

Utjecaj modulacije interneurona na razvoj pretilosti

Milić, Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:344939>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za Biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Lea Milić

Utjecaj modulacije interneurona na razvoj pretilosti

Završni rad

Mentor: Dr. sc. Senka Blažetić, doc.

Osijek, 2019

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za Biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ MODULACIJE INTERNEURONA NA RAZVOJ PRETILOSTI

Lea Milić

Rad je izrađen na: Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju

Mentor: Dr. sc. Senka Blažetić, doc.

Kratak sažetak završnog rada:

Pretilost možemo definirati kao prekomjernu količinu masti u tijelu koja predstavlja globalni, socioekonomski i zdravstveni problem. Središnji živčani sustav, pretežno područje hipotalamusa, odgovorno za regulaciju homeostaze energije i hranjenja ima veliku odgovornost za patologiju pretilosti. Za regulaciju unosa hrane i homeostaze energije odgovorne su brojne anoreksigenične tvari poput leptina, inzulina i kolecistokinina koje koče hranjenje te oreksigenične tvari poput grelina i galanina koje potiču hranjenje. GABA, POMC, AGRP, neuropeptid Y predstavljaju interneurone koji imaju ključnu ulogu u razvoju pretilosti. Navedeni interneuroni moduliraju svoju električnu aktivnost kao odgovor na fluktuacije u razinama hormona, metabolita i živčanih signala. Današnja su istraživanja usmjerena na modulaciju navedenih interneurona koja ima ključnu ulogu u shvaćanju mehanizama razvoja pretilosti kao i jednu od mogućih terapija za njezino liječenje. Jedna od takvih metoda je duboka stimulacija mozga (DBS) koja predstavlja visoko djelotvornu terapiju za brojne neurološke poremećaje.

Broj stranica: 28

Broj slika: 7

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 42

Web izvor: 4

Jezik govornika: hrvatski

Ključne riječi: hipotalamus, jezgre hipotalamusa, neurotransmiteri, leptin, gastrointestinalni hormoni

Rad je pohranjen na: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

INTERACTION BETWEEN INTERNEURON MODULATION AND OBESITY

Lea Milić

Thesis performed at: the Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Department of Biology

Supervisor: Senka Blažetić, PhD, Assistant Prof.

Short abstract:

Obesity can be defined as an excessive amount of body fat that represents a global, socioeconomic and health problem in the world. The central nervous system, predominantly the hypothalamus area which is responsible for regulation of energy homeostasis and feeding, has a great responsibility for the pathology of obesity. Important substances in regulation of food intake and energy homeostasis are anorexigenic substances such as leptin, insulin and cholecystokinin that inhibit feeding and orexigenic substances such as ghrelin, neuropeptide Y and galanin that promote feeding. GABA, POMC, AGRP, neuropeptide Y represent interneurons that play a key role in developing obesity. These interneurons modulate their electrical activity in response to fluctuations in levels of hormones, metabolites and nerve signals. Today's research focuses on interneuronal modulation that plays a key role in understanding obesity mechanisms as well as one of the possible therapies for treating it. One of those methods is a deep brain stimulation (DBS) that represents a highly effective therapy for numerous neurological disorders.

Number of pages: 28

Number of figures: 7

Number of tables: 2

Number of references: 42

Web source: 4

Original in: Croatian

Key words: hypothalamus, hypothalamus nuclei, neurotransmitters, leptin, gastrointestinal hormones

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OSNOVNI DIO.....	2
2.1. Epidemija pretilosti.....	2
2.2. Centralna regulacija energetskeg metabolizma.....	3
2.2.1. Regulacija uzimanja hrane.....	4
2.2.2. Regulacije potrošnje energije.....	7
2.3. Hipotalamus – neuroendometabolički centar (anatomija, funkcija).....	8
2.4. Hipotalamički neuronski krugovi u kontroli energetske homeostaze.....	10
2.4.1. Osnovne jezgre hipotalamusa.....	10
2.4.2. Inzulinska i leptinska rezistencija.....	12
2.4.3. Uloga gastrointestinalnih hormona.....	13
2.5. Karakteristike interneurona uključenih u razvoj pretilosti.....	16
2.5.1. GABA.....	17
2.4.2. Neuropeptid Y.....	19
2.4.3. AGRP.....	21
2.5.4. POMC.....	22
3. ZAKLJUČAK.....	24
4. LITERATURA.....	25

POPIS KRATICA

α -MSH- hormon koji stimulira melanocyte

AGRP- bjelančevina srodna aguti- proteinu

ARC- arkuatna jezgra hipotalamusa

ATP- adenzin-trifosfat

BDNF- moždani neurotrofni faktor (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*)

BMI- indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Indeks*)

CART- prijepis reguliran amfetaminom i kokainom (engl. *Cocaine and Amphetamine Related Transcript*)

CCK- kolecistokinin

DBS- duboka stimulacija mozga (engl. *Deep Brain Stimulation*)

DMH- dorzomedijalna jezgra hipotalamusa

DYN- dinorfin

ENK- enkefalin

GABA- gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*)

GAD 65- glutamatna dekarboksilaza 65

GAD 67- glutamatna dekarboksilaza 67

GAL- galanin

GLP- peptid sličan glukagonu

GLP- peptid sličan glukagonu

LepR- leptinski receptor

LEPRB- leptin receptor duge izoforme (engl. *leptin receptor long isoform*)

LH- lateralna jezgra hipotalamusa

MCH- hormon koji koncentrira melanin

MCR3- melanokortinski receptor 3

MCR4- melanokortinski receptor 4

NPY- neuropeptid Y

NTS- jezgra solitarnog trakta

ORX- oreksin

POMC- proopiomelanokortin

PV- parvalbumin

PVN- paraventrikularna jezgra hipotalamusa

PYY- peptid YY

SF-1- steroidogeni faktor 1

SST- somatostatin

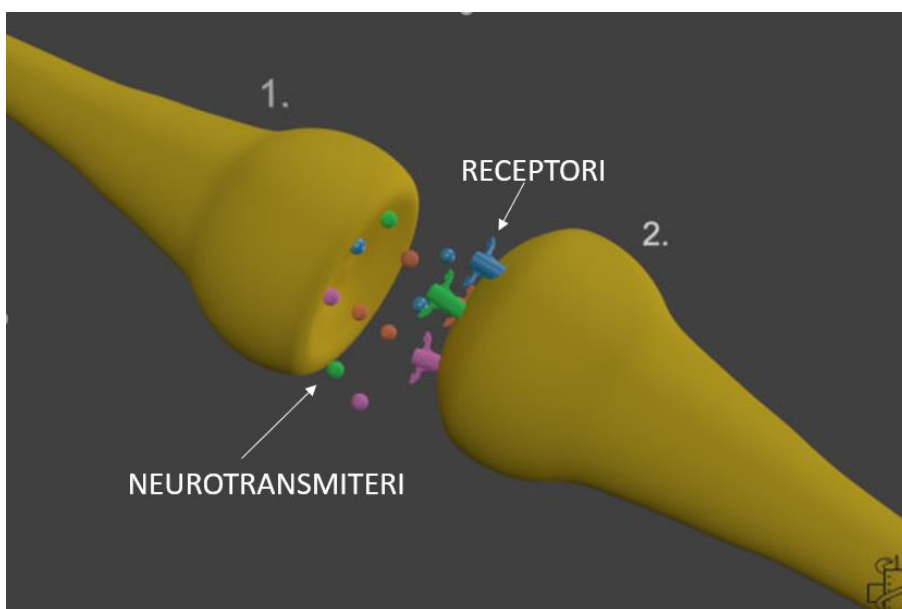
SŽS- središnji živčani sustav

VMH- ventromedijalna jezgra hipotalamusa

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

1. UVOD

Neuroni su stanice koje predstavljaju osnovnu funkcionalnu i gradivnu jedinicu živčanog sustava. Proizvode i provode elektrokemijske impulse, odgovaraju na kemijske i fizičke stimulacije te otpuštaju odgovarajuće kemijske regulatore. S obzirom na smjer provođenja impulsa neurone dijelimo na senzorne ili aferentne neurone (prenose informacije od senzornih receptora do središnjeg živčanog sustava, motorne ili eferentne neurone (odvode informacije iz središnjeg živčanog sustava do efektornih organa) te interneurone koji omogućuju komunikaciju između osjetilnih ili motoričkih neurona i središnjeg živčanog sustava (SŽS) (Fox, 1996). Neuron otpušta neurotransmitere, tvari koje se vežu na receptore sljedećeg neurona te uzrokuju njegovu inhibiciju ili eksitaciju (Guyton i Hall, 2011). Slika 1 prikazuje presinaptički neuron (1) i postsinaptički neuron (2) između kojih je sinapsa, područje na kojemu se signal prenosi s jednog neurona na drugi zahvaljujući neurotransmiterima. Iz presinaptičkog neurona oslobađaju se neurotransmiteri koji se vežu za receptore postsinaptičkog neurona te ovisno o svojoj vrsti, izazivaju inhibiciju ili eksitaciju postsinaptičkog neurona. Na taj način djeluju i neurotransmiteri koji sudjeluju u regulaciji apetita.



Slika 1. Prijenos signala između 2 neurona na području sinapse (Izvor: preuzeto i prilagođeno prema Web 1)

Brojna istraživanja mehanizama poremećaja apetita kao što su pretilost i anoreksija pokazala su da SŽS ima veliku odgovornost za patologiju navedenih bolesti. Duboka stimulacija mozga (engl. *deep brain stimulation*, DBS) predstavlja visoko djelotvornu terapiju za brojne neurološke poremećaje stoga je dio istraživanja lijeka za pretilost usmjerena upravo prema toj terapiji (Whiting i sur., 2018). Normalnu tjelesnu težinu zdravih osoba osigurava ravnoteža između unosa i potrošnje kalorija. Mozak regulira količinu energije osjetljivošću na razinu hranjivih tvari i metaboličkih hormona. Putem autonomnog živčanog sustava prima metaboličke informacije s periferije. Poremećaj mozga u regulaciji apetita dovodi do hiperfagije i pretilosti (Roh i Kim, 2016).

