

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nora Bancelj

**Terapijski potencijal moždanog
neurotrofnog čimbenika, neurosteroida
dehidroepiandrosterona i
dehidroepiandrosteron sulfata u *in vitro*
modelu Parkinsonove bolesti**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Matee Nikolac Perković, znanstvene suradnice, te komentorstvom dr.sc. Julije Erhardt više predavačice. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta IP-2019-04-6100, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Matei Nikolac Perković na pruženoj prilici, strpljenju, svim savjetima i prenesenom znanju. Hvala i drugim djelatnicima Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju, osobito Barbari Vuić i Tini Miloš na nesebičnoj pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala i komentorici dr. sc. Juliji Erhardt na stručnom vodstvu i savjetima.

Veliko hvala i kolegama iz Novog Sada iz Laboratorija za reproduktivnu endokrinologiju i signaling, a posebno Prof. Silvani Andrić na primanju u laboratorij te Mariji Opačić i Tamari Tomanić na svakom savjetu i nezaboravnom iskustvu.

Mojim roditeljima, Ruži i Vladi, najveće hvala na bezuvjetnoj ljubavi i podržavanju svake moje ideje. Bez vas se moji snovi ne bi mogli ostvariti. Posebno hvala mojoj sestri Ivani, bez čijeg vodstva kroz život ne bih bila tu gdje jesam.

Hvala i kolegama s Odjela za biologiju na prekrasne tri godine, a osobito Ivi i Nikoli koji su ih učinili posebnima.

Mojoj cimerici, Nikolini, bez čije bi se motivacije ispitni rokovi teže preživjeli. Hvala što si omogućila da se udaljenost od kuće lakše podnese.

Najveće hvala onima koji nisu bili tu samo za fakultetske brige, već i za sve životne od 2005. godine – Ani, Gabrijelu i Mii, bez vas ništa ne bi bilo isto.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Terapijski potencijal moždanog neurotrofnog čimbenika, neurosteroida dehidroepiandrosterona i dehidroepiandrosteron sulfata u *in vitro* modelu Parkinsonove bolesti

Nora Bacelj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Parkinsonova bolest je najčešći neurodegenerativni poremećaj kretanja kojeg karakteriziraju progresija bolesti te kompleksna klinička slika s motoričkim i ne-motoričkim simptomima. Neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) te moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) ključni su za neuroprotekciju, neurogenezu, memoriju i učenje te djeluju antioksidativno i protuupalno. Uzimajući u obzir ove činjenice, kao i činjenicu da trenutno ne postoji lijek za Parkinsonovu bolest, ističe se važnost istraživanja novih potencijalnih terapeutika poput DHEA, DHEAS i BDNF koji će liječenje učiniti učinkovitijim. Cilj ovog rada je istražiti potencijalne učinke DHEA, DHEAS i BDNF u prevenciji smrti dopaminergičkih neurona uporabom *in vitro* modela, odnosno staničnih linija ozlijeđenih neurotoksinima rotenonom i 6-hidroksidopaminom koji uzrokuju oštećenja stanica nalik onima u Parkinsonovoj bolesti. U tu svrhu, provedene su analize vijabilnosti stanica, parametara oksidativnog stresa te detekcija stanične smrti. Rezultati istraživanja upućuju na to da DHEA, DHEAS i BDNF pokazuju značajan neuroprotektivni potencijal što se očituje kroz povećanje preživljavanja stanica te smanjenje razine unutarstaničnih reaktivnih kisikovih jedinki i apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica.

Ključne riječi: dopamin, neurodegenerativni poremećaj, neuroprotekcija, neurotoksini, oksidativni stres, stanična smrt

(58 stranica, 25 slika, 6 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Matea Nikolac Perković, znanstveni suradnik

Komentor: v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Ocjenitelji: v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

prof. dr. sc. Zorana Grubić

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Therapeutic potential of brain-derived factor, neurosteroid dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in an *in vitro* model of Parkinson's disease

Nora Bacelj

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Parkinson's disease is the most common neurodegenerative movement disorder characterized by disease progression and a complex clinical picture with motor and non-motor symptoms. The neurosteroids dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are crucial for neuroprotection, neurogenesis, memory and learning, and have antioxidant and anti-inflammatory effects. Considering these facts, as well as the fact that there is currently no cure for Parkinson's disease, the importance of research for new potential therapeutics such as DHEA, DHEAS and BDNF that will make the treatment more effective is essential. The aim of this thesis is to investigate the potential effects of DHEA, DHEAS and BDNF in preventing the death of dopaminergic neurons using *in vitro* model, i.e. cell lines injured by the neurotoxins rotenone and 6-hydroxydopamine, which cause cell damage similar to those in Parkinson's disease. For this purpose, analyzes of cell viability, oxidative stress parameters and detection of cell death were carried out. Research results indicate that DHEA, DHEAS and BDNF show a significant neuroprotective potential, which is manifested through an increase in cell survival and a decrease in the level of intracellular reactive oxygen species and apoptotic and/or necrotic cells.

Keywords: dopamine, neurodegenerative disorder, neuroprotection, neurotoxins, oxidative stress, cell death

(58 pages, 25 figures, 6 tables, 87 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Research Associate Matea Nikolac Perković, PhD

Co-mentor: sen.lec. Julija Erhardt, PhD

Reviewers: sen. lec. Julija Erhardt, PhD

prof. Dubravka Hranilović, PhD

prof. Zorana Grubić, PhD

Thesis accepted: September 08th 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Dopamin	1
1.1.1. Metabolizam dopamina	1
1.1.2. Dopaminergički putovi u mozgu.....	3
1.1.2.1. Nigrostrijatalni put	3
1.2. Parkinsonova bolest.....	4
1.2.1. Simptomi bolesti	5
1.2.1.1. Motorički simptomi.....	5
1.2.1.2. Ne-motorički simptomi	6
1.2.2. Klinički tijek bolesti	6
1.2.3. Etiologija bolesti	7
1.2.3.1. Genetski čimbenici.....	7
1.2.3.2. Okolišni čimbenici	7
1.2.3.3. Oksidativni stres.....	8
1.2.4. Neuropatologija bolesti	8
1.2.5. Modeli za istraživanje Parkinsonove bolesti	10
1.2.5.1. Animalni modeli.....	10
1.2.5.1.1. Parakvat.....	10
1.2.5.1.2. MPTP	11
1.2.5.1.3. 6-OHDA.....	11
1.2.5.1.4. Rotenon	11
1.2.5.2. Stanični modeli	11
1.2.6. Liječenje Parkinsonove bolesti.....	12
1.2.6.1. Liječenje bazirano na lijekovima	12
1.2.6.2. Nefarmakološki pristup liječenju	13
1.3. Neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS)..	14
1.3.1. Sinteza i metabolizam DHEA i DHEAS	14
1.3.2. Mehanizam djelovanja	15
1.3.3. Neurobiološko djelovanje DHEA(S).....	15
1.4. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)	17
1.4.1. Metabolizam i mehanizam djelovanja BDNF	17
1.4.2. Neurobiološko djelovanje BDNF	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	21

3.1.1. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y.....	21
3.1.2.. Kultura štakorskih N27 dopaminergičkih neurona	21
3.1.3. Osnovne otopine.....	22
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Uzgoj, održavanje i presađivanje SH-SY5Y i N27 staničnih kultura	23
3.2.2. Brojanje stanica.....	24
3.2.3. Tretman stanica	25
3.2.3.1. Lijekovi.....	25
3.2.3.2. Ozljeda	25
3.2.4. MTT test.....	25
3.2.5. Detekcija parametara oksidativnog stresa	26
3.2.6. Detekcija stanične smrti	27
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI	29
4.1. Preživljenje stanica.....	29
4.1.1. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost SH-SY5Y stanica ozlijeđenih rotenonom.....	30
4.1.2. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost SH-SY5Y stanica ozlijeđenih 6-OHDA	31
4.1.3 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost N27 stanica ozlijeđenih rotenonom.....	32
4.1.4. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost N27 stanica ozlijeđenih 6-OHDA.....	33
4.2. Parametri oksidativnog stresa	34
4.2.1. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenima rotenonom.....	34
4.2.2. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenima 6-OHDA	35
4.2.3 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u N27 stanicama ozlijeđenima rotenonom.....	36
4.2.4 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u N27 stanicama ozlijeđenima 6-OHDA	37
4.3. Detekcija stanične smrti	38

4.3.1 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod rotenonom ozlijeđenih SH-SY5Y stanica	40
4.3.2 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod 6-OHDA ozlijeđenih SH-SY5Y stanica	40
4.3.3 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod rotenonom ozlijeđenih N27 stanica	41
4.3.4 Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod 6-OHDA ozlijeđenih N27 stanica.....	42
5. RASPRAVA	44
6. ZAKLJUČAK.....	49
7. POPIS LITERATURE.....	50
8. ŽIVOTOPIS.....	57

POPIS KRATICA

3-MT – 3-metoksitiramin

6-OHDA – 6-hidroksidopamin

AADC – dekarboksilaza aromatskih aminokiselina

Akt – proteinska kinaza B

ARC – arkuatna jezgra

ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BACE – beta sekretaza

BBB – krvno-moždana barijera (engl. *Blood-Brain Barrier*)

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain-derived Neurotrophic Factor*)

COMT – katekol O-metiltransferaza

DAT – transporter dopamina

DBS – duboka mozgovna stimulacija (engl. *Deep Brain Stimulation*)

DCFH-DA - 2',7'-diklorodihidrodifluorescein-diacetat

DHEA – dehidroepiandrosteron (engl. *Dehydroepiandrosterone*)

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat (engl. *Dehydroepiandrosterone Sulphate*)

DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DOPAC - 3,4-dihidroksifenil acetatna kiselina

DOPAL - 3,4-dihidroksifenilacetaldehid

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

ERK – ekstracelularnim signalom regulirana kinaza

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

GPe – *globus pallidus pars externa*

GPI – *globus pallidus pars interna*

HVA – homovanilična kiselina

IL-6 – interleukin 6

L-dopa – 1-3,4-dihidroksifenilalanin

LTD – dugotrajna depresija (engl. *Long-Term Depression*)

