

Neuroprotektivni učinak dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) u staničnim modelima Alzheimerove bolesti

Pendelić, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:787617>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Robert Pendelić

**Neuroprotektivni učinak
dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) u
staničnim modelima Alzheimerove bolesti**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Robert Pendelić

**The neuroprotective effect of
dehydroepiandrosterone-sulphate (DHEAS)
in *in vitro* models of Alzheimer's disease**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Gordane Nedić Erjavec, više znanstvene suradnice, te komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović, redovite profesorice u trajnom zvanju. Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta "Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji", financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Najviše se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Gordani Nedić Erjavec na pruženoj prilici, znanstvenim savjetima, podijeljenom iskustvu, angažiranosti, kritikama i sveukupno izvrsnom mentorstvu.

Zahvaljujem se komentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na suvoditeljstvu, angažiranosti, komentarima i pomoći pri pronalasku rada pod stručnim mentorstvom.

Zahvaljujem se dr. sc. Dubravki Švob Štrac koja me uputila dr. sc. Gordani Nedić Erjavec i omogućila izradu rada pod stručnim mentorstvom u sklopu laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju na IRB-u.

Zahvaljujem se i svim drugim djelatnicima laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju na IRB-u, pogotovo Barbari Vuić, Luciji Tudor, Marceli Konjevod i Tini Miloš na savjetima, ispomoći i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom mog rada u laboratoriju.

Velike zahvale mojim roditeljima, Božidaru i Grozdani na bezuvjetnoj ljubavi i podršci te strpljenju tijekom cijele moje edukacije. Hvala vam što ste uvijek dostupni kada naiđem na životne prepreke.

Velike zahvale i mom dragom bratu, Željku, koji mi je uvijek voljan pomoći, neovisno o situaciji u kojoj se nađe.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima Ani, Blažu, Janji, Leonu, Krešimiru, Matku i Tei koji su mi učinili studentske godine divnim životnim iskustvom.

Za kraj, hvala svim mojim dragim prijateljima van i unutar okvira studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Neuroprotektivni učinak dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) u staničnim modelima Alzheimerove bolesti

Robert Pendelić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alzheimerova bolest (AB) je najučestaliji oblik demencije koji se očituje kroz gubitak raznih kognitivnih sposobnosti. Uzrokovana je propadanjem neurona i sinaptičkih veza unutar mozga i visoko je povezana s nakupljanjem peptida amiloid beta ($A\beta$) u središnjem živčanom sustavu. Uglavnom se razvija kod ljudi starijih od 65 godina, a udio oboljelog stanovništva je u stalnom porastu. Bolest je posljedica velikog broja čimbenika, što je čini vrlo složenom i zasad neizlječivom. Istraživanja u biomedicini su, između ostalog, usmjerena i na pronalazak tretmana koji bi značajno usporili proces odumiranja neurona u mozgu. Potencijalan kandidat za to je neurosteroid dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) koji u središnjem živčanom sustavu pomaže u očuvanju neurona, a njegove endogene razine pozitivno koreliraju s kognitivnim sposobnostima. Cilj ovog rada bio je istražiti potencijalni učinak DHEAS-a u promociji preživljenja stanica korištenjem dvaju *in vitro* modela AB-a, primarne kulture mišjih neurona i stanične linije SH-SY5Y, tretiranih oligomerima $A\beta$. Rezultati istraživanja sugeriraju neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a u staničnom modelu AB-a temeljenom na primarnoj kulturi mišjih neurona. S druge strane, isti učinak nije bilo moguće postići na staničnoj liniji SH-SY5Y tretiranoj oligomerima $A\beta$.

Ključne riječi: DHEAS, neurosteroid, demencija, *in vitro* studija, tretman, apoptoza
(51 stranica, 22 slike, 1 tablica, 105 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Gordana Nedić Erjavec, viši znanstveni suradnik

Komentor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

izv. prof. dr. sc. Petra Korać

izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Zamjena: prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 7.9.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone-sulphate (DHEAS) in *in vitro* models of Alzheimer's disease

Robert Pendelić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia which is characterised by the loss of various cognitive abilities. It is caused by neural and synaptic loss within the brain and is highly associated with the accumulation of amyloid beta ($A\beta$) peptide in the central nervous system. It mostly affects people older than 65 years and the overall percentage of people affected by it is constantly increasing. Many factors play a role in the formation of the disease, which makes it very complex and currently incurable. Research in biomedicine is, among other things, focused on finding treatments that would significantly reduce the neural loss in the brain. A potential candidate for this is the neurosteroid dehydroepiandrosterone-sulphate (DHEAS) which participates in neuronal preservation in the central nervous system, and its endogenous levels positively correlate with cognitive abilities. The aim of this research was to investigate the potential effect of DHEAS in promoting cell survival using two *in vitro* models of AD, primary cultures of mouse neurons and the SH-SY5Y cell line, both treated with $A\beta$ oligomers. The obtained results suggest a neuroprotective effect of DHEAS in an *in vitro* model of AD based on the primary culture of mouse neurons. On the other hand, the same effect could not be achieved on the SH-SY5Y cell line treated with $A\beta$ oligomers.

Keywords: DHEAS, neurosteroid, dementia, *in vitro* study, treatment, apoptosis
(51 pages, 22 figures, 1 table, 105 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Senior Research Associate Gordana Nedić Erjavec, PhD
Co-mentor: Full Professor Dubravka Hranilović, PhD

Reviewers: prof. Dubravka Hranilović, PhD
 assoc. prof. Petra Korać, PhD
 assoc. prof. Duje Lisičić, PhD
Substitute: prof. Biljana Balen, PhD

Thesis accepted: 7.9.2023.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerova bolest	1
1.1.1. Simptomi i dijagnoza	2
1.1.2. Stadiji	3
1.1.3. Neuropatološka obilježja	3
1.1.3.1. Senilni neuritični plakovi.....	4
1.1.3.2. Neurofibrilarni snopići.....	5
1.1.3.3. Poveznica A β i tau oligomera	6
1.1.3.4. Gubitak sinaptičkih veza	6
1.1.4. Etiologija.....	7
1.1.4.1. Starenje.....	8
1.1.4.2. Genetički čimbenici	8
1.1.4.3. Okolišni čimbenici.....	9
1.1.4.4. Zdravstveni čimbenici.....	10
1.1.5. Modeli istraživanja AB	10
1.1.6. Liječenje.....	12
1.2. Dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS)	13
1.2.1. Sinteza i metabolizam	14
1.2.2. Mehanizam djelovanja	14
1.2.3. Uloga u Alzheimerovoj bolesti	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Primarna kultura mišjih neurona.....	18
3.1.2. Stanična linija neuroblastoma SH-SY5Y.....	18
3.1.3. Popis kemikalija.....	19
3.2. Metode	21
3.2.1. Priprema ploča za nasađivanje.....	21
3.2.2. Izolacija primarne kulture mišjih neurona	21
3.2.3. Nasađivanje primarne kulture mišjih neurona	22
3.2.4. Uspostava i održavanje kulture SH-SY5Y stanica	22
3.2.5. Uspostava <i>in vitro</i> modela AB-a.....	23
3.2.6. Tretman <i>in vitro</i> modela AB-a baziranog na primarnoj kulturi mišjih neurona DHEAS-om.....	23

3.2.7. Tretman <i>in vitro</i> modela AB-a baziranog na kulturi neuroblastoma DHEAS-om .	24
3.2.8. Mjerenje vijabilnosti stanica	24
3.2.8.1. <i>MTT test</i>	24
3.2.8.2. <i>RealTime-Glo® MT Cell Viability</i>	25
3.2.9. Detekcija stanične smrti.....	26
3.2.10. Ispitivanje kaspazne aktivnosti	27
3.2.11. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI	29
4.1. Vijabilnost primarne kulture mišjih neurona.....	29
4.1.1. Vijabilnost neurona određena MTT testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om.....	29
4.1.2. Vijabilnost neurona određena <i>RealTime-Glo® MT Cell Viability</i> testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om	30
4.2. Vijabilnost stanične linije SH-SY5Y	31
4.2.1. Vijabilnost SH-SY5Y stanica određena MTT testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om.....	31
4.3. Detekcija stanične smrti.....	31
4.3.1. Detekcija stanične smrti neurona nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om	33
4.3.2. Detekcija stanične smrti SH-SY5Y stanica nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om.....	33
4.4. Kaspazna aktivnost stanica.....	34
4.4.1. Kaspazna aktivnost primarne kulture mišjih neurona određena uslijed tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om	34
4.4.2. Kaspazna aktivnost SH-SY5Y stanica nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om.....	35
5. RASPRAVA.....	36
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. LITERATURA	42
8. ŽIVOTOPIS

POPIS KRATICA

AB – Alzheimerova boleost

A β – amiloid beta

ACh – acetilkolin (od eng. *acetylcholine*)

ANOVA – analiza varijance (od eng. *analysis of variance*)

AP1 – protein aktivator 1 (od eng. *activator protein 1*)

APOE – apolipoprotein E

APP – prekursor proteina amiloid-beta (od eng. *amyloid-beta precursor protein*)

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (od eng. *brain derived neurotrophic factor*)

CAA – cerebralna amiloidna angiopatija

CREB – eng. *cAMP response element-binding protein*

CSF – cerebrospinalna tekućina (od eng. *cerebrospinal fluid*)

CVD – kardiovaskularne bolesti (od eng. *cardiovascular diseases*)

DHEA – dehidroepiandrosteron

DHEAS – dehidroepiandrosteron-sulfat

DMEM – eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetil sulfoksid

ER – receptor estrogena (od eng. *estrogen receptor*)

FAB – obiteljski tip Alzheimerove bolesti (eng. *familial Alzheimer's disease*)

GABA – γ -aminomaslačna kiselina (od eng. *γ -aminobutyric acid*)

HBSS – Hankova balansirana otopina soli (od eng. *Hanks' Balanced Salt Solution*)

HFIP – heksafluorizopropanol

iPSC – inducirane pluripotentne matične stanice (od eng. *induced pluripotent stem cells*)

MAP – proteini povezani s mikrotubulama (od eng. *microtubule-associated proteins*)

NF- κ B – nuklearni faktor kapa-B

NFT – neurofibrilarni snopići (od eng. *neurofibrillary tangles*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

PHF – upareni spiralni filament (od eng. *paired helical filament*)

PSEN1 – presenilin-1

PSEN2 – presenilin-2

ROS – reaktivne kisikove vrste (od eng. *reactive oxygen species*)

SAB – sporadični tip Alzheimerove bolesi (eng. *sporadic Alzheimer's disease*)

TH – tirozin hidroksilaza

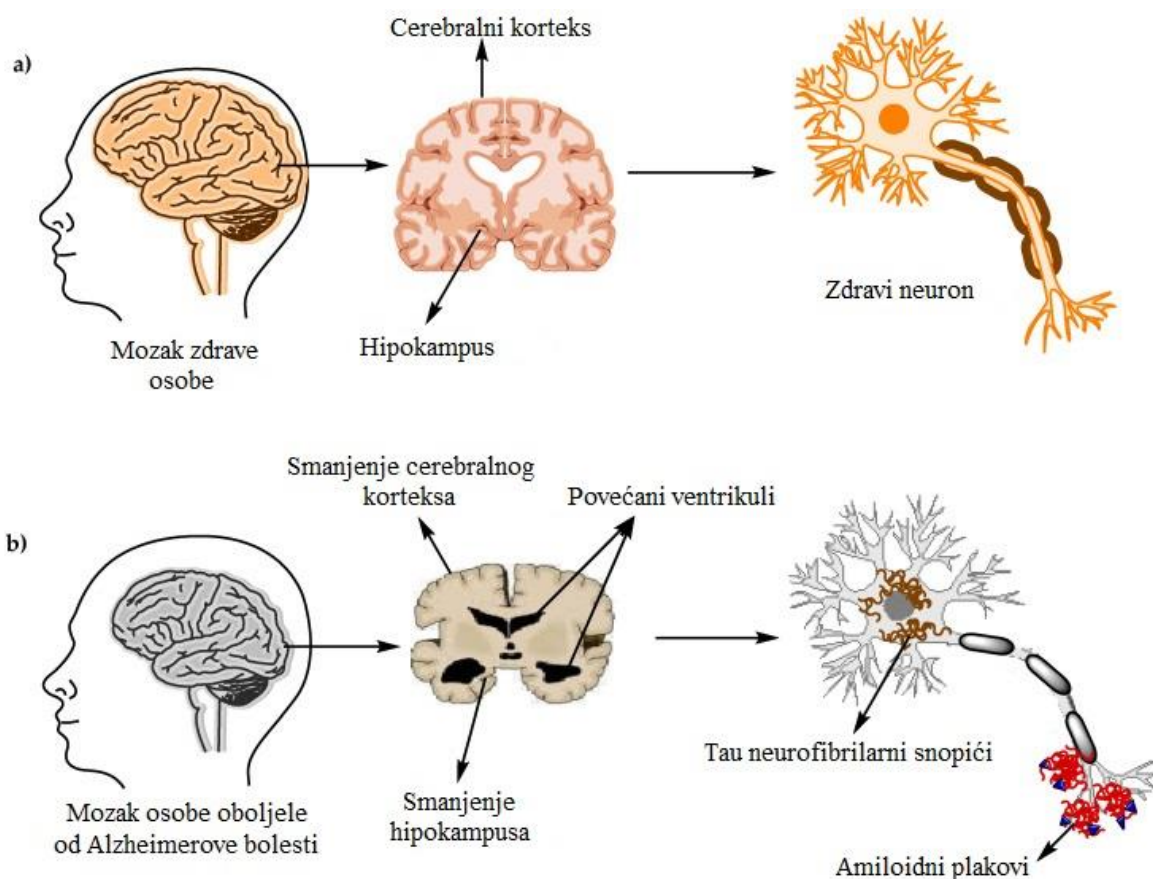
TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (od eng. *tumor necrosis factor alpha*)

σ 1 – sigma receptor podtipa 1

1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je najučestaliji oblik demencije koji se očituje kroz gubitak kognitivnih sposobnosti poput pamćenja, govora, percepcije, koncentracije i dr. Ime je dobila po njemačkom psihijatru Aloisu Alzheimeru, koji je prvi opisao bolest 1906. godine kao kombinaciju progresivnog gubitka pamćenja, dezorijentacije i prisutnosti patoloških markera, neuritičnih plakova i neurofibrilarnih čvorova (Schachter i Davis 2000). Danas se zna da je glavna karakteristika bolesti nakupljanje peptida amiloid beta ($A\beta$) u obliku senilnih plakova i hiperfosforiliranog proteina tau kao neurofibrilarnih snopića koji su povezani s propadanjem neurona i sinaptičkih veza unutar mozga (Murphy i LeVine 2010). To nadalje rezultira promjenama u mozgu, kao što su smanjenje obujma mozga i hipokampusa te povećanje volumena ventrikula (Slika 1) (Breijyeh i Karaman 2020).



Slika 1. Ilustrativni prikaz promjena u središnjem živčanom sustavu povezanih s Alzheimerovom bolešću. Fiziološke strukture mozga i neurona zdrave osobe (a) i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti (b).

(Preuzeto i prilagođeno iz Breijyeh i Karaman 2020)

Prema podacima iz 2018. (Patterson) oko 50 milijuna ljudi boluje od demencije, od čega dvije trećine njih imaju AB. Pritom se do 2050. godine očekuje porast broja ljudi s demencijom na 152 milijuna. Broj i udio oboljelih stanovnika diljem svijeta je svake godine sve veći, što je ujedno razlog za pridavanje sve veće važnosti pronalasku mogućnosti liječenja ove bolesti. Bolest nema uski, strogo definirani set uzročnika, već je posljedica velikog broja čimbenika, što je čini vrlo složenom i zasad neizlječivom. Uz promociju vođenja zdravog života u svrhu prevencije nastanka AB-a, nošenje s bolešću podrazumijeva razne medicinske, psihološke i sociološke metode kojima bi se usporila progresija bolesti (Zhang X. X. i sur. 2021).

1.1.1. Simptomi i dijagnoza

Alzheimerova bolest se klinički manifestira kao niz promjena u područjima mozga odgovornim za pamćenje, govor, prostornu orijentaciju i više izvršne funkcije, koje rezultiraju u gubitku odgovarajućih kognitivnih sposobnosti kod oboljelih. Nekognitivne promjene u oboljelih uključuju promjenu osobnosti, smanjenu mogućnost donošenja odluka, lutanje, psihozu, poremećaje raspoloženja, uzrujanost i abnormalnosti spavanja (Schachter i Davis 2000).

Prema Schachter i Davis (2000) dijagnostička evaluacija pacijenata za koje se smatra da boluju od AB-a sastoji se od:

- (1) Općenite, neurološke, neuropsihijatrijske i obiteljske povijesti bolesti
- (2) Fizikalnog i neurološkog pregleda
- (3) Rutinskih laboratorijskih pregleda (kompletna krvna slika, mjerenje krvne razine vitamina B12 i folata, testiranje funkcije štitnjače, brzi plazma reagin (od eng. *rapid plasma reagin*) test) i neobaveznih laboratorijskih pretraga (sedimentacija eritrocita, serologija virusa humane imunodeficijencije (HIV), serologija na lajmsku bolest, analiza urina, test urina na lijek, lumbalna punkcija, elektroencefalografija)
- (4) Neuroslikovnih pretraga (eng. *neuroimaging*) (kompjutorizirana tomografija i magnetska rezonancija)

Standardizirani dijagnostički kriteriji opisani su u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 5. izdanje (DSM-V, od eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th revision*), Međunarodnoj klasifikaciji bolesti, 11. izdanje (MKB-11) i priručniku Nacionalnog instituta za neurološke i komunikacijske bolesti i moždani udar – Udruga za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (NINCDS-ADRDA, od eng.

National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Opisana dijagnostička evaluacija rezultira u stopi točnosti od 90% za kliničku detekciju AB-a (Schachter i Davis 2000).

Yaari i sur. (2011) opisuju kako su 2011. godine ažurirani kriteriji NINCDS-ADRDA čime je uvedeno praćenje raznih kliničkih biomarkera. Tako je moguće pratiti amiloide pomoću pozitronske emisijske tomografije i analizom cerebrospinalne tekućine (CSF, od eng. *cerebrospinal fluid*), tau proteine analizom CSF-a, razne biomarkere oštećenosti neurona i sinaptičkih veza, te poremećaje u aktivnosti metabolizma pomoću pozitronske emisijske tomografije bazirane na fluorodeoksiglukozi.

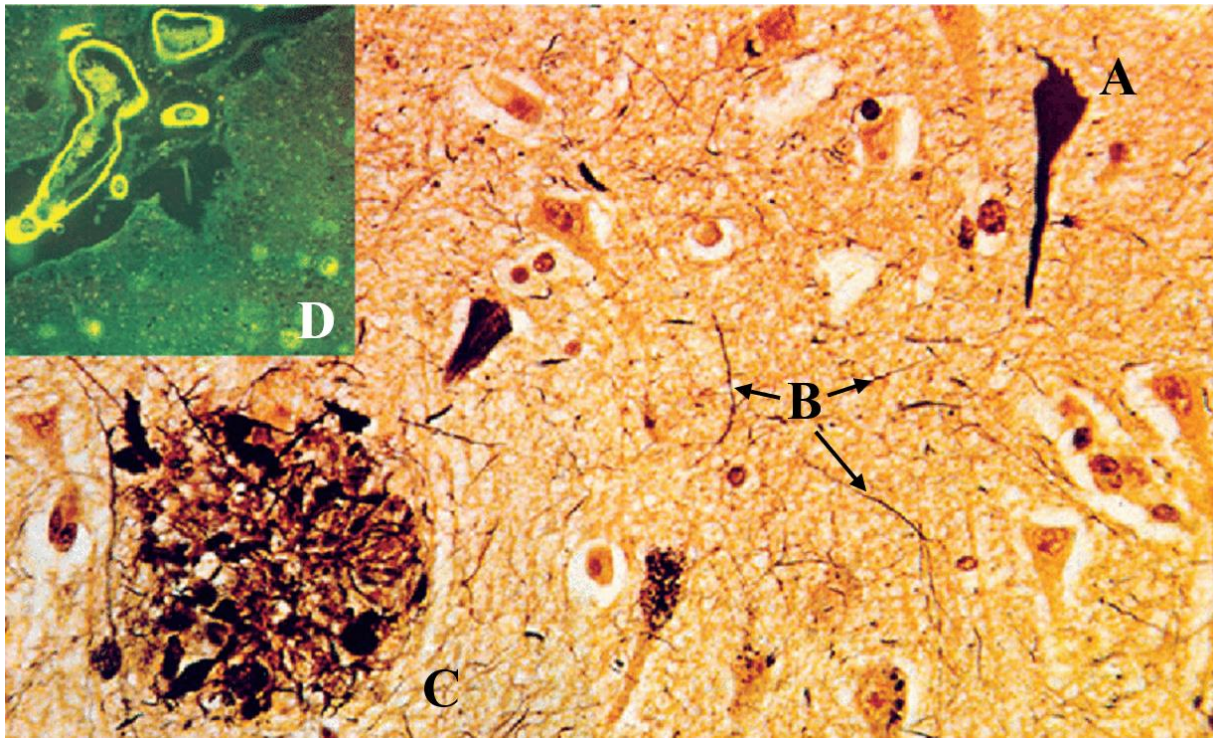
1.1.2. Stadiji

Tijek AB-a je najčešće sporo progresivan i oboljeli u prosjeku žive još 8-10 godina nakon dijagnoze (Schachter i Davis 2000). Unutar tog vremenskog perioda, razlikuju se četiri stadija bolesti (De-Paula i sur. 2012, Kumar i sur. 2022):

- (1) Pretklinički stadij – blagi gubitak pamćenja i rane patološke promjene korteksa i hipokampusa pri čemu nema smetnji u svakodnevnim aktivnostima, kliničkih znakova ni simptoma AB-a.
- (2) Rani stadij – javljaju se razni simptomi poput smetnji u svakodnevnim aktivnostima, gubitka koncentracije i pamćenja, dezorijentiranosti u vremenu i prostoru, promjene raspoloženja i razvitka depresije.
- (3) Umjereni stadij – povećani gubitak pamćenja (poteškoće u prepoznavanju obitelji i prijatelja), gubitak samokontrole, poteškoće u čitanju, pisanju i pričanju.
- (4) Teški stadij – progresivne kognitivne (nemogućnost raspoznavanja obitelji) i fizičke (prikovanost za krevet, poteškoće u gutanju i mokrenju) poteškoće što u konačnici rezultira smrću.