Iz navedenog vidljivo je da SŽS ima veliku ulogu u regulaciji homeostaze glukoze i energije. Unutar arkuatne jezgre hipotalamusa (ARC) nalazi se najveći broj neurona koji sudjeluju u metaboličkoj regulaciji hranjivih tvari u organizmu većinom preko perifernih hormona inzulina i leptina. Neuronima unutar ARC-a povezani su sa neuronima u ostalim dijelovima hipotalamusa, kao i sa neuronima ostalih regija mozga izvan hipotalamusa. Upravo to omogućuje njihov koordinirani rad i djelovanje. Poremećaj koordiniranog rada navedene neuronske mreže može dovesti do prekomjerne ishrane i pretilosti. Današnja su istraživanja uzroka pretilosti usmjerena proučavanju neuronskih mreža hipotalamusa koji reguliraju energetske metabolizam i hranjenje te brojnih čimbenika uključenih u regulaciju i disregulaciju homeostatskog hipotalamičkog sustava u kontekstu pretilosti kao što je upala hipotalamusa te leptinska i inzulinska rezistencija (Timper i Brüning, 2017).

2. OSNOVNI DIO

2.1. Epidemija pretilosti

Pretilost je veliki socioekonomski i zdravstveni problem, posebice u razvijenim zemljama. Broj pretilih ljudi kao i broj ljudi s prekomjernom tjelesnom težinom u posljednjih nekoliko godina uvelike se povećao što je rezultiralo globalnom epidemijom pretilosti. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), 2014. godine više od 1,9 milijardi odraslih osoba bilo je prekomjerno težine, od čega je više od 600 milijuna klasificirano kao klinički pretili osobe. 2013. godine 42 milijuna djece mlađe od 5 godina klasificirani su kao pretili ili sa prekomjernom težinom. Dugo se vremena smatralo da su jedini uzroci pretilosti nedostatak tjelesne aktivnosti i

prekomjerman unos kalorija, međutim novija istraživanja dovela su do rezultata da okolišni čimbenici i zajedničko djelovanje gena koji utječu na SŽS i njegovu regulaciju homeostaze glukoze i energije dovode do postupnog razvoja pretilosti (Timper i Brüning, 2017).

Pretilost se definira kao prekomjerna količina masti u tijelu ili kao indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) veći ili jednak 30 (Whiting, 2018; Guyton i Hall, 2011). Morbidna je pretilost povezana s prijevremenom smrću i lošom kvalitetom života. Definira se kao BMI \geq 40 ili veći od 35 s komorbiditetima (Whiting, 2018). Pretilost predstavlja veliki rizik obolijevanja od dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, astme te određenih vrsta raka (Laning i sur., 2019; Timper i Brüning, 2017). Pretilost u djetinjstvu također predstavlja veliki zdravstveni problem diljem svijeta. Počinje uglavnom u predškolskoj dobi te se kod velikog broja proteže kroz pubertet i odrasli život. Jednom uspostavljena pretilost kod čovjeka se teško regulira stoga je prevencija zasada najbolje rješenje (Laning i sur., 2019).

Motivacija prehranbenog ponašanja regulirana je neuronima u cerebralnom korteksu i limbičkim regijama dok je energetska ravnoteža uglavnom kontrolirana neuronskom mrežom u hipotalamusu i moždanom deblu. Mozak je osjetljiv na energetske promjene unutar organizma i aktivira različite metaboličke signale zadužene za regulaciju energetske ravnoteže. Poznavanje složenih puteva razvoja pretilosti na molekularnoj razini ključno je za njezino liječenje kao i za liječenje poremećaja metabolizma glukoze i lipida (Beck, 2000).

Tablica 1: Nutritivni status prema BMI vrijednosti (preuzeto i prilagođeno prema: Web 2)

BMI	Nutritivni status
<18.5	Poثرanjenost
18.5-24.9	Normalna težina
25.0-29.9	Pred-pretilo stanje
30.0-34.9	Pretilost, razred I
35.0-39.9	Pretilost, razred II
>40	Pretilost, razred III

2.2. Centralna regulacija energetskeg metabolizma

Energija potrebna čovjeku za obavljanje različitih funkcija dobiva se unošenjem masti, bjelančevina i ugljikohidrata. Stalna se tjelesna masa čovjeka održava samo ako su unos i potrošnja energije u ravnoteži. Unošenjem preobilne ishrane dolazi do poremećaja u

ravnoteži energije; unos energije postaje veći od potrošnje te se stvoreni višak energije pohranjuje u obliku masti što dovodi do povećanja tjelesne mase. Također, unos hrane treba biti uravnotežen kako bi se sve potrebne i povoljne reakcije metaboličkog sustava mogle nesmetano odvijati. U tijelu čovjeka postoje značajni fiziološki sustavi koji nadziru unos hrane, potrošnju energije i količinu pohranjene energije (Guyton i Hall, 2011).

Epidemija pretilosti kao i pojava raznih metaboličkih bolesti dovela je do potrebe za kontroliranom prehranom. Brojni metabolički signali iz masnog tkiva, probavnog sustava i drugih perifernih organa ciljaju mozak u svrhu regulacije ishrane i energetske potrošnje. Mozak prepoznaje promjene energije zahvaljujući neuronskim i hormonskim signalima te zatim aktivira različite puteve zadužene za održavanje energetske ravnoteže. Poznavanje ovih puteva neurobiološke osnove ključno je za razumijevanje uzroka i liječenja pretilosti. Regulirani unos hrane nužan je za normalnu funkciju metaboličkih puteva kao i pohranu viška energije u obliku masti. Znanje o ulozi mozga u kontroli energetske homeostaze i prehrane potječe iz opisa „adipozogenitalnog sindroma“ uočenog kod ljudi s tumorom hipofize. Bolesnici su bolovali od morbidne pretilosti što je dovelo do zaključka da je mozak ključan u regulaciju njihove težine. Daljnje istraživanje ovog sindroma provedeno je na štakorima. Oštećenje ventromedijalnog hipotalamusa rezultiralo je prevelikom unosom hrane dok je oštećenje lateralnog hipotalamusa rezultiralo izgladnjivanjem, odnosno sprječavanjem spontanog hranjenja. Ova istraživanja su dovela do zaključka da se hranjenje regulira u lateralnom dijelu hipotalamusa, a sitost u ventromedijalnom (Ahima i Atwi, 2009).

2.2.1. Regulacija uzimanja hrane

Kontrola hranjenja i energije regulira se prvenstveno u regiji mozga koju nazivamo hipotalamus (Roh i Kim, 2016). U procesu želje i samog uzimanja hrane javlja se nekoliko osjeta na koje utječu kulturološki i okolišni čimbenici, kao i fiziološki nadzor putem specifičnih centara u hipotalamusu. Osjet gladi predstavlja potrebu za uzimanjem hrane pri čemu se javljaju npr. ritmičke kontrakcije želuca i uznemirenost. Zadovoljavanjem želje i nagona za hranom, nastaje osjećaj sitosti. Regulaciju unosa hrane možemo podijeliti na kratkoročnu i dugoročnu. Kratkoročna se regulacija odnosi na sprječavanje unosa prekomjerne količine hrane što omogućuje ravnomjernu apsorpciju i prolaz hrane kroz probavni sustav. Dugoročna regulacija hranjenja omogućuje održavanje hranjivih tvari, odnosno energijskih zaliha tijela na stalnoj razini. Dijelovi hipotalamusa koji imaju važnu ulogu u regulaciji uzimanja hrane su: lateralne (LH), ventromedijalne (VMH), paraventricularne (PVN), dorzomedijalne (DMH) i arkuatne (ARC) jezgre hipotalamusa.

Svaka od navedenih jezgara ma određene specifične funkcije. LH predstavljaju centar za glad, a VMH centar za sitost. Daljnjim istraživanjima dokazano je da oštećenje primjerice DMH jezgara obično potiskuje želju za hranom, dok oštećenja PVN jezgara dovodi do proždrljivosti. Hormoni štitnjače, nadbubrežnih žlijezda, kao i Langerhansovi otočići u gušterači važni su za održavanje metabolizma i energetske ravnoteže. Hipotalamičke jezgre utječu na njihovo lučenje. Među hipotalamičkim neuronima prenose se brojni signali koji su bitni za regulaciju uzimanja hrane i stvaranje osjećaja sitosti. Razlikujemo kemijske signale koji potječu od glukoze, masnih kiselina i aminokiselina koji stvaraju osjećaj sitosti, živčane signale iz probavnog sustava koji pružaju informacije o napunjenosti želuca, signale moždane kore te signale što ih donose probavni hormoni i hormoni koje izlučuje masno tkivo. Tvari koje utječu na hranjenje i sam apetit dijele se na: oreksigenične tvari (potiču apetit) i anoreksigenične tvari (aktiviraju sitost) (Guyton i Hall, 2011)

ARC jezgra hipotalamusa smještena je u području s relativno poroznom krvno-moždanom barijerom što omogućuje slobodan pristup cirkulirajućim hranjivim tvarima i hormonima. U ARC jezgrama postoje dvije vrste različitih neurona prikazanih na slici 2, koji imaju ulogu u regulaciji uzimanja hrane: 1) neuroni koji proizvode oreksigenične tvari, neuropeptid Y (NPY) i bjelančevinu srodnu aguti-proteinu (AGRP); 2) proopiomelanokortinski (POMC) neuroni koji proizvode anoreksigenične tvari: hormon koji stimulira melanocyte (α -MSH) i prijepis reguliran amfetaminom i kokainom (engl. *Cocaine and Amphetamine Related Transcript*, CART). To su neuroni prvog reda koji primjerice reagiraju na PVN jezgre hipotalamusa. Aktivacijom NPY-AGRP neurona povećava se unos hrane, dok se aktivacijom POMC neurona inhibira hranjenje (Roh i Kim, 2016)