LTP - dugotrajna potencijacija (engl. *Long-Term Potentiation*)

MAO – monoamin-oksidaza

MAP2 – protein povezan s mikrotubulima 2

MAPK – protein-kinaza aktivirana mitogenom

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridinij

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

mTOR – meta rapamicina kod sisavaca

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NF-κB – nuklearni faktor kappa B

NMDA – N-metil-D-aspartat

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza

PKC – protein kinaza C

PLC – fosfolipaza C

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

RPMI - engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SN – substantia nigra

SNC – *substantia nigra pars compacta*

SNr – *substantia nigra pars reticulata*

STN – subtalamičke jezgre

TH – tirozin hidroksilaza

VMAT-2 – vezikularni monoaminski transporter 2

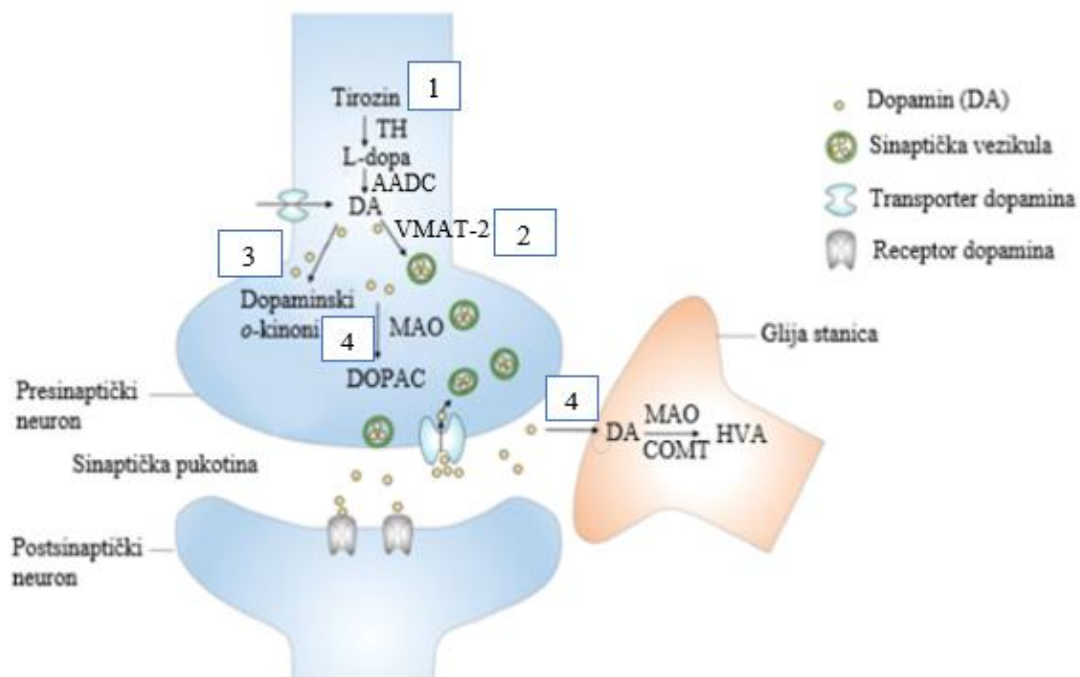
VTA – ventralno tegmentalno područje

1. UVOD

1.1. Dopamin

1.1.1. Metabolizam dopamina

Dopamin je katekolamin koji djeluje kao neurotransmitor čija je osnovna funkcija modulacija motoričkog sustava, kontrola kognitivnih procesa te regulacija osjećaja nagrade i zadovoljstva. Dopamin je i prekursor za sintezu drugih katekolamina, adrenalina i noradrenalina, te se njegova sinteza, osim u meduli nadbubrežne žlijezde, odvija i u mozgu (Slika 1).

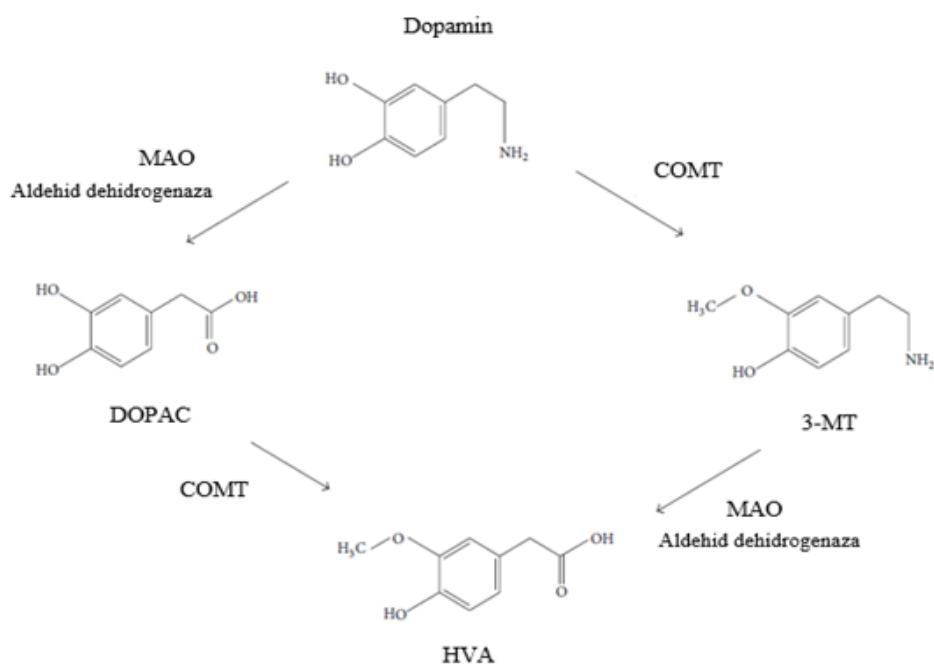


Slika 1. Prikaz metabolizma dopamina (DA); na slici su označeni brojevima: 1) sinteza DA u dva koraka djelovanjem tirozin hidroksilaze (TH) i dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (AADC) preko 1-3,4-dihidroksifenilalanina (L-dopa) 2) pakiranje sintetiziranog DA u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog monoaminskog transportera 2 (VMAT-2) 3) oksidacija DA 4) razgradnja DA djelovanjem monoamin oksidaze (MAO) i katekol O-metiltransferaze (COMT) do homovanilične kiseline (HVA) preko 3,4- dihidroksifenil acetatne kiseline (DOPAC)

(Preuzeto i prilagođeno prema: Zhang i sur. 2019)

Dopamin se sintetizira u citosolu neurona iz aminokiseline tirozin koja se konvertira u 1-3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa) djelovanjem enzima tirozin-hidroksilaze (TH) (Slika 1). Pomoću dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (AADC), iz L-dope nastaje dopamin (Slika 1). Sintetizirani dopamin se ne skladišti u citosolu zbog visokog pH, uslijed čega dolazi do njegove oksidacije u *o*-kinone, te se iz tog razloga skladišti u sinaptičkim vezikulama djelovanjem vezikularnog

monoaminskog transportera 2 (VMAT-2). pH vezikula je niži u odnosu na citosolni, što osigurava stabilnost dopamina, te se kao takav oslobađa iz vezikula procesom egzocitoze u sinapsu nakon čega se veže za presinaptičke ili postsinaptičke receptore (Latif i sur. 2021). Presinaptički receptori (autoreceptori) imaju ulogu u održavanju normalnih razina dopamina te vezanje na njih uzrokuje inhibiciju njegove sinteze i otpuštanja, a vezanje na postsinaptičke dopaminske receptore (D1-D5) omogućuje prijenos signala na postsinaptički neuron. Nakon obavljanja svoje funkcije, dopamin se povratno unosi u presinaptički neuron djelovanjem transportera dopamina (DAT) te se dio ponovno pakira u vezikule djelovanjem VMAT-2, a dio razgrađuje pomoću dva enzima (Slika 2). Prvi od njih je monoamin-oksidaza (MAO) koja postoji u dvije izoforme od kojih je MAO-A dominantna izoforma u katekolaminskim neuronima, a MAO-B u astrocitima. MAO djeluje na način da razgrađuje dopamin u 3,4-dihidroksifenilacetaldehid (DOPAL) koji se djelovanjem aldehyd dehidrogenaze razgrađuje u 3,4-dihidroksifenil acetatnu kiselinu (DOPAC). Drugi enzim je katekol-O-metiltransferaza (COMT) koji je primarno eksprimiran u glija stanicama, dok je njegova razina vrlo niska u neuronima ili COMT nije uopće eksprimiran (Juárez Olguín i sur. 2016). S jedne strane, COMT katalizira metilaciju DOPAC u homovaniličnu kiselinu (HVA) koja predstavlja jedan od glavnih produkata razgradnje dopamina (Zhang i sur. 2019), a s druge strane razgrađuje dopamin u 3-metoksitiramin (3-MT) koji se djelovanjem MAO i aldehyd dehidrogenaze reducira u HVA i eliminira urinom (Juárez Olguín i sur. 2016).