1.1.3. Neuropatološka obilježja

Neuropatološka obilježja AB-a obuhvaćaju pozitivne lezije (Slika 2) poput amiloidnih plakova, neurofibrilarnih snopića, cerebralne amiloidne angiopatije (CAA) i odgovora glija stanica te negativne lezije poput gubitka neurona i sinaptičkih veza (Serrano-Pozo i sur. 2011).



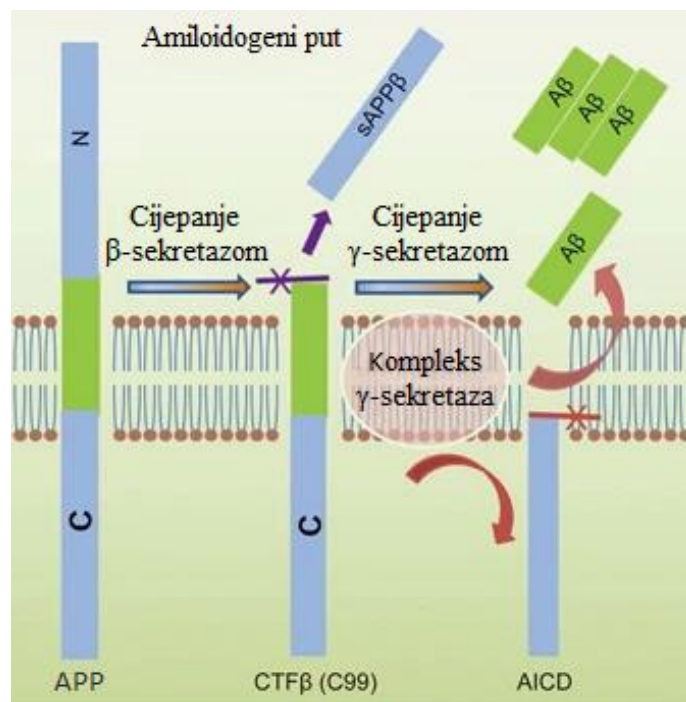
Slika 2. Histološka slika pozitivnih lezija u Alzheimerovoj bolesti. Na slici su prikazani neurofibrilarni čvorovi (A), neuropilne niti (B, crne strelice), neuritični plakovi (C) i amiloidna angiopatija (D, insert).

(Preuzeto i prilagođeno iz Lewczuk i sur. 2017)

1.1.3.1. Senilni neuritični plakovi

Senilni plakovi su svojim sastavom pretežito izvanstanične nakupine visoko netopivog proteina A β . Lanci A β nastaju sekvencijalnim cijepanjem proteazama (Slika 3). Prvo se prekursor proteina amiloid-beta (APP) cijepa β -sekretazom na izvanstanični fragment, sAPP β i fragment od 99 aminokiselina (CTF β) vezan za membranu. Nakon toga γ -sekretaza cijepa CTF β na lanac A β i unutarstanični ostatak. Enzim γ -sekretaza je pomalo neprecizan zbog čega nastaju lanci A β raznih duljina, odnosno različitog broja aminokiselina. Najviše se stvara A β 40 (80-90%) i A β 42 (5-10%), dok A β lanci drugih veličina čine manjinu. Malo dulji i hidrofobniji A β 42 su skloniji agregaciji i odgovorni za inicijaciju stvaranja plakova, iako su unutar plakova prisutni i A β 40 (Murphy i LeVine 2010, Chen i sur. 2017).

Agregati A β monomera mogu tvoriti velike i netopljive amiloidne fibrile, koji se mogu akumulirati u amiloidne plakove, i manje i topljive oligomere koji se mogu širiti po mozgu. Oligomerni oblik A β ima jače neurotoksično djelovanje, koje rezultira u nakupljanju gušćih plakova u hipokampusu, amigdali i cerebralnom korteksu (Tabaton i Piccini 2005, Chen i sur. 2017), što dalje uzrokuje kognitivna oštećenja preko stimulacije astrocita i mikroglija, oštećenja aksona i dendrita te gubitka sinaptičkih veza (Breijyeh i Karaman 2020).



Slika 3. Shematski prikaz amiloidogenog humanog APP proteolitičkog puta. Enzim β-sekretaza cijepa N-terminalni kraj APP-a čime se oslobađa sAPPβ u izvanstanični prostor, nakon čega kompleks γ-sekretaza cijepa C-terminalni kraj APP-a (CTFβ) čime nastaju Aβ lanci. Kratice: CTFβ – unutarstanični C-terminalni fragment APP-a cijepan na beta mjestu, sAPPβ – topljivi peptid APP beta, AICD – unutarstanična APP domena.

(Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur. 2017)

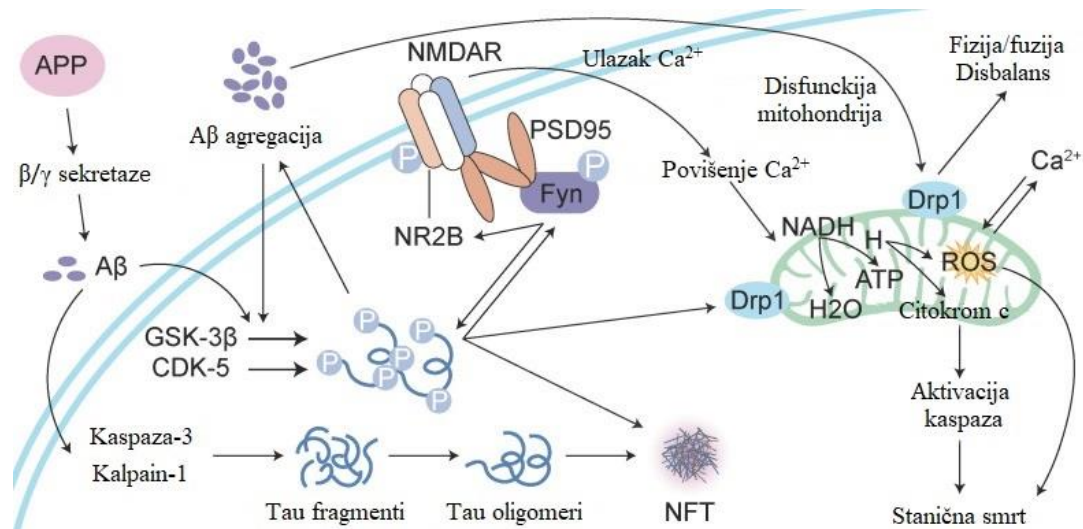
1.1.3.2. Neurofibrilarni snopići

Neurofibrilarne snopiće (NFT, od eng. *neurofibrillary tangles*) tvore netopljivi agregati hiperfosforiliranog tau proteina koji ima primarnu ulogu u stabilizaciji unutarnjeg skeleta neurona (Mandelkew E. M. i Mandelkew E. 2012). Takvi fibrili se mogu uvijati jedan oko drugoga kako bi formirali upareni spiralni filament (PHF, od eng. *paired helical filaments*). Akumulacija NFT-a i PHF-a u citoplazmi neurona, aksonima i dendritima uzrokuje gubitak citoskeletnih mikrotubula i proteina povezanih s mikrotubulama (MAP, od eng. *microtubule associated proteins*) što krajnje rezultira oštećenjem neurona (Brion 1998, Sinsky i sur. 2021). Formacija NFT-a prati različita morfološka stanja (Brion 1998, Metaxas i Kempf 2016):

- (1) Faza prije zapetljanja – hiperfosforilirani tau proteini se nakupljaju u somatodendritičkom odjeljku bez stvaranja PHF-a
- (2) Zrela faza – nastaju kompaktni agregati filamenata citoplazmatskog tau proteina koji uzrokuju pomak stanične jezgre prema periferiji some neurona, a stvaraju se i PHF
- (3) Izvanstanična faza – zbog obilne količine, NFT počinju izvirati iz stanice što upućuje na gubitak neurona, a sami snopići opstaju dugo zbog djelomičnog otpora na proteolizu

1.1.3.3. Poveznica A β i tau oligomera

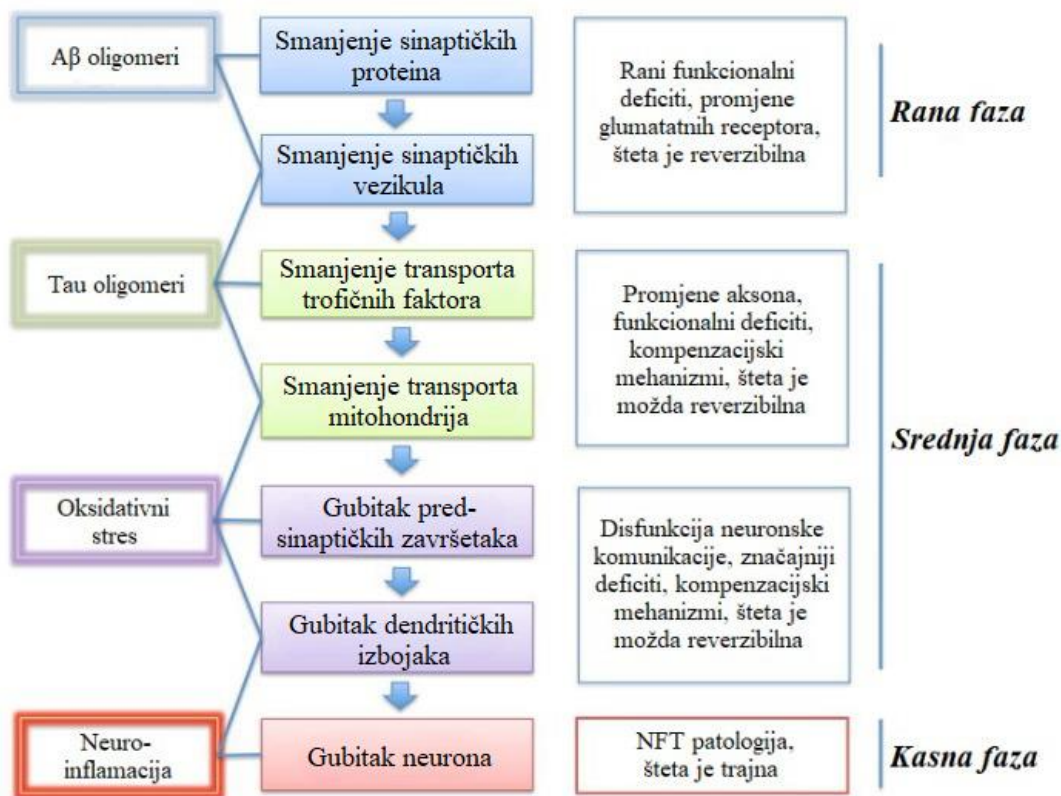
U raznim člancima (Ma i sur. 2009, Overk i Masliah 2014) se opisuje uočena korelacija između oligomera A β i NFT-a, a na Slici 4 je sumirana interakcija A β -a i tau proteina prema Zhang H. i sur. (2021).



Slika 4. Shematski prikaz recipročne toksičnosti između A β i tau. Enzimi β i γ sekretaze cijepaju APP čime nastaje A β . Amiloid beta aktivira kinaze GSK-3 β i CDK-5 odgovorne za fosforilaciju tau proteina. On također aktivira kaspazu-3 i kalpain-1 koji hidroliziraju tau protein što rezultira stvaranjem tau oligomera. Fosforilirani tau proteini stupaju u interakciju s kinazom Fyn. Kinaza Fyn aktivirana A β -om ubrzava fosforilaciju tau proteina i veže se za tau. Fosforilirana Fyn kinaza djeluje na NR2B podjedinicu NMDAR, stvarajući kompleks NMDAR-PSD95-Fyn. Receptor NMDA se aktivira, i kalcij ulazi u stanicu, što utječe na funkciju mitohondrija. Agregirani A β i fosforilirani tau induciraju fuziju i fisiju mitohondrija djelovanjem na Drp1, što potiče disfunkciju mitohondrijske dinamike i u konačnici dovodi do prekomjerne proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i apoptoze. Kratice: GSK-3 β – kinaza glikogen sintaze-3 beta, CDK-5 – ciklin ovisna kinaza 5, NMDAR – N-metil-D-aspartat receptor, NR2B – NMDAR podtip 2B, PSD95 – eng. *Postsynaptic Density Protein-95*; Drp1 – protein povezan s dinaminom 1, ROS – reaktivne kisikove vrste. (Preuzeto i prilagođeno iz Zhang H. i sur. 2021)

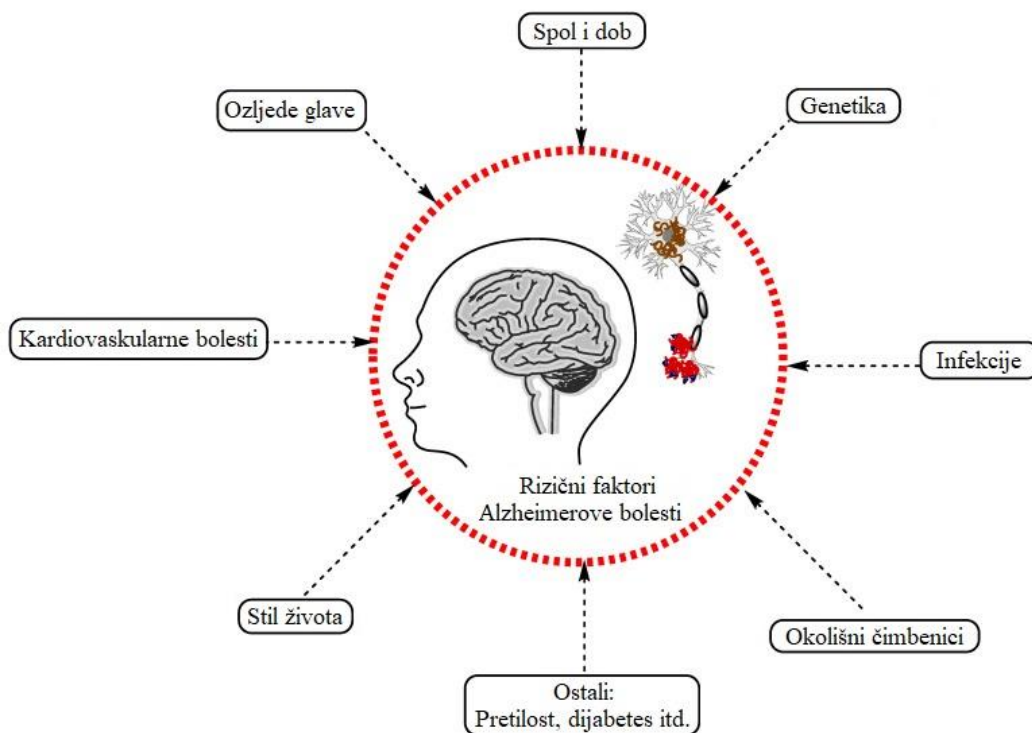
1.1.3.4. Gubitak sinaptičkih veza

Iako A β plakovi i NFT služe kao biomarkeri AB-a, njihova brojnost nije u korelaciji s progresijom bolesti, odnosno gubitkom kognitivnih sposobnosti. S druge strane sinaptičko oštećenje u neokorteksu i limbičkom sustavu, koje je prisutno još u početnim fazama AB-a, ukazuje na progresiju kognitivnog deficita (Overk i Masliah 2014). Stoga je korištenjem sinaptičkih proteina kao biomarkera moguće detektirati ozbiljnost kognitivnog deficita još u ranim fazama (Tarawneh i sur. 2016, Lleó i sur. 2019). Mehanizmi gubitka sinaptičkih veza (Slika 5) uključuju nedostatke u aksonskom transportu, oštećenje mitohondrija, oksidativni stres, neuroinflamaciju (Krstic i Knuesel 2012) i druge procese koji imaju manji učinak, poput akumulacije A β na sinaptičkim mjestima (Breijyeh i Karaman 2020).



Slika 5. Shematski prikaz progresije mehanizma sinaptičkog oštećenja u AB-u.
(Preuzeto i prilagođeno iz Overk i Masliah 2014)

1.1.4. Etiologija



Slika 6. Ilustrativni prikaz rizičnih faktora Alzheimerove bolesti.
(Preuzeto i prilagođeno iz Breijjeh i Karaman 2020)

Alzheimerova bolest je vrlo složena bolest koja je uglavnom posljedica velikog broja čimbenika (Slika 6) poput starenja, spola, genetike, ozljeda glave, okoliša, infekcije, stila života i zdravstvenog stanja (kardiovaskularne bolesti, dijabetes itd.) (Armstrong 2019).

1.1.4.1. Starenje

Starenje je kompleksan i ireverzibilan biološki proces koji se odvija u cijelom tijelu, dakle svim organima i stanicama. Starenjem stanica se akumuliraju oštećenja DNA koja povećavaju genomsku nestabilnost, postaje sve teže ispravljati stanične greške, telomere se skraćuju, akumuliraju se epigenetičke modifikacije, gubi se balans između sinteze i degradacije proteina, mitohondriji postaju disfunkcionalni i prolaze kroz mitofagiju, troše se matične stanice itd. (Hou i sur. 2019). Stanične promjene uzrokuju promjene organa i kod mozga se to izražava u obliku smanjenja volumena i mase mozga, gubitka sinapsi, proširenja ventrikula i akumulacije senilnih plakova i NFT-a. Zbog svih komplikacija, uobičajena je pojava raznih stanja poput disfunkcije mitohondrija, depresije, kognitivnog oštećenja, hipometabolizma glukoze te narušavanja homeostaze kolesterola (Breijyeh i Karaman 2020).

Alzheimerova bolest se rijetko pojavljuje kod mladih osoba, a prema Hou i sur. (2019) svaka deseta osoba starija od 65 godina boluje od nje. Upravo zato je starenje najbitniji rizični faktor AB-a. Tako razlikujemo dva tipa AB-a s obzirom na dob početka bolesti. Rjeđi (1-6% slučajeva) je tip s ranim početkom. Najčešće je obiteljskog tipa (genetički stečen) i javlja se u dobi između 30. i 65. godine života. Tip s kasnim početkom se javlja u 65. godini i kasnije. Zanimljivo je da se oba tipa mogu javiti u ljudi čija obitelj ima pozitivnu povijest AB-a s kasnim početkom (Bekris i sur. 2010).

1.1.4.2. Genetički čimbenici

Centralnu ulogu A β -a u AB-u najbolje podržavaju predloženi mehanizmi djelovanja četiri gena za koje se zna da uzrokuju obiteljski naslijeđeni tip AB-a. Mutacije gena za APP, presenilin-1 (PSEN1) i presenilin-2 (PSEN2) su prisutne samo kod pacijenata s autosomalno dominantnim tipom AB-a ranog početka. Naime, sve tri mutacije povišuju omjer A β 42/A β 40 tako što potiču staničnu proizvodnju A β 42 ili smanjuju onu od A β 40 (Schachter i Davis 2000, Breijyeh i Karaman 2020).

Značajne mutacije gena *APP* se odvijaju na mjestu za cijepanje APP-a sekretazama. Većina mutacija rezultira povećanom akumulacijom A β i povezane su sa AB-om (Breijyeh i Karaman 2020), ali neke mogu imati protektivno djelovanje, smanjujući sekreciju A β (TCW i Goate 2017, Li i sur. 2019).

Presenilin 1 je ključan protein za aktivaciju kompleksa γ -sekretaze zbog čega se njegovom jednostavnom mutacijom (npr. supstitucija jedne aminokiseline) uzrokuje smanjenje sinteze A β -a. Međutim, većina uočenih mutacija značajnije smanjuje proizvodnju A β 40 nego A β 42, što rezultira većim omjerom A β 42/A β 40 (Kelleher III i Shen 2017).

Presenilin 2 je isto odgovoran za regulaciju kompleksa γ -sekretaze, ali njegove mutacije povećavaju sintezu A β -a. Mutacije gena *PSEN2* su rijetke, ali kada su prisutne, neke od njih rezultiraju značajnijim povećanjem proizvodnje A β 42, nego A β 40 (Breijyeh i Karaman 2020).

Apolipoprotein E (APOE) je glikoprotein primarno eksprimiran u jetri i mozgu (astrociti i mikroglije). Služi kao ligand pri endocitozi posredovanoj receptorima za lipoproteinske čestice poput kolesterola, koji su esencijalni za stvaranje mijelina i normalnu funkciju mozga. Ima tri alelna oblika (APOE-2, -3 i -4), pri čemu velik broj studija (Kim i sur. 2009, Liu i sur. 2013, Van Giau i sur. 2015) ukazuje na visoku korelaciju APOE-4 oblika s oba tipa AB-a (s ranim i kasnim početkom) (Schachter i Davis 2000, Breijyeh i Karaman 2020). Naime, APOE ima bitnu ulogu pri unosu topljivog A β -a u stanice i ometa njegovo raščišćavanje. Alelni oblik APOE-4 je pri tome najdjelotvorniji što rezultira nakupinama A β i CAA (Liu i sur. 2013).

