57. Scarpace PJ, Matheny M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1998; 275: E259–E264.
58. Gutierrez-Juarez R, Obici S, Rossetti L. Melanocortin independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. J Biol Chem. 2004; 279: 49704–49715.
59. Igel M, Kainulainen H, Brauers A, Becker W, Herberg L, Joost HG. Long-term and rapid regulation of ob mRNA levels in adipose tissue from normal (Sprague Dawley rats) and obese (db/db mice, fa/fa rats) rodents. Diabetologia. 1996; 39: 758–765.
60. Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H et al. Skeletal muscle AMP-activated protein-kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. Diabetes. 2005; 54: 2365–2374.
61. Korner J, Chua SC Jr, Williams JA, Leibel RL, Wardlaw SL. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin by leptin in lean and obese rats. Neuroendocrinology. 1999; 70: 377–383.
62. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000; 404: 661–671.
63. Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – a review. Neuropeptides. 2006; 40: 375–401.

64. Clement K, Vaisse C, Lahlou N et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature. 1998; 392: 398–401.
65. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. Peptides. 1996; 17: 305–311.
66. Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsberger P. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of leptin receptor. Peptides. 1999; 20: 1449–1453.
67. Tilve DP, Stern JE, Tscho ¨p M. The brain and the metabolic syndrome: not a wireless connection. Endocrinology. 2006; 147: 1136–1139.
68. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling: key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature. 2001; 413: 794–795.
69. Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. Exp Biol Med (Maywood). 2001; 226: 963–977.
70. Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. Nutr Rev. 2002; 60: S20–S29 (discussion S68–S87 and S85–S87).
71. Cases JA, Gabriely I, Ma XH et al. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. Diabetes. 2001; 50: 348–352.
72. Seufert J. Leptin effects on pancreatic b-cell gene expression and function. Diabetes. 2004; 53 (Suppl. 1): S152–S158.
73. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000; 278: E1–E14.
74. Arora A, Arora S, Leptin and its metabolic interactions – an update. Diabetes Obes Metab. 2008, 10:981
75. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, et al. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1988; 319: 369–456.
76. Ward CW, Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. BioEssays. 2009; 31: 422–434.
77. Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. Biochem Bioph Res Co. 1989; 159: 312–316.

78. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. Mol Endocrinol. 1989; 3: 1263–1269.
79. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, et al. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. EMBO J. 1990; 9: 2409–2413.
80. Sciacca L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R, et al. In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. Oncogene. 2002; 21: 8240–8250.
81. Serrano R, Villar M, Martinez C, Carrascosa JM, Gallardo N, et al. Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. J Mol Endocrinol. 2005; 34: 153–161.
82. Kellerer M, Lammers R, Ermel B, Tippmer S, Vogt B, et al. Distinct α-subunit structures of human insulin receptor A and receptor B variants determine differences in tyrosine kinase activities. Biochemistry. 1992; 31: 4588–4596.
83. 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; 403: 603–613
84. Glendorf T, Stidsen CE, Norrman M, Nishimura E, Sørensen AR, Kjeldsen T. Engineering of Insulin Receptor Isoform-Selective Insulin Analogues. PLoS ONE. 2011; 6(5): e20288.
85. White M. Insulin Signalling in Health and Disease. Science. 2004; 302 (5651), 1710-1711
86. Kalsbeek, A., Strubbe, J.H. Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. Physiol. Behav. 1998; 63, 553-558.
87. La Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Buijs, R.M. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. J. Neuroendocrinol. 1999; 11, 643-652.
88. Ruiter, M., La Fleur, S.E., van Heijningen, C., van der Vliet, J., Kalsbeek, A., Buijs, R.M. The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is

modulated by the biological clock and by feeding behaviour. Diabetes. 2003; 52, 1709-1715.