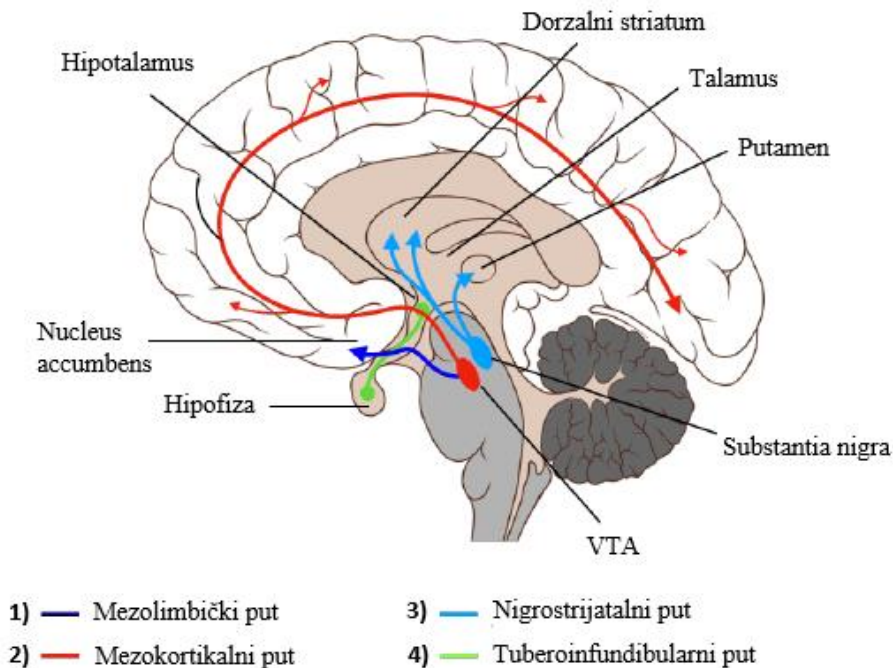


Slika 2. Shematski prikaz enzimske razgradnje dopamina; lijevo je prikazana razgradnja do homovanilične kiseline (HVA) pomoću monoamin-oksidaze (MAO), katekol O-metiltransferaze (COMT) i aldehyd dehidrogenaze preko 3,4- dihidroksifenil acetatne kiseline (DOPAC), a desno preko 3-metoksitiramina (3-MT)

(Preuzeto i prilagođeno prema: Juárez Olguín i sur., 2016)

1.1.2. Dopaminergički putovi u mozgu

Dopaminergički neuroni se primarno nalaze u ventralnom tegmentalnom području (VTA) srednjeg mozga, substanciji nigri (SN) i u arkuatnoj jezgri (ARC) hipotalamusa odakle projiciraju svoje aksone u različite dijelove mozga kroz četiri glavna puta poznata kao mezokortikalni, mezolimbčki, tuberoinfundibularni i nigrostrijatalni put (Slika 3; Latif i sur. 2021, Juárez Olguín i sur. 2016).



Slika 3. Glavni putovi dopamina u mozgu; na slici su označeni brojevima: 1) mezolimbčki put koji započinje u ventralnom tegmentalnom području (VTA) i završava u ventralnom striatumu (osjećaj nagrade i zadovoljstva) 2) mezokortikalni put koji započinje u VTA i završava u prefrontalnom korteksu (kontrola kognitivnih funkcija)

3) nigrostrijatalni put koji povezuje substanciju nigru sa striatumom (kontrola pokreta)

4) tuberoinfundibularni put koji povezuje hipotalamus s hipofizom (kontrola lučenja prolaktina)

(Preuzeto i prilagođeno prema: Nummenmaa i sur. 2020)

1.1.2.1. Nigrostrijatalni put

Substantia nigra je spljoštena ovalna struktura srednjeg mozga koju čine dva dijela definirana prema tipu stanica, *substantia nigra pars reticulata* (SNr) i *substantia nigra pars compacta* (SNc). Dok aksoni SNr neurona inerviraju talamus, gornji kolikulus i pedunkulopontinu tegmentalnu jezgru te sintetiziraju neurotransmiter gama-aminomaslačnu kiselinu (GABA), SNc se primarno sastoji od tijela dopaminergičkih neurona podijeljenih na dorzalni (kalbindin-pozitivni) i ventralni (kalbindin-negativni) sloj koji projiciraju na striatum (Prensa i sur. 2009). Striatum je zajednički naziv za *nucleus caudatus* i *putamen* (Tel i Ćakmakli, 2017), a podijeljen je na dva odjeljka koja se razlikuju po kemijskom sastavu

i ulazno-izlaznim vezama. Prvi odjeljak, zvan striosomi, karakterizira visoka razina opioidnih receptora, enkefalina, neurotenzina i tvari P te je njegova glavna uloga primanje informacija iz limbičkog sustava (Prensa i sur. 2009). Drugi odjeljak, koji okružuje striosome, poznat pod nazivom ekstrasomalni matriks, a karakterizira ga visoka razina acetilkolinesteraze, proteina koji vežu kalcij, kolin-acetiltransferaze i TH te predstavlja cilj projekcija iz talamusa (Prensa i sur. 2009). Striatum je glavna receptivna jezgra bazalnog ganglija koji se, osim od striatuma, sastoji i od substancije nigre, globus pallidusa i subtalamičkih jezgri (STN). Bazalni ganglij ima važnu ulogu u izvršavanju naučenog pokreta, odgovoru na nove podražaje te u motorici, a dopaminergička inervacija je ključna za izvršavanje tih funkcija (Tel i Çakmakli, 2017).

Dopaminergičke projekcije iz neurona dorzalnog sloja SNc projiciraju primarno na matriks striatuma, a projekcije iz ventralnog sloja na striosome, dok neki neuroni iz oba sloja mogu inervirati oba odjeljka striatuma. Striatum integrira dobivene informacije te projicira direktnim ili indirektnim putem do dvije glavne izlazne jezgre bazalnog ganglija – *globus pallidus pars interna* (GPi) i SNr. Neuroni direktnog puta izravno projiciraju na GPi i SNr te koeksprimiraju tvar P i dinorfin koji djeluju kao kotransmiteri, inhibirajući ili stimulirajući otpuštanje dopamina. Za razliku od direktnog puta, neuroni indirektnog puta projiciraju na STN preko *globus pallidus pars externa* (GPe) do GPi i SNr te koeksprimiraju enkefalin (Tel i Çakmakli 2017). Oba puta konačne signale šalju u talamus odakle se dalje ekscitatorne ili inhibitorne informacije šalju u korteks za regulaciju pokreta na način da direktni put potiče, a indirektni put inhibira pokret (Latif i sur. 2021).

Poremećaji u direktnom i indirektnom putu, kao i općenito disfunkcija u sustavu dopamina, mogu biti povezani s različitim neurološkim bolestima i poremećajima od depresije i shizofrenije do poremećaja kretanja.

1.2. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest, za koju je karakteristično propadanje dopaminergičkih neurona nigrostrijatalnog puta s Lewyjevim tjelešcima (Sveinbjornsdottir 2016), je najčešći neurodegenerativni poremećaj kretanja i druga najčešća neurodegenerativna bolest nakon Alzheimerove (Tysnes i Storstein 2017). Procjenjuje se da od Parkinsonove bolesti boluje 7-10 milijuna ljudi širom svijeta pri čemu prevalencija za područje Europe iznosi 100-200/100 000 ljudi (Jellinger 2014). Glavni rizični faktor za razvoj bolesti, uz spol, predstavlja dob. Najčešće oboljevaju ljudi dobi između 60 i 65 godina, a češće oboljevaju muškarci što ukazuje na mogući neuroprotektivni učinak estrogena kod žena (Ball i sur. 2019). Smatra se da Parkinsonova bolest nastaje kao rezultat različitih genetskih i okolišnih čimbenika (Jellinger 2014), a bolest karakteriziraju motorički i ne-motorički klinički simptomi, dok rana dijagnoza kao i učinkovito liječenje i dalje ostaju izazov (Jellinger 2014).

1.2.1. Simptomi bolesti

1.2.1.1. Motorički simptomi

Bolest je uobičajeno dijagnosticirana prema prvim motoričkim simptomima (Tablica 1) te se procjenjuje da je oko 80% dopaminergičkih neurona već degeneriralo prije pojavljivanja značajnih motoričkih simptoma (Sveinbjornsdottir 2016).

Tablica 1. Klinički kriteriji razvijeni od strane britanskog Društva za Parkinsonovu bolest (United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank), prema kojima se postavlja dijagnoza Parkinsonove bolesti.

L-dopa – 1-3,4-dihidroksifenilalanin, MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

(Preuzeto i prilagođeno prema: Sveinbjornsdotti 2016)

1. Korak: Dijagnoza Parkinsonove bolesti	Bradikinezija i barem jedan od sljedećih navedenih: rigidnost mišića, 4-6 Hz tremor u mirovanju, posturalna nestabilnost koja nije uzrokovana vizualnom, vestibularnom, cerebelarnom ili proprioceptijskom disfunkcijom
2. Korak: Kriteriji isključenja za Parkinsonovu bolest	Povijest ponovljenih moždanih udara s postupnom progresijom bolesti, ponovljene ozljede glave, povijest encefalitisa, okulogirne krize, neuroleptičko liječenje na početku simptoma, više od jednog oboljelog rođaka, remisija bolesti, strogo unilateralna svojstva nakon 3 godine, progresivna supranuklearna paraliza, znakovi bolesti malog mozga, rano ozbiljno oštećenje autonomnog živčanog sustava, rana teška demencija s poremećajima pamćenja i jezika, babinski refleks, prisutnost cerebralnog tumora ili hidrocefalusa, negativan odgovor na velike doze L-dope, izloženost MPTP-u
3. Korak: Potporni kriteriji za dijagnozu Parkinsonove bolesti (3 ili više potrebno za konačnu dijagnozu)	Unilateralnost, tremor u mirovanju, progresivni poremećaj, trajna asimetrija koja više zahvaća stranu s početka bolesti, izvrstan odgovor (70-100%) na L-dopu, teška koreja izazvana L-dopom, odgovor na L-dopu 5 ili više godina, klinički tijek od 10 ili više godina

Motorički simptomi kod većine oboljelih su u početku unilateralni pri čemu se kontralateralni simptomi pojavljuju s progresijom bolesti. S vremenom tijelo postaje pognuto, udovi ukočeni te se javlja njihovo drhtanje, lice postaje bezizražajno te koraci postaju sve manji i brži što dovodi do gubitka ravnoteže i velikog postotka padova i ozljeda kod oboljelih. Također, često se pojavljuju i oralni motorički poremećaji poput brzog i tihog govora, problema s gutanjem i curenja sline (Sveinbjornsdottir 2016).