Osim već navedenih mutacija, Breijyeh i Karaman (2020) spominju i mutacije drugih gena. Primjerice, gen kazetnog transportera koji veže adenozin trifosfat (ATP) A1 (*ABCA1*), gen klasterina (*CLU*), gen za premošćujući integrator 1 (*BIN1*, od eng. *Bridging integrator 1*), gen receptora estrogena (*ER*) i drugi. Mutacija gena *ABCA1* povezuje se s patogenezom AB-a (Nordestgaard i sur. 2015), a gen *BIN1* je nakon *APOE-4* drugi najbitniji genetički rizični faktor AB-a jer ima ulogu u sintezi A β i moduliranju tau proteina i NFT-a (Holler i sur. 2014, Andrew i sur. 2019). Funkcija *CLU* nije potpuno razjašnjena iako slovi kao treći najbitniji genetički rizični faktor AB-a (Foster i sur. 2019). Nekoliko varijanti gena *ER* pokazuje visoku korelaciju s AB-om (Goumidi i sur. 2011).

1.1.4.3. Okolišni čimbenici

Okolišni čimbenici koji se smatraju rizičnim faktorima AB-a su uglavnom oni kojima je moguće inducirati oksidativni stres u stanicama i upalu (neuroinflamaciju) čime se povećava mogućnost daljnjeg razvitka u AB (Breijyeh i Karaman 2020). Konkretni primjeri istraženi na kliničkim slučajima i raznim modelima, prema Breijyehu i Karamanu (2020), uključuju onečišćeni zrak, prehrambene navike, toksikološke metale aluminij, olovo i kadmij te kronične infekcije. Naime, svaki od navedenih čimbenika pokazuje pozitivnu korelaciju s A β plakovima i NFT-ima, čineći ih rizičnim faktorima AB-a.

1.1.4.4. Zdravstveni čimbenici

Razne druge bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, pretilosti i dijabetesa također služe kao rizični faktori AB-a (Breijyeh i Karaman 2020). Kardiovaskularne bolesti (CVD, od eng. *Cardiovascular diseases*), poput moždanog udara i bolesti srca, rezultiraju privremeno ili kontinuirano slabijim dovodom krvi u mozak što rezultira gubitkom neurona i sinaptičkih veza, povećavajući rizik oboljenja od AB-a (Santos i sur. 2017). Pretilost je visoko povezana sa smanjenim dovodom krvi u mozak jer povećani udio masnog tkiva ima štetan učinak na kardiovaskularni sustav. Pretilost i/ili loša prehrana mogu uzrokovati poremećenu toleranciju glukoze ili dijabetes, stanja koja karakterizira hiperglikemija. Kronični oblik hiperglikemije je problematičan jer povisuje akumulaciju A β , oksidativni stres, disfunkciju mitohondrija i neuroinflamaciju, što sve vodi ka kognitivnom oštećenju. Pretilost nije samo rizični faktor AB-a, već i raznih drugih bolesti (CVD, dijabetes, rak), neke od kojih su već spomenute u ovom poglavlju (Alford i sur. 2018, Anjum i sur. 2018).

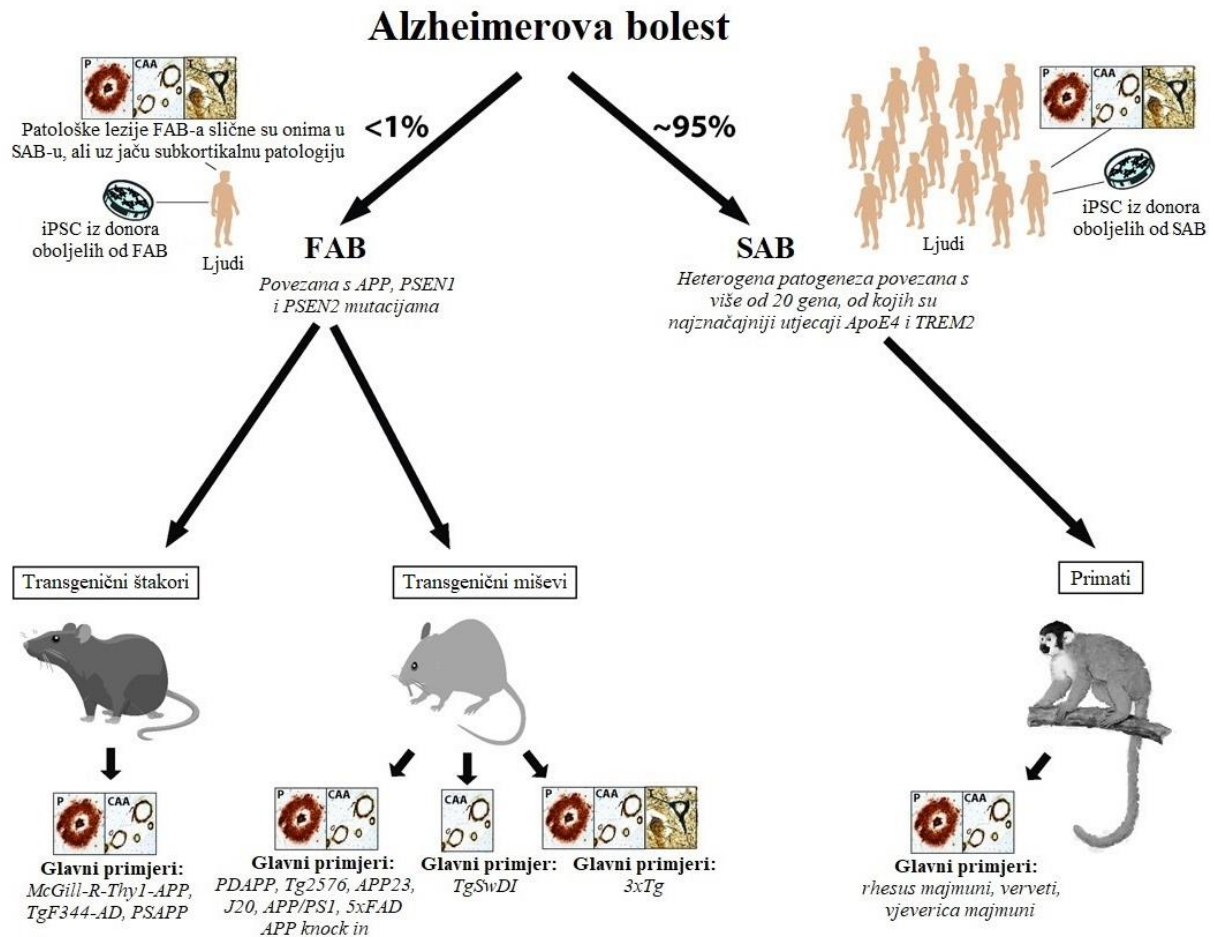
1.1.5. Modeli istraživanja AB

Eksperimentalni modeli AB-a su nužni za bolje razumijevanje patogeneze AB-a i ispitivanje novih terapijskih pristupa. Za eksperimentalne modele je bitno što bolje imitirati uvjete ljudskog AB-a, što podrazumijeva A β plakove i NFT. Svaki od opisanih modela ima svoje prednosti i mane te je bitno znati kada koji koristiti. Generalno je bolje koristiti više modela za evaluaciju svakog terapijskog pristupa (Drummond i Wisniewski 2017).

U ovom poglavlju razlikujemo obiteljski (FAB) i sporadični tip AB-a (SAB). Tip AB-a s ranim početkom (FAB) je puno rjeđi tip AB-a (<1%) koji je uzrokovan autosomno dominantnim mutacijama u APP, PSEN1 ili PSEN2, dok je SAB (tip s kasnim početkom) češći. Najučestaliji modeli istraživanja oba tipa AB-a su prikazani na Slici 7.

In vivo modeli transgeničnih miševa koji prekomjerno ekspimiraju ljudske gene povezane s AB-om (*APP*, *PSEN1* i *PSEN2*) su generalno najkorišteniji modeli (F)AB-a (Drummond i Wisniewski 2017). Homologija sekvenci ljudskog i mišjeg APP-a divljeg tipa je 97%. Sekvence se razlikuju u točno 3 aminokiseline, što je mala, ali dovoljna promjena da ne dolazi do stvaranja amiloidnih plakova u miševa divljeg tipa (Xu i sur. 2015). Stoga se kao modeli koriste transgenični miševi koji prekomjerno ekspimiraju APP pomoću pojedinačnih mutacija vezanih uz FAB ili raznih kombinacija FAB mutacija *APP* i *PSEN1* gena. Time je dobivena konzistentna A β patologija, ali ne i tauopatija. Razlog tome je razlika u ljudskim i mišjim tau proteinima i činjenici da miševi divljeg tipa ne stvaraju tau agregate. Tauopatija u

transgeničnim miševima je dobivena naknadnim uvođenjem ekspresije ljudskog tau proteina koji sadrži mutacije (Drummond i Wisniewski 2017). Prednosti ovih modela su kraći životni vijek, brzi razvoj neuropatologije i prisutnost NFT (samo kod transgeničnih miševa), a mane razlike između vrsti (ljudi i miševi) te ograničenje na FAB model.



Slika 7. Shema glavnih životinjskih modela Alzheimerove bolesti. Najbolji dostupni životinjski modeli FAB-a su transgenični miševi i štakori, a najbolji dostupni životinjski modeli SAB-a su primati. Dosljedna prisutnost tipova neuropatologije prisutnih u svakom modelu prikazana je u okvirima i njihovi glavni primjeri navedeni ispod. Samo 3xTg miševi od *in vivo* modela izražavaju sva 3 patološka obilježja AB-a (A β plakovi, CAA, NFT). Kratice: iPSC – inducirane pluripotentne matične stanice, P – amiloid beta plakovi, CAA – cerebralna amiloidna angiopatija, T – neurofibrilarni snopići (NFT). (Preuzeto i prilagođeno iz Drummond i Wisniewski 2017)

In vivo modeli transgeničnih štakora su razvijeni po sličnom principu kao i transgenični miševi. Štakori su fiziološki, morfološki i genetički sličniji ljudima nego miševi te njihov veći mozak omogućuje lakše slikanje i prikazivanje rezultata. Također, imaju bogatiji bihevioralni fenotip od miševa, što omogućuje složenija bihevioralna testiranja (Do Carmo i Cuello 2013). Mane ovih modela su ograničenje na FAB model, razlike između vrsta (ljudi i štakori) te nedostatak tauopatije. Također, slabije su okarakterizirani nego mišji modeli zbog čega su modeli transgeničnih miševa trenutno korišteniji (Drummond i Wisniewski 2017).

U fiziološkim modelima AB-a moguće je pratiti razvoj SAB, što je velika prednost u odnosu na modele transgeničnih miševa i štakora koji su limitirani na proučavanje modela FAB. Idealan fiziološki model SAB-a bi bila jedinka koja spontano razvije iste značajke SAB-a koje i ljudi. Razne vrste evolucijski srodne čovjeku (primati, zamorci, psi) koje pokazuju prirodan razvitak neuropatoloških obilježja sličnih onima u AB-u su testirane kao potencijalni modeli SAB-a u raznim istraživanjima. Prema Drummondu i Wisniewskom (2017), većina ispitanih vrsta je pokazivala A β patologiju, ali tauopatija je bila rijetka i vrlo limitirajuća, unatoč činjenici da je homologija sekvenci ljudskog tau proteina i tau proteina svake ispitane vrste visoka. Mane ovog modela AB-a leže u dugom životnom vijeku jedinki, nemogućnosti kognitivnog ispitivanja i nedostatku tauopatije.

Prednost *in vitro* istraživanja ljudskih stanica je u tome što se radi s ljudskim stanicama. Mana staničnih kultura je uvijek u tome što se ne mogu pratiti složenije interakcije među različitim tipovima stanica za koje se zna da imaju veliku ulogu u razvitku AB-a. Taj problem samo djelomično rješava 3D model stanične kulture (Choi i sur. 2014). U *in vitro* modelima, koriste se inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC, od eng. *induced pluripotent stem cells*) dobivene iz većeg broja različitih tipova (fibroblasti, krvne stanice i epitelne stanice dobivene iz urina) donorskih stanica zdravih ljudi (kontrola) i onih oboljelih od FAB-a i SAB-a. Stanične linije iPSC dobivene od donorskih stanica oboljelih od AB-a pokazuju povećanu produkciju A β , odnosno A β 42, i tau hiperfosforilaciju u usporedbi s kontrolnom skupinom (Israel i sur. 2012, Kondo i sur. 2013). Većina staničnih modela je generirana od FAB donorskih stanica i trebalo bi povećati broj SAB linija kako bi se usporedili njihovi fenotipovi, pogotovo jer su specifične FAB mutacije poistovječene sa specifičnim iPSC fenotipovima, a SAB iPSC linije bi najvjerojatnije pokazale veće fenotipske razlike (Drummond i Wisniewski 2017).

1.1.6. Liječenje

Alzheimerova bolest nastaje kao posljedica dugotrajne akumulacije učinaka velikog broja čimbenika, mnogi od kojih su već spomenuti u prethodnim poglavljima. S obzirom da nije moguće specificirati kada bolest nastaje niti kako se razvija, nije iznenađujuće da je zasad neizlječiva. Detaljnije razumijevanje nastanka i razvitka bolesti, pogotovo u njenim ranim fazama, bi moglo rezultirati metodom potpunog izlječenja ili prevencije AB-a. No, do tada će se koristiti metode usporavanja progresije bolesti i promovirati vođenje zdravog života kako bi se smanjio rizik oboljenja od AB-a (Zhang X. X. i sur. 2021). Bou i sur. (2017) opisuju da kognitivna, socijalna i intelektualna aktivnost skupa s višom edukacijom i stručnim postignućem smanjuju rizik od kognitivnog oštećenja, demencije, a time i AB-a.

Prvi način usporavanja progresije bolesti je kroz psihosocijalne metode. Pacijenti bi trebali voditi jednostavan, zdrav i uredan život uz dnevne podsjetnike i svakodnevno ponavljanje jednostavnih dnevnih zadataka u svrhu što boljeg sprječavanja gubitka pamćenja (Schachter i Davis 2000). Osim toga, nužna je obiteljska podrška kako bi se smanjio rizik za depresiju, anksioznost i nesanicu (Stern i sur. 1997).

Alternativni način usporavanja progresije AB-a je farmakoterapija. Trenutno postoje dvije odobrene klase lijekova koje se koriste za tretman AB-a, inhibitori enzima kolinesteraze (prirodni, sintetički i hibridni analozi) i antagonisti NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora (Breijyeh i Karaman 2020). Brojni fiziološki procesi AB-a uništavaju stanice koje proizvode acetilkolin (ACh) što rezultira smanjenom kolinergičnom transmisijom u mozgu. Kolinesteraza je enzim koji cijepa ACh i kada se on inhibira lijekom, razine ACh su u porastu (Sharma 2019). Receptor NMDA, kao što je prethodno opisano, prilikom aktivacije otvara kanale kroz koje kalcijevi ioni ulaze u stanicu. Tako povišena razina kalcija u stanici promovira staničnu smrt i sinaptičku disfunkciju. Stoga, antagonističkim djelovanjem lijekova na NMDA receptore, kanali se zatvaraju i sprječava se nizvodan proces odumiranja stanica i sinapsi (Wang i Reddy 2017).

Osim dvije navedene klase lijekova, istražuju se mnogi drugi smjerovi farmakoterapije koji uključuju uporabu protutijela (na A β i tau), razne modulatore (receptora, kinaza, enzima), imunoterapiju, molekule s protuupalnim djelovanjem i dr. Mnogi od tih lijekova su u kliničkim ispitivanjima od čega neki pokazuju obećavajuće djelovanje (Breijyeh i Karaman 2020).

1.2. Dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS)

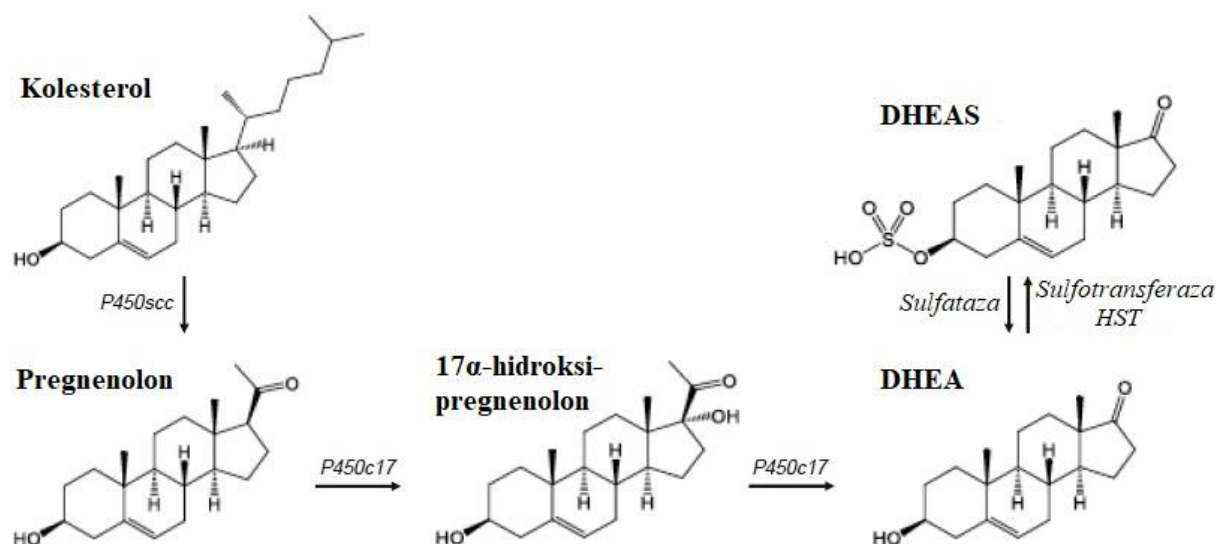
Dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) je sulfatni ester dehidroepiandrosterona (DHEA) i najobilniji steroidni hormon u ljudskom tijelu (Kaasik i sur. 2001, de Menezes i sur. 2016). Unatoč tome, fiziološki značaj, mehanizmi djelovanja i uloge DHEAS-a nisu potpuno definirani niti razjašnjeni (Maninger i sur. 2009). Kimonides i sur. (1998) su uočili da DHEAS može spriječiti ili smanjiti neurotoksičnu aktivnost u hipokampusu. Također, predložili su da pad koncentracije DHEAS-a znatno povećava osjetljivost mozga starijih ljudi i/ili mozga ljudi pod stresom na ishemiju. U mnogim raznim izvorima je zapaženo opadanje koncentracije DHEAS-a s dobi (Birkenhäger-Gillesse i sur. 1994, Berr i sur. 1996) i tijekom obolijevanja od AB-a (Näsman i sur. 1991).

Uzimajući u obzir pristojan broj istraživanja koji ukazuju na blage pozitivne i potencijalno neuroprotektivne učinke DHEAS-a, jasno je zašto se DHEAS gleda kao

obećavajući kandidat farmakoterapije raznih bolesti usko povezanih s neurodegeneracijom, starenjem mozga i stresom, poput AB-a.

1.2.1. Sinteza i metabolizam

Dehidroepiandrosteron-sulfat (5-androsten-3- β -ol-17-on sulfat) je steroid s 19 atoma ugljika i nastaje iz molekule DHEA, koja se sintetizira *de novo* iz kolesterola nizom kemijskih reakcija (Slika 8). Prvi korak je hormonski reguliran i posredovan mitohondrijskim enzimom citokromom P450_{scc} koji konvertira kolesterol u pregnenolon. Nakon toga se pregnenolon konvertira u DHEA pomoću enzima citokroma P450_{c17} koji katalizira dvije reakcije, 17 α hidroksilaciju pregnenolona i 7,20-liazu 17-OH pregnenolona. Sulfacijom DHEA, koju katalizira enzim hidroksteroid sulfotransferaza (HST), nastaje stabilniji spoj DHEAS. Enzim steroidna sulfataza (STS) omogućuje povratnu reakciju (Maninger i sur. 2009).



Slika 8. Shematski prikaz sinteze DHEAS-a sa strukturama kemijskih spojeva.

(Preuzeto i prilagođeno iz Maninger i sur. 2009 i Švob Štrac i sur. 2020)

Opisana sinteza DHEAS-a se odvija u *zoni reticularis* kore nadbubrežne žlijezde, testisima i jajnicima, odakle se i izlučuje. Međutim, obilna prisutnost DHEAS-a u mozgu upućuje na to da se najvjerojatnije sintetizira i ondje, zbog čega je spoj klasificiran kao neurosteroid (Maninger i sur. 2009).

1.2.2. Mehanizam djelovanja

U pravilu, steroidni hormoni reguliraju transkripciju gena tako što se vežu za receptore u citoplazmi ili jezgri nakon čega u jezgri djeluju direktno na odgovarajuće regije DNA (Maninger i sur. 2009). Međutim, do danas nije otkriven nijedan nuklearni steroidni receptor s visokim afinitetom za DHEAS (Widstrom i Dillon 2004). Mehanizmi djelovanja DHEAS-a

nisu potpuno razjašnjeni, ali je pokazano da DHEAS može djelovati indirektno konverzijom u aktivnije spolne hormone (npr. testosteron i estradiol) ili konverzijom u njegove metabolite te aktivacijom androgenih ili estrogenih receptora u tkivu (Maninger i sur. 2009).