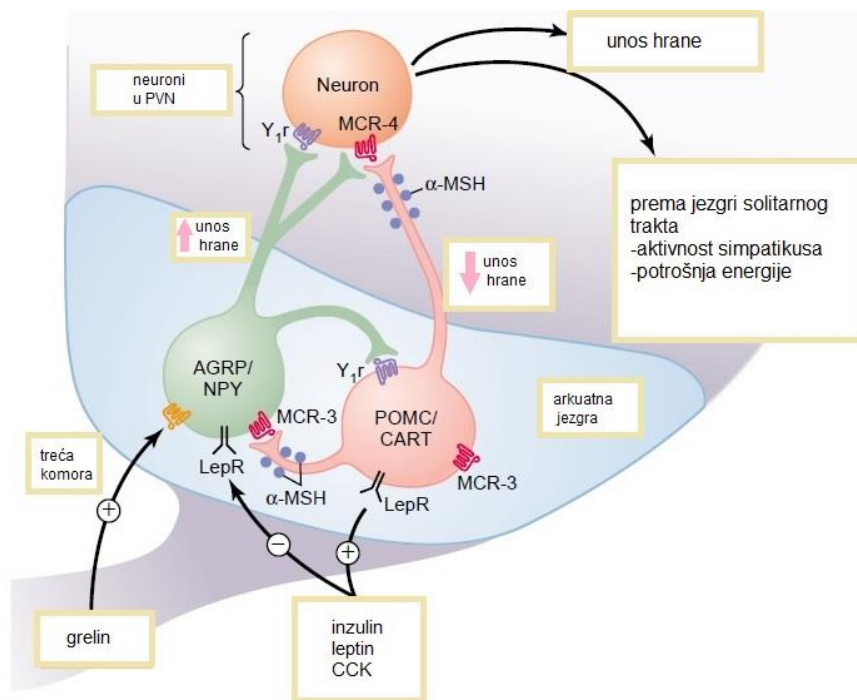
Neurokemijski sustavi koji potiču hranjenje osim prethodno navedenih NPY i AGRP su hormoni koji koncentriraju melanin (MCH), galanin (GAL), oreksin (ORX), enkefalin (ENK), dinorfin (DYN), endorfine, kortizol, grelin, endogene kanabinoide, aminokiseline (glutamat i gama-aminomaslačna kiselina). Za inhibiranje hrane osim POMC neurona koji proizvode α -MSH i CART, veliku ulogu imaju i kolecistokinin (CCK), serotonin, leptin, inzulin, noradrenalin, hormon koji oslobađa kortikotropin, peptid sličan glukagonu (GLP) i peptid YY (PYY) (Guyton i Hall, 2011; Leibowitz i Wortley, 2009).

Nakon što POMC neuroni proizvedu α -MSH hormon dolazi do njegovog djelovanja preko melanokortinskih receptora, nađenih primjerice na neuronima PVN jezgara (Guyton i Hall, 2011) α -MSH hormon veže se na melanokortinske receptore 3 i 4 (MCR3 i MCR4) na

neuronima drugog reda te njihovom aktivacijom dolazi do povećane potrošnje energije i smanjenog unosa hrane. Oni zatim aktiviraju neuronske puteve do jezgre solitarnog trakta (NTS) te povećavaju potrošnju energije i aktivnost simpatikusa. Inhibicija vezanja α -MSH hormona na melanokortinske receptore uzrokuje povećano uzimanje hrane što dovodi do hiperfagije i pretilosti (Roh i Kim, 2016). Mutacije gena za MCR4 najčešći su poznati monogenetski uzrok pretilosti kod ljudi te uzrokuju oko 5% slučajeva teških oblika rane pretilosti kod djece. Neka su istraživanja usmjerena na prekomjernu aktivaciju melanokortinskog sustava koja bi mogla biti jednim od uzroka anoreksije (Guyton i Hall, 2011). Oreksigenični neuroni hipotalamusa proizvode AGRP i NPY. AGRP djeluje kao prirodni antagonist MCR3 i MCR4, odnosno djeluje kao inhibitor vezanja α -MSH hormona na njih. Prekomjerno stvaranje AGRP-a dovodi do pretilosti. Centralna primjena NPY povećava apetit, odnosno unos hrane preko Y1 ili Y5 receptora, koji su visoko izraženi u PVN, ARC i VMH jezgrama hipotalamusa. Na aktivnost POMC i NPY/AGRP neurona u ARC jezgrama hipotalamusa utječe razina glukoze u krvi. NPY/AGRP neuroni aktiviraju se u stanju bez glukoze, dok povišena razina glukoze aktivira POMC neurone (Roh i Kim, 2016).

Zasićenost probavnog sustava hranom i njegovi hormonalni čimbenici inhibiraju uzimanje hrane. Istraživanjima je dokazano da samu mehaniku hranjenja kontroliraju centri u moždanom deblu. Primjerice, životinja kojoj se prereže mozak iznad mezencefalona, a ispod hipotalamusa, može i dalje obavljati neke radnje vezane za hranjenje: sliniti, žvakati i gutati hranu. Osim hipotalamusa, živčani centri koji također imaju ulogu u kontroli hranjenja su prefrontalni korteks i amigdala čiji su dijelovi ujedno dio olfaktornog živčanog sustava. Uništavanje amigdala pokazalo je da neka područja amigdala stimuliraju hranjenje, dok neka inhibiraju. Podraživanje nekih dijelova amigdala pobuđuje mehanički način uzimanja hrane. Rastezanjem dvanaesnika i želuca nastaju inhibicijski signali koji se prenose preko vagusnih živaca i deaktiviraju centar za hranjenje, odnosno inhibiraju unos hrane (Guyton i Hall, 2011).

ARC jezgra hipotalamusa ključna je za očitavanje signala inzulina i leptina koji signaliziraju stanje energijskih zaliha u tijelu. Inzulin i leptin inhibiraju NPY/AGRP neurone, dok aktiviraju POMC neurone. Hormon grelin aktivira AGRP/NPY neurone i potiče unos hrane (Roh i Kim, 2016). PYY, CCK i inzulin se luče nakon unosa hrane i svojim djelovanjem inhibiraju daljnje hranjenje (Guyton i Hall, 2011). Detaljno djelovanje ovih hormona opisano je u poglavljima 2.4.2. i 2.4.3.



Slika 2: Shematski prikaz regulacije unosa hrane na molekularnoj razini (Preuzeto i prilagođeno prema Guyton i Hall, 2011).

2.2.2. Regulacija potrošnje energije

Razgradnjom ugljikohidrata, masti i bjelančevina nastaje adenozin trifosfat (ATP) koji se upotrebljava kao izvor energije za brojne procese kao što su fizička aktivnost, bazalni metabolizam i termogeneza (Roh i Kim, 2016; Guyton i Hall, 2011). Kod zdrave osobe stalne tjelesne mase, unos i potrošnja energije su u ravnoteži. Procesi u kojima se energija troši uključuju: 1) odvijanje osnovnih metaboličkih procesa u organizmu; 2) probava, apsorpcija i prerada hranjivih tvari; 3) procesi tjelesnih aktivnosti i 4) održavanje tjelesne temperature. Poslije svakog obroka, intenzitet metabolizma, odnosno količina energija potrebne za opstanak povećava se zbog različitih kemijskih procesa povezanih s unosom, apsorpcijom i razgradnjom hranjivih tvari u tijelu. Ti procesi troše energiju i oslobađaju toplinu što je poznato kao *termogeni učinak hrane*. Neki od primarnih mehanizama za održavanje tjelesne temperature su drhtanje i *termogeneza bez drhtanja*. Drhtanje predstavlja proces regulacije stvaranja topline povećanjem mišićne aktivnosti pri hladnoći. Drugi mehanizam, *termogeneza bez drhtanja* također regulira, odnosno potiče stvaranje topline pri

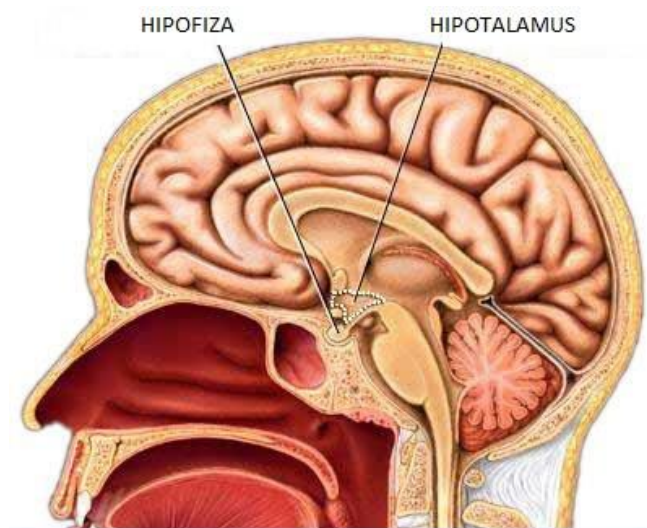
hladnoći. No taj oblik termogeneze potaknut je aktivacijom simpatičkog živčanog sustava koji otpušta hormone adrenalin i noradrenalin koji potiču oslobađanje topline (Guyton i Hall, 2011).

Termogeneza se odnosi na toplinu koja se proizvodi u svrhu pohrane viška energije nakon unosa hrane i održavanja stalne tjelesne temperature, drugim riječima predstavlja ključnu komponentu potrošnje energije (Roh i Kim, 2016). Smeđe masno tkivo ima veliku ulogu u termogenezi, točnije djelovanjem simpatičkog živčanog sustava oslobađa velike količine topline (Roh i Kim, 2016; Guyton i Hall, 2011). Ta vrsta tkiva sadrži mnogo malih kapljica masti te veliki broj mitohondrija koji nakon podraživanja simpatičkim živcima stvaraju velike količine topline, ali gotovo nimalo ATP-a, pa se sva oslobođena oksidacijska energija pretvara u toplinu. Norepinefrin veže se na β 3-adrenergične receptore na adipocitima smeđeg masnog tkiva i ingvinalnim masnim podlogama. Aktivirani adrenergični receptori potiču signalizaciju cikličkog adenozin monofosfata, koji aktivira mitohondrijsko razdvajanje određenih proteina čime se povećava termogeneza. Glukoza, leptin, inzulin i peptid sličan glukagonu (GLP) mogu utjecati na simpatičku aktivnost na smeđe masno tkivo. Smatra se da su MCR3 i MCR4 jedni od glavnih stimulativnih regulatora u termogenezi smeđeg masnog tkiva. ARC jezgra hipotalamusa smatra se glavnim mjestom djelovanja leptina na lokomotornu aktivnost. Aktivacija leptinskih receptora povećava potrošnju energije, a smanjuje unos hrane dok primjerice AGRP/ NPY sustav, kao i oreksin smanjuju potrošnju energije, a povećavaju unos hrane (Roh i Kim, 2016). Simpatička je aktivnost kod pretilih osoba povećana. Istraživanja pokazuju da bi glavni uzrok takve povećane aktivnosti simpatičkog živčanog sustava mogao biti povećana koncentracija leptina, koji aktivira POMC neurone u hipotalamusu čime se nastoji povećati potrošnja energije (Guyton i Hall, 2011).