1.2.1.2. Ne-motorički simptomi

U nekim slučajevima se kod oboljelih ne-motorički simptomi, koji variraju od osobe do osobe, manifestiraju prije motoričkih (Sveinbjornsdottir 2016). Prema Sveinbjornsdottir (2016) postoje 4 skupine ne-motoričkih simptoma: poremećaji autonomnih funkcija, poremećaji spavanja, neuropsihijatrijski simptomi i demencija te senzorni simptomi. U prvu skupinu se ubrajaju simptomi poput ortostatske hipotenzije, gastrointestinalnih simptoma (kao što je konstipacija u 70-80% oboljelih te disfunkcija rektalnog sfinktera), erektilna disfunkcija i disfunkcija znojenja te seboreja i poremećaj kontrole mokrenja (Sveinbjornsdottir 2016; JelLinger 2014). Poremećaji spavanja, poput isprekidanog sna i prekomjerne pospanosti tijekom dana, pojavljuju se kod otprilike dvije trećine pacijenata. Vizualne halucinacije, za razliku od olfaktornih, auditornih i taktilnih, su vrlo česte kod oboljelih te su uobičajeno bezopasne i traju kratko. Depresija i anksioznost se pojavljuju kod otprilike trećine oboljelih. Demencija se često pojavljuje kod starijih pacijenata, a rani simptomi podrazumijevaju probleme s planiranjem i organizacijom, snalaženjem u prostoru te poremećaje pamćenja. U senzorne simptome se ubrajaju smanjen ili u potpunosti izgubljen osjet mirisa, abnormalni osjeti i bol u različitim dijelovima tijela te bol u udovima (Sveinbjornsdottir 2016).

Važno je naglasiti da, iako su za Parkinsonovu bolest karakteristični motorički simptomi, navedeni ne-motorički simptomi također značajno utječu na kvalitetu života oboljelih te u nekim slučajevima predstavljaju veći problem od motoričkih.

1.2.2. Klinički tijek bolesti

Početak bolesti je postupan te se pre-motorički simptomi mogu pojaviti 10-20 godina prije pojave značajnih motoričkih simptoma zbog čega mogu biti zanemareni ili pogrešno protumačeni, a podrazumijevaju umor, rigidnost, monotoni govor, poremećaje raspoloženja i spavanja te disfunkcije različitih sustava. Neki simptomi, poput poteškoća u razlikovanju boja i mirisa, mogu pomoći identificirati rani stadij najmanje pet godina prije početka bolesti. Ipak, najčešći simptom koji ukazuje na početak bolesti kod 50% pacijenata je tremor jedne ruke ili noge u stadiju mirovanja koji se širi na druge udove. Drugi najčešći simptom je poremećaj hoda, a treći bradikinezija (JelLinger 2014).

Progresija simptoma bolesti je kod pacijenata varijabilna. U ranom stadiju navedeni simptomi su blagi te obično zahvaćaju jednu stranu tijela, a liječenje je uspješno. Kako simptomi napreduju,

odgovor na liječenje je sve slabiji, a uz motoričke simptome se nakon (ili prije) određenog vremena mogu pojaviti i ne-motorički za koje trenutno postoje ograničene mogućnosti liječenja. U konačnici, kvaliteta života osobe je značajno narušena te oboljeli zahtijevaju konstantnu brigu. Prosječno razdoblje od trenutka dijagnoze do smrti iznosi 6,9-14,3 godina pri čemu su starost i demencija najveći prediktori povećane smrtnosti (Sveinbjornsdottir 2016).

1.2.3. Etiologija bolesti

Postoje dva oblika Parkinsonove bolesti: obiteljski (s ranim početkom) za koji je karakteristična mutacija gena i sporadični (s kasnim početkom) od kojeg obolijeva oko 85% pacijenata za čiji je nastanak odgovorna interakcija gena i okoline (JeLLinger 2014).

1.2.3.1. Genetski čimbenici

Do danas su poznata 23 gena za koje se smatra da su povezani s nastankom Parkinsonove bolesti te se tim genima dodjeljuje naziv „PARK“ redom kojim su otkriveni (Kouli i sur. 2018). Trenutno se najčešće istražuju mutacije u genima *SNCA* koji kodira za alfa-sinuklein, *LRRK2* koji kodira za kinazu bogatu ponavljajućim slijedom leucina 2, *PRKN* za protein parkin, *PINK1* za PTEN induciranu kinazu 1 i *GBA* koji kodira lizosomalni enzim beta-glukocerebrozidazu (Bloem i sur. 2021; Kouli i sur. 2018; Jagmag i sur. 2016). Mutacije u ovim genima pokazuju autosomno dominantno (npr. *SNCA*, *LRRK2*, *GBA*) ili recesivno (npr. *PRKN*, *PINK1*) nasljeđivanje (Kouli i sur. 2018). *SNCA* gen kodira protein alfa-sinuklein pronađen u Lewyjevim tjelešcima oboljelih (Jagmag i sur. 2016), a mutacije u ovom genu su povezane s ranijim početkom bolesti, bržim napretkom motoričkih simptoma i prisutnosti ne-motoričkih simptoma (Bloem i sur. 2021). Nadalje, pronađeno je sedam mutacija odgovornih za 3-41% obiteljskih oblika Parkinsonove bolesti u *LRRK2* genu (Bloem i sur. 2021; Jagmag i sur. 2016). *PRKN* kodira protein parkin koji djeluje kao ligaza unutar ubikvitin-proteasom sustava, a *PINK1* mitohondrijsku kinazu (Jagmag i sur. 2016). Kod osoba s *PRKN* i *PINK1* mutacijama bolest sporo napreduje, ali je karakterizirana distonijom i rjeđe demencijom te oboljeli dobro odgovaraju na liječenje (Bloem i sur. 2021). Osobe s mutacijom *GBA* gena pokazuju raniji početak i teži oblik bolesti (Bloem i sur. 2021).

Bitno je spomenuti da potomci te braća i sestre oboljele osobe imaju 2-3 puta veći rizik za razvoj bolesti u odnosu na opću populaciju te da su monogeniski slučajevi Parkinsonove bolesti koji mogu varirati od ostalih oblika bolesti rijetki, ali zabilježeni (Tysnes i Storstein 2017).

1.2.3.2. Okolišni čimbenici

Genotip svakog pojedinca je jedinstven te zbog toga izloženost istim okolišnim čimbenicima na svakoga utječe drugačije što dovodi do različitih fenotipova bolesti. Okolišni čimbenici, poput izloženosti teškim metalima i pesticidima, mogu utjecati na propadanje nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona (Ball i sur. 2019).

Željezo i bakar su teški metali koji uzrokuju smrt neurona mehanizmom oksidativnog stresa. Toksičnost mangana uzrokuje oštećenje substancije nigre i drugih dijelova bazalnog ganglija što uzrokuje poremećenu motoriku te povećava rizik za razvoj Parkinsonove bolesti. Olovo, imitirajući kalcij, može ući u mozak putem kalcijevih kanala što uzrokuje disfunkciju motoričkog sustava u vidu gubitka voljnih pokreta što nastaje kao posljedica smrti neurona u centralnom i perifernom živčanom sustavu. Slično djeluje i poznati neurotoksin živa koja, uz gubitak voljnih pokreta, uzrokuje i drhtanje. Dok pojedina istraživanja pokazuju povezanost izloženosti prethodno navedenim metalima s povećanjem rizika od obolijevanja od Parkinsonove bolesti, važno je napomenuti da su rezultati istraživanja oprečni (Ball i sur. 2019).

Pesticidi se danas često koriste u poljoprivredi u svrhu kontrole štetočina i bolesti koje izazivaju te je poznat njihov negativan utjecaj na dopaminergičke neurone. Jedna od dvije skupine insekticida koje se najčešće istražuju u ovom kontekstu su organoklorni insekticidi, specifično dieldrin koji uzrokuje oštećenja dopaminergičkog sustava. Drugu skupinu čine organofosforni insekticidi od kojih je najpoznatiji rotenon koji djeluje kao dieldrin što povećava rizik od razvoja Parkinsonove bolesti. Također, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) selektivno cilja substanciju nigru što ide u prilog činjenici da su pesticidi povezani s oboljenjem od Parkinsonove bolesti (Ball i sur. 2019).

Važan rizični faktor za razvoj Parkinsonove bolesti predstavlja i način života, odnosno pušenje, način prehrane, fizička aktivnost i stres.

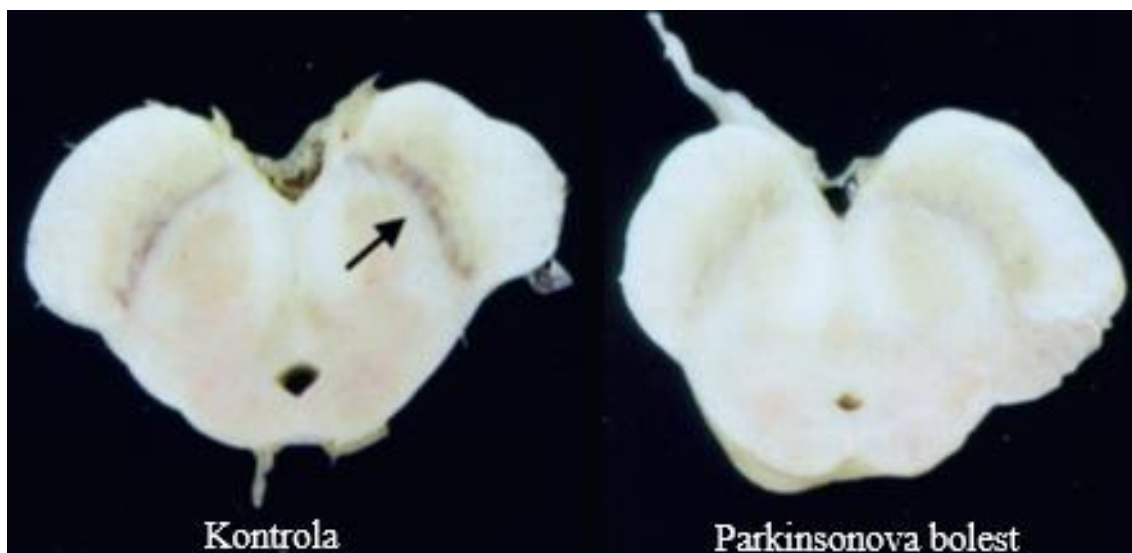
1.2.3.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres se javlja kao posljedica prekomjernog nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) jer stopa proizvodnje i uklanjanja ROS-a nisu u ravnoteži. ROS-ovi djeluju negativno na makromolekule uzrokujući oštećenje stanica i DNA, mitohondrijsku disfunkciju i upalni proces što doprinosi razvoju Parkinsonove bolesti uz pokretanje kaskada reakcija koje uzrokuju sve veće nakupljanje ROS-a što u konačnici vodi ka gubitku dopaminergičkih neurona (Guo i sur. 2018).