Webb i sur. (2006) opisuju da DHEAS utječe na neke receptore i pokazuje slabiji afinitet za neka vezna mjesta. Specifično, DHEAS u mozgu djeluje kao antagonist receptora γ -aminomaslačne kiseline tipa A (GABA_A, od eng. *γ -aminobutyric acid*), stimulans receptora NMDA i agonist sigma receptora podtipa 1 (σ_1). Agonističko djelovanje na receptor σ_1 omogućuje modulaciju kolinergičnih receptora i posredno agonističko djelovanje na NMDA receptor. DHEAS pokazuje neuroprotektivni učinak pri djelovanju na sva tri navedena receptora (Webb i sur. 2006, Maninger i sur. 2009).

Maninger i sur. (2009) su opisali još neke mehanizme djelovanja DHEAS-a. Tako se zna da on povećava ekspresiju tirozin hidroksilaze (TH), što dovodi do povećane sinteze katekolamina, stimulira depolimerizaciju aktina i rastavljanje submembranskog aktinskog filameta, čime povećava sekreciju katekolamina, inhibira aktivaciju transkripcije NF- κ B posredovanu reaktivnim kisikovim vrstama (ROS, od eng. *reactive oxygen species*) i dr.

Najvažnije fiziološke uloge DHEAS-a u središnjem živčanom sustavu sažeto su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Neurobiološko djelovanje DHEAS-a.

(Preuzeto i prilagođeno iz Maninger i sur. 2009)

Neuroprotekcija	Štiti neurone od ekscitotoksičnosti (inducirana NMDA-om, glutamatima, kolhicinom i GABA-om), štiti oštećene neurone nakon moždanog udara i nedostatka kisika i glukoze
Neurogeneza, rast i preživljenje neurona	Povećava duljinu neurita te brojnost neurona i astrocita, potiče preživljenje neurona i njima nalik stanica (utječe na sintezu BDNF-a)
Apoptoza	Štiti neurone od serumski inducirane apoptoze, ali smanjenjem aktivnosti protein kinaze Akt može pojačati apoptozu
Antioksidativno i protuupalno djelovanje	Smanjuje proces peroksidacije lipida i proizvodnju proupalnih citokina, inhibira aktivaciju NF- κ B (TNF- α , ROS i H ₂ O ₂ putevi) i AP1
Sinteza i sekrecija katekolamina	Potiče sintezu katekolamina (dopamina i norepinefrina) i njihovu sekreciju

Kratice: BDNF – moždani neurotrofni čimbenik, NF- κ B – nuklearni faktor kapa-B, TNF- α – faktor nekroze tumora alfa, H₂O₂ – vodikov peroksid, AP1 – protein aktivator 1.

1.2.3. Uloga u Alzheimerovoj bolesti

Razine DHEAS-a u ljudi oboljelih od AB-a su značajno manje nego one u zdravih ljudi iste dobi. Taj obrazac je uočen u *post-mortem* analizama mozga i CSF-a (Weill-Engerer i sur. 2002) i kliničkim ispitivanjima krvne plazme i seruma (Hillen i sur. 2000, Ray i sur. 2013). Pan i sur. (2019) su sumirali veći broj istraživanja te proveli meta-analizu čime se podupire ista poveznica na većem broju uzoraka. Sukladno tome, koncentracije DHEAS-a su u negativnoj korelaciji s glavnim obilježjima AB-a, A β plakovima i hiperfosforiliranim tau proteinima (Weill-Engerer i sur. 2002). Uočavajući te obrasce, postavlja se pitanje jesu li snižene razine DHEAS-a rezultat patoloških procesa ili rizični faktor AB-a. Stoga je bitno istražiti mehanizme djelovanja DHEAS-a i dalje ispitati potencijalne učinke njegove primjene kao suplementa u ljudi oboljelih od AB-a.

Unatoč zamijećenju negativnoj korelaciji DHEAS-a i A β plakova, izravni mehanizmi djelovanja jednog na drugo su slabo istraženi, a veći broj istraživanja usmjeren je na DHEA. Tako je pokazano da DHEA utječe na metabolizam APP-a, čija deregulacija vodi prema akumulaciji plakova (Gandy S. 1999, 2002), ublažava smrtnost stanica uzrokovanu akumulacijom A β svojim agonističkim djelovanjem na $\sigma 1$ receptore (Li i sur. 2010) i smatra se da povećana koncentracija A β -a može potaknuti alternativni put sinteze DHEA (Brown i sur. 2000). Također, pokazano je i da DHEAS ublažava povišenje kalcija uzrokovano peptidima A β , što upućuje na njegov neuroprotektivan učinak (Kawahara i sur. 2009). S obzirom na laku konverziju između DHEA i DHEAS i njihovih isprepletenih regulacijskih uloga (Maninger i sur. 2009, do Vale i sur. 2014), moguće je da obje molekule dijele spomenute mehanizme djelovanja.

Što se tiče poveznice DHEAS-a i tau proteina i PHF, razni neurosteroidi poput DHEA i DHEAS-a potencijalno mogu utjecati na fosforilaciju tau proteina zbog njihove uloge u održanju redoks homeostaze (Grimm i sur. 2016). Pokazano je da podizanje razina neurosteroida rezultira povećanom ekspresijom tau proteina divljeg tipa i smanjenom ekspresijom hiperfosforiliranog tau proteina (Grimm i sur. 2012) što bi u konačnici smanjilo broj NFT-a i PHF-a.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati potencijalni učinak neurosteroida dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) u promociji preživljenja stanica dvaju *in vitro* modela Alzheimerove bolesti (AB), primarne kulture mišjih neurona i stanične linije SH-SY5Y, tretiranih oligomerima amiloida beta ($A\beta$).

Pritom su postavljeni sljedeći konkretni ciljevi istraživanja:

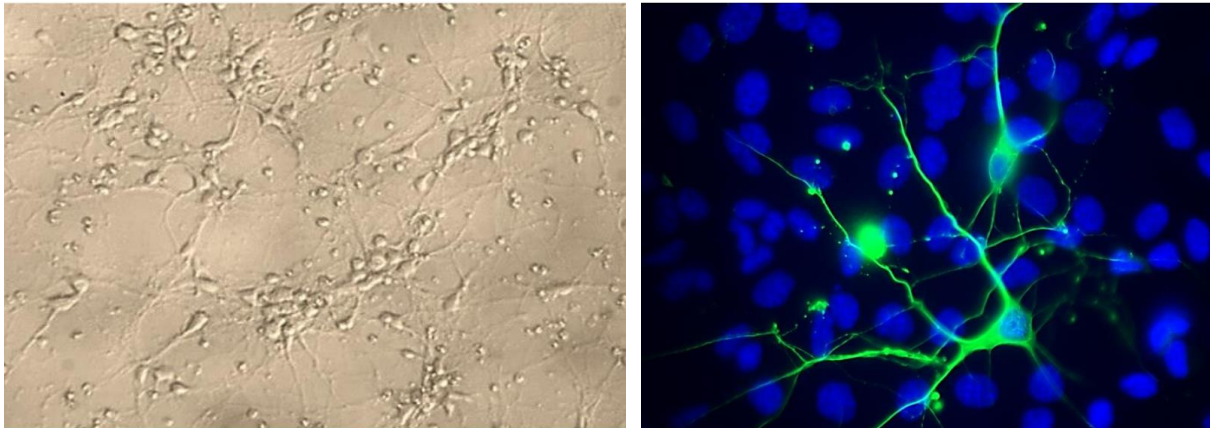
1. Uspostaviti primarnu kulturu kortikalnih neurona izoliranih iz mozga embrija miša soja C57BL/6.
2. Uspostaviti *in vitro* modele AB-a bazirane na primarnoj kulturi mišjih neurona i staničnoj liniji SH-SY5Y.
3. Ispitati učinak DHEAS-a na preživljenje stanica u oba *in vitro* modela AB-a.
4. Ispitati učinak DHEAS-a na apoptotski put stanica u oba *in vitro* modela AB-a

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Primarna kultura mišjih neurona

Primarnu kulturu mišjih neurona (Slika 9) koju sam koristio u ovom istraživanju sam uspostavio izolacijom kortikalnih neurona iz mozгова embrija C57BL/6 mišice u gestacijskoj dobi od 15 dana prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.

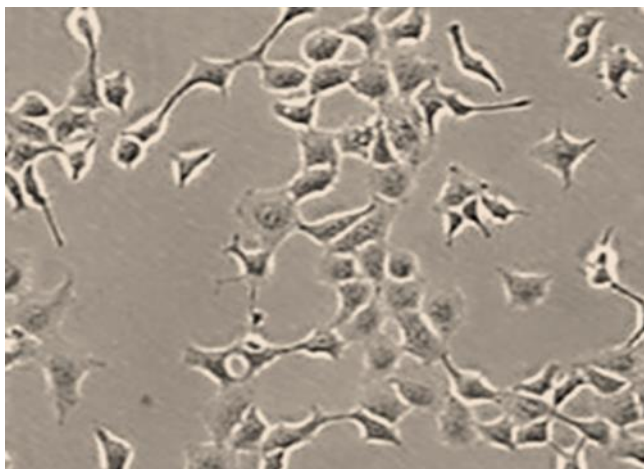


Slika 9. Primarna kultura mišjih kortikalnih neurona uspostavljena u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković. Lijevo je primarna kultura neurona je prikazana pomoću svjetlosnog invertnog mikroskopa, a desno pomoću fluorescentnog mikroskopa nakon obilježavanja Hoechst (jezgra) bojom i fluorescentno obilježenim protutijelom na beta tubulin (tijelo).

3.1.2. Stanična linija neuroblastoma SH-SY5Y

Stanice SH-SY5Y (Slika 10) su trostruki subklon roditeljske stanične linije neuroblastoma SK-N-SH, originalno izolirane biopsijom koštane srži iz 4-godišnjeg djeteta koje je oboljelo od neuroblastoma (Biedler i sur. 1973). Točnije, SH-S linija je subklon SK-N-SH linije, iz koje je dobiven subklon SH-S5 stanična linija čijim je trećim subkloniranjem dobivena SH-SY5Y linija. Subklonovi se genetički razlikuju u odnosu na klonove stanične linije iako su dobiveni iz iste kulture, što je ostvarivo jer stanice neuroblastoma tijekom par mjeseci uzgoja gube svoju morfološku homogenost (Biedler i sur. 1978). SH-SY5Y stanice imaju stabilan kariotip koji se sastoji od 47 kromosoma. Prema Shipleyu i sur. (2016), one se mogu diferencirati iz stanica nalik neuroblastu u zrele ljudske neurone djelovanjem retinoične kiseline, forbol estera i specifičnih neurotrofina poput moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF od eng. *Brain-derived neurotrophic factor*). Druga istraživanja (Påhlman i sur. 1984, Xie i sur. 2010) ukazuju da se primjenom raznih metoda SH-SY5Y stanice mogu specifično diferencirati u adrenergične, kolinergične i dopaminergične neurone. Zbog toga se ove stanice

koriste u raznim neurobiološkim eksperimentima, uključujući *in vitro* model Alzheimerove bolesti, što su 2010. opisali Agholme i sur. U ovom radu sam koristio nediferencirane SH-SY5Y stanice.



Slika 10. Stanična linija SH-SY5Y prikazana pomoću svjetlosnog invertnog mikroskopa u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković.

3.1.3. Popis kemikalija

- 1X Hankova balansirana otopina soli (HBSS, od eng. *Hanks' Balanced Salt Solution*) (Lonza)
- 0,1 M boratni pufer
 - 1,24 g borne kiseline (Roth)
 - 1,9 g boraxa (VWR)
 - redestilirana sterilna voda do konačnog volumena 500 mL
 - pH 8,5
 - steriliziran filtriranjem kroz filter (0,2 μm)
- Otopina poli-D-lizina (4 mg/mL)
 - 10 mg poli-D-lizina (Sigma)
 - 2,5 mL boratnog pufera
 - sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 μm)
- Matična otopina DNAze (10 mg/mL)
 - DNAza (Sigma) otopljena u HBSS-u (Lonza)
 - sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 μm)
- Trituracijska otopina
 - 0,5 g Albumaxa (Gibco)
 - 25 mg inhibitora tripsina (Sigma)

- 50 µL matične otopine DNAze (10 mg/mL)
- 50 mL HBSS-a (Lonza)
- sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 µm)
- 2,5% tripsin (10X) (Invitrogen)
- B27 suplement (50X) (Gibco)
 - odmrznut preko noći na 4°C dan prije kreiranja medija
- Neurobazalni medij (Gibco) – za kompletirani neurobazalni medij dodati:
 - 0,5 mM L-glutamina (Sigma)
 - 100 U/mL penicilina (Sigma)
 - 100 µg/mL streptomicina (Sigma)
 - 1X B27 suplementa (Gibco)
 - pH 7,4
- Medij za uzgoj stanica DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) s visokim udjelom (4500 mg/L) glukoze – za kompletirani medij dodati:
 - 10% fetalni goveđi serum (Gibco) inaktiviran 60 min na 56°C
 - 2 mM L-glutamina (Sigma)
 - 100 U/mL penicilina (Sigma)
 - 100 µg/mL streptomicina (Sigma)
 - 2,5 µg/mL amfotericina B (Sigma)
 - pH 7,4
- Pufferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBSA)
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 8,1 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
 - pH 7,4
- Dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma)
- Oligomeri amiloid beta 42 (Aβ42) (10 µM)
 - tanki sloj Aβ42 otopljen u 2 µL DMSO (Sigma)
 - 98 µL hladnog DMEM/F12 medija
- DHEAS (1 mg/mL) (Supelco) otopljen u metanolu
 - razrjeđivanje do radne koncentracije (10 µM) u redestiliranoj sterilnoj vodi

- razrjeđivanje radne do konačnih koncentracija (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) u redestiliranoj sterilnoj vodi
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) (0,5 mg/mL) (Sigma)
- *MT Cell Viability Substrate* (1000X) i *NanoLuc[®] Luciferase* (1000X) (Promega)
- Hoechst 33342 (Sigma) radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi (1 µg/mL)
- Propidijev jodid (Sigma) radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi (1 µg/mL)
- *Caspase-Glo[®] 3/7 Buffer* i *Caspase-Glo[®] 3/7 Substrate* (liofilizirani) (Promega)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ploča za nasadivanje

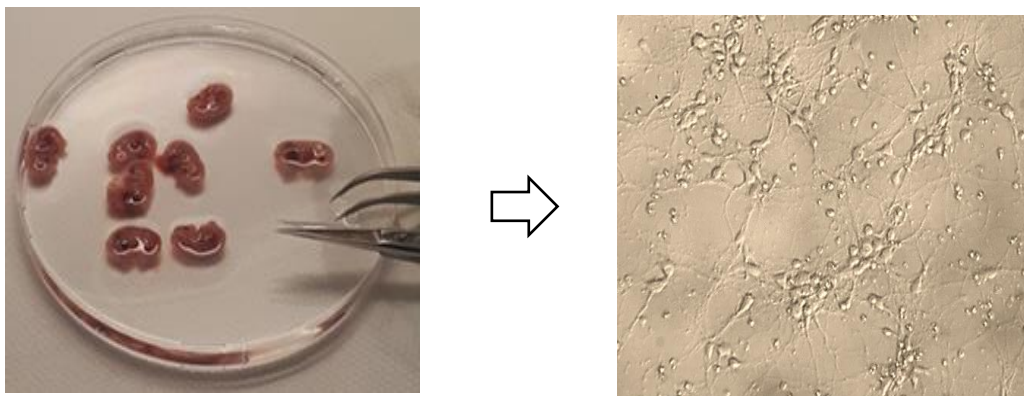
Dan prije izolacije neurona sam razrijedio otopinu poli-D-lizina (4 mg/mL) boratnim puferom do konačne koncentracije 0,02 mg/mL. Otopinu sam sterilizirao filtriranjem kroz filter (0,2 µm). U svaku jažicu ploča za uzgoj stanica sam dodao radnu otopinu poli-D-lizina (0,02 mg/mL). Pritom sam u jažice ploča s 12 jažica dodao 1 mL, a u one s 96 jažica sam dodao 200 µL radne otopine poli-D-lizina. Ploče sam zatim prekrrio aluminijskom folijom i stavio ih inkubirati (37°C, 5% CO₂) preko noći. Prije nasadivanja neurona, odsisao sam poli-D-lizin iz jažica te ih isprao sterilnom vodom tri puta. U jažice sam zatim dodao DMEM u istim volumenima kao i otopinu poli-D-lizina te sam vratio ploče u inkubator.

3.2.2. Izolacija primarne kulture mišjih neurona

Eutanaziju gravidne mišice cervikalnom dislokacijom je provela ovlaštena i licencirana osoba iz jedinice za uzgoj životinja "Pogon laboratorijskih životinja" u sklopu Instituta Ruđer Bošković. Nakon toga sam izolirao kortikalne neurone iz mozgovog embrija mišice soja C57BL/6 u gestacijskoj dobi od 15 dana prema modificiranom postojećem protokolu (Hilgenberg i Smith 2007). U skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste za znan. svrhe, Zakonom o zaštiti životinja NN 102/17, 32/19, i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znan. svrhe NN 55/13, te njegovim izmjenama NN 39/17, postupci na žrtvovanim životinjama u svrhu izolacije organa radi dobivanja primarnih staničnih kultura ne smatraju se pokusom i za njih nije potrebna dozvola Etičkog povjerenstva.

Iz maternice eutanazirane mišice sam izolirao embrije i položio ih u sterilnu Petrijevu posudu ispunjenu HBSS-om (Slika 11, lijevo). Nakon dekapitacije embrija izdvojio sam njihove mozgovce. Pod lupom sam pažljivo odvojio korteks izoliranih mozgovog embrija i

uklonio moždane ovojnice. Izolirani korteks sam prebacio u plastičnu epruvetu i isprao s 10 mL HBSS-a. Nakon ispiranja sam u epruvetu dodao 5 mL sterilnog HBSS-a i 100 μ L 2,5% tripsina i ostavio inkubirati 20 min (37°C, 5% CO₂), lagano miješajući epruvetu svakih 5 min. Nakon toga sam dodao 5 mL DNaze (10 μ g/mL), blago pomiješao njen sastav okrećući epruvetu dva puta i uklonio supernatant odsisavanjem. Dodao sam 1 mL otopine za trituiranje i koristeći staklenu Pasteurovu pipetu sam trituirao sastav iz epruvete točno 10 puta. U trituiranu staničnu suspenziju sam dodao DMEM (1 mL po izoliranom mozgu) nakon čega sam otopinu profiltrirao kroz cjedilo s porama (70 μ m) u plastičnu epruvetu od 50 mL. Otopinu sam stavio centrifugirati 5 min (300x g) nakon čega sam talog resuspendirao u 1 mL DMEM-a po izoliranom mozgu.



Slika 11. Embriji izolirani iz C57BL/6 mišice (lijevo) i kortikalni neuroni izolirani iz njihovih mozgov (desno) u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković. Mišji neuroni su prikazani pomoću svjetlosnog invertnog mikroskopa.

3.2.3. Nasađivanje primarne kulture mišjih neurona

Koncentraciju stanica sam odredio u 10 μ L stanične suspenzije pomoću uređaja za brojanje stanica LUNA-II Automated Cell Counter (Logos Biosystems).

S prethodno pripremljenih ploča za uzgoj, obloženih poli-D-lizinom, sam odsisao DMEM i na njih nasađio neurone. U jažice ploča s 12 jažica sam nasađio 3 x 10⁵ stanica u ukupnom volumenu od 1 mL, a u one s 96 jažica 4 x 10⁴ stanica u ukupnom volumenu od 200 μ L. Dva sata nakon nasađivanja sam DMEM zamijenio kompletiranim neurobazalnim medijem i stavio kultivirati u inkubator (37°C, 5% CO₂), mijenjajući neurobazalni medij svaka 3 dana.

3.2.4. Uspostava i održavanje kulture SH-SY5Y stanica

Epruvetice sa zamrznutim stanicama sam izvadio iz spremnika s tekućim dušikom i odmrznuo ih u vodenoj kupelji pri 37°C. Nakon toga sam stanice stavio u 5 mL DMEM hranjivog medija, prethodno zagrijanog do 37°C, i stavio centrifugirati 5 min (300x g). Talog

sam resuspendirao u novih 5 mL DMEM-a zagrijanog do 37°C. Staničnu suspenziju sam prenio u bočicu za uzgoj staničnih kultura (75 cm², 250 mL) uz dodatak 5 mL DMEM-a i sve sam stavio inkubirati (37°C, 5% CO₂).

Nakon što su SH-SY5Y stanice postigle konfluentnost, rasađivao sam ih na ploče s 12 i 96 jažica. Prvo sam odsisao medij iz bočica za uzgoj stanica i stanice sam isprao dva puta otopinom PBSA. Nakon toga sam za odizanje stanica od podloge dodao 0,05% tripsina i stavio ih inkubirati 1 min (37°C, 5% CO₂). Dodatkom DMEM-a sam postigao inaktivaciju tripsina nakon čega sam stanice resuspendirao. Samo dio stanične suspenzije sam dalje koristio za nasadivanje na ploče za uzgoj, a ostatak sam uz dodatak medija vratio na inkubaciju.

Isto kao i s neuronima, suspenziji SH-SY5Y stanica sam odredio koncentraciju koristeći uređaj za brojanje stanica. Nakon toga sam nasadio SH-SY5Y stanice na ploče za uzgoj u koncentraciji 5 x 10⁴ stanica/mL.

3.2.5. Uspostava *in vitro* modela AB-a

Za uspostavu *in vitro* modela Alzheimerove bolesti (AB), obje kulture (mišjih neurona i SH-SY5Y stanica) sam podvrgnuo 24-satnom tretmanu oligomerima amiloid beta 42 (Aβ42) koncentracije 10 μM. Prilikom toga sam kao kontrolu Aβ42 tretmana koristio oba tipa stanica tretiranih samo otapalom oligomera Aβ42, heksafluorizopropanolom (HFIP).