2.3. Hipotalamus – neuroendometabolički centar

Hipotalamus predstavlja glavni dio limbičkog sustava koji ima ulogu u regulaciji emocionalnog ponašanja i motivacijskih nagona. Područja limbičkog sustava sudjeluju u nadzoru brojnih stanja unutar tijela, kao što su tjelesna temperatura, nagoni hranjenja ili pijenja te kontrola tjelesne mase. Te funkcije zajednički se nazivaju vegetativne funkcije mozga. Hipotalamus je, unatoč tome što čini manje od 1% moždane mase, brojnim komunikacijskim putevima povezan sa svim područjima limbičkog sustava i predstavlja

njegovu najvažniju strukturu. Hipotalamus šalje izlazne signale u tri smjera: 1) prema gore u viša područja diencefalona i velikog mozga, posebno u prednji dio talamusa i u limbička područja moždane kore; 2) prema natrag i dolje u moždano deblo, uglavnom u retikularna područja mezencefalona, ponsa i produljene moždine, a iz tih područja u periferne živce autonomnog živčanog sustava i 3) u hipotalamični držak (infundibulum) za nadzor nad većinom sekrecijskih uloga prednjeg i stražnjeg režnja hipofize. Različita područja hipotalamusa reguliraju vegetativne i endokrine funkcije. Neke od uloga hipotalamusa su regulacija endokrinog lučenja hormona prednjeg režnja hipofize, nadzor kardiovaskularnog sustava, tjelesne temperature, količine vode u tijelu, kontraktilnosti maternice i istiskivanje mlijeka iz dojki, te regulacija probavnog sustava i hranjenja (Guyton i Hall, 2011).



Slika 3. Položaj hipotalamusa i hipofize u mozgu (preuzeto i prilagođeno prema: Web 3)

Različiti dijelovi hipotalamusa imaju obujam manji od 4 cm^3 i teže približno 4 grama u odnosu na 1200 do 1400 grama mozga odraslog čovjeka. Smješten je u podnožju treće komore međumozga (diencefalona) te ga grade četiri glavne strukture: infundibulum, optička hijazma, tuber cinereum i mamilarna tijela. Desni i lijevi dio hipotalamusa spojeni su na dnu komore, a uz njega hipotalamičnom drškom pričvršćena je hipofiza - glavna endokrina žlijezda, što upravlja radom svih ostalih endokrinih žlijezda (Slika 3). Dva posebno značajna sustava hipotalamusa su: 1) nakupine stanica (jezgre) koje imaju brojne anatomske i funkcionalne značajke i 2) devet zona određenih njihovim anterioposteriornim i mediolateralnim položajem. Vrlo bitna anatomska značajka hipotalamusa je opskrba krvlju.

Hipotalamus komunicira s prednjom hipofizom kroz posebnu portalnu cirkulaciju koja dvosmjerno prenosi informacije što povećava sposobnost hipotalamusa da primi oba signala iz cirkulacije, kao i povratne informacije iz hipofize. Hipotalamus sintetizira i izlučuje neurotransmitere, kemijske glasnike koji se koriste za sinaptički prijenos i signalizaciju, što mu omogućava sudjelovanje u brojnim neuronskim putevima. Ima ključnu ulogu u nadzoru metaboličkog stanja organizma reguliranjem unosa hrane i potrošnje energije. U ovim procesima veliku ulogu imaju jezgre hipotalamusa opisane u poglavlju 2.4.1. na koje djeluju periferni hormoni. Današnja istraživanja usmjerena su upravo na te hormone koji su ključni u prenošenju informacija tijekom hipotalamičke regulacije metabolizma (Grimberg i Katz Kutikov, 2017).

2.4. Hipotalamički neuronski krugovi u kontroli energetske homeostaze

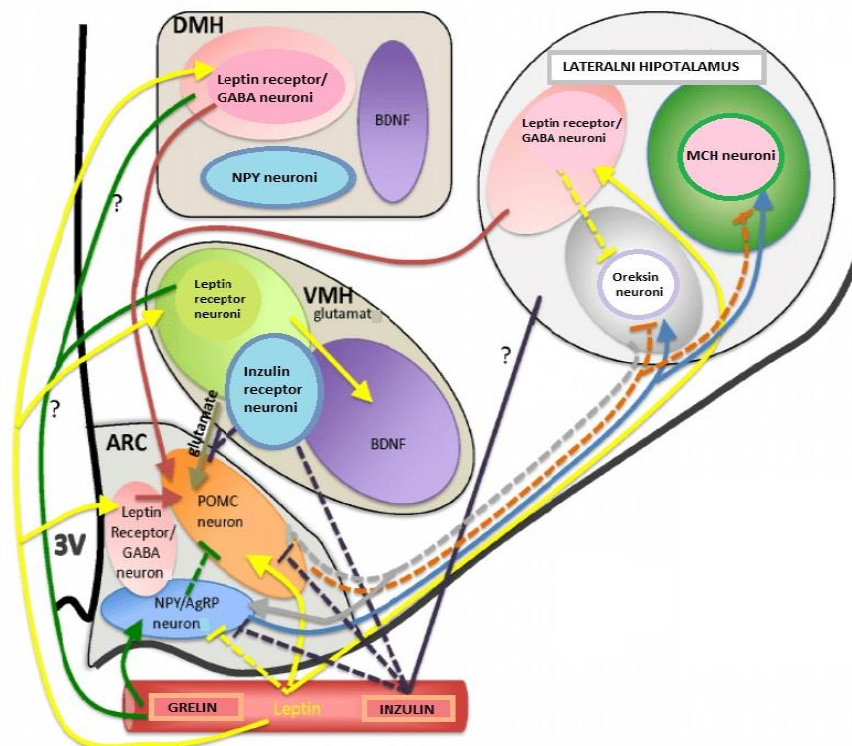
2.4.1. Osnovne jezgre hipotalamusa

Kao što je navedeno u poglavlju 2.2.1 osnovne jezgre hipotalamusa koje imaju ulogu u regulaciji unosa hrane i potrošnje energije su: ARC, LH, VMH, PVN i DMH jezgre. Podraživanje ili oštećenje jezgara hipotalamusa ima snažno djelovanje na ponašanja životinja i ljudi. LH jezgre predstavljaju centar za hranjenje dok VMH jezgre djeluju kao centar za sitost. Istraživanja su pokazala da uništavanje lateralnih jezgara dovodi do smanjenja apetita, tjelesne mase i metabolizma što upućuje na to da podražavanje lateralnih jezgara potiče motoričke aktivnosti u svrhu traženja hrane. Uništavanje VMH jezgara dovodi do prevelikog unosa hrane, proždrljivosti i pretilosti kao konačne posljedice, što upućuje na to da u normalnim uvjetima centar za sitost u VMH jezgrama hipotalamusa inhibira želju za hranom. Također je dokazano da oštećenja DMH jezgara obično inhibiraju želju za hranom dok oštećenja PVN jezgara potiču unos hrane (Guyton i Hall, 2011).

Jezgre hipotalamusa primaju metaboličke signale i iz područja izvan samog hipotalamusa kao što je NTS za regulaciju unosa hrane i potrošnje energije (Timper i Brüning, 2017). ARC jezgre hipotalamusa ključne su za regulaciju metabolizma i hranjenja (Myers i Olesen, 2012). Dokazno je da su centri za nagradu smješteni u VMH i LH jezgri hipotalamusa. LH jezgra hipotalamusa smatra se jednim od najsnažnijih područja za nagradu, dok jači podražaj te jezgre može izazvati bijes (Guyton i Hall, 2011).

ARC jezgra predstavlja agregaciju neurona koja je smještena u blizini medijalne eminencije, kružnog organa bogatog kapilarama koje uzrokuje propusnost krvno moždane

barijere. (Timper i Brüning, 2017). Taj organ olakšava prijenos hranjivih tvari i perifernih hormona do neurona ARC jezgre hipotalamusa (Rodríguez i sur., 2010). Na taj način neuroni ARC jezgre primaju brojne metaboličke signale što ARC jezgru čini primarnim područjem hipotalamusa u regulaciji unosa hrane i potrošnje energije. POMC neuroni prenose metaboličke signale do neurona drugog reda u PVN, DMH, LH i VMH jezgri hipotalamusa (Waterson i Horvath, 2015; Kleinridders i sur., 2009). Neuroni drugog reda obrađuju primljene metaboličke informacije i prenose ih izvan hipotalamusa, što dovodi do koordiniranog odgovora na ukupni unos hrane i potrošnju energije (Roh i Kim, 2016).



Slika 4. Shematski prikaz najvažnijih jezgri hipotalamusa i njihovih neurona u regulaciji hranjenja (Preuzeto i prilagođeno prema Web 4)

ARC, VMH, LH, DMH i PVN predstavljaju glavne jezgre hipotalamusa koje svojim koordiniranim radom reguliraju hranjenje. ARC je ključna jezgra koja sadrži AGRP i POMC neurone koji reagiraju na hormonske signale i šalju brojne informacije unutar i izvan hipotalamusa. AGRP neuroni komuniciraju i s neuronima ORX i MCH u lateralnom hipotalamusu. U VMH i DMH nalaze se receptori hormona grelina koji povećava unos hrane. POMC neuroni aktiviraju se leptinom i inhibiraju unos hrane. GABAerģični neuroni koji reagiraju na leptin nalaze se u DMH, ARC i LH imaju važniju ulogu u sprečavanju razvoja pretilosti u odnosu na leptinske receptore na POMC neuronima. POMC neuroni

dobivaju jak pogon glutamata iz VMH koji im povećava aktivnost čime se potiskuje apetit stoga lezije VMH dovode do pretilosti. Leptin aktivira neurone VMH-a povećavanjem djelovanja glutamata na POMC neurone ili povećavanjem BDNF signalizacije u VMH.

2.4.2. Inzulinska i leptinska rezistencija

POMC i AGRP/NPY neuroni sadrže receptore za leptin i inzulin, hormone koji imaju veliku ulogu u regulaciji homeostaze glukoze i energije (Timper i Brüning, 2017). Kao što je navedeno u poglavlju 2.2.1 inzulin i leptin inhibiraju hranjenje i povećavaju potrošnju energije. Inzulin je hormon kojeg proizvode β stanice gušterače dok se leptin oslobađa iz adipocita. Iako su uloge leptina i inzulina povezane na razini hipotalamusa leptin i inzulin djeluju na različite subpopulacije POMC neurona (Williams i sur., 2010) zbog čega su brojna istraživanja uvelike usmjerena na njihovu karakterizaciju koja je potrebna za detaljno razumjevanje njihove funkcije (Vogt i Brüning, 2013; Belgardt i Brüning, 2010).