89. Cailotto, C., La Fleur, S.E., Van Heijningen, C., Wortel, J., Kalsbeek, A., Feenstra, M., et al. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? Eur.J. Neurosci. 2005; 22, 2531-2540.
90. la Fleur, S.E., Kalsbeek, A.,Wortel, J., Fekkes, M.L., Buijs, R.M. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. Diabetes. 2001; 50, 1237-1243.
91. Kumar Jha P, Challet E, Kalsbeek A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. Molecular and Cellular Endocrinology. 2015; 418: 74-88
92. Vajo Z, Duckworth WC. Genetically engineered insulin analogues: diabetes in the new millennium. Pharmacol Rev. 2000; 52: 1–9.
93. Gerich JE. Novel insulins: expanding options in diabetes management. Am J Med. 2002; 113: 308–316.
94. Smith U, Gale EA. Does diabetes therapy influence the risk of cancer? Diabetologia. 2009; 52: 1699–1708.
95. Renehan AG. Insulin analogues and cancer risk: the emergence of second-generation studies. Diabetologia. 2012; 55: 7–9.
96. Sehgal A, Mignot E. Genetics of sleep and sleep disorders. Cell. 2011; 146: 194–207.
97. Duez H, Staels B. Rev-erb-α: an integrator of circadian rhythms and metabolism. J Appl Physiol. 2009; 107: 1972–1980.
98. Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. Cell. 2008; 134: 728–742.
99. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. Hum Mol Genet 15 Spec. 2006; 2: R271–7.
100. Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. Chronobiol Int. 2007;24: 195–213.
101. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. Nat Struct Mol Biol. 2005; 12: 441–448.

102. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. J Biol Rhythms. 2005;20: 391–403.

103. Delerive P, Chin WW, Suen CS. Identification of Reverb(alpha) as a novel ROR(alpha) target gene. J Biol Chem. 2002; 277: 35013–35018.

104. Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. Nat Genet. 2005; 37: 187–192.

105. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. Cell. 2002; 110: 251–260.

106. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. Neuron. 2004; 43: 527–537.

107. Liu C, Li SM, Liu TH, Borjigin J, Lin JD. Transcriptional coactivator PGC-1a integrates the mammalian clock and energy metabolism. Nature. 2007; 447: 477–4U4.

108. Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. Genome Biol. 2000; 1: REVIEWS 3002.

109. Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. A family of mammalian F-box proteins. Curr Biol. 1999; 9: 1180–1182.

110. Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, Tucci V, Barnard AR, et al. The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. Science. 2007; 316: 897–900.

111. Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song W, Kumar V, et al. Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. Cell. 2007; 129: 1011–1023.

112. Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon. J Biol Chem. 2002; 277: 17248–17254.

113. Tsuchiya Y, Akashi M, Matsuda M, Goto K, Miyata Y, Node K, Nishida E. Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. Sci Signal. 2009; 2: ra26

114. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8: 139–148.

115. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. Science. 2000; 288: 483–492.

116. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. Hum Mol Genet 15 Spec. 2006; 2: R271–277.

117. Cardone L,Hirayama J,Giordano F,Tamaru T,Palvimo JJ,Sassone-Corsi P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. Science. 2005; 309: 1390–1394.

118. Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. Nature. 2003; 421: 177–182.

119. Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. Cell. 2006; 125: 497–508.

120. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. Nature. 2007; 450: 1086–1090.

121. Duez H, Staels B. Rev-erb-: an integrator of circadian rhythms and metabolism. J Appl Physiol. 2009; 107: 1972–1980, 2009.

122. Brobeck JR, Tepperman J, Long CN. Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. Yale J Biol Med. 1943; 15: 831–853

123. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a “feeding centre” in the hypothalamus of the rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1951; 77: 323–324

124. Stellar . The physiology of motivation. Psychol Rev. 1954; 61: 5–22

125. Cone RD et al. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. Int J Obes Relat Metab Disord. 2001; 25 (Suppl 5): S63–S67

126. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. Nutrition. 2000; 16: 894–902

127. Balthasar N et al. Leptin receptor signalling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. Neuron 2004; 42: 983–991

128. Hill JW et al. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. Cell Metab. 2010; 11: 286–297

129. Huo L et al. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. Cell Metab. 2009; 9: 537–547

130. Gamber KM et al. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. PLoS ONE. 2012; 7: e30485.

131. Berglund ED et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. J Clin Invest. 2012; 122: 1000–1009

132. Bruning JC et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 2000; 289: 2122–2125

133. Konner AC et al. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. Cell Metab. 2007; 5: 438–449

134. Williams KW et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. Neurosci J. 2010; 30: 2472–2479

135. Lin HV et al. Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. Diabetes. 2010; 59: 337–346

136. Obici S et al. Hypothalamic insulin signalling is required for inhibition of glucose production. Nat Med. 2002; 8: 1376–1382

11. Životopis

Ime i prezime: Marko Mešin

Datum i mjesto rođenja: 8. svibnja 1996, Vinkovci.

Adresa stanovanja: Mala Cerna 82, 32272 Cerna

Kontakt: 099 847 90 05

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija Županja

2003. – 2011. Osnovna škola Matije Antuna Reljkovića u Cerni