3.2.6. Tretman *in vitro* modela AB-a baziranog na primarnoj kulturi mišjih neurona DHEAS-om

Za utvrđivanje optimalne koncentracije tretmana DHEAS-om, *in vitro* model AB-a baziran na primarnoj kulturi mišjih neurona sam tretirao različitim dozama DHEAS-a: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M. Kotretman primarnih kultura mišjih neurona na pločama s 12 i 96 jažica oligomerima Aβ42 (10 μM) i različitim koncentracijama DHEAS-a trajao je 24 h. Usporedne grupe su kontrolna grupa (neuroni tretirani otapalom oligomera Aβ42, HFIP-om), Aβ grupa (neuroni tretirani samo oligomerima Aβ42 u koncentraciji 10 μM) te Aβ+DHEAS grupe (neuroni tretirani oligomerima Aβ42 u koncentraciji 10 μM i različitim koncentracijama DHEAS-a). Nakon toga sam provođenjem testova vijabilnosti (MTT i *RealTime-Glo*[®] *MT Cell Viability*) ispitao učinak djelovanja različitih koncentracija DHEAS-a. Pritom sam kao usporedne skupine koristio neurone tretirane HFIP-om te neurone tretirane samo oligomerima Aβ42.

3.2.7. Tretman *in vitro* modela AB-a baziranog na kulturi neuroblastoma DHEAS-om

Za uspostavu *in vitro* modela AB-s baziranog na kulturi stanica SH-SY5Y, koristio sam DHEAS u koncentraciji 10^{-7} M za koju sam utvrdio da je imala optimalno djelovanje u *in vitro* modelu AB-a baziranom na primarnoj kulturi mišjih neurona. Izvršio sam tretman kulture neuroblastoma oligomerima A β 42 (10 μ M) i DHEAS-om (10^{-7} M), a potom ispitao učinak djelovanja tretmana MTT testom. Pritom sam kao usporedne skupine koristio stanice SH-SY5Y tretirane HFIP-om te stanice tretirane samo oligomerima A β 42.

3.2.8. Mjerenje vijabilnosti stanica

Kod MTT testa sam mjerio apsorbanciju pri valnoj duljini 570 nm, a kod *RealTime-Glo*[®] *MT Cell Viability* testa intenzitet luminiscencije. U oba testa sam za svaku grupu od oba modela napravio 6 mjerenja. Rezultate za oba testa sam prikazao kao postotak vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu, a izračun sam proveo prema idućim formulama:

$$\text{Vijabilnost stanica (\%)} = \frac{A(\text{test}) - A(\text{negativna kontrola})}{A(\text{kontrola}) - A(\text{negativna kontrola})} \cdot 100$$

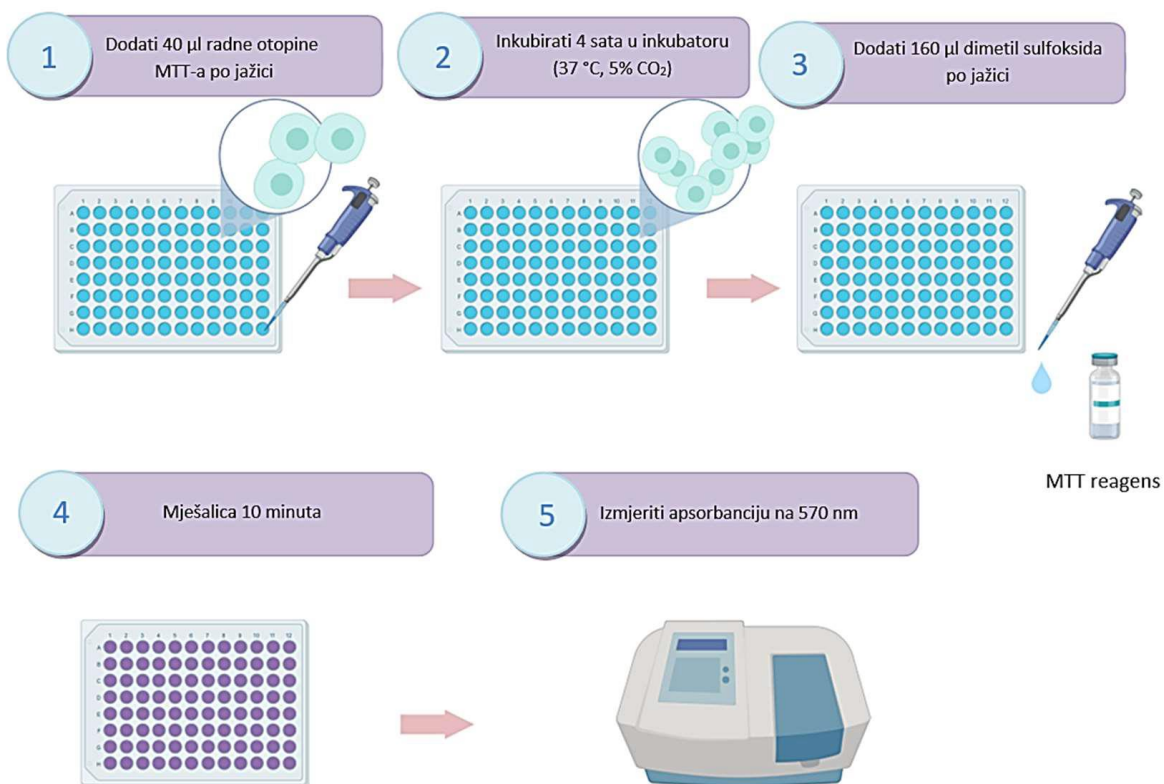
$$\text{Vijabilnost stanica (\%)} = \frac{L(\text{test}) - L(\text{negativna kontrola})}{L(\text{kontrola}) - L(\text{negativna kontrola})} \cdot 100$$

Gdje je A apsorbancija, L intenzitet luminiscencije, a negativna kontrola su jažice bez stanica (prosječna pozadinska apsorbancija/luminiscencija) što služi kao korekcija.

3.2.8.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijski test koji se bazira na redukciji topive žute MTT tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) u netopivi formazan ljubičaste boje. Posrednici te reakcije su NAD(P)H-ovisne oksidoreduktaze koje su funkcionalne samo u vijabilnim stanicama. Količina formazana se kvantificira mjerenjem apsorbancije pri 570 nm, što je direktno proporcionalno broju živih stanica u kulturi.

Matičnu otopinu MTT-a sam razrijedio u mediju za uzgoj stanica do konačne koncentracije 0,5 mg/mL. Prethodno tretiranim i kontrolnim stanicama nasađenim na ploči za uzgoj stanica s 96 jažica sam uklonio medij i potom dodao 40 μ L otopine MTT-a (0,5 mg/mL) u svaku jažicu. Nakon inkubacije (4 h pri 37°C, 5% CO₂) sam dodao 160 μ L DMSO-a u svaku jažicu. Ploču sam stavio na orbitalnu miješalicu 10 min kako bi se sastav jažica dobro promiješao. Apsorbanciju sam mjerio pri valnoj duljini od 570 nm koristeći čitač mikrotitarskih ploča (Thermo Labsystems Multiskan EX Micrplate Reader) (Slika 12).



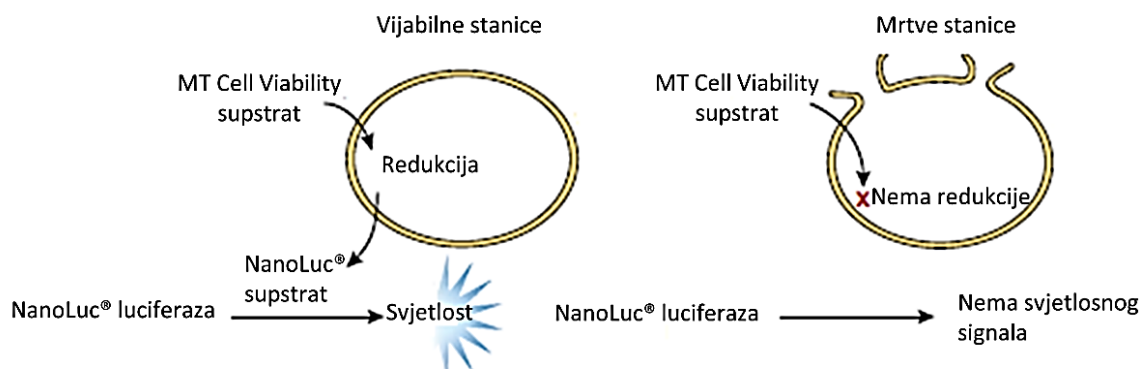
Slika 12. Shematski prikaz postupka MTT testa.

(Preuzeto i prilagođeno iz <https://theferalexplorer.wordpress.com/2019/07/05/understanding-mtt-assay/>)

3.2.8.2. *RealTime-Glo*[®] *MT Cell Viability*

RealTime-Glo[®] *MT Cell Viability* (Promega) test omogućuje mjerenje vijabilnosti stanica u stvarnom vremenu. Testom se mjeri broj vijabilnih stanica u kulturi na način da se mjeri reducirajući potencijal stanica i time njihova metabolička aktivnost. Test se temelji na dodavanju *MT Cell Viability* supstrata u staničnu kulturu kojeg vijabilne stanice reduciraju. Redukcijom se stvara produkt koji difundira iz vijabilnih stanica u okolni medij gdje služi kao supstrat za enzim *NanoLuc*[®] luciferazu. Reakcijom luciferaze i njegova supstrata nastaje luminiscentni signal koji je direktno proporcionalan broju vijabilnih stanica (Slika 13).

Test sam provodio na pločama s 96 jažica koje su sadržavale tretirane i kontrolne stanice pri čemu je konačni volumen svake jažice bio 100 µL. *MT Cell Viability Substrate* (1000X) i *NanoLuc*[®] luciferazu (1000X) sam zagrijao do 37°C. Obje otopine sam razrijedio u odgovarajućem staničnom mediju do konačne koncentracije 2X i dodao po 100 µL pripremljene otopine u jažice s prethodno tretiranim stanicama. Intenzitet luminiscencije sam izmjerio nakon inkubacije od 30 minuta koristeći luminometar Tecan Infinite M200.



Slika 13. Shematski prikaz principa *RealTime-Glo® MT Cell Viability* testa vijabilnosti.

(Preuzeto i prilagođeno iz https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/realtime_glo-mt-cell-viability-assay/?catNum=G9711)

3.2.9. Detekcija stanične smrti

Za detekciju stanične smrti koristio sam fluorescentne boje Hoechst 33342 i propidijev jodid. Hoechst 33342 je plava boja koja prolazi kroz membranu i unutar stanice se veže na adenin-timin (A-T) regije DNA u jezgri. Kako je kromatin apoptotičnih stanica kompaktniji od onog iz neapoptotičnih stanica, Hoechst 33342 daje znatno jači signal u slučaju apoptotične stanice. Hoechst 33342 ima maksimume ekscitacije i emisije pri valnim duljinama 361 i 497 nm. Propidijev jodid je crvena DNA-interkalirajuća boja koja, za razliku od Hoechsta 33342, ne može proći kroz staničnu membranu. Stoga se ovom bojom mogu prikazati nekrotične stanice čija je stanična membrana raspadnuta. Propidijev jodid u slobodnom obliku postiže ekscitaciju i emisiju pri valnim duljinama 493 i 636 nm, a ukoliko je vezan na DNA, pri valnim duljinama 535 i 617 nm.

Za ovaj dio istraživanja, koristio sam prethodno tretirane i kontrolne stanice oba tipa (mišji neuroni i SH-SY5Y stanice) na pločama s 12 jažica. U svaku jažicu sam dodao 1 μ L Hoechsta 33342 i 1 μ L propidijeva jodida te ostavio inkubirati 3 min u zamračenoj prostoriji na sobnoj temperaturi. Apoptotične i nekrotične stanice sam zatim vizualizirao i prebrojao koristeći EVOS Flويد Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific). Za detekciju fluorescencije korišteni su plavi filter za Hoechst 33342 (ekscitacija 357 nm, emisija 447 nm) i crveni za propidijev jodid (ekscitacija 531 nm, emisija 593 nm).

Stanice sam brojao manualno pod EVOS Flويد Cell Imaging Station fluorescentnim mikroskopom, pritom brojeći nekrotične i apoptotične stanice te ukupan broj stanica unutar vidnog polja. Postupak sam za svaku grupu kod oba modela ponovio 3 puta nakon čega sam udjele nekrotičnih i apoptotičnih stanica izrazio u postocima prema idućim formulama:

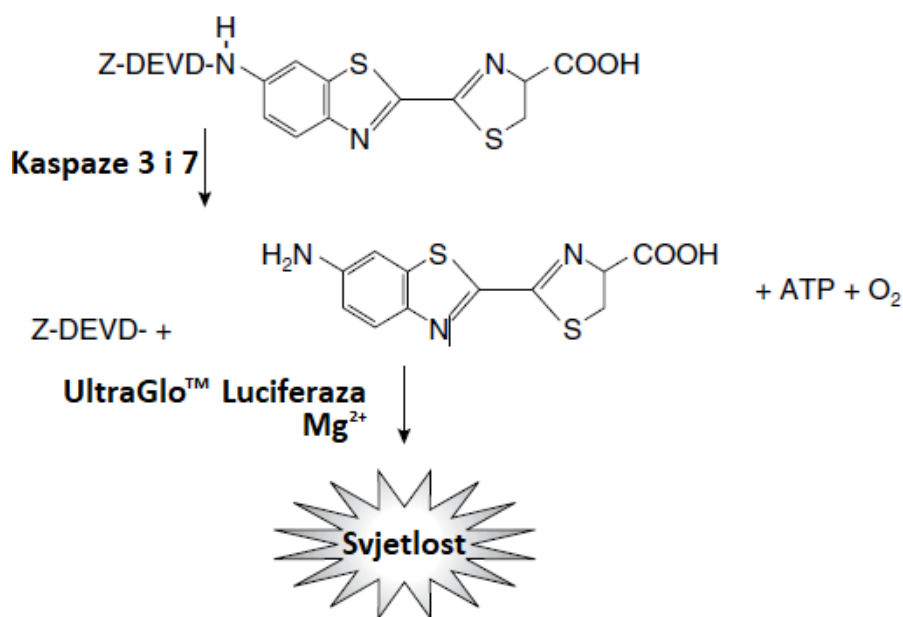
$$\text{Udio nekrotičnih stanica (\%)} = \frac{\text{Broj nekrotičnih stanica}}{\text{Ukupan broj stanica}} \cdot 100$$

$$\text{Udio apoptotičnih stanica (\%)} = \frac{\text{Broj apoptotičnih stanica}}{\text{Ukupan broj stanica}} \cdot 100$$

Pritom je važno napomenuti da sam za ovaj eksperiment svaki tretman provodio u monoplikatu.

3.2.10. Ispitivanje kaspazne aktivnosti

Za ovaj korak, koristio sam *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay (Promega) test. Kaspazna aktivnost se ovim testom određuje dodajući luminogeni DEVD-peptidni supstrat za kaspaze 3 i 7 i *Ultra-Glo*[™] rekombinantnu termostabilnu luciferazu. Kaspaze 3 i 7 cijepaju luminogeni supstrat na luciferin, koji je dalje supstrat za luciferazu, a njihovom reakcijom se stvara svjetlost (Slika 14). Intenzitet svjetlosti je direktno proporcionalan aktivnosti kaspaza 3 i 7 što je dalje proporcionalno broju stanica u apoptozi.



Slika 14. Shematski prikaz principa *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa kaspazne aktivnosti stanica.

(Preuzeto i prilagođeno iz tehničkog priručnika *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa dostupnom na https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090)

Prije analize sam čitavi sastav boce s *Caspase-Glo 3/7*[®] puferom prenio u jantarnu bocu koja sadrži *Caspase-Glo 3/7*[®] supstrat. Sadržaj sam promiješao naizmjenice vrteći i okrećući bocu 20-ak sekundi dok se supstrat nije potpuno otopio, sada tvoreći *Caspase-Glo 3/7*[®] reagens.

Ploče s 96 jažica s tretiranim i kontrolnim stanicama oba tipa (mišji neuroni i SH-SY5Y stanice), s ukupnim volumenom 100 μL, sam izvadio iz inkubatora i ostavio da se ohlade do

sobne temperature. Nakon toga sam dodao 100 μ L *Caspase-Glo 3/7*[®] reagensa u svaku jažicu. Ploču sam prekrrio poklopcem i stavio miješati 30-ak sekundi na orbitalnu miješalicu pri brzini 300-500 okretaja/min. Nakon 30 min inkubacije pri sobnoj temperaturi, izmjerio sam luminiscenciju svakog uzorka koristeći uređaj Tecan Infinite M200.

Kod *Caspase-Glo 3/7*[®] *Assay* testa je kaspazna aktivnost u stanicama proporcionalna intenzitetu luminiscencije. Kod oba modela sam za svaku grupu napravio 6 mjerenja. Kaspaznu aktivnost stanica sam prikazao kao postotak promjene u odnosu na kontrolu prema idućoj formuli:

$$\text{Kaspazna aktivnost stanica (\%)} = \frac{L(\text{test}) - L(\text{kontrola})}{L(\text{kontrola})} \cdot 100$$

Gdje je L intenzitet luminiscencije.

3.2.11. Statistička obrada podataka

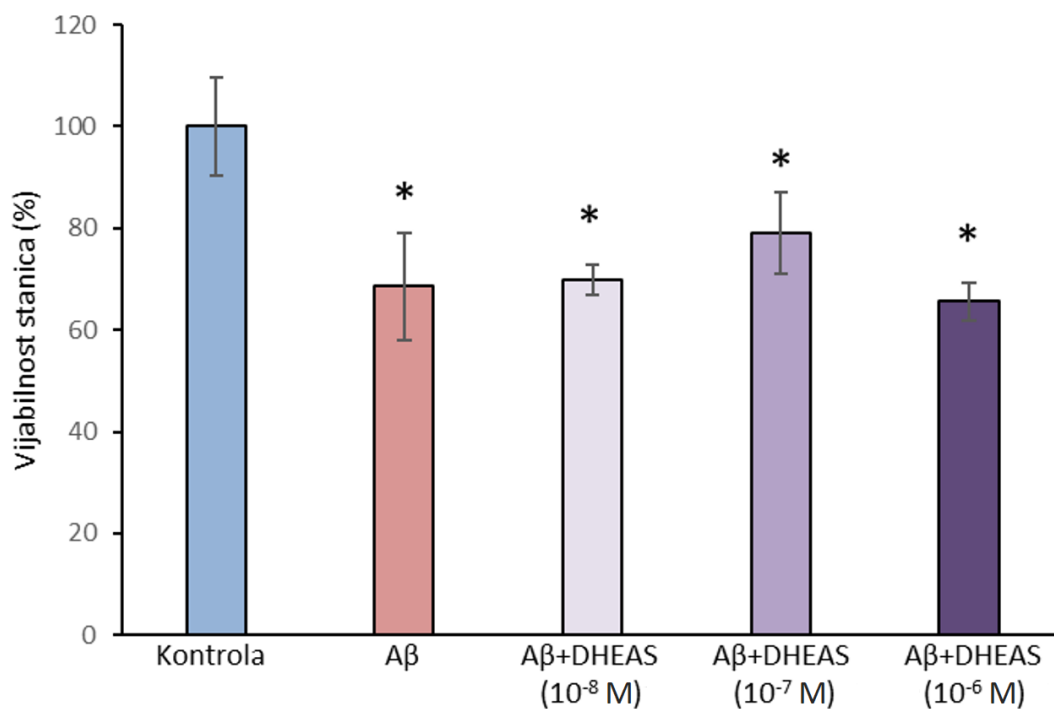
Dobivene rezultate sam statistički obradio koristeći program Sigma Stat (Jandell Scientific Corp., SAD). Grafičke prikaze rezultata sam izradio koristeći program Microsoft Excel. Za provjeru normalnosti razdiobe korištenih podataka koristio sam Kolmogorov-Smirnov test. Kako su sve skupine podataka imale normalnu razdiobu ($p > 0,05$), za njihovu daljnju analizu sam koristio parametrijske statističke testove. S obzirom da sam uspoređivao više od dvije tretmanske skupine, koristio sam jednostruku analizu varijance (ANOVA) popraćenu *post-hoc* Tukey testom kako bih usporedio sve skupine međusobno i utvrdio postojanje pojedinačnih razlika. Za svaki tretman, osim kod određivanja tipa stanične smrti, sam imao 6 mjerenja čije sam rezultate prikazao kao njihovu srednju vrijednost i standardnu devijaciju. Razinu značajnosti α sam postavio na 0,05 za sve analize, a korišteni testovi su bili dvosmjerni. Rezultate detekcije stanične smrti sam dobio manualnim prebrojavanjem stanica pomoću programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4. REZULTATI

4.1. Vijabilnost primarne kulture mišjih neurona

4.1.1. Vijabilnost neurona određena MTT testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

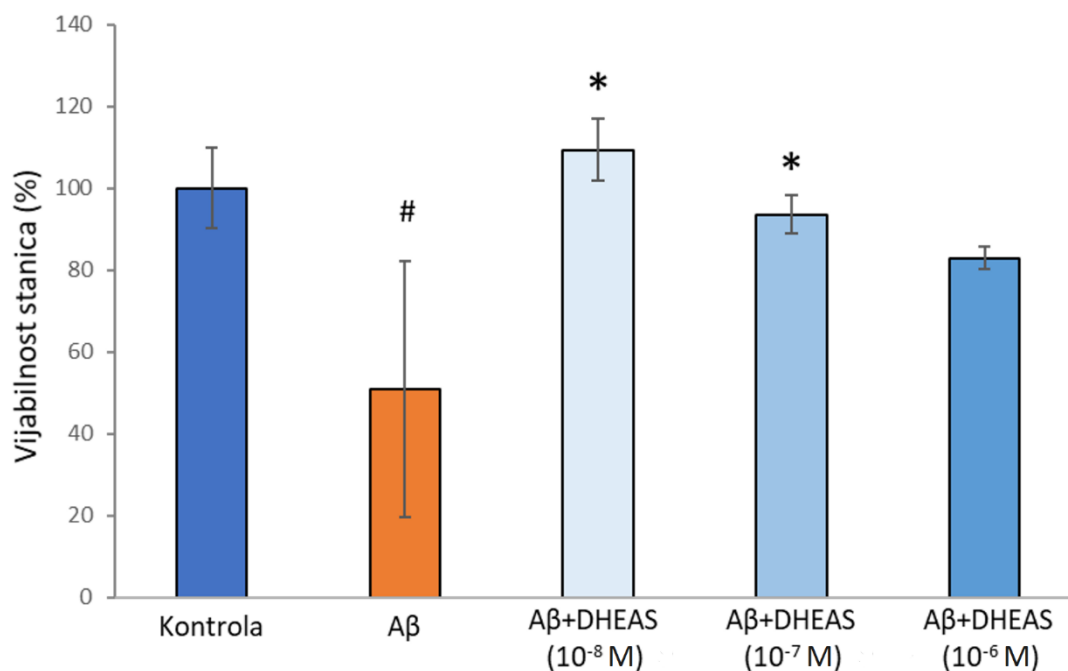
Rezultati MTT testa nakon 24 h tretmana neurona su grafički prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (%) \pm standardna devijacija (SD) na Slici 15. Statistička analiza ANOVA testom je uputila na značajnu razliku ($F = 13,81$; $p < 0,001$) u vijabilnosti stanica između svih ispitivanih grupa. *Post-hoc* Tukey testom je pokazan statistički značajan pad vijabilnosti stanica svake tretirane grupe u odnosu na kontrolu. Usporedbom kontrole i neurona tretiranih oligomerima A β 42, vidljiv je značajan pad vijabilnosti stanica sa 100% na 68,6%. Nadalje, vijabilnosti stanica izloženih kotretmanu oligomerima A β 42 i DHEAS-om variraju ovisno o koncentraciji primijenjenog DHEAS-a, međutim nisu uočene značajne razlike između tih skupina. Pritom je najučinkovitiji tretman DHEAS-om koncentracije 10^{-7} M gdje je vidljiv najveći porast vijabilnosti stanica sa 68,6% na 79%, a najmanje učinkovit DHEAS-om koncentracije 10^{-6} M gdje je uočen pad vijabilnosti stanica na 65,5%.