Tzv. glukostatska teorija gladi i regulacije hrane temelji se na činjenici da smanjenje koncentracije glukoze u krvi izaziva glad. Različitim neurofiziološkim istraživanjima utvrđeno je da povećanje koncentracije glukoze u krvi povećava učestalost slanja signala glukoreceptorskih neurona u centru za sitost u PVN i VMH jezgrama hipotalamusa te istodobno smanjuje slanje signala glukosenzitivnih neurona u centru za glad u LH jezgrama hipotalamusa. Smanjenom potrošnjom energije dolazi do povećanja količine masnog tkiva nakon čega adipociti oslobađaju veću količinu leptina u krvotok. Leptin zatim olakšanom difuzijom prolazi kroz krvno-moždanu barijeru i veže se na POMC neurone u ARC jezgrama i na neurone PVN jezgara hipotalamusa. Podraživanjem leptinskih receptora dolazi do smanjene proizvodnje AGRP/NPY odnosno tvari koje potiču apetit, zatim aktivacije POMC neurona što dovodi do proizvodnje α -MSH-a i aktivacije melanokortinskih receptora. Povećava se i proizvodnja hipotalamičnih tvari koje zaustavljaju hranjenje te se povećava aktivnost simpatičkog živčanog sustava čime se povećava potrošnja energije (Guyton i Hall, 2011).

Inzulin osim što ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze glukoze i energije na razini hipotalamusa, bitan je i u perifernoj regulaciji homeostaze glukoze i energije. Periferni metabolizam glukoze reguliran je zaustavljanjem proizvodnje glukoze u jetri izravnim djelovanjem na njegove receptore. Osim ARC jezgre, VMH jezgra hipotalamusa također predstavlja bitno mjesto za djelovanje inzulina i leptina. Miševi s delecijom inzulinskih receptora u ventromedijalnim specifičnim steroidogenim faktorima-1 (SF-1) nisu pogođeni

poremećajem metabolizma glukoze i pretilošću te pokazuju povećanu aktivnost POMC neuronima pri visokoj masnoći u ishrani (Klöckener i sur., 2011). Pojačana signalizacija leptinskih receptora u SF-1 neuronima VMH jezgara dovodi do poboljšanja homeostaze glukoze, dok nema značajne promjene u tjelesnoj težini. (Zhang i sur. 2008)

Istraživanjima je dokazano da poremećaj funkcije leptinskih receptora hipotalamusa ili mutacija adipocita koje stvaraju leptin dovodi do izrazite hiperfagije i pretilosti. Međutim, čini se da kod većine pretilih ljudi, proizvodnja leptina nije smanjena, jer se pojavom pretilosti, plazmatske koncentracije leptina povećavaju. Mogući razlog ove pojave mogla bi biti povezanost pretilosti sa neosjetljivošću na leptin ili postojanje brojnih čimbenika koji mogu biti uzrokom pretjeranog unosa hrane čak i pri visokim koncentracijama leptina. (Guyton i Hall, 2011)

2.4.3. Uloga gastrointestinalnih hormona

Gastrointestinalni hormoni važni su regulatori homeostaze energije i hranjenja u tijelu. Izlučuju se iz gastrointestinalnog trakta kao odgovor na unesene hranjive tvari. Njihovo djelovanje može biti lokalno i centralno. Centralno se djelovanje odnosi na djelovanje na centre za regulaciju apetita u mozgu kao što je ARC jezgra hipotalamusa, dok se lokalno djelovanje odnosi na regulaciju probave i specifične organe (Timper i Brüning, 2017). Gastrointestinalni trakt oslobađa više od 20 peptidnih hormona koji djeluju na različite fiziološke procese. Jedni od najvažnijih hormona u regulaciji hranjenja su peptid YY (PYY), peptid sličan glukagonu (GLP 1), oreksin (OXM), kolekistokinin (CCK) koji djeluju na anoreksigene neurone ARC jezgre hipotalamusa te na taj način koče hranjenje, odnosno smanjuju apetit. Jedini gastrointestinalni hormon koji ima ulogu povećanja apetita djelovanjem na oreksigene neurone ARC jezgre hipotalamusa je grelin (Bewick, 2012).

Tablica 2. Najvažniji gastrointestinalni hormoni u regulaciji hranjenja (Preuzeto i prilagođeno prema Chaoudhri i sur., 2006)

HORMON	STANICA KOJA IZLUČUJE	RECEPTOR	AKTIVNOST
GLP-1	GI L-stanice	GLP-1R	Glukoza ovisno otpuštanje inzulina Usporava pražnjenje želuca Djeluje na CNS Smanjuje unos hrane
PYY	GI L-stanice	Y2	Usporava pražnjenje želuca Djeluje na <i>vagus</i> i SŽS Smanjuje unos hrane
OXM	GI L- stanice	GLP-1R	Glukoza ovisno otpuštanje inzulina Usporava pražnjenje želuca Smanjuje unos hrane
GRELIN	A-stanice fundusa želuca	GHS-R	Povećava aktivnost želuca Povećava unos hrane

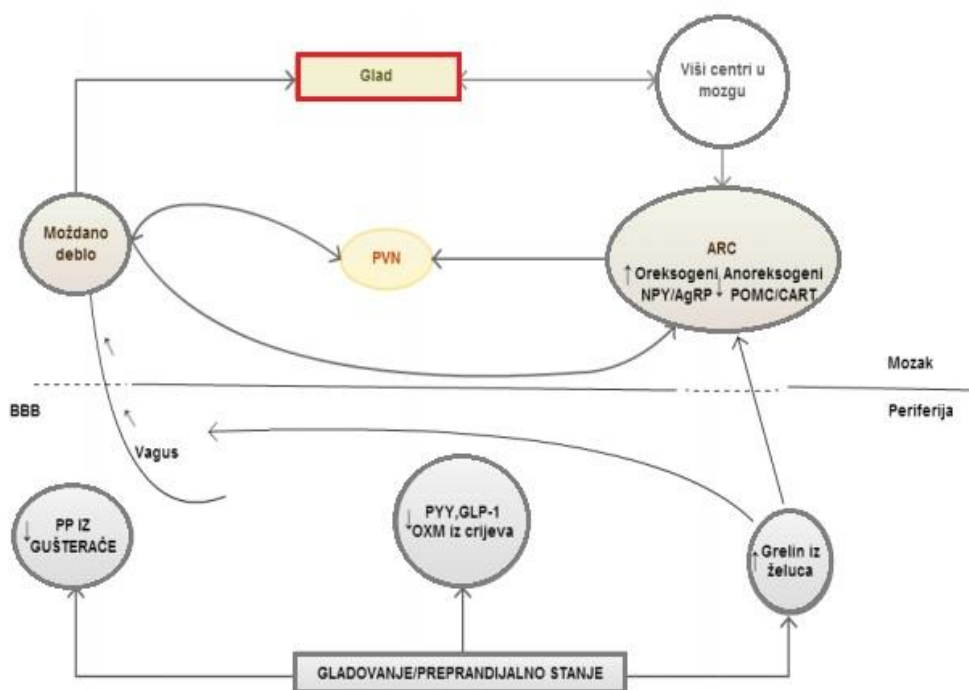
Hormon grelin proizvode uglavnom kiselinske stanice želuca, ali se i u manjoj količini proizvodi i u crijevu. Koncentracija grelina u krvi povisuje se tijekom gladovanja, najveća je koncentracija prisutna neposredno prije uzimanja hrane, dok se nakon jela naglo smanjuje što upućuje na njegovo oreksigenično djelovanje (Guyton i Hall, 2011). Grelina nakon otpuštanja, krvotokom dolazi do ARC jezgre hipotalamusa te aktivira AGRP/NPY neurone koji djeluju stimulirajuće na unos hrane. Intravenskim davanjem grelina unos količine u obroku povećava se za 30% što ukazuje na njegovu ulogu u razvitku pretilosti (Atalayer i sur. 2013). Dosadašnjim istraživanjima razvijen je antagonist grelina NOX-B11, koji suprimira grelinom što je inducirano lučenjem hormona rasta te dovodi do pada tjelesne mase životinjskih modela. Trenutno je u fazi istraživanja na ljudima (Davenport i Wright, 2013).

Ostali hormoni, peptid sličan glukagonu 1 (GLP-1), peptidaYY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) i CCK, oslobađaju se iz crijeva nakon unosa hranjivih tvari i vrše anoreksigenično djelovanje u različitim regijama mozga kao što su glavne jezgre hipotalamusa i moduliranjem perifernih komponenti crijevno-moždane osi (Sobrin Crespo i sur., 2014).

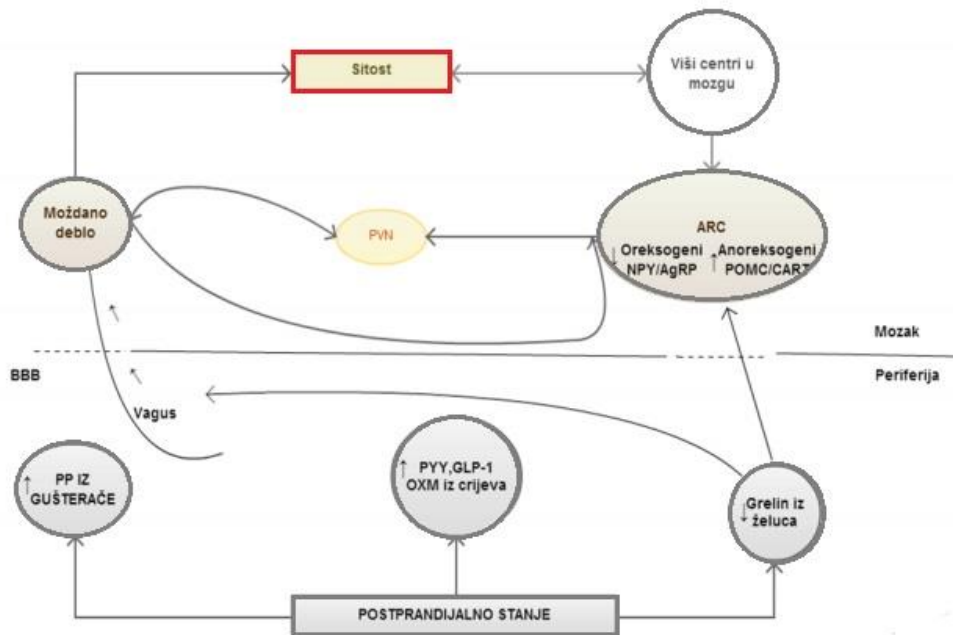
PYY proizvodi se uglavnom u ileumu i debelom crijevu, ali u manjoj mjeri i u drugim dijelovima probavnog sustava. Istraživanjima je dokazano da ubrizgavanje PYY miševima dovodi do smanjenog unosa hrane tijekom sljedećih 12 sati ili dulje što upućuje na njegovu

ulogu inhibicije unosa hrane. Unos hrane u organizam potiče lučenje PYY, a njegova najveća koncentracija u krvi postiže se 1 do 2 sata nakon unosa. CCK centralnim djelovanjem utječe na funkcije probavnog sustava, kao što su pražnjenje želuca, crijevna peristaltika i lučenje želučane kiseline. Lokalnim djelovanjem potiče receptore na duodenalnim osjetnim živcima i putem vagusa šalje signale u mozak. Dijelovi mozga prepoznaju signale koje ukazuju na osjećaj sitosti i prestanak unosa hrane. Njegovo djelovanje je kratkotrajno stoga uglavnom ne utječe na tjelesnu težinu no ima bitnu ulogu u sprječavanju prejedanja tijekom obroka (Guyton i Hall, 2011).