Kod oboljelih, znakovi oksidativnog stresa i oštećenja su vidljivi u substanciji nigri. Razine oksidiranih produkata makromolekula se povećavaju, dok se razine antioksidansa smanjuju. Osim toga, kompleks I mitohondrija je inhibiran, a povišene razine oksidativnog stresa mogu u konačnici uzrokovati apoptozu (Alexander 2004).

1.2.4. Neuropatologija bolesti

Konačna dijagnoza Parkinsonove bolesti se može postaviti isključivo na temelju *post mortem* karakterističnih neuropatoloških promjena u mozgu. Glavnu morfološku promjenu predstavlja gubitak tamno pigmentiranog područja u SNc koje nastaje kao posljedica gubitka dopaminergičkih A9 neurona (Slika 4; Kouli i sur. 2018).



Slika 4. Obojenost substantije nigre (strelica) kod kontrolne skupine u usporedbi s oboljelima.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Jellinger 2014)

Stupanj gubitka A9 neurona kao i gubitak aksona koji projiciraju u striatum što uzrokuje poremećaj funkcije, povezani su s tijekom i trajanjem bolesti (Jellinger 2014). Nestanak dopaminergičkih neurona se osim u SNc očituje i u drugim područjima mozga poput *raphe nuclei*, *locus coeruleus*, hipotalamusu i olfaktornom bulbusu te u ne-dopaminergičkim neurotransmitterskim sustavima za što se smatra da pridonosi ne-motoričkim simptomima bolesti (Kouli i sur. 2018).

Još jedna od patoloških značajki Parkinsonove bolesti je prisutnost proteinskih agregata u citoplazmi neurona, Lewyjevih tjelešaca, koji su imunoreaktivni za protein alfa-sinuklein. Osim njih, često su prisutni i aksonalni distrofični neuriti poznati kao Lewyjevi neuriti (Kouli i sur. 2018), a Lewyjeva patologija se širi od ventrolateralnog ka dorzalnom dijelu SNc (Jellinger 2014). Udio neurona koji pokazuju ove patološke značajke se smatra stalnim, odnosno nije povezan s trajanjem bolesti (Jellinger 2014). Primarna komponenta Lewyjevih tjelešaca je alfa-sinuklein koji se kod oboljelih abnormalno fosforilira te iz filamentozne strukture prelazi u agregat (Kouli i sur. 2018). Smatra se da je razlog selektivnog propadanja A9 neurona, a ne A8 i A10 koji su bogati kalbindinom i glikolitičkim enzimima, povećan sadržaj željeza koji potiče agregaciju alfa-sinukleina te čini A9 neurone osjetljivijima na mitohondrijsku disfunkciju i oksidativni stres. Poznato je da se Lewyjeva tjelešca stvaraju kroz nekoliko faza, ali mehanizmi kojima agregacija alfa-sinukleina može potaknuti njihovo stvaranje ostaju nerazjašnjeni (Jellinger 2014).

Bitno je spomenuti da prisutnost Lewyjevih tjelešaca nije karakteristična isključivo za Parkinsonovu bolest te da se njihova uloga i tijek pojavljivanja još istražuju (Jellinger 2014).

1.2.5. Modeli za istraživanje Parkinsonove bolesti

Danas se koriste različiti animalni (miševi, štakori, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*..) i stanični modeli za istraživanje Parkinsonove bolesti u svrhu otkrivanja potencijalnih lijekova te istraživanja progresije bolesti.

1.2.5.1. Animalni modeli

Animalni modeli se dijele u dvije glavne grupe: genetski modeli i modeli bazirani na toksinima. Cilj genetskih modela je istražiti signalne putove gena koji uzrokuju bolest uvođenjem mutiranih oblika tih gena te istražiti bolest uvođenjem gena koji nisu uzročni, ali mogu uzrokovati poremećaj signalizacije te tako oponašati fenotip bolesti u modelnom organizmu. Najčešće se koristi pet gena u istraživanju Parkinsonove bolesti u genetskim modelima: *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1* i *DJ-1* (Jagmag i sur. 2016). Istraživanje je pokazalo da injektiranje mutiranog *SNCA* gena uzrokuje gubitak dopaminergičkih neurona i motoričku disfunkciju kod miševa i štakora kao i agregaciju alfa-sinukleina u preživjelim neuronima (Oliveras-Salvá i sur. 2013). *LRRK2* transgenični modeli pokazuju poremećen metabolizam i neurotransmisiju dopamina te agregaciju alfa-sinukleina i drugih proteina (Melrose i sur. 2010, Tong i sur. 2010, Li i sur. 2009). Nadalje, divlji tip i mutant *PRKN* uzrokuju smrt dopaminergičkih neurona u modelima štakora (Dave i sur. 2014), kao što je i slučaj kod *PINK1* i *DJ-1* transgeničnih modela (Van Rompuy i sur. 2014). Važno je naglasiti da neki genetski modeli bazirani na prethodno navedenim genima nisu uspješno demonstrirali fenotip Parkinsonove bolesti u istraživanjima (Sanchez i sur. 2014, Kitada i sur. 2009, Yamaguchi i Shen 2007). S obzirom da je u Parkinsonovoj bolesti često promijenjena funkcija više od jednog gena, smatra se da su monogenetski modeli bolesti manje uspješni u usporedbi s modelima baziranim na toksinima (Jagmag i sur. 2016).

Kao i u slučaju genetskih modela, modeli bazirani na toksinima ne demonstriraju uvijek uspješno fenotip Parkinsonove bolesti, a mogući razlog je taj što oni ne postoje prirodno u ljudskom mozgu te stoga ne mogu u potpunosti oponašati bolest. Također, neurotoksini uzrokuju brzi gubitak velikog broja dopaminergičkih neurona u usporedbi s neurodegeneracijom koja se odvija dugi niz godina prije pojave prvih simptoma bolesti (Herrera i sur. 2017). S obzirom na to da još ne postoji alternativa, najčešći neurotoksini koji se nastavljaju koristiti za modeliranje Parkinsonove bolesti su: parakvat, MPTP, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) i rotenon.

1.2.5.1.1. Parakvat

Parakvat je herbicid koji je vrlo selektivan za SNc dopaminergičke neurone te uzrokuje njihovu smrt isključivo u prisutnosti mikroglije. Lako prolazi krvno-moždanu barijeru (engl. *Blood-Brain Barrier*, BBB) te u neuronima djeluje na antioksidativni sustav na način da ometa funkciju glutatona i tioredoksina. Osim toga, potiče apoptozu putem proapoptotskih proteina Bcl-2 te aktiviranjem kaspaze 3 (Zeng i sur. 2018).

1.2.5.1.2. MPTP

MPTP lako prolazi BBB te odlazi u glija stanice gdje se metabolizira pomoću MAO-B u 1-metil-4-fenilpiridinij (MPP⁺) koji se potom transportira u dopaminergičke neurone zbog visokog afiniteta za DAT (Jagmag i sur. 2016). Unutar neurona, MPP⁺ se nakuplja u mitohondrijima i uzrokuje smanjenu sintezu adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) te akumulaciju ROS-a inhibicijom kompleksa I mitohondrija što posljedično oštećuje dopaminergičke neurone u striatumu i SNc (Zeng i sur. 2018; Jagmag i sur. 2016).

1.2.5.1.3. 6-OHDA

Neurotoksin 6-OHDA, analog dopamina, djeluje na način da selektivno uzrokuje gubitak dopaminergičkih neurona jer pokazuje visoki afinitet za DAT (Lopes i sur. 2010). 6-OHDA se unosi isključivo direktnim injektiranjem u SNc ili striatum jer zbog svojstva hidrofilnosti ne može proći BBB (Jagmag i sur. 2016). Unutar neurona, 6-OHDA se akumulira i autooksidira što dovodi do stvaranja ROS-a i posljedično lipidne peroksidacije te oksidacije proteina i DNA što rezultira oksidativnim stresom i disfunkcijom mitohondrija (Zeng i sur. 2018).

1.2.5.1.4. Rotenon

Rotenon, poznati pesticid, je za razliku od 6-OHDA, hidrofoban te iz tog razloga uspješno prolazi BBB u neovisnosti o DAT. U animalnim modelima, može se injektirati intraperitonealno, intravenozno, subkutano ili direktno u mozak (Jagmag i sur. 2016). Djeluje na način da u dopaminergičkim neuronima inhibira aktivnost kompleksa I mitohondrija što uzrokuje akumulaciju ROS-a i posljedično oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija (Zeng i sur. 2018). Osim toga, rotenon inhibira mitozu i proliferaciju stanica (Jagmag i sur. 2016).

Važno je naglasiti da se prethodno navedeni neurotoksini, osim u animalnim modelima, koriste i u staničnim modelima u kojima uzrokuju ozljedu stanica nalik ozljedi u Parkinsonovoj bolesti.

1.2.5.2. Stanični modeli

U usporedbi s animalnim modelima, stanični modeli su jeftiniji, ne zahtijevaju odobrenje etičkog povjerenstva, brže razvijaju fenotip bolesti te je genetička i farmakološka manipulacija jednostavnija i pouzdanija (Falkenburger i sur. 2016). Najčešći stanični modeli koji se koriste u istraživanju Parkinsonove bolesti su prikazani u Tablici 2, a koriste za istraživanje gubitka dopaminergičkih neurona u SNc te za istraživanje proteinskih agregata koji sadrže alfa-sinuklein (Falkenburger i sur. 2016).