Slika 15. Vijabilnost primarne kulture mišjih neurona nakon 24 h tretmana $10 \mu\text{M}$ A β oligomerima i različitim koncentracijama DHEAS-a. Vijabilnost stanica je ispitana pomoću MTT testa, a iskazana je kao postotak u odnosu na kontrolne stanice. * $p < 0,050$ vs. kontrola (*post-hoc* Tukey test).

4.1.2. Vijabilnost neurona određena *RealTime-Glo[®] MT Cell Viability* testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

Rezultati *RealTime-Glo[®] MT Cell Viability* testa nakon 24 h tretmana neurona su prikazani na Slici 16 kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica (%) \pm SD u odnosu na kontrolu. Rezultat ANOVA testa je uputio na statistički značajnu razliku ($F = 6,55$, $p = 0,007$) u vijabilnosti stanica između svih ispitivanih grupa. Nadalje, vidljiv je značajan pad vijabilnosti stanica sa 100% u kontroli na 50,9% kod neurona tretiranih oligomerima A β 42. Kod neurona tretiranih oligomerima A β 42 i različitim koncentracijama DHEAS-a vidljiv je obrazac porasta vijabilnosti stanica u odnosu na neurone tretirane samo oligomerima A β 42. Pritom neuroni tretirani DHEAS-om koncentracija 10^{-8} i 10^{-7} M imaju značajan porast vijabilnosti stanica s 50,9% na 109,2%, odnosno 93,5%. Tretman DHEAS-om koncentracije 10^{-6} M nema značajan učinak na vijabilnost neurona. Najučinkovitiji je tretman DHEAS-om koncentracije 10^{-8} M s čak većim udjelom živih stanica nego u kontrolnoj grupi. Međutim, uzimajući u obzir rezultate oba testa vijabilnosti (MTT i *RealTime-Glo[®] MT Cell Viability*), koncentracija DHEAS-a 10^{-7} M odabrana je kao optimalna za provođenje tretmana.

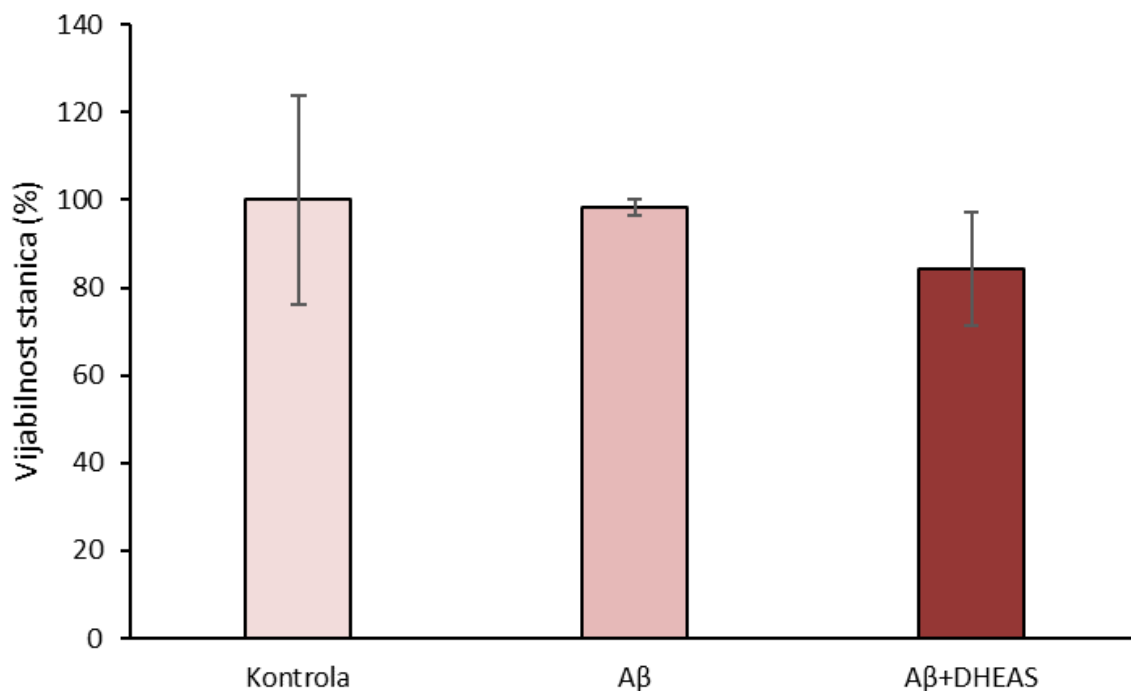


Slika 16. Vijabilnost primarne kulture mišjih neurona nakon 24 h tretmana 10 μ M A β oligomerima i različitim koncentracijama DHEAS-a. Vijabilnost stanica je ispitana bioluminiscentnom metodom *RealTime-Glo[®] MT Cell Viability Assay*, a iskazana je kao postotak u odnosu na kontrolne stanice. # $p < 0,001$ vs. kontrola (*post-hoc* Tukey test); * $p < 0,030$ vs. A β (*post-hoc* Tukey test).

4.2. Vijabilnost stanične linije SH-SY5Y

4.2.1. Vijabilnost SH-SY5Y stanica određena MTT testom nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

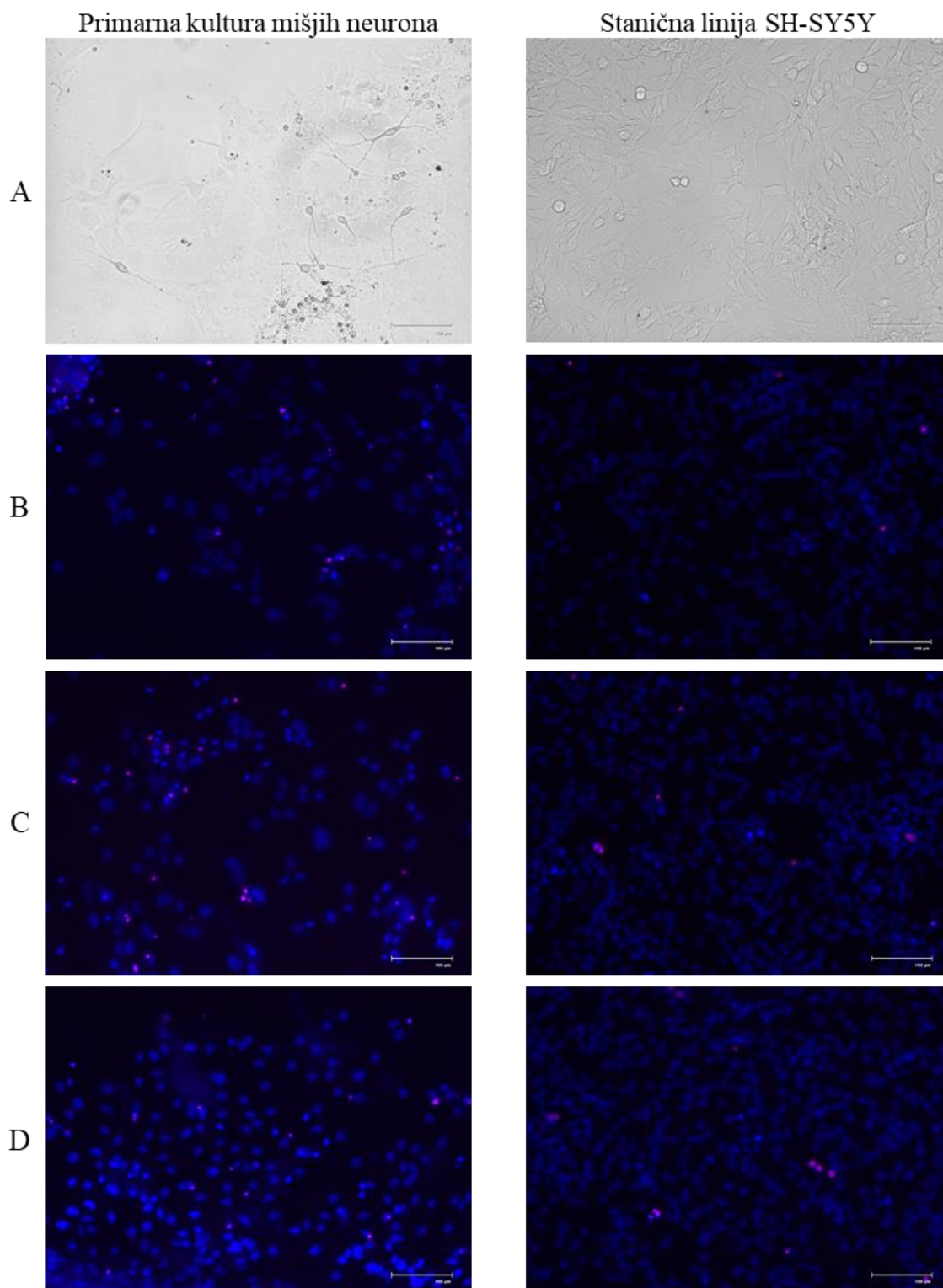
Rezultati MTT testa vijabilnosti nakon 24 h tretmana SH-SY5Y stanica su grafički prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica (%) \pm SD u odnosu na kontrolu na Slici 17. Iako je vidljiv blagi pad vijabilnosti stanica tretiranih oligomerima A β 42 (98,3%) i stanica tretiranih oligomerima A β 42 i DHEAS-om (84,2%), statistička analiza ANOVA testom je uputila na izostanak razlike u vijabilnosti stanica između ispitivanih grupa ($F = 0,46$, $p = 0,655$).



Slika 17. Vijabilnost stanične linije SH-SY5Y nakon 24 h tretmana 10 μ M A β oligomerima i 10⁻⁷ M DHEAS-om. Vijabilnost stanica je ispitana pomoću MTT testa, a iskazana je kao postotak u odnosu na kontrolne stanice.

4.3. Detekcija stanične smrti

Stanice podvrgnute tretmanu oligomerima A β 42 (10 μ M) i DHEAS-om (10⁻⁷ M) su vizualizirane i fotografirane pomoću fluorescentnog EVOS mikroskopa (Slika 18).

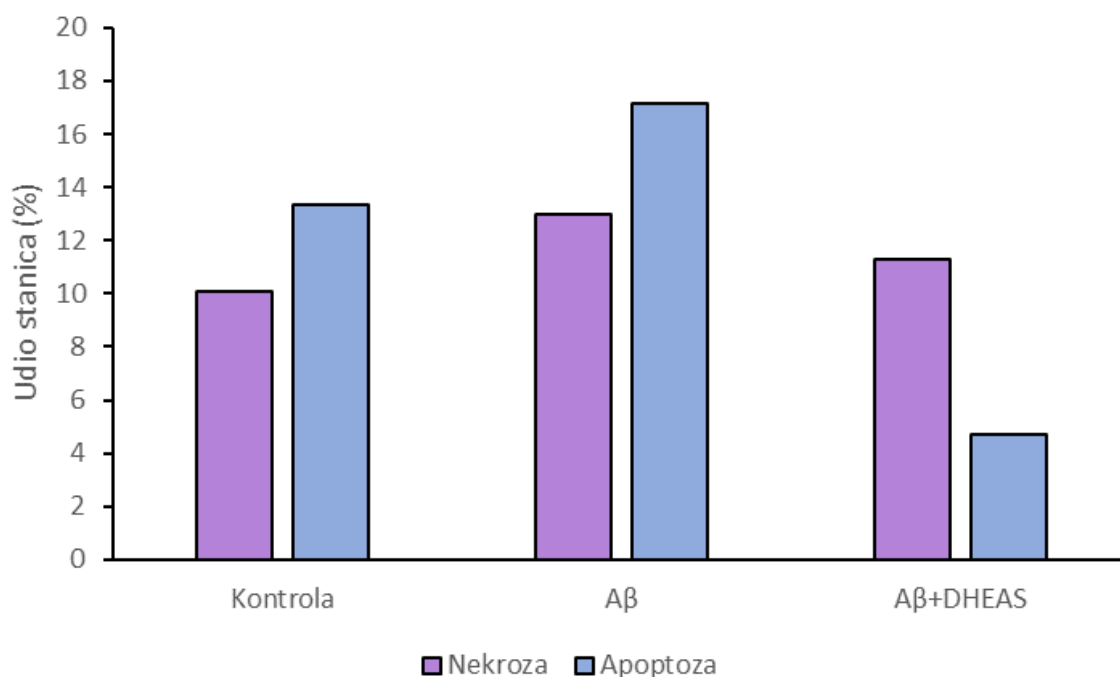


Slika 18. *In vitro* modeli AB-a nakon bojanja fluorescentnom bojom Hoechst 33342 i propidijevim jodidom, prikazani pomoću fluorescentnog mikroskopa u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković. Prikazane su kontrolne skupine primarne kulture mišjih neurona i stanične linije SH-SY5Y prije (A) i nakon (B) primjene fluorescentnih boja te stanice tretirane oligomerima A β (C), odnosno kombinacijom oligomera A β i DHEAS-a (D), oboje nakon primjene fluorescentnih boja. Slike su prvo uslikane zasebno pod odgovarajućim filterom nakon čega su pomoću softvera EVOS Fluid Cell Imaging Station-a dobivene preklapljene slike. Ljubičasta boja nekrotičnih stanica i stanica u završnoj fazi apoptoze potječe od preklapajućeg efekta fluorescentnih boja.

4.3.1. Detekcija stanične smrti neurona nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

Rezultati detekcije stanične smrti nakon 24 h tretmana neurona su grafički prikazani kao udjeli nekrotičnih i apoptotičnih stanica (%) (Slika 19).

Iz rezultata se vidi porast udjela nekrotičnih (s 10,1% na 13%) i apoptotičnih (s 13,4% na 17,2%) stanica uslijed tretmana oligomerima A β 42 u odnosu na kontrolu. S druge strane vidljiv je pad udjela nekrotičnih (s 13% na 11,2%) i apoptotičnih (sa 17,2% na 4,7%) stanica koje su, osim oligomerima A β 42, tretirane i DHEAS-om. Pritom se uočava veći pad udjela apoptotičnih, nego nekrotičnih stanica.

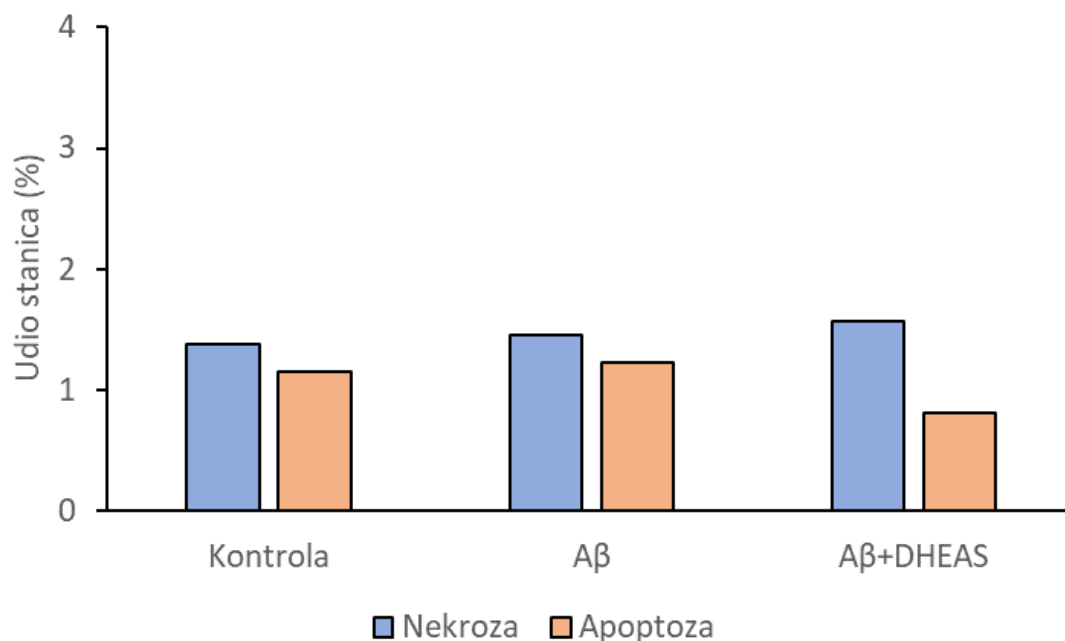


Slika 19. Detekcija stanične smrti u primarnoj kulturi mišjih neurona. Udjeli nekrotičnih i apoptotičnih stanica u primarnoj kulturi mišjih neurona tretiranoj oligomerima A β 42 (10 μ M) i DHEAS-om (10⁻⁷ M) nakon 24 sata. Kako je svaki tretman proveden u monoplikatu, podaci nisu statistički obrađeni.

4.3.2. Detekcija stanične smrti SH-SY5Y stanica nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

Rezultati detekcije stanične smrti nakon 24 h tretmana SH-SY5Y stanica su grafički prikazani kao udjeli nekrotičnih i apoptotičnih stanica (%) (Slika 20).

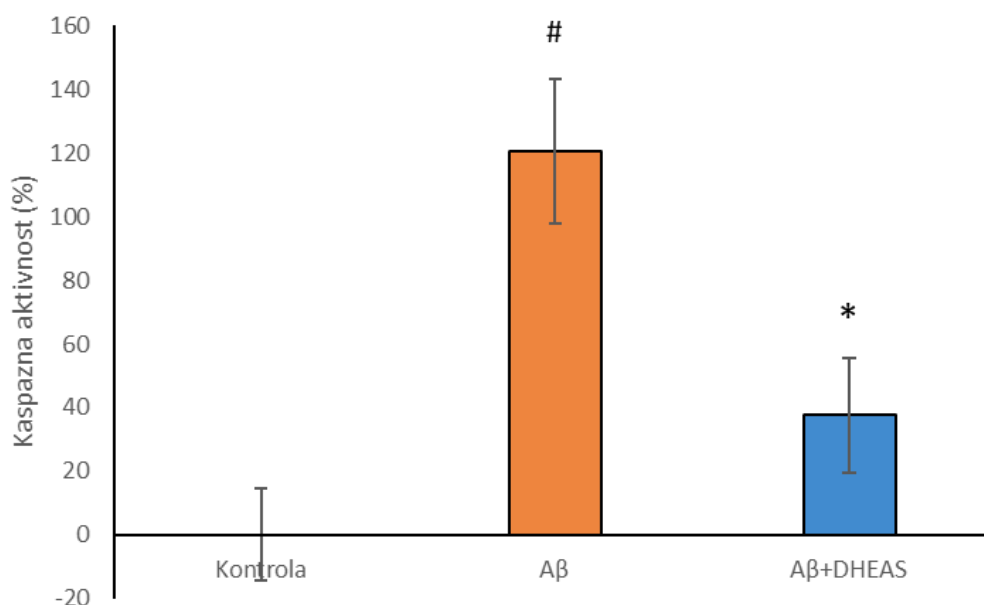
Iz rezultata se vidi da su udjeli nekrotičnih i apoptotičnih stanica veoma slični i niski za sve ispitivane grupe. Usporedbom stanica tretiranih oligomerima A β 42 i onih tretiranih i oligomerima A β 42 i DHEAS-om, uočljiv je pad u udjelu apoptotičnih stanica, a porast u udjelu nekrotičnih stanica.