GLP-1 luči se u crijevima i poticanjem lučenja inzulina iz gušterače inhibira unos hrane. Oba hormona, inzulin i GLP-1 povećavaju potrošnju energije i zaustavljanje hranjenja (Guyton i Hall, 2011). GLP-1 također djeluje kao neurotransmiter u mozgu koji se proizvodi u različitim neuronskim populacijama u mozgu te osim što utječe na unos hrane, tjelesnu težinu i homeostazu glukoze, ima veliku ulogu u kontroli ponašanja nagrađivanja hrane (Timper i Brüning, 2017; Skibicka, 2013). Potrebna su još brojna istraživanja za otkrivanje točnog molekularnog mehanizma djelovanja GLP-1 receptora (Timper i Brüning, 2017). Zbog korisnih učinaka na održavanje tjelesne težine, agonisti GLP-1 receptora nedavno su odobreni za liječenje pretilosti ili prekomjerne težine. (Burcelin i Gourdy, 2017). U stanju gladovanja hormon grelin se luči iz želuca te preko vagusa i ARC potiče hranjenje (Slika 5), dok se nakon obroka luče hormoni PYY, GLP-1, OXM i PP iz crijeva te preko ARC, vagusa i moždanog debla kočie hranjenje (Slika 6).



Slika 5. Signalizacija gastrointestinalnim hormonima do centara u mozgu u stanju gladovanja (Preuzeto i prilagođeno prema Suzuki K. i sur., 2012).



Slika 6. Signalizacija gastrointestinalnim hormonima do centara u mozgu nakon obroka (Preuzeto i prilagođeno prema Suzuki K. i sur., 2012).

2.5. Karakteristike interneurona uključenih u razvoj pretilosti

Živčani je sustav građen od brojnih neuronskih krugova koji imaju važnu ulogu u kontroli različitih tjelesnih aktivnosti. Glavne skupine neurona čine eferentni i aferentni neuroni i interneuroni koji imaju ulogu u razvoju pretilosti. Informacije u SŽS-u prenose se putem neurona uglavnom u obliku živčanih impulsa, odnosno živčanih akcijskih potencijala. Sinapsa je mjesto povezivanja jednog neurona sa drugim. U njima neuron na svojim završecima luči kemijsku tvar nazvanu neurotransmiter ili jednostavno prijenosna tvar, koja djeluje na receptorsku bjelančevinu u membrani sljedećeg neurona te ga koči ili pobuđuje, ovisno o tipu neurotransmitera. Neki od niskomolekularnih prijenosnika brzog djelovanja su acetilkolin, amini kao npr. dopamin te aminokiseline od kojih najvažnije inhibicijsko djelovanje ima gama-aminomaslačne kiseline (engl. *Gamma-AminoButyric Acid*, GABA). Drugu skupinu prijenosnika čini veliki broj neuropeptida, čije su molekule veće i uglavnom djeluju sporije. Klinička istraživanja bolesnika s različitim oštećenjima živčanog sustava upućuju na to da su mnoga od tih stanja posljedica smanjene funkcije neurona koji proizvode specifične neurotransmitere zadužene za prenošenje signala između

neurona te neurona i drugih stanica. Za normalno funkcioniranje živčanog sustava bitan je koordinirani rad interneurona i drugih neurona (Guyton i Hall, 2011).

Prema definiciji, interneuron je specijalizirani tip neurona čija je primarna uloga formiranje veze između drugih tipova neurona. Velika većina interneurona SŽS-a ima inhibicijsku ulogu te za razliku od ekscitatornih neurona, inhibitorni kortikalni interneuroni oslobađaju neurotransmitere: GABA i glicin (Kelsom i Lu, 2013). Kortikalni interneuroni su tako nazvani zbog svoje lokalizacije u moždanoj kori, koja je definirana kao sloj neurona koji pokriva površinu svih moždanih vijuga (Kelsom i Lu, 2013; Guyton i Hall, 2011). U moždanoj kori razlikujemo zrnaste, piramidne i vretenaste neurone. Zrnaste neurone uglavnom karakteriziraju kratki aksoni stoga oni djeluju kao interneuroni koji prenose živčane signale na kratke udaljenosti moždane kore za razliku od projekcijskih neurona koji prenose signale na veće udaljenosti kao što je npr. leđna moždina (Guyton i Hall, 2011).

U svrhu lakšeg shvaćanja uloge pojedinih interneurona, uspostavljena je njihova podjela prema funkciji, anatomskim obilježjima, kemijskim i električnim karakteristikama, odnosno prema genskoj ekspresiji (DeFelipe i sur., 2013). Istraživanja na pokusnim životinjama pokazuju da prilikom davanja male količine hrane pretilim životinjama nastaju velike promjene u lučenju hipotalamičnih neurotransmitera, što snažno pojačava glad i suprosvavlja se gubitku tjelesne mase (Guyton i Hall, 2011). Glavni interneuroni uključeni u razvoj pretilosti su GABA, POMC, AGRP i NPY interneuroni.

2.5.1. GABA

GABA predstavlja glavni neurotransmiter preko kojega djeluju inhibicijski neuroni lokalnih krugova, odnosno interneuroni (Kay i sur., 2012). Luče ju živčani završetci u malome mozgu, leđnoj moždini, bazalnim ganglijima te u mnogim kortikalnim područjima. Uz glicin, smatra se glavnim inhibitornim prijenosnikom (Guyton i Hall, 2011). Sintetizira se iz glutamata pomoću enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline, čija aktivnost limitira brzinu njezine sinteze. Razgradnja se odvija u živcima i u stanicama glije, pri čemu prelazi u semialdehid jantarne kiseline. GABA se osim u interneuronima pojavljuje i u Purkinjeovim stanicama malog mozga gdje ima ulogu neurotransmitera projekcijskih neurona (Barac i sur., 1992).

Presinaptičku inhibiciju, odnosno inhibiciju koja se zbiva na presinaptičkim završetcima uzrokuje oslobađanje kemijske tvari inhibicijskog djelovanja na vanjsku stranu presinaptičkih živčanih vlakana, prije nego što ta vlakna dopijuju do postsinaptičkog neurona.

Kemijska tvar inhibicijskog djelovanja, drugim riječima, neurotransmiter, u većini slučajeva je GABA. Njezinim djelovanjem dolazi do otvaranja anionskih kanala pri čemu dolazi do difundiranja velikog broja kloridnih iona u završno vlakn čiji negativni naboji inhibiraju sinaptički prijenos poništavanjem velikog dijela eksitacijskog djelovanja natrijevih iona pozitivnog naboja (Guyton i Hall, 2011).

Unutar velike skupine GABA-ergičnih interneurona postoje i brojni drugi podtipovi interneurona koji su kategorizirani uglavnom prema tvarima koje eksprimiraju. Tri glavna kortikalna interneuronska podtipa su: parvalbuminski (PV), somatostatinski (SST) i 5HT3a (5HT3aR) eksprimirajući interneuroni. Jedan od najtežih zadataka današnjice, predstavlja razumijevanje mehanizma kojim je svaki interneuronski podtip specificiran, kao i otkrivanje gena i transkripcijskih faktora koji mogu biti uključeni. S obzirom da postoje brojni podtipovi različitih GABA-ergičnih interneurona, logično je da imaju i različite uloge u živčanom sustavu odrasle osobe. No, svima je zajednička njihova inhibicijska uloga i sinaptičko otpuštanje neurotransmitera GABA u svrhu pokretanja neuronskog signalnog puta. Procjenjuje se da postoji više od 20 različitih podtipova GABA-ergičnih interneurona dok su PV i neuropeptid SST dva ključna markera u kategorizaciji najdominantnijih interneuronskih podtipova moždanog korteksa. Skupina interneurona koja eksprimira SST neovisni se od interneurona koji eksprimiraju PV (Kelsom i Lu, 2013). Oni čine oko 70% populacije GABA-ergičnih interneurona korteksa, dok interneuroni koji eksprimiraju 5HT3aR čine oko 30% populacije (Lee i sur., 2010).

Lateralni hipotalamus također sadrži veliki dio GABA-ergičnih interneurona (Carus-Cadavieco, 2018). GABA, kao i glutamat su aminokiseline koje imaju oreksigenično djelovanje, odnosno potiču hranjenje (Guyton i Hall, 2011). Neurotransmiter GABA važan je u regulaciji unosa hrane u LH jezgri hipotalamusa. Istraživanja su pokazala da injekcije GABA agonista u LH inhibiraju unos hrane, dok injekcije GABA antagonista u LH stimuliraju unos hrane (Kelly i sur., 1979 navedeno u Carus-Cadavieco, 2018). Podtipove interneurona lateralnog hipotalamusa karakterizira lučenje neurotransmitera glutamata. Ti neuroni primaju inhibitorne aksonalne projekcije od GABA-ergičnih interneuron, što dovodi do stimulacije unosa hrane (Carus-Cadavieco, 2018).