Tablica 2. Prednosti i nedostaci staničnih linija koje se koriste za istraživanje Parkinsonove bolesti. DAT – transporter dopamina, TH – tirozin hidroksilaza, VMAT-2 – vezikularni monoaminski transporter 2

(Preuzeto i prilagođeno prema: (Cagle i sur. 2021; Ferrari i sur. 2020; Slanzi i sur. 2020)

Stanična linija	Prednost	Nedostatak
N27 (Stanice mezencefalnih dopaminergičkih neurona štakora)	Nedavno (2016.) napravljen novi klon s višim razinama TH i DAT. Stanice eksprimiraju VMAT-2 te oslobađaju dopamin.	Mala ekspresija DAT što ograničava korištenje stanične linije u ispitivanju metabolizma dopamina. Varijabilna ekspresija ključnih proteina.
SH-SY5Y (Humane neuroblastoma stanice)	Diferenciraju u stanice nalik neuronima koje pokazuju dopaminergički, kolinergički ili noradrenergički fenotip.	Podrijetlo neuroblastoma može utjecati na diferencijaciju, vitalnost, sposobnost rasta, genomsku stabilnost.
PC12 (Stanice iz feokromocitoma srži nadbubrežne žlijezde štakora)	Sintetizira, oslobađa i pohranjuje katekolamine. Jednostavno rukovanje.	Nehumane, potječu iz neuralnog tumora što može utjecati na signalizacijske putove.
Primarni neuroni (Iz moždanog tkiva embrija glodavaca)	Morfološki i fiziološki slični ljudskim neuronima. Prikladni za stvaranje genetskih modela.	Etički problemi, mješovita kultura, teško održavanje, postupak disekcije može uzrokovati eksperimentalnu varijabilnost, razlike ovisne o vrsti.

1.2.6. Liječenje Parkinsonove bolesti

Liječenje Parkinsonove bolesti je vrlo kompleksno zbog progresivne prirode same bolesti kao i kombinacije motoričkih i ne-motoričkih simptoma. Iako nijedan lijek ne može u potpunosti izliječiti bolest, danas postoje različiti pristupi liječenju (Prediger i sur. 2014).

1.2.6.1. Liječenje bazirano na lijekovima

Lijekovi bazirani na dopaminu predstavljaju glavnu strategiju liječenja Parkinsonove bolesti (Tablica 3), a osim njih, koriste se i ne-dopaminergički lijekovi poput antikolinergika i inhibitora N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora (Prediger 2014).

Tablica 3. Skupine lijekova temeljene na dopaminu za liječenje Parkinsonove bolesti. COMT - katekol O-metiltransferaza, L-dopa - l-3,4-dihidroksifenilalanin, MAO – monoamin-oksidaza (MAO-B; izoforma MAO)

(Preuzeto i prilagođeno prema: Prediger i sur. 2014)

Lijek	Nuspojave
L-dopa (primarni i najefektivniji lijek)	Mučnina, diskinezija, hipotenzija, halucinacije
COMT inhibitori	Dijareja, pogoršava nuspojave L-dope
Agonisti dopamina (primjena i u ranim i kasnim fazama bolesti)	Mučnina, glavobolja, vrtoglavica
MAO-B inhibitori (koriste se za simptomatsko liječenje bolesti te kao adjuvantna terapija)	Mučnina, nesanica, interakcija s drugim MAO inhibitorima

L-dopa, prekursor dopamina, predstavlja najučinkovitiji lijek za ublažavanje motoričkih simptoma bolesti, a mehanizam djelovanja se temelji na mogućnosti prolaska kroz BBB do nigrostrijatalnog puta gdje se dekarboksilira u dopamin djelovanjem enzima. U ranoj fazi bolesti, oboljeli odgovaraju dobro i dugo na primijenjene doze L-dope, ali s napretkom bolesti, konverzija L-dope u dopamin postaje ograničena. Osim toga, primjena velikih doza L-dope može uzrokovati diskineziju čiji mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen te neuropsihijatrijske simptome i demenciju (Prediger i sur. 2014). Prema Bloem i sur. (2021), primjena lijekova baziranih na dopaminu pogoršava ne-motoričke simptome bolesti što ukazuje na potrebu multidisciplinarnog pristupa liječenju, odnosno potrebu za kombinacijom farmakološkog i nefarmakološkog pristupa.

1.2.5.2. Nefarmakološki pristup liječenju

Danas postoji nekoliko nefarmakoloških pristupa liječenju Parkinsonove bolesti koji primarno podrazumijevaju neurokirurgiju. Prvi pristup je usmjeren na obnovu funkcije bazalnog ganglija pomoću dubinske mozgovne stimulacije (engl. *Deep Brain Stimulation*, DBS) GPI, STN i talamusa visokom frekvencijom ili operacijom lezija. Za razliku od DBS-a, operacija lezija je unilateralna zbog rizika oštećenja govora, gutanja ili kognicije te predstavlja dugotrajnije rješenje jer je neovisno o stalnoj potrebi za stimulacijom i podešavanjem baterije (Bloem i sur. 2021). Drugi pristup je rekonstruktivna operacija koja podrazumijeva implantaciju stanica koje proizvode dopamin u striatum (npr. ljudske

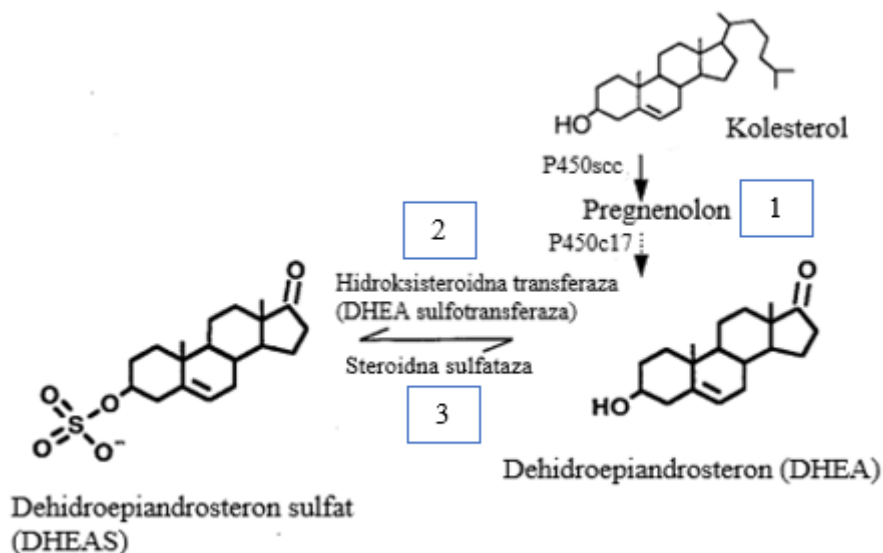
fetalne mezencefalne stanice). Prethodno navedeni nefarmakološki pristupi sami po sebi ili u kombinaciji s klasičnim lijekovima uzrokuju bolje poboljšanje simptoma bolesti nego lijekovi sami (JeLLinger 2014). Jedan od nekirurških pristupa je i rehabilitacija u vidu fizioterapije ili rehabilitacije govora (Prediger i sur. 2014).

Uzimajući u obzir činjenicu da trenutno ne postoji lijek za Parkinsonovu bolest, jasna je važnost istraživanja novih potencijalnih terapeutika koji će liječenje učiniti učinkovitijima.

1.3. Neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS)

1.3.1. Sinteza i metabolizam DHEA i DHEAS

Nadbubrežna žlijezda luči dva najbrojnija steroidna hormona u ljudskom organizmu – dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS; u daljnjem tekstu DHEA(S) kada se odnosi na oboje). DHEA se sintetizira *de novo* iz kolesterola (Slika 5). Prvi korak je konvertiranje kolesterola u pregnenolon djelovanjem mitohondrijskog enzima citokrom P450_{scc}, nakon čega djelovanjem enzima citokrom P450_{c17}, preko 17 OH-pregnenolon, iz pregnenolona nastaje DHEA. DHEA se nadalje djelovanjem enzima hidrosisteroidne transferaze (DHEA sulfotransferaza) prevodi u stabilniji sulfatni ester DHEAS te iz DHEAS može ponovno nastati DHEA pomoću steroidne sulfataze (Maninger i sur. 2009).



Slika 5. Prikaz metabolizma dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS); na slici su označeni brojevima: 1) sinteza DHEA iz kolesterola djelovanjem P450_{scc} i P450_{c17} preko pregnenolona 2) konverzija DHEA u DHEAS djelovanjem hidrosisteroidne transferaze 3) konverzija DHEAS u DHEA djelovanjem steroidne sulfataze

(Preuzeto i prilagođeno prema: Baulieu i Robel 1998)

Sinteza započinje još tijekom gestacijskog razdoblja kada se visoke razine DHEA(S) stvaraju i luče iz fetalne zone nadbubrežne žlijezde te opadaju šest mjeseci nakon rođenja i ostaju niske do adrenarhije. Nakon toga, *zona reticularis* nadbubrežne kore postaje glavno mjesto sekrecije DHEA(S) te razina kreće rasti do vrhunca u 20.-im godinama nakon čega progresivno opada i doseže minimum pri 65-70 godina starosti osobe kada se razvija većina bolesti (Maninger i sur. 2009), što je dovelo do pretpostavke da je smanjenje razine povezano s neurodegeneracijom i disfunkcijom koji se javljaju tijekom starenja (Quinn i sur. 2018). Muškarci dobi između 40 i 80 godina prosječno gube 1-4% DHEA(S) u plazmi godišnje, a žene 2% (Maninger i sur. 2009). Osim prirodnog gubitka DHEA(S), pokazano je da su promjene koncentracije u serumu uočene kod bolesnika s kardiovaskularnim problemima i neuropsihijatrijskim bolestima (Svob Strac i sur. 2020).

Osim nadbubrežne žlijezde kao primarnog mjesta lučenja, 10-20% DHEA(S) stvaraju gonade, a osobito je zanimljiva činjenica da se DHEA(S) sintetizira *de novo* u neuronima, oligodendrocitima i astrocitima u mozgu gdje je koncentracija 6-8 puta viša nego u perifernoj krvi zbog čega se DHEA(S) smatra neurosteroidom (Svob Strac i sur. 2020).

1.3.2. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja DHEA(S) nije u potpunosti razjašnjen (Maninger i sur. 2009), ali ima ključnu ulogu u različitim fiziološkim sustavima poput imunološkog i živčanog (Svob Strac i sur. 2020). Poznato je da DHEA(S) posreduje svoju funkciju kroz spolne steroide i njihove metabolite poput testosterona i estradiola koji nastaju iz DHEA(S) te aktivacijom receptora androgena ili estrogena u tkivu poput kože, jetre i mozga (Maninger i sur. 2009). DHEA(S) se veže i za protein povezan s mikrotubulima 2 (MAP2) te aktivira receptore u membrani povezane s G-proteinom što može npr. potaknuti brzu ekspresiju miR-21 preko estrogenskog receptora s G-proteinom. Poznato je da DHEA može povećati razinu receptora faktora rasta sličnih inzulinu te, iako nije izravni ligand za mineralokortikoidne receptore, aktivirati ih. Osim toga, DHEA u srcu inhibira T-tip kalcijevih kanala. DHEAS je povezan sa sintezom dušikovog oksida te s funkcijom ionskih kanala (Svob Strac i sur. 2020).

1.3.3. Neurobiološko djelovanje DHEA(S)

U mozgu, DHEA(S) modulira djelovanje GABA_A, NMDA te sigma 1 receptora na način da djeluje kao nekompetitivni antagonist GABA_A receptora, pozitivni alosterički modulator NMDA receptora i agonist sigma receptora (Maninger i sur. 2009). Nadalje, DHEA utječe na gene uključene u regulaciju apetita, iskorištavanje energije, budnost, preživljavanje stanica i apoptozu u hipotalamusu i hipokampusu. Osim toga, DHEA(S) djeluje i na serotoninergički te dopaminergički sustav (Svob Strac i sur. 2020). Ostale funkcije DHEA(S) u centralnom živčanom sustavu su sumirane u Tablici 4.

Tablica 4. Multifunkcionalna uloga dehidroepiandrosterona (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) u mozgu.

IL-6 – interleukin 6, NF- κ B – nuklearni faktor kappa B, NMDA - N-metil-D-aspartat

(Preuzeto i prilagođeno prema: (Quinn i sur. 2018))

Centralni živčani sustav	Funkcija
Neuroprotekcija	Štiti neurone od ekscitotoksičnosti glutamata, toksičnosti beta-amiloida i oksidativnog stresa. Inhibira NMDA-induciranu aktivnost dušik oksid sintetaze i proizvodnju dušikovog oksida.
Razvoj i regeneracija	Održavanje i endokrina kontrola trudnoće. Povezan s ljudskim rastom i razvojem organa, osobito mozga, tijekom adrenarhije. Potiče neurogenezu i preživljavanje neurona.
Memorija i učenje	DHEAS olakšava neurotransmisiju, kronična administracija DHEAS stimulira dugotrajno potenciranje, DHEA značajno čuva radnu memoriju i povećava koncentraciju acetilkolina, noradrenalina i dopamina u mozgu štakora.
Protuupalno djelovanje	Inhibira lučenje interleukina 6 (IL-6), inhibira citokinima potaknutu transkripciju nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B) antioksidativnim djelovanjem.

Glavno biološko djelovanje DHEA(S) je neuroprotekcija što je potvrđeno brojnim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima. Naprimjer, u jednom istraživanju je pokazano da primjena DHEA nakon ozljede leđne moždine poboljšava oporavak koordinacije i pokreta kod miševa (Fiore i sur. 2004). Česta su ispitivanja neuroprotekcije DHEA(S) u ishemiji te su rezultati različitih istraživanja pokazali da DHEA smanjuje ozljedu neurona kod štakora (Li i sur. 2001) i produljuje toleranciju na ishemiju kod zečeva (Lapchak i sur. 2000). Također, u kulturi stanica izloženoj anoksiji te u *in vitro* modelu ishemije

DHEA(S) pokazuje neuroprotektivno djelovanje (Kaasik i sur. 2001; Marx i sur. 2000). Ovisno o dozi te vremenu i trajanju liječenja, DHEA(S) može djelovati i suprotno, odnosno neurotoksično (Borowicz i sur. 2011).

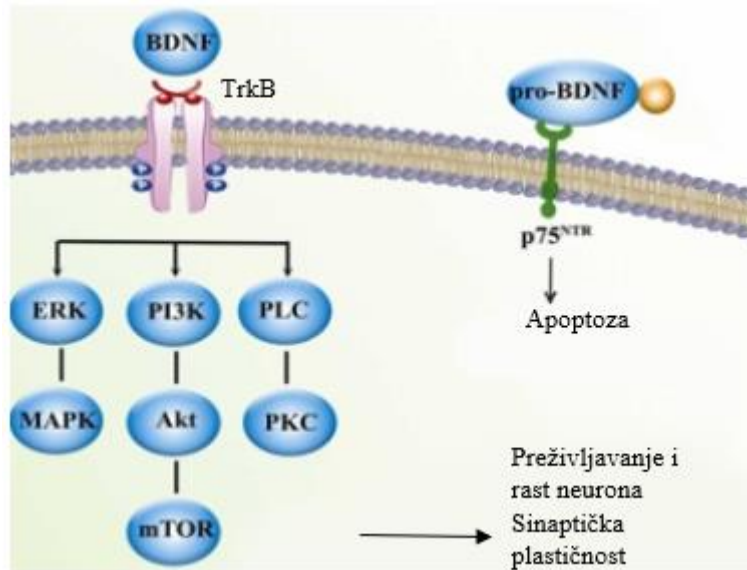
DHEA(S) ima važnu ulogu i u modulaciji raspoloženja, emocija, ponašanja te u kognitivnim funkcijama što čini DHEA(S) potencijalnom metom za prevenciju i liječenje različitih neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti kao što je Parkinsonova (Svob Strac i sur. 2020).

Također, DHEA(S) potiče neurogenezu i preživljavanje neurona, a jedan od potencijalnih mehanizama koji omogućavaju tu funkciju uključuje utjecaj DHEA(S) na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *Brain-derived Neurotrophic Factor*, BDNF; Maninger i sur. 2009).

1.4. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)

1.4.1. Metabolizam i mehanizam djelovanja BDNF

BDNF je član skupine neurotrofina koji se kao prekursor preproBDNF sintetizira u endoplazmatskom retikulumu iz kojeg nastaje proBDNF odcjepljivanjem signalnog peptida. Potom se proBDNF ili pakira u trans-Golgijevu mrežu za sortiranje u sekretorne vezikule ili djelovanjem enzima pretvara u zreli protein BDNF (Lu i sur. 2014). Pro regija se veže na karboksipeptidazu E te stupa u interakciju s proteinom koji regulira sortiranje, poznat kao sortilin. Vezikule s BDNF-om se transportiraju anterogradno i retrogradno do mjesta sekrecije u aksonima i dendritima putem mikrotubula. Za transport su ključna dva proteina, kinezin u slučaju anterogradnog i dinein-dinaktin kompleks za retrogradni transport. Protein huntingtin ima ulogu u kontroli brzine i smjera transporta na način da njegova fosforilacija potiče anterogradni transport regrutiranjem kinezina 1, a u slučaju kada nije fosforiliran, kinezin 1 se odvaja i vezikule odlaze retrogradnim transportom. Kao odgovor na depolarizaciju, BDNF se otpušta iz aksona, dendrita ili tijela neurona. Nadalje, BDNF se veže za tropomiozin receptorsku kinazu B (TrkB) što potiče dimerizaciju receptora te autofosforilaciju tirozina što rezultira regrutacijom adaptorskih proteina i transdukcijskih molekula koje aktiviraju glavne tri nizvodne kaskade fosforilacije putem kojih BDNF ostvaruje svoju ulogu (Slika 6; Benarroch 2015). S druge strane, proBDNF se veže na p75 neurotrofinski receptor (p75NTR) čija aktivacija zahtijeva nastanak i vezanje proBDNF/p75NTR/sortilin kompleksa što pokreće različite signalne putove koji imaju ulogu u apoptozi, preživljavanju neurona te održavanju adekvatnog broja neurona tijekom razvoja (Kowiański i sur. 2018).



Slika 6. Shematski prikaz signalizacije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) i prekursora proBDNF. BDNF ostvaruje svoju ulogu kroz ERK/MAPK, PI3K/Akt/mTOR i PLC/PKC signalne putove do čije aktivacije dolazi vezanjem BDNF na tropomiozin receptorsku kinazu B (TrkB).

Vezanje proBDNF na p75 neurotrofinski receptor (p75^{NTR}) potiče apoptozu.

Akt – proteinska kinaza B, ERK – ekstracelularnim signalom regulirana kinaza, MAPK – protein-kinaza aktivirana mitogenom, mTOR – meta rapamicina kod sisavaca, PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza, PLC – fosfolipaza C, PKC – protein kinaza C

(Preuzeto i prilagođeno prema: Zarneshan i sur. 2022)

BDNF je eksprimiran od rane embrionalne faze (Lu i sur. 2014), a razina ekspresije ostaje visoka i u odrasloj dobi (Miranda i sur. 2019). Razina BDNF mRNA doseže najviše razine do postnatalnog dana (Lu i sur. 2014), a široko je eksprimirana u neokorteksu, hipokampusu, amigdali i cerebelumu. U odnosu na periferna tkiva, razina BDNF je viša u mozgu (Benarroch 2015).

1.4.2. Neurobiološko djelovanje BDNF

Jedna od glavnih funkcija BDNF u mozgu je neuroprotekcija sprječavanjem ekscitotoksičnosti i poticanjem regeneracije dendrita antiapoptotičkim djelovanjem. Također, mikroglia oslobađa BDNF koji može imati neuroprotektivno djelovanje u kontekstu neuropale (Benarroch 2015).

BDNF ima ulogu i u neurogenezi, odnosno održavanju optimalnog broja proliferirajućih neuralnih progenitora i uvjeta koji omogućavaju daljnji rast i diferencijaciju (Kowiański i sur. 2018). U vizualnom korteksu u razvitku, egzogena primjena BDNF-a je rezultirala povećanom duljinom dendrita i složenosti piramidalnih neurona te je uočeno da neuroni moraju biti dovoljno aktivni da bi mogli odgovoriti na djelovanje BDNF-a (Bathina i Das 2015). U istraživanju gdje je korišten model ozljede centralnog živčanog sustava, pokazano je da *in vivo* injektiranje BDNF-a povećava preživljavanje

neurona, inhibira apoptozu te potiče neurogenezu (Klöcker i sur. 2000). Također, BDNF može potaknuti gliogenezu te proliferaciju glija stanica tijekom razvoja mozga i nekih patoloških procesa (Kowiański i sur. 2018).

Dugotrajna potencijacija (engl. *Long-Term Potentiation*, LTP) i dugotrajna depresija (engl. *Long-Term Depression*, LTD) predstavljaju dva modela sinaptičke plastičnosti na koje BDNF može utjecati. LTP je sinaptički specifičan, brzo induciran i postojan u usporedbi s LTD koji je induciran stimulacijom niske frekvencije (Tapia-Arancibia i sur. 2008). Prema Tanaka i sur. (2008), BDNF je potreban za induciranje dugotrajnih strukturnih promjena na dendritičkim trnovima koji tvore sinapse s drugim neuronima. Nadalje, kod miševa kojima nedostaje BDNF gen LTP je poremećen (Tapia-Arancibia i sur. 2008). Smatra se da BDNF eksprimiran nakon stimulacije visokom frekvencijom pojačava LTP, a da proBDNF izražen nakon stimulacije niskom frekvencije inducira LTD (Kowiański i sur. 2018).

Nadalje, BDNF može imati ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa zbog antioksidativnih svojstava, utjecati na kognitivne funkcije (Miranda i sur. 2019) te potaknuti proliferaciju stanica i regulirati migracijom neuronskih progenitora rostralnog migratornog toka (Kowiański i sur. 2018).

Upravo zbog brojnih funkcija i široke rasprostranjenosti, poremećaj u funkciji ili metabolizmu BDNF je povezan s razvojem neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove bolesti gdje je uočen smanjen aksonski transport BDNF-a u dopaminergičkim neuronima (Lu i sur. 2014) te su uočene smanjene razine BDNF-a kod oboljelih (Miranda i sur. 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

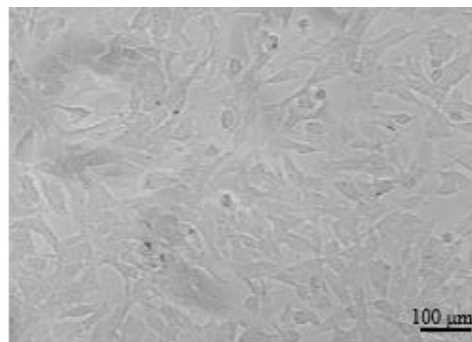
Cilj ovog istraživanja je ispitati terapijski potencijal neurotrofina BDNF i neurosteroida DHEA i DHEAS u prevenciji stanične smrti dopaminergičkih neurona koristeći stanični model Parkinsonove bolesti u kojem je ozljeda inducirana rotenonom ili pomoću 6-OHDA, na staničnoj liniji humanoga neuroblastoma SH-SY5Y te na kulturi animalnih dopaminergičkih neurona N27.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y

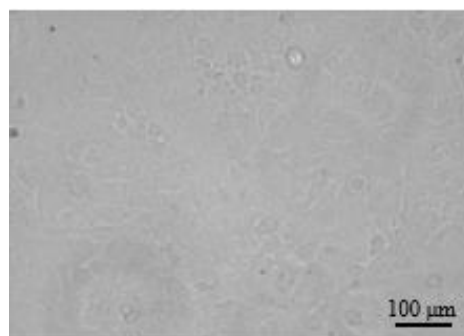
SH-SY5Y je subklon SK-N-SH neuroblastoma stanica generiranih iz koštane srži oboljele osobe koje se od 1980-ih koriste kao stanični model za različite bolesti, kao i za Parkinsonovu (Slika 7). Sposobnost sinteze dopamina i ekspresija prijenosnika DAT su najvažnije karakteristike SH-SY5Y stanica koje ih čine pogodnim modelima za istraživanje Parkinsonove bolesti uz mogućnost diferencijacije u izraženiji dopaminergički fenotip djelovanjem npr. retinoične kiseline, purina, staurosporina i BDNF-a. Takvi agensi mogu potaknuti toleranciju SH-SY5Y stanica te se iz tog razloga u istraživanju neurotoksičnosti i neuroprotekcije češće koristi nediferencirani oblik (Hong-rong i sur. 2010).



Slika 7. Kultura SH-SY5Y stanica.

3.1.2. Kultura štakorskih N27 dopaminergičkih neurona

N27 (1RB3AN27) kultura je generirana 1990-ih iz embrionalnih štakorskih mezencefalnih dopaminergičkih neurona te imortalizirana s SV40 velikim T antigenom (Slika 8). Stanice pokazuju umjerenu ekspresiju enzima TH i nisku ekspresiju prijenosnika DAT te se danas često koriste za istraživanje različitih molekularnih mehanizama poput neurotoksičnosti i neurodegeneracije te kao *in vitro* model za istraživanje Parkinsonove bolesti (Gao i sur. 2016).



Slika 8. Kultura N27 stanica.

3.1.3. Osnovne otopine

Sastav otopina koje sam koristila za uzgoj, presađivanje i održavanje SH-SY5Y i N27 stanica je prikazan u Tablici 5.

Tablica 5. Popis i sastav korištenih otopina i sastav za uzgoj, presađivanje i održavanje stanica.

Otopina	Sastav
Potpuni i kompletirani medij za SH-SY5Y stanice	Medij DMEM (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM) (Gibco): s visokim udjelom glukoze (4500 mg/L) s 10% fetalnim goveđim serumom (Gibco) (inaktiviranim 60 minuta na 56 °C), 2 mM L-glutaminom (Sigma), 100 U/ml penicilinom (Sigma), 100 µg/ml streptomycinom (Sigma), 2,5 µg/ml amfotericinom B (Sigma); pH 7,4; steriliziran filtriranjem kroz 0,2 µM filter
Potpuni i kompletirani medij za N27 stanice	Medij RPMI 1640 (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> , RPMI) (Gibco): s 10% fetalnim goveđim serumom (Gibco) (inaktiviranim 60 minuta na 56 °C), 2 mM L-glutaminom (Sigma), 100 U/ml penicilinom (Sigma), 100 µg/ml streptomycinom (Sigma), 2,5 µg/ml amfotericinom B (Sigma); pH 7,4; steriliziran filtriranjem kroz 0,2 µM filter
Antimikotik	amfotericin B (Sigma)
Antibiotici	penicilin (Sigma), streptomycin (Sigma)
Puferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM K ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Otopina tripsina za presađivanje stanica	0,05% tripsin, 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) u PBSA
Otopina tripanskog modrila (Trypan blue) za brojanje stanica	0,4% tripansko modrilo, 0,81% NaCl, 0,06% K ₂ HPO ₄

Otopine koje sam koristila za ispitivanje terapijskog potencijala su prikazane u Tablici 6.

Tablica 6. Popis korištenih otopina u istraživanju.

Uloga	Kemikalije
Lijekovi	DHEA (Avanti, matična otopina (1 mg/ml) u metanolu, radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi – 1000 nM) , DHEAS (Supelco, m.o. (1 mg/ml) u metanolu, radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi – 1000 nM), BDNF (Sigma-Aldrich, liofiliziran (10 µg), radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi – 1000 ng/mL)
Za induciranje ozljede	6-OHDA (Sigma-Aldrich, radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi – 75 µM), rotenon (Sigma-Aldrich, radna otopina u etanolu – 1 µM)
Za mjerenje vijabilnosti stanica	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT; Sigma, 0,5 mg/ml)
Za određivanje parametara oksidativnog stresa	2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, radna otopina u DMSO -10 mM)
Za detekciju stanične smrti	Hoechst 33342 (Sigma, radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi - 1 mg/µL), propidij jodid (PI; Sigma, radna otopina u redestiliranoj sterilnoj vodi - 1 mg/µL)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj, održavanje i presađivanje SH-SY5Y i N27 staničnih kultura

Stanice su prethodno bile smrznute u tekućem dušiku te sam u svrhu njihova topljenja, ampule sa stanicama inkubirala u termalnoj kupelji na 37 °C. Stanice sam prebacila u 5 mL prethodno zagrijanog hranjivog medija i centrifugirala 5 min na 300 g. Dobiveni talog stanica sam resuspendirala u 5 mL novog medija te sam sve zajedno prenijela u posudu za uzgoj staničnih kultura (75 cm², 250 mL) nakon čega sam dodala još 5 mL medija. Pri uvjetima od 37 °C i 5% CO₂, stanice su čuvane u inkubatoru (Heraeus).

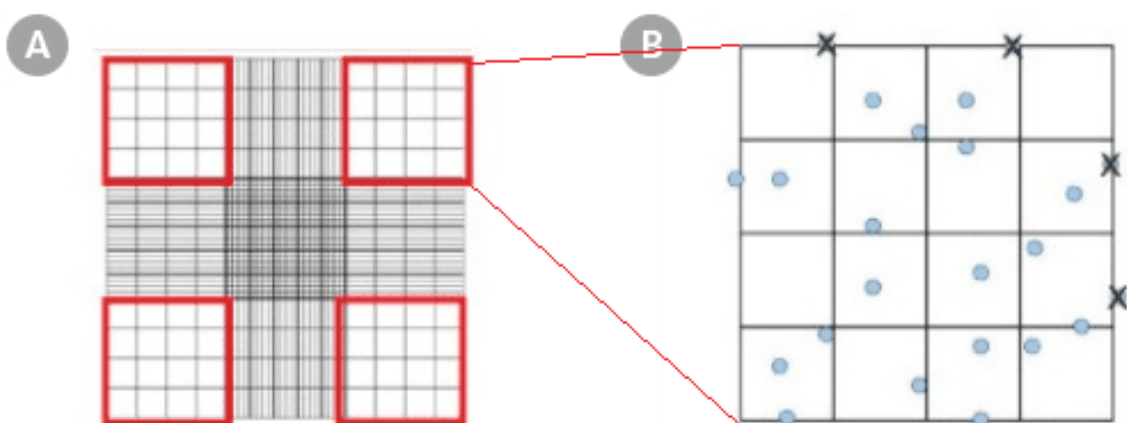
Stanice su održavane na način da sam ih presađivala dva puta tjedno u slučaju SH-SY5Y stanica te jednom dnevno u slučaju N27 stanica na način da sam prvo iz posude za uzgoj