Slika 20. Detekcija stanične smrti u staničnoj liniji SH-SY5Y. Udjeli nekrotičnih i apoptotičnih stanica u staničnoj liniji SH-SY5Y tretiranoj oligomerima Aβ42 (10 μM) i DHEAS-om (10⁻⁷ M) nakon 24 sata. Kako je svaki tretman proveden u monoplikatu, podaci nisu statistički obrađeni.

4.4. Kaspazna aktivnost stanica

4.4.1. Kaspazna aktivnost primarne kulture mišjih neurona određena uslijed tretmana oligomerima Aβ42 i DHEAS-om

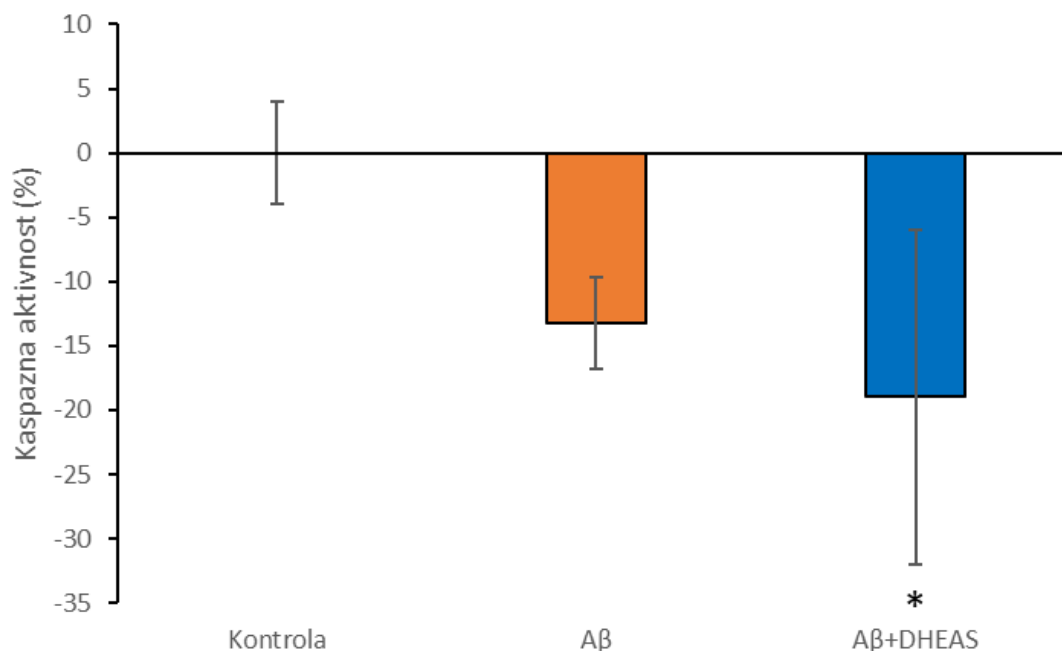


Slika 21. Kaspazna aktivnost u primarnoj kulturi mišjih neurona nakon 24 h tretmana 10 μM Aβ oligomerima i 10⁻⁷ M DHEAS-om. Kaspazna aktivnost je ispitana pomoću *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa. #p = 0,006 vs. kontrola (*post-hoc* Tukey test); *p = 0,017 vs Aβ (*post-hoc* Tukey test).

Rezultati *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa nakon 24 h tretmana neurona su grafički prikazani kao srednja vrijednost kaspazne aktivnosti stanica (%) ± SD u odnosu na kontrolu na Slici 21. Statističkim ANOVA testom je pokazana značajna razlika ($F = 22,498$, $p = 0,007$) u kaspaznoj aktivnosti stanica između svih ispitivanih grupa. *Post-hoc* Tukey testom je pokazan značajan porast kaspazne aktivnosti neurona tretiranih oligomerima A β 42 u odnosu na kontrolu. Nadalje, vidljiv je značajan pad kaspazne aktivnosti kod neurona izloženih kotretmanu oligomerima A β 42 i DHEAS-om u odnosu na neurone tretirane samo oligomerima A β 42.

4.4.2. Kaspazna aktivnost SH-SY5Y stanica nakon tretmana oligomerima A β 42 i DHEAS-om

Rezultati *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa nakon 24 h tretmana SH-SY5Y stanica su grafički prikazani kao srednja vrijednosti kaspazne aktivnosti stanica (%) ± SD u odnosu na kontrolu na Slici 22. Statistička analiza ANOVA testom je uputila na značajnu razliku u kaspaznoj aktivnosti između svih ispitivanih grupa ($F = 8,44$, $p = 0,009$). Pritom je uočeno da je kaspazna aktivnost najveća u kontrolnim stanicama, a pada kod stanica tretiranih oligomerima A β 42, odnosno najniža je kod stanica izloženih kotretmanu oligomerima A β 42 i DHEAS-om.



Slika 22. Kaspazna aktivnost u staničnoj liniji SH-SY5Y nakon 24 h tretmana 10 μ M A β oligomerima i 10⁻⁷ M DHEAS-om. Kaspazna aktivnost je ispitana pomoću *Caspase-Glo 3/7*[®] Assay testa. * $p = 0,010$ vs. kontrola (*post-hoc* Tukey test).

5. RASPRAVA

U ovom radu je istražen neuroprotektivni potencijal DHEAS-a na dvije stanične linije, primarnoj kulturi mišjih neurona i SH-SY5Y, tretirane oligomerima amiloid beta ($A\beta$). Stanične kulture tretirane $A\beta$ -om su poslužile kao *in vitro* modeli AB-a jer je stvaranje plakova agregacijom $A\beta$ -a važan čimbenik u patogenezi AB-a. Toksičnost $A\beta$ -a izaziva abnormalnu aktivaciju staničnog ciklusa u terminalno diferenciranim neuronima, što uzrokuje apoptozu (Yao i sur. 2005, Han i sur. 2017) i druge oblike stanične smrti (Goel i sur. 2022), zbog čega su u radu uz praćenje vijabilnosti, procijenjeni i stupnjevi apoptoze i nekroze stanica.

S obzirom da je kotretman oligomerima $A\beta$ i DHEAS-om rezultirao značajno većim preživljenjem neurona u odnosu na neurone tretirane samo oligomerima $A\beta$, pokazano je da DHEAS u opisanim uvjetima ima neuroprotektivno djelovanje, odnosno promovira preživljenje stanica oštećenih tretmanom oligomerima $A\beta$. U ovom istraživanju se tretman dozom 10^{-7} M pokazao najučinkovitijim, što je djelomično u skladu s drugim *in vitro* studijama (Bologa i sur. 1987, Kimonides i sur. 1998, Kurata i sur. 2004) gdje su koncentracije DHEAS-a 10^{-7} M i 10^{-8} M pokazale najveću djelotvornost u promociji preživljenja stanica kulture neurona mišjeg embrija i kulture hipokampusa izolirane iz fetusa štakora. Marx i sur. (2000) su u svojim rezultatima predtretmana DHEAS-om *in vitro* kulture kortikalnih neurona štakora također pokazali neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a koncentracije 10^{-6} M, dok DHEAS koncentracije 10^{-8} M nije dao isti rezultat. U navedenim radovima nisu korišteni *in vitro* modeli AB-a, odnosno oštećenje neurona je dobiveno drugim mehanizmima. Međutim, nisu pronađene druge studije u kojima bi se istraživao tretman DHEAS-a na *in vitro* modelu AB-a za bolju usporedbu dobivenih rezultata.

O neuroprotektivnim učincima DHEAS-a u raznim uvjetima i modelima AB-a svjedoče i rezultati drugih studija. Primjerice, razine DHEAS-a su značajno manje u malom mozgu, striatumu i hipotalamusu mozga ljudi oboljelih od AB-a u usporedbi s kontrolnom grupom iste dobi (Weill-Engerer i sur. 2002). Drugim riječima, uočena je negativna korelacija između DHEAS-a i glavnih obilježja AB-a (plakovi $A\beta$, NFT i PHF), što upućuje na potencijalno neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a. Suprotno sniženim razinama DHEAS-a, DHEA je značajno povišen u mozgu osoba oboljelih od AB-a prilikom usporedbe s odgovarajućim kontrolnim ispitanicima, posebice u hipokampusu (Naylor i sur. 2008). Primjenom paralelnog tretmana oligomerima $A\beta$ i inhibitorom steroidne sulfataze na štakorskom modelu pokazalo se da povećana razina endogenog DHEAS-a može imati pozitivne učinke u smislu ublažavanja

oštećenja prostorne memorije i sinaptičke plastičnosti izazvane oligomerima A β (Yue i sur. 2016). Naime, inhibitor steroidne sulfataze sprječava konverziju DHEAS-a u DHEA i održava veću količinu DHEAS-a, što se povezuje s opisanim neuroprotektivnim učinkom. El Bitar i sur. (2014) su rezultatima svog istraživanja na *in vitro* i *in vivo* modelima pokazali da sintetički i prirodni DHEAS značajno smanjuju toksičnost A β_{25-35} peptida i sprječava ulazak stanica u kasnu apoptozu i nekrozu. Za *in vitro* model korištena je stanična linija B104 predtretirana DHEAS-om (sintetičkim i prirodnim zasebno) te nakon toga tretirana A β_{25-35} peptidima, dok su za *in vivo* model korišteni miševi u čije su cerebralne ventrikule istovremeno ubrizgani A β_{25-35} peptidi i DHEAS. Oba tipa DHEAS-a su pokazala neuroprotektivno djelovanje i rast neurita u *in vitro* modelu. Također, zanimljivo je da su u svojim rezultatima pokazali bolju efikasnost djelovanja sintetičkog DHEAS-a u odnosu na prirodni. Sintetički DHEAS, osim što je djelovao efikasnije, je djelovao i dulje. Razlog tome je, predlažu El Bitar i sur. (2014), što sintetički DHEAS nije supstrat za 3 β hidroksisteroid sulfatazu koji je uključen u biosintezu DHEAS-a. Dakle, smatra se da je sintetički DHEAS manje podložan daljnjem metaboliziranju. Još jedna *in vivo* studija (Maurice i sur. 1998) pokazuje blagotvorne učinke DHEAS-a na miševima u koje su intracerebroventrikularno ubrizgani A β_{25-35} peptidi. Točnije, miševi tretirani DHEAS-om subkutano ili intraperitonealno su pokazali manji gubitak pamćenja kroz razne testove (npr. Morrisov test vodenog labirinta). Također, i oralna primjena DHEAS-a je pokazala pozitivan učinak, ovisan o dozi, na smanjenje kognitivnog oštećenja izazvanog prekomjernom ekspresijom A β u SAMP8 miševa koji se koriste kao model AB-a (Farr i sur. 2004).

Kada su isti uvjeti kotretmana oligomerima A β i DHEAS-om primijenjeni na staničnoj liniji humanog neuroblastoma, rezultati mjerenja vijabilnosti stanica su bili suprotni od očekivanih. Prvenstveno, izostao je negativan učinak tretmana oligomerima A β na preživljenje stanica. Drugim riječima, nisu postignuti uvjeti *in vitro* modela AB-a. Nadalje, iako nije statistički značajan, uočava se pad vijabilnosti stanica nakon tretmana DHEAS-om u odnosu na stanice tretirane samo oligomerima A β . Što se tiče neurotoksičnog učinka tretmana oligomerima A β , Krishtal i sur. (2017) su pokazali da on također izostaje uslijed tretiranja nediferenciranih SH-SY5Y stanica. U svojim istraživanjima su pokazali da su diferencirane neuronima slične SH-SY5Y stanice osjetljivije na oštećenja izazvana peptidima A β u odnosu na nediferencirane stanice kojima nedostaju dugi neuriti. Naime, spontano fibrilizirajući A β_{1-42} peptidi su pokrili tijela i neurite diferenciranih stanica izazivajući fragmentaciju neurita, dok je isti učinak izostao kod nediferenciranih stanica. Također, A β_{1-42} peptidi, koji imaju sposobnost spontane fibrilacije, su ostvarili jači toksični učinak od A β_{1-40} peptida koji nisu formirali

fibrile. Isti tim znanstvenika (Krishtal i sur. 2019) je dalje pokazao da osjetljivost diferenciranih SH-SY5Y stanica na toksičnost peptida A β ₄₂ znatno ovisi o tipu diferencijacije pri čemu su stanice diferencirane pomoću kombinacije retinoične kiseline i moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) te stanice diferencirane pomoću N(6),2'-O-dibutiriladenozin 3':5' cikličkog monofosfata pokazale najveću osjetljivost. S druge strane, postoje studije kod kojih je toksičan učinak oligomera A β ₁₋₄₂ postignut na nediferenciranim SH-SY5Y stanicama kakve su korištene i u ovom radu. U studiji djelovanja baikalina na smanjenje apoptoze inducirane peptidom A β , uspješno je uspostavljen *in vitro* model AB-a tretmanom nediferencirane stanične linije SH-SY5Y peptidima A β ₁₋₄₂ (Song i sur. 2022).

U svrhu ispitivanja tipa stanične smrti izazvane tretmanom oligomerima A β te učinka DHEAS-a na isto, stanice obiju kultura su obojane fluorescentnim bojama Hoechst 33342 i propidijevim jodidom nakon kotretmana oligomerima A β i DHEAS-om. Kod modela AB-a baziranog na primarnoj kulturi mišjih neurona, oligomeri A β evidentno uzrokuju povećanje i nekroze i apoptoze stanica s tim da je veći udio stanica zahvaćen apoptozom. Pritom, tretman DHEAS-om ublažava oba tipa stanične smrti, što ide u prilog njegovom neuroprotektivnom potencijalu. Brojne objavljene studije (Yao i sur. 2005, Han i sur. 2017, Takada i sur. 2020) su već uputile na to da A β kroz različite stanične mehanizme potiče apoptozu. Istraživanje provedeno na primarnoj kulturi mišjih neurona i diferenciranim SK-N-BE neuroblastoma stanicama je pokazalo da A β ₁₋₄₂ monomeri inhibiraju apoptozu i potiču autofagiju, dok A β ₁₋₄₂ oligomeri, kakvi su korišteni i u ovom radu, potiču apoptozu (Guglielmotto i sur. 2014). Kod modela AB-a baziranog na SH-SY5Y stanicama nije uočljiv porast niti jednog tipa stanične smrti što je u skladu s rezultatima procjene opće vijabilnosti stanica gdje tretman oligomerima A β nije ostvario toksičan učinak.

Apoptotska aktivnost stanica je u ovom radu procijenjena mjerenjem aktivnosti kaspaza u stanicama tretiranim oligomerima A β i DHEAS-om. Rezultati su pokazali toksično djelovanje oligomera A β na mišje neurone te da kotretman oligomerima A β i DHEAS-om značajno smanjuje kaspaznu aktivnost u usporedbi s neuronima tretiranim samo oligomerima A β , što upućuje da DHEAS ostvaruje antiapoptotsko djelovanje. Time se dodatno potvrđuje neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a, koji najvjerojatnije omogućuje preživljenje stanica tako što inhibira staničnu apoptozu. Na sličan zaključak navode i rezultati studije provedene na mišjem i staničnom modelu gdje je uočeno da primjena DHEAS-a značajno smanjuje toksičnost izazvanu peptidom A β ₂₅₋₃₅ tako što sprječava ulazak stanica u kasnu apoptozu i nekrozu (El Bitar i sur. 2014). Charalampopoulos i sur. (2004) su u rezultatima svog istraživanja

pokazali da DHEAS može aktivirati CREB (eng. *cAMP response element-binding protein*) i NF- κ B, čijim se nizvodnim djelovanjem povisuje ekspresija antiapoptotskog Bcl-2 proteina. Studija je provedena *in vitro* na staničnoj liniji PC12, koja služi kao utvrđeni model za proučavanje apoptoze i preživljenje neurona (Behl i sur. 1994), te na primarnoj kulturi štakorskih kromafinih stanica. Povećana ekspresija Bcl-2 proteina dalje inhibira intrinzični apoptotski put stanične smrti. To za posljedicu ima smanjenu aktivnost apoptotskih kaspaza 3 i 7, što je uočeno i u rezultatima ovog rada. Zanimljivo je da je smanjena CREB regulacija upletena u patologiju AB-a, a povećanje ekspresije CREB-a se razmatra kao potencijalna metoda tretmana AB-a (Pugazhenti i sur. 2011, Bartolotti i sur. 2016).

Što se tiče modela AB-a baziranog na SH-SY5Y stanicama, rezultati mjerenja kaspazne aktivnosti pokazuju izostanak utjecaja tretmana oligomerima A β na procese apoptoze što bi zajedno s ostalim rezultatima moglo uputiti na to da tretman nediferenciranih SH-SY5Y stanica oligomerima A β nije pogodan model za istraživanje AB-a. Kao što je prethodno diskutirano, toksičnost A β varira ovisno o diferencijaciji SH-SY5Y stanica i u slučaju nediferenciranih stanica pokazuje dvosmislene rezultate (Krishtal i sur. 2017, Song i sur. 2022). Razlog tome može ležati u činjenici da se radi o tumorskoj staničnoj liniji, a takve stanice po definiciji imaju pojačanu proliferaciju, rast i izbjegavaju staničnu smrt (apoptozu) zahvaljujući svojim mnogobrojnim mutacijama i izmjenama (Campos Cogo i sur. 2020). Upravo zbog narušene ravnoteže signalnih puteva za proliferaciju i apoptozu, ove stanice mogu izbjegavati apoptotske signalne puteve od kojih su neki bitni za toksičnost A β peptida. To u konačnici rezultira manjkom toksičnog učinka A β -a na stanice kao što je dobiveno u ovom istraživanju. Diferencijacija tih stanica izaziva smanjenje izraženosti tih karakteristika, pogotovo proliferacije (Kovalevich i Langford 2013), što ih čini više predvidivima za daljnje korištenje i kultivaciju. Zato se za konzistentnije rezultate kao *in vitro* modeli u raznim neurobiološkim eksperimentima mogu koristiti diferencirani oblici ovih stanica. Dodatna prednost diferencijacije jest što takve stanice više nalikuju zdravim neuronima, morfološki i funkcijski (Agholme i sur. 2010, Slanzi i sur. 2020). Međutim, problem leži u tome što protokoli za diferencijacije i daljnje održanje kulture nisu optimizirani, a potrebna je velika preciznost jer svaka mala izmjena, primjerice u sastavu medija, može dovesti do varijacija u tipu diferencijacije, rastu i proliferaciji stanica (Encinas i sur. 2000, Buttiglione i sur. 2007, Agholme i sur. 2010). S druge strane, korištenje tumorskih staničnih linija u ovakvom tipu istraživanja ima svoje prednosti kao što su mogućnost dugoročnog održavanja, lakše manipuliranje u odnosu na primarne kulture te smanjenje potrebe za žrtvovanjem životinja u istraživanjima.

Osim kroz već navedene mehanizme, DHEAS bi mogao imati posredno neuroprotektivno i antiapoptotsko djelovanje kroz regulaciju BDNF-a. Ukratko, neke od uloga BDNF-a su promocija diferencijacije, sazrijevanje stanica, neurogeneza i neuroprotekcija (Bathina i Das 2015), a Naert i sur. (2007) su u svom istraživanju na štakorima pokazali da primjena DHEAS-a u mozgu regulira koncentracije BDNF-a. U nekim regijama je došlo do povišenja koncentracije BDNF-a, a u nekima do sniženja. Međutim, nije dalje istraženo niti objašnjeno kako te promjene utječu na neurogenezu i preživljenje neurona.

Cjelokupno gledajući, rezultati dobiveni na primarnoj kulturi mišjih neurona u ovom istraživanju ukazuju na neuroprotektivni potencijal DHEAS-a te je vjerojatno da molekula to ostvaruje djelovanjem na apoptotični put stanične smrti. Ovi rezultati su poduprijeti rezultatima raznih drugih istraživanja provedenih u sličnim (*in vitro* studije) i različitim (*in vitro* i kliničke studije) uvjetima. Suprotno tome, rezultati tretmana DHEAS-om dobiveni na staničnoj liniji SH-SY5Y nisu pouzdani jer nije bilo moguće uspostaviti pouzdan model AB-a. Kako bi se detaljnije utvrdio točan mehanizam djelovanja DHEAS-a na prevenciju stanične smrti uzrokovanu oligomerima A β , potrebna su daljnja istraživanja. S obzirom da je ovo istraživanje provedeno na *in vitro* modelima koji obuhvaćaju samo utjecaj oligomera A β , buduća istraživanja bi trebala sadržavati i faktor tauopatije jer je ona također ključna karakteristika AB-a. Također, poznato je da su *in vitro* modeli vrlo limitirajući, zbog čega bi buduća istraživanja provedena na *in vivo* i 3D staničnim modelima, kod kojih je prisutan faktor interakcije među drugim organima i/ili okolnim tkivima, mogla dati bolju potpunu sliku.

6. ZAKLJUČAK

Uspostavljena je primarna kultura kortikalnih neurona izoliranih iz mozga embrija miša soja C57BL/6.

Uspostavljen je *in vitro* model Alzheimerove bolesti (AB) tretmanom primarne kulture mišjih kortikalnih neurona oligomerima amiloid-beta ($A\beta$) koncentracije 10 μ M kroz 24 h. Primjenom istih uvjeta nije postignuto smanjenje vijabilnosti SH-SY5Y stanica koje bi odgovaralo staničnom oštećenju u AB-u.

Tretman dehidroepiandrosteron sulfatom (DHEAS) u koncentraciji 10^{-7} M potiče preživljenje stanica *in vitro* modela AB-a baziranom na primarnoj kulturi mišjih kortikalnih neurona, ali ne i kod stanične linije SH-SY5Y tretirane oligomerima $A\beta$.