GABA-ergični interneuroni eksprimiraju glutamatne dekarboksilaze: GAD65 i GAD67, za pretvaranje ekscitatorne aminokiseline glutamat u GABA (Buddhala i sur., 2009). Neposredni prekursor glutamata je glutamin koji se može koristiti kao alternativni izvor

GABA. Nakon oslobađanja GABA dolazi do aktivacije dvije vrste membranskih receptora: ionotropnih (GABAA) ili metabotropnih (GABAB) receptora (Delgado, 2013). Procjenjuje se da se više od 90% svih GABA u SŽS sisavaca razgrađuje transaminacijom GABA i α -ketoglutarata u sukcinilni semialdehid i glutamat u mitohondrijima astrocita i neurona (Roth i Draguhn, 2012). Neuronima u ARC jezgri hipotalamusa eksprimiraju GABA transporter, VGAT te GABA sintetizirajuće enzime, GAD65 i GAD67. Navedene tvari su dokazane u većini AGRP/NPY neurona ARC jezgre hipotalamusa koje imaju stimulacijsku ulogu pri hranjenju. Prisutnost GAD65 i GAD67 dokazana je u otprilike jednoj trećini POMC neurona koji imaju inhibicijsko djelovanje pri hranjenju (Delgado, 2013).

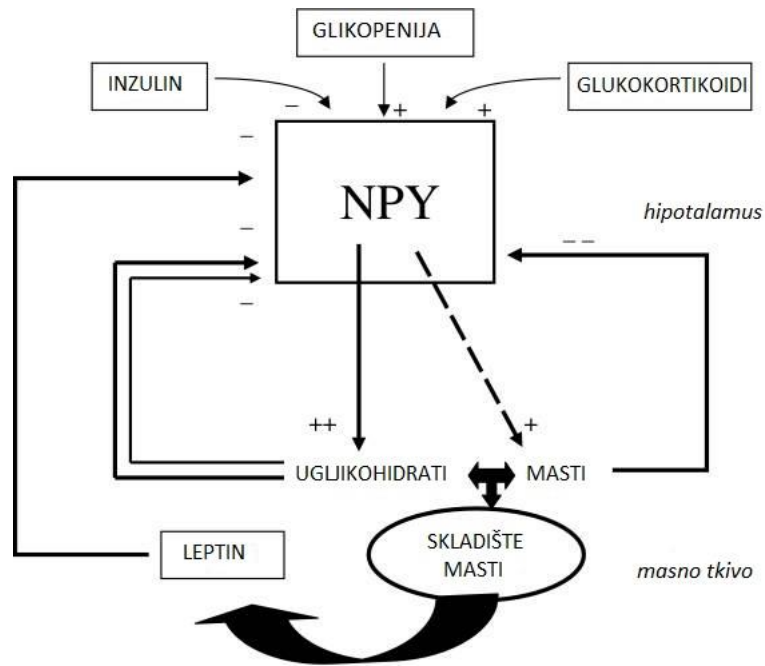
2.5.2. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y pripada najzastupljenijim peptidima u mozgu čije ime potječe od koda s jednim slovom (Y) za aminokiselinu tirozin jer sadrži nekoliko tirozinskih ostataka uključujući amidirani C-terminalni ostatak tirozina (Beck, 2006). Građen je od 36 aminokiselina te je zastupljen u hipokampusu, korteksu, stražnjem mozgu i hipotalamusu (Chronwall, 1985; Beck, 2005). Izražen je pretežno u GABA-ergičnim interneuronima ARC-a hipotalamusa koji zatim šalju signale u ostala područja hipotalamusa kao što su LH i PVN hipotalamusa. Neuropeptid Y sudjeluje u regulaciji hranjenja putem tri receptora: Y1R, Y5R i eventualno Y2R. Ima oreksigeni učinak na unos hrane, posebice ugljikohidrate. Prehrana zasnovana uglavnom na ugljikohidratima uzrokuje konstantno visoke koncentracije NPY. Ovaj peptid djeluje ovisno o raspoloživosti glukoze u organizmu. Pozitivno je povezan sa signalima koji ukazuju na manjak glukoze, što je dokazano činjenicom da se koncentracija NPY povećava nakon farmakološke blokade korištenja glukoze. NPY se smanjuje odmah nakon gutanja ili nakon ubrizgavanja injekcije glukoze (Leibowitz i Wortley, 2009).

Glavni model za proučavanje pretilosti su ob/ob miševi koje karakterizira nedostatak leptina koji je važan regulator NPY puteva (Ingalls i sur., 1950 navedeno u Brothers i Wahlestedt, 2010). Kod ob/ob miševa prisutna je veća ekspresija NPY u hipotalamusu (Stephens i sur., 1995 navedeno u Brothers i Wahlestedt, 2010). Kronični stres u kombinaciji s lošom prehranom može dovesti do goleme pretilosti putem aktivacije NPY i adipogeneze (Kuo i sur., 2007 navedeno u Brothers i Wahlestedt, 2010). Otkriće Y5R antagonista peptida, kao i Y2R i Y4R agonista povećalo je zanimanje o ulozi NPY u pretilosti (Brothers i Wahlestedt, 2010). Kao rezultat, modulatori receptora kao što su obinipitid, MK-0557 ili

velneperit ušli su u klinička ispitivanja (Small i Bloom, 2005 navedeno u Brothers i Wahlestedt, 2010).

NPY karakterizira velika osjetljivost u ARC-u i PVN-u na stanja poremećene energetske homeostaze. Pri nedostatku dostupne glukoze oslobađa se kortikosteron i NPY koji pokazuju visoke koncentracije na samom početku prirodnog razdoblja hranjenja kada su energetske zalihe niske i ugljikohidrati vrlo poželjni. Također pri unosu hrane dolazi i do otpuštanja grelina koji aktivira NPY neurone u ARC-u. Drugim riječima, djelovanje kortikosterona, NPY-a i grelina značajno je u stanju manjka glukoze. Obrnut odnos NPY povezan je s hormonima leptinom i inzulinom koji svojim djelovanjem smanjuju unos hrane, povećavaju energetske potrebe i inhibitorski djeluju na NPY. Porast i pad koncentracije navedenih hormona bitan je u regulaciji pravilne homeostaze energije i hranjenja. Istraživanja pokazuju da NPY funkcionira u stanjima poremećene, odnosno negativne energetske ravnoteže u svrhu održavanja homeostaze glukoze i promicanja sinteze masti radi metabolizma ugljikohidrata, nakon čega dolazi do aktivacije leptina i inzulina koji inhibicijski djeluju na NPY (slika 7). Istraživanjima je dokazano da transgenični miševi podvrgnuti dijeti bogatoj saharozom s prekomjernom ekspresijom NPY postaju pretili. Dolazi do hiperglikemije, prejedanja, povećanog izlučivanja inzulina i ekspresije NPY receptora. Recipročne su interakcije prisutne između NPY i inhibitora unosa hrane, kao što su melanokortini u ARC-u i serotonin u srednjem mozgu. Ukratko, ova istraživanja pokazuju da se NPY neuroni u ARC-u stimuliraju pri poremećaju homeostaze energije dok se koncentracija samog peptida povećava kao posljedica promjena u različitim hormonima, uključujući povišene razine grelina, kortikosterona i smanjene razine inzulina i leptina (Leibowitz i Wortley, 2009).



Slika 7. Shema mehanizma djelovanja NPY pri hranjenju u odnosu na glavne hormone i makronutrijente. Znak + označava stimulacijsko djelovanje na NPY dok znak – označava inhibicijsko djelovanje. Dugotrajna i kratkotrajna regulacija makronutrijentima označena je punim i isprekidanim strijelicama (preuzeto i prilagođeno prema Beck, 2006).

2.5.3. AGRP

Neuroni koji proizvode bjelančevinu srodnu aguti-proteinu (AGRP) nalaze se u ARC-u hipotalamusa. AGRP ima oreksigenično djelovanje na hranjenje, drugim riječima, potiče unos hrane. AGRP, koji luče hipotalamični oreksigenični neuroni prirodni je antagonist MCR-3 i MCR-4 koji potiče unos hrane inhibicijskim djelovanjem na α -MSH na MCR-3 i MCR-4 (Guyton i Hall, 2011).

Tijela stanica AGRP-a ograničena su na ARC, dok vlakna AGRP-a nalazimo u mnogim područjima hipotalamusa i mozga. AGRP se eksprimira u neuronima ARC-a koji ekspimiraju i NPY. Istraživanja ukazuju na veliku povezanost djelovanja NPY i AGRP-a u stanju poremećene homeostaze energije što uključuje povećanu potrošnju energije i smanjeni unos hrane. AGRP neurone aktiviraju oreksigeni učinci npr. grelina i oreksina dok ih inhibiraju anoreksigeni učinci hormona kao što su inzulin i leptin koji su aktivni u uvjetima pozitivne energetske ravnoteže, odnosno kada je smanjena potrošnja energije, a povećan unos hrane. Istraživanja su pokazala da stimuliranje AGRP neurona može prevladati različite oblike poremećaja apetita. AGRP, kao i NPY, ima ulogu u metabolizmu ugljikohidrata i sinteze masti stoga se ekspresija AGRP gena povećava pri unosu hrane s

malo ugljikohidrata s niskom razinom masnoće, a smanjuje se s povećanjem sadržaja masti. Prekomjerna ekspresija AGRP gena dovodi do hiperfagije i pretilosti. Istraživanja provedena na mladim AGRP deficijentnim miševima u uvjetima slobodnog pristupa hrani, ne pokazuju znakove hiperfagije te su normalne tjelesne težine. No, nakon kratkog uskraćivanja hrane miševi pokazuju znakove hiperfagije što ukazuje na ulogu AGRP-a u procesima usmjerenim na vraćanje homeostaze energije kada su izvori hrane niski. Produžavanjem vremena uskraćivanja hrane, AGRP smanjuje lokomotornu aktivnost i metaboličke procese putem inhibicije osi hipotalamus - hipofiza- štitnjača u svrhu očuvanja energije. Ukratko rečeno, istraživanja provedena do danas ukazuju na djelovanje AGRP-a pri povećanoj potrošnji energije, stimulaciji gladi te smanjenju oksidacije lipida u korist ugljikohidrata. Stoga se smatra da su AGRP i NPY sustavi vjerojatno evoluirali u svrhu signalizacije gladi pri poremećenom metabolizmu glukoze ili lipida te omogućavanju tijelu da izdrži duga razdoblja poremećene energetske homeostaze (Leibowitz i Wortley, 2009).