Ispitivanje apoptotske aktivnosti u mišjim kortikalnim neuronima tretiranim oligomerima $A\beta$ pokazalo je da primjena DHEAS-a djeluje neuroprotektivno što se manifestira smanjenjem apoptotske aktivnosti i sniženjem udjela apoptotičnih stanica. Isti učinak nije uočen prilikom kotretmana stanične linije SH-SY5Y oligomerima $A\beta$ i DHEAS-om.

7. LITERATURA

- Agholme L., Lindström T., Kågedal K., Marcusson J., Hallbeck M. (2010) An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* **20 (4)**: 1069-1082.
- Alford S., Patel D., Perakakis N., Mantzoros C. S. (2018) Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obes Rev.* **19 (2)**: 269-280.
- Andrew R. J., De Rossi P., Nguyen P., Kowalski H. R., Recupero A. J., Guerbette T., Krause S. V., Rice R. C., Laury-Kleintop L., Wagner S. L., Thinakaran G. (2019) Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor *BINI* does not affect amyloid pathology in an AD mouse model. *J Biol Chem.* **294 (12)**: 4477-4487.
- Anjum I., Fayyaz M., Wajid A., Sohail W., Ali A. (2018) Does obesity increase the risk of dementia: a literature review. *Cureus.* **10 (5)**.
- Armstrong R. A. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **57 (2)**: 87-105.
- Bartolotti N., Bennett D. A., Lazarov O. (2016) Reduced pCREB in Alzheimer's disease prefrontal cortex is reflected in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Psychiatry.* **21 (9)**: 1158-1166.
- Bathina S., Das U. N. (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci.* **11 (6)**: 1164-1178.
- Behl C., Davis J. B., Klier F. G., Schubert D. (1994) Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* **645 (1-2)**: 253-264.
- Bekris L. M., Yu C. E., Bird T. D., Tsuang D. W. (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* **23 (4)**: 213-227.
- Berr C., Lafont S., Debuire B., Dartigues J. F., Baulieu E. E. (1996) Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, and mental status, and short-term mortality: a French community-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93 (23)**: 13410-13415.
- Biedler J. L., Helson L., Spengler B. A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33 (11)**: 2643-2652.
- Biedler J. L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L. S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **38**: 3751-3757.

- Birkenhäger-Gillesse E. G., Derksen J., Lagaay A. M. (1994) Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in the oldest old, aged 85 and over. *Ann N Y Acad Sci.* **719**: 543-552.
- Bologa L., Sharma J., Roberts E. (1987) Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *J Neurosci Res.* **17 (3)**: 225-34.
- Brejijeh Z., Karaman R. (2020) Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules.* **25**: 5789.
- Brion J. P. (1998) Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* **40 (3)**: 130-140.
- Brown R. C., Cascio C., Papadopoulos V. (2000) Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. *J Neurochem.* **74 (2)**: 847-859.
- Buttiglione M., Vitiello F., Sardella E., Petrone L., Nardulli M., Favia P., d'Agostino R., Gristina R. (2007) Behaviour of SH-SY5Y neuroblastoma cell line grown in different media and on different chemically modified substrates. *Biomaterials.* **28 (19)**: 2932-2945.
- Campos Cogo S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento T., de Almeida Brehm Pinhatti F., de França Junior N., Santos Rodrigues B., Cavalli L. R., Elifio-Esposito S. (2020) An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and *in vitro* models. *Exp Biol Med (Maywood).* **245 (18)**: 1637-1647.
- Charalampopoulos I., Tsatsanis C., Dermitzaki E., Alexaki V. I., Castanas E., Margioris A. N., Gravanis A. (2004) Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101 (21)**: 8209-8214.
- Chen G. F., Xu T. H., Yan Y., Zhou Y. R., Jiang Y., Melcher K., Xu H. E. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* **38**: 1205-1235.
- Choi S. H., Kim Y. H., Hebisch M., Sliwinski C., Lee S., D'Avanzo C., Chen H., Hooli B., Asselin C., Muffat J., Klee J. B., Zhang C., Wainger B. J., Peitz M., Kovacs D. M., Woolf C. J., Wagner S. L., Tanzi R. E., Kim D. Y. (2014) A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature.* **515 (7526)**: 274-278.
- Crous-Bou M., Minguillón C., Gramunt N., Molinuevo J. L. (2017) Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther.* **9**: 71.

- De Menezes K. J., Peixoto C., Nardi A. E., Carta M. G., Machado S., Veras A. B. (2016) Dehydroepiandrosterone, its sulfate and cognitive functions. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. **12**: 24-37.
- De-Paula V. J., Radanovic M., Diniz B. S., Orestes V. F. (2012) Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*. **65**: 329-352.
- Do Carmo S., Cuello A. C. (2013) Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*. **8**: 37.
- Do Vale S., Selinger L., Martins J. M., Gomes A. C., Bicho M., do Carmo I., Escera C. (2014) The relationship between dehydroepiandrosterone (DHEA), working memory and distraction--a behavioral and electrophysiological approach. *PLoS One*. **9** (8): e104869.
- Drummond E., Wisniewski T. (2017) Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. **133** (2): 155-175.
- El Bitar F., Meunier J., Villard V., Alméras M., Krishnan K., Covey D. F., Maurice T., Akwa Y. (2014) Neuroprotection by the synthetic neurosteroid enantiomers ent-PREGS and ent-DHEAS against A β ₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity *in vitro* and *in vivo* in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **231** (17): 3293-3312.
- Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Ceña V., Gallego C., Comella J. X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. **75** (3): 991-1003.
- Farr S. A., Banks W. A., Uezu K., Gaskin F. S., Morley J. E. (2004) DHEAS improves learning and memory in aged SAMP8 mice but not in diabetic mice. *Life Sci*. **75** (23): 2775-2785.
- Foster E. M., Dangla-Valls A., Lovestone S., Ribe E. M., Buckley N. J. (2019) Clusterin in Alzheimer's disease: mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front Neurosci*. **13**: 164.
- Gandy S. (1999) Neurohormonal signaling pathways and the regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. **10** (7): 273-279.
- Gandy S. (2002) Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. **23** (6): 1009-1016.
- Goel P., Chakrabarti S., Goel K., Bhutani K., Chopra T., Bali S. (2022) Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Front Mol Neurosci*. **15**: 937133.
- Goumidi L., Dahlman-Wright K., Tapia-Paez I., Matsson H., Pasquier F., Amouyel P., Kere J., Lambert J. C., Meirhaeghe A. (2011) Study of estrogen receptor- α and receptor- β gene polymorphisms on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **26** (3): 431-439.

- Grimm A, Lim Y. A., Mensah-Nyagan A. G., Götz J., Eckert A. (2012) Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Mol Neurobiol.* **46 (1)**: 151-160.
- Grimm A., Biliouris E. E., Lang U. E., Götz J., Mensah-Nyagan A. G., Eckert A. (2016) Sex hormone-related neurosteroids differentially rescue bioenergetic deficits induced by amyloid- β or hyperphosphorylated tau protein. *Cell Mol Life Sci.* **73 (1)**: 201-215.
- Guglielmotto M., Monteleone D., Piras A., Valsecchi V., Tropiano M., Ariano S., Fornaro M., Vercelli A., Puyal J., Arancio O., Tabaton M., Tamagno E. (2014) A β 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy.* **10 (10)**: 1827-1843.
- Han X. J., Hu Y. Y., Yang Z. J., Jiang L. P., Shi S. L., Li Y. R., Guo M. Y., Wu H. L., Wan Y. Y. (2017) Amyloid β -42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Mol Med Rep.* **16 (4)**: 4521-4528.
- Hilgenberg L. G., Smith M. A. (2007) Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *J Vis Exp.* **10**: 562.
- Hillen T., Lun A., Reischies F. M., Borchelt M., Steinhagen-Thiessen E., Schaub R. T. (2000) DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* **47 (2)**: 161-163.
- Holler C. J., Davis P. R., Beckett T. L., Platt T. L., Webb R. L., Head E., Murphy M. P. (2014) Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J Alzheimers Dis.* **42 (4)**: 1221-1227.
- Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S. G., Croteau D. L., Bohr V. A. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology.* **15**: 565-581.
- Israel M. A., Yuan S. H., Bardy C., Reyna S. M., Mu Y., Herrera C., Hefferan M. P., Van Gorp S., Nazor K. L., Boscolo F. S., Carson C. T., Laurent L. C., Marsala M., Gage F. H., Remes A. M., Koo E. H., Goldstein L. S. B. (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature.* **482 (7384)**: 216-220.
- Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A. (2001) Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience.* **102 (2)**: 427-32.
- Kawahara M., Negishi-Kato M., Sadakane Y. (2009) Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid protein. *Expert Rev Neurother.* **9 (5)**: 681-693.

- Kelleher R. J. III, Shen J. (2017) Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114 (4)**: 629-631.
- Kim J., Basak J. M., Holtzman D. M. (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron.* **63 (3)**: 287-303.
- Kimonides V. G., Khatibi N. H., Svendsen C. N., Sofroniew M. V., Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95 (4)**: 1852-1857.
- Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., Egawa N., Yahata N., Okita K., Takahashi K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Watanabe K., Kadoya C., Nakano R., Watanabe D., Maruyama K., Hori O., Hibino S., Choshi T., Nakahata T., Hioki H., Kaneko T., Naitoh M., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Hata R., Ueno S., Seki T., Kobayashi K., Toda T., Murakami K., Irie K., Klein W. L., Mori H., Asada T., Takahashi R., Iwata N., Yamanaka S., Inoue H. (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell.* **12 (4)**: 487-496.
- Kovalevich J., Langford D. (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol.* **1078**: 9-21.
- Krishtal J., Bragina O., Metsla K., Palumaa P., Tõugu V. (2017) *In situ* fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells. *PLoS One.* **12 (10)**: e0186636.
- Krishtal J., Metsla K., Bragina O., Tõugu V., Palumaa P. (2019) Toxicity of amyloid- β peptides varies depending on differentiation route of SH-SY5Y Cells. *J Alzheimers Dis.* **71 (3)**: 879-887.
- Krstic D., Knuesel I. (2012) Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* **9 (1)**: 25-34.
- Kurata K., Takebayashi M., Morinobu S., Yamawaki S. (2004) Beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* **311 (1)**: 237-245.
- Kumar A., Sidhu J., Goyal A., Tsao J. W. (2022) Alzheimer disease. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/> (pristupljeno 20. 7. 2023.)

- Li L., Xu B., Zhu Y., Chen L., Sokabe M., Chen L. (2010) DHEA prevents A β 25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology*. **59 (4-5)**: 323-333.
- Lewczuk P., Riederer P., O'Bryant S. E., Verbeek M. M., Dubois B., Visser P. J., Jellinger K. A., Engelborghs S., Ramirez A., Parnetti L., Jack Jr C. R., Teunissen C. E., Hampel H., Lleó A., Jessen F., Glodzik L., de Leon M. J., Fagan A. M., Molinuevo J. L., Jansen W. J., Winblad B., Shaw L. M., Andreasson U., Otto M., Mollenhauer B., Wiltfang J., Turner M. R., Zerr I., Handels R., Thompson A. G., Johansson G., Ermann N., Trojanowski J. Q., Karaca I., Wagner H., Oeckl P., Waalwijk van Doorn L., Bjerke M., Kapogiannis D., Kuiperij H. B., Farotti L., Li Y., Gordon B. A., Epelbaum S., Vos S. J. B., Klijn C. J. M., Van Nostrand W. E., Minguillon C., Schmitz M., Gallo C., Mato A. L., Thibaut F., Lista S., Alcolea D., Zetterberg H., Blennow K., Kornhuber J. (2017) Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: an update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *The World Journal of Biological Psychiatry*. **19 (4)**: 244-328.
- Li N. M., Liu K. F., Qiu Y. J., Zhang H. H., Nakanishi H., Qing H. (2019) Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen Res*. **14 (4)**: 658-665.
- Liu C. C., Kanekiyo T., Xu H., Bu G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurol*. **9 (2)**: 106-118.
- Lleó A., Núñez-Llaves R., Alcolea D., Chiva C., Balateu-Pañós D., Colom-Cadena M., Gomez-Giro G., Muñoz L., Querol-Vilaseca M., Pegueroles J., Rami L., Lladó A., Molinuevo J. L., Tainta M, Clarimón J., Spires-Jones T., Blesa R., Fortea J., Martínez-Lage P., Sánchez-Valle R., Sabidó E., Bayés À., Belbin O. (2019) Changes in synaptic proteins precede neurodegeneration markers in preclinical Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *Mol Cell Proteomics*. **18 (3)**: 546-560.
- Ma Q. L., Yang F., Rosario E. R., Ubeda O. J., Beech W., Gant D. J., Chen P. P., Hudspeth B., Chen G., Zhao Y., Vinters H. V., Frautschy S. A., Cole G. M. (2009) β -Amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-Terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci*. **29 (28)**: 9078-9089.
- Mandelkow E. M., Mandelkow E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2 (7)**.

- Maninger N., Wolkowitz O. M., Reus V. I., Epel E. S., Mellon S. H. (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol.* **30** (1): 65-91.
- Marx C. E., Jarskog L. F., Lauder J. M., Gilmore J. H., Lieberman J. A., Morrow A. L. (2000) Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain Res.* **871**(1): 104-112.
- Maurice T., Su T. P., Privat A. (1998) Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience.* **83** (2): 413-428.
- Metaxas A., Kempf S. J. (2016) Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *Neural Regen Res.* **11** (10): 1579-1581.
- Murphy M. P., LeVine H. III (2010) Alzheimer's disease and the β -amyloid peptide. *J Alzheimers Dis.* **19**: 311.
- Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L. (2007) Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology.* **32** (8-10): 1062-1078.
- Naylor J. C., Hulette C. M., Steffens D. C., Shampine L. J., Ervin J. F., Payne V. M., Massing M. W., Kilts J. D., Strauss J. L., Calhoun P. S., Calnaido R. P., Blazer D. G., Lieberman J. A., Madison R. D., Marx C. E. (2008) Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer's disease, and related to neuropathological disease stage. *J Clin Endocrinol Metab.* **93** (8): 3173-3178.
- Näsman B., Olsson T., Bäckström T., Eriksson S., Grankvist K., Viitanen M., Bucht G. (1991) Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry.* **30** (7): 684-690.
- Nordestgaard L. T., Tybjærg-Hansen A., Nordestgaard B. G., Frikke-Schmidt R. (2015) Loss-of-function mutation in ABCA₁ and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimers Dement.* **11** (12): 1430-1438.
- Overk C. R., Masliah E. (2014) Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and lewy body disease. *Biochem Pharmacol.* **88** (4): 508-516.
- Pan X., Wu X., Kaminga A. C., Wen S. W., Liu A. (2019) Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Front Aging Neurosci.* **11**: 61.

- Patterson C. (2018) World Alzheimer Report 2018. Alzheimer's Disease International (ADI), London.
- Påhlman S., Ruusala A. I., Abrahamsson L., Mattsson M. E., Esscher T. (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* **14 (2)**: 135-144.
- Pugazhenth S., Wang M., Pham S., Sze C. I., Eckman C. B. (2011) Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in A β -treated rat hippocampal neurons. *Mol Neurodegener.* **6**: 60.
- Ray L., Khemka V. K., Behera P., Bandyopadhyay K., Pal S., Pal K., Basu D., Chakrabarti S. (2013) Serum homocysteine, dehydroepiandrosterone sulphate and lipoprotein (a) in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Aging Dis.* **4 (2)**: 57-64.
- Santos C. Y., Snyder P. J., Wu W. C., Zhang M., Echeverria A., Alber J. (2017) Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: a review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst).* **7**: 69-87.
- Schachter A. S., Davis K. L. (2000) Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* **2**: 91-100.
- Serrano-Pozo A., Frosch M. P., Masliah E., Hyman B. T. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **1 (1)**.
- Sharma K. (2019) Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Mol Med Rep.* **20 (2)**: 1479-1487.
- ShIPLEY M. M., MANGOLD C. A., SZPARA M. L. (2016) Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp.* **108**: 53193.
- Sinsky J., Pichlerova K., Hanes J. (2021) Tau protein interaction partners and their roles in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Int J Mol Sci.* **22 (17)**: 9207.
- Slanzi A., Iannoto G., Rossi B., Zenaro E., Constantin G. (2020) *In vitro* models of neurodegenerative diseases. *Front Cell Dev Biol.* **8**: 328.
- Song Z., He C., Yu W., Yang M., Li Z., Li P., Zhu X., Xiao C., Cheng S. (2022) Baicalin attenuated A β 1-42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells by inhibiting the ras-ERK signaling pathway. *Biomed Res Int.* **2022**: 9491755.
- Stern Y., Tang M. X., Albert M. S., Brandt J., Jacobs D. M., Bell K., Marder K., Sano M., Devanand D., Albert S. M., Bylsma F., Tsai W. Y. (1997) Predicting time to nursing home care and death in individuals with Alzheimer disease. *JAMA.* **277 (10)**: 806-812.
- Švob Štrac D., Konjevod M., Nikolac Perković M., Tudor L., Nedić Erjavec G., Pivac N. (2020) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate (DHEAS) in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **17 (2)**: 141-157.

- Takada E., Okubo K., Yano Y., Iida K., Someda M., Hirasawa A., Yonehara S., Matsuzaki K. (2020) Molecular mechanism of apoptosis by amyloid β -protein fibrils formed on neuronal cells. *ACS Chem Neurosci.* **11** (5): 796-805.
- Tarawneh R., D'Angelo G., Crimmins D., Herries E., Griest T., Fagan A. M., Zipfel G. J., Ladenson J. H., Morris J. C., Holtzman D. M. (2016) Diagnostic and prognostic utility of the synaptic marker neurogranin in Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* **73** (5): 561-571.
- Tabaton M., Piccini A. (2005) Role of water-soluble amyloid- β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol.* **86** (3): 139-145.
- TCW J., Goate A. M. (2017) Genetics of β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **7** (6).
- Van Giau V., Bagyinszky E., An S. S. A., Kim S. Y. (2015) Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* **11**: 1723-1737.
- Wang R., Reddy P. H. (2017) Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **57** (4): 1041-1048.
- Widstrom R. L., Dillon J. S. (2004) Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin Reprod Med.* **22** (4): 289-298.
- Webb S. J., Geoghegan T. E., Prough R. A., Michael Miller K. K. (2006) The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev.* **38** (1-2): 89-116.
- Weill-Engerer S., David J. P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E. E., Akwa Y. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab.* **87** (11): 5138-5143.
- Xie H. R., Hu L. S., Li G. Y. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J. (Engl).* 2010 Apr 20;123(8):1086-92.
- Xu G., Ran Y., Fromholt S. E., Fu C., Yachnis A. T., Golde T. E., Borchelt D. R. (2015) Murine A β over-production produces diffuse and compact Alzheimer-type amyloid deposits. *Acta Neuropathol Commun.* **3**: 72.
- Yaari R., Fleisher A. S., Tariot P. N. (2011) Updates to diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Prim Care Companion CNS Disord.* **13** (5).

- Yao M., Nguyen T. V., Pike C. J. (2005) Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci.* **25 (5)**: 1149-1158.
- Yue X. H., Tong J. Q., Wang Z. J., Zhang J., Liu X., Liu X. J., Cai H. Y., Qi J. S. (2016) Steroid sulfatase inhibitor DU-14 protects spatial memory and synaptic plasticity from disruption by amyloid β protein in male rats. *Horm Behav.* **83**: 83-92.
- Zhang H., Wei W., Zhao M., Ma L., Jiang X., Pei H., Cao Y., Li H. (2021) Interaction between A β and tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Biol Sci.* **17 (9)**: 2181-2192.
- Zhang X. X., Tian Y., Wang Z. T., Ma Y. H. Tan L., Yu J. T. (2021) The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease.* **8**: 313-321.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 9.9.1998. u Zagrebu gdje sam završio srednjoškolsko obrazovanje u XV. gimnaziji (MIOC). Nakon toga sam, 2017. godine upisao preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF), Sveučilište u Zagrebu. Tijekom studija sam u sklopu studentskog posla držao dodatnu nastavu iz biologije učenicima 2. razreda srednje škole u MIOC-u (2019) i primao STEM stipendiju (2017-2019). Titulu prvostupnika molekularne biologije sam stekao 2020. godine. Iste godine sam nakon toga upisao diplomski studij Molekularne biologije na PMF-u, Sveučilište u Zagrebu. Kao studentski posao, snimio sam kratke instruktivske video zapise iz kemije za učenike srednjih škola (pretežito maturante) na platformi Gradivo.hr (2022).

Dvije godine zaredom (2020-2021) sam odrađivao laboratorijsku stručnu praksu pod vodstvom poslijedoktorandice dr. sc. Zrinke Karačić prilikom čega smo pokušali mutacijama pretvoriti izopentenil-difosfat izomerazu u hidrolazu (po pitanju enzimskog djelovanja) i obrnuto, u sklopu većeg projekta na Institutu Ruđer Bošković.

Bio sam sudionik na 10. hrvatskom farmakološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem i 1. hrvatskom kongresu kliničke farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem 2022. godine s naslovom "The neuroprotective potential of brain-derived neuron factor (BDNF) in an *in vitro* model of Alzheimer's disease", pod mentorstvom više znanstvene suradnice, dr. sc. Gordane Nedić Erjavec.

Diplomski rad "Neuroprotektivni učinak dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) u staničnim modelima Alzheimerove bolesti" sam izrađivao kroz veći dio 2022. godine pod mentorstvom više znanstvene suradnice, dr. sc. Gordane Nedić Erjavec, na Institutu Ruđer Bošković.

Izvorni sam govornik hrvatskog jezika, iskusni korisnik engleskog jezika (IELTS ocjena 8) i znam osnove njemačkog jezika.