2.5.4 POMC

Prekursorski protein, proopiomelanokortin (POMC) proizvodi mnoge biološki aktivne peptide putem brojnih enzimskih procesa dajući hormone koji stimuliraju melanocyte (MSH), kortikotropin (ACTH) i β -endorfin. ACTH i MSH vežu se na G-protein koji je vezan melanokortinskim receptorima od kojih postoji najmanje pet podtipova. U SŽS-u ekspresija receptora MCR3 i MCR4 je na visokoj razini, dok je ekspresija receptora MC1R i MC5R na niskoj razini. POMC neuroni pretežno se nalaze u ARC-u i NTS jezgrama moždanog debla, područjima koji imaju veliku ulogu u regulaciji apetita (Millington, 2007).

Aktivacija POMC neurona povećava potrošnju energije i smanjuje unos hrane. POMC neuroni luče α -MSH koji djeluje preko navedenih melanokortinskih receptora, nađenih pretežno na neuronima PVN-a (Guyton i Hall, 2011). Nokaut miševi (engl. *knockout mouse*-genetički modificirani miševi) za MCR3, MCR4 i POMC pokazuju fenotip pretilosti, što je dokazano i kod ljudi sa mutacijama MCR4 i POMC kod kojih se smatra da mutacije MCR4 uzrokuju oko 5% slučajeva teških oblika rane pretilosti u dječjoj dobi (Guyton i Hall, 2011; Millington, 2007). Istraživanja su zatim pokazala da ljudi sa specifičnim mutacijama u β -MSH-a također razvijaju pretilost, kao i miševi s nedostatkom β -endorfina. POMC neuronski sustav osim regulacije hranjenja ima i druge funkcije, uključujući regulaciju laktacije, seksualnog ponašanja i reproduktivnog ciklusa (Millington, 2007).

Aktivacija MCR-a PVN-a kojom se smanjuje unos hrane, djelomično je posredovana aktiviranjem živčanih puteva koji se šire od PVN-a do NTS-a, što aktivira simpatički živčani sustav. Hormoni leptin i inzulin stimulacijski djeluju na POMC (Guyton i Hall, 2011). Leptin djeluje na neurone ARC-a preko tzv. leptin receptora duge izoforme (engl. *leptin receptor long isoform*- LEPRB) što utječe na aktivnost POMC i AGRP neurona tog područja. POMC neuroni ARC-a koji eksprimiraju LEPRB aktiviraju se leptinom i projektiraju se na druge jezgre hipotalamusa. U ovom slučaju, leptin predstavlja signal koji povezuje stanje energijskih zaliha sa POMC neuronima hipotalamusa. No, dokazano je da nemaju svi hipotalamički POMC neuroni leptinske receptore što upućuje na postojanje melanokortinskog signalizacijskog sustava koji nije povezan s leptinom (Millington, 2007).

3. ZAKLJUČAK

U posljednjih nekoliko desetljeća porasla je pojavnost bolesti vezanih za pretilost kao što su dijabetes i kardiovaskularne bolesti. Mehanizam nastanka pretilosti nije u potpunosti razjašnjen, no veliku ulogu imaju životne navike i okolišni čimbenici, posebice u današnje vrijeme jer genske promjene ne bi mogle nastati tako brzo. Drugi uzrok pretilosti predstavlja poremećaj u samoj regulaciji apetita što uključuje poremećaj djelovanja hormona, interneurona SŽS-a i genske mutacije. ARC predstavlja glavno područje mozga odgovorno za regulaciju apetita u kojemu AGRP i POMC neuroni primaju signale perifernih hormona kao što je npr. leptin koji utječe na njihovu daljnju aktivnost. U nadzoru hranjenja veliku ulogu imaju i gastrointestinalni hormoni od kojih većina ima anoreksigenični učinak, dok grelin ima oreksigenično djelovanje. Gastrointestinalni hormoni postali su vrlo značajni u razvoju lijekova u terapiji pretilosti, posebice jer su fiziološki prisutni u organizmu, što smanjuje mogućnost pojave nuspojava primjenom mogućih lijekova. Geni pridonose pojavi pretilosti uzrokujući poremećaje: homeostaze energije i pohrane masti, kao i jednog ili više puteva za regulaciju funkcije centara za hranjenje. Najčešći monogeniski uzrok pretilosti je mutacija MCR-4 receptora na koje inhibicijski djeluju AGRP neuroni. Rijetki, ali mogući uzroci pretilosti su mutacija leptinskog gena.

Glavni dio tijela zadužen za regulaciju apetita nalazi se upravo u mozgu točnije interneuronima hipotalamusa, stoga su brojna istraživanja usmjerena upravo proučavanju promjena mehanizma hranjenja u stanju pretilosti. Jedna od takvih metoda je duboka stimulacija mozga koja je za ciljne mete imala LH i VMH jezgre hipotalamusa. Provedenim eksperimentom dokazano je smanjenje BMI među ispitanicima što ukazuje na pozitivan učinak ove metode, ali su potrebna daljnja istraživanja u svrhu razumijevanja svih učinaka i njihovih dugoročnih rezultata.

4. LITERATURA

Ahima, Rexford S., and Daniel A. Antwi. (2008) Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37: 811-823

Atalayer D, Gibson C, Konopacka A, Geliebter A. (2013) Ghrelin and eating disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 70-82

Barac B. i sur. (1992) *Neurologija*. Zagreb, Medicinska biblioteka

Beck B. (2000) Neuropeptides and Obesity. *Nutrition* 16: 916–918

Beck, B. (2006) Neuropeptide Y in Normal Eating and in Genetic and Dietary-Induced Obesity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1159–1164

Belgardt, B. F. and Brü ning, J. C. (2010) CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 97-113

Bewick GA (2012) Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Biochemia Medica* 22(3): 283-97

Brothers S. P., i Wahlestedt C. (2010) Therapeutic Potential of Neuropeptide Y (NPY) Receptor Ligands. *EMBO Molecular Medicine* 2: 429- 39

Buddhala C, Hsu CC, Wu JY. (2009) A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *NeurochemInt* 55: 9- 12

Burcelin, R. and Gourdy, P. (2017). Harnessing glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the pharmacological treatment of overweight and obesity. *Obes. Rev.* 18: 86-98

Carus-Cadavieco M. (2018) Coordination of innate behaviors by GABAergic cells in lateral hypothalamus. *n.d.*, 149: 1-10

Chaudhri O., Small C., Bloom S. (2006) Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1471): 1187-209

Chronwall, B. M., Di Maggio, D. A., Massari, V. J., Pickel, V. M., Ruggiero, D. A. & O'Donohue, T. L. (1985) The anatomy of neuropeptide Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15, 1159–1181

- Davenport, R.J., Wright, S. (2013) Treating obesity: is it all in the gut? *Drug Discov. Today*. 1359-6446
- DeFelipe, J. et al. (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 202–216
- Delgado, T C. (2013) Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Frontiers in Endocrinology* 4: 1-6
- Fox. S. I. (1996) *Human Physiology*. Fifth edition. Dubuque, IA Wm. C. Brown 144-147
- Guyton A. C. i Hall J.E (2010). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier
- Grimberg A. i Katz Kutikov J. (2017). “Hypothalamus.” In *Fetal and Neonatal Physiology*, 1451-1461.e2. Elsevier, 2017
- Kay JN, Voinescu PE, Chu MW, Sanes JR. (2011) Neuro expression defines new retinal amacrine cell subtypes and regulates their fate. *Nat Neurosci* 14: 965-972
- Kelly, J., J. Rothstein, et al. (1979). GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of muscimol. *Physiol Behav* 23(6): 1123-1134
- Kelsom C i Lu W. (2013) Development and Specification of GABAergic Cortical Interneurons. *Cell & Bioscience* 3, 19: 3-19
- Kleinridders A. Könnner A.C. i Brüning J.C. (2009) CNS-Targets in Control of Energy and Glucose Homeostasis. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 794–804
- Klößener, T., Hess, S., Belgardt, B. F., Paeger, L., Verhagen, L. A., Husch, A., Sohn, J.-W., Hampel, B., Dhillon, H., Zigman, J. M. et al. (2011) High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat. Neurosci.* 14, 911-918
- Kukolja Taradi S., Andreis I. (2012) *Medicinska fiziologija*. Medicinska naklada, Zagreb
- Lanigan J., Tee L., Brandreth R. (2019) Childhood Obesity. *Medicine* 47: 1-3

- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, Fishell G, Rudy B. (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30: 16796–16808
- Leibowitz, S.F. i Wortley. K.E (2009) Neuropeptides: Food Intake. In *Encyclopedia of Neuroscience*, 915–920
- Millington G. WM. (2007) The Role of Proopiomelanocortin (POMC) Neurones in Feeding Behaviour. *Nutrition & Metabolism* 4: 1-5
- Myers, M. G i Olson, D. P. (2012) Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491, 357-363
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L. and Guerra, M. (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31, 757-776
- Roh E., Kim M.S. (2016) Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinology and Metabolism* 31: 519-522
- Roth FC, Draguhn A. (2012) GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural Plast* 2012:805830
- Skibicka, K. P. (2013) The central GLP-1: implications for food and drug reward. *Front Neurosci* 7: 181
- Sobrinho Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jimenez, L., Barrios, V. and Arilla Ferreiro, E. (2014). Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 58
- Suzuki K, Jayasena C.N., Bloom S.R. (2012) Obesity and Appetite Control. *Experimental Diabetes Research* 2012: 824305
- Timper K. i Brüning. J.C. (2017) Hypothalamic Circuits Regulating Appetite and Energy Homeostasis: Pathways to Obesity. *Disease Models & Mechanisms* 10: 679-685
- Vogt, M. C. and Brüning, J. C. (2013) CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 76-84

Waterson, M. J. and Horvath, T. L. (2015) Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* 22: 962-970

Whiting A.C., Oh M.Y., Whiting D.M. (2018) Deep brain stimulation for appetite disorders. *Neurosurgical Focus* 45: 1-4

Williams, K.W., Margatho, L. O., Lee, C. E., Choi, M., Lee, S., Scott, M. M., Elias, C. F. and Elmquist, J. K. (2010) Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci.* 30: 2472-2479

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432

WEB IZVORI

Web 1: Zona Medicine <https://zonamedicine.com> (2.6. 2019.)

Web 2: World Health Organization, WHO, Regional office for Europe <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> (3. 6. 2019.)

Web 3 : <http://www.futura-sciences.us/dico/d/biology-hypothalamus-50002972>
(10. 6. 2019.)

Web 4: Research gate <https://www.researchgate.net> (10. 6. 2019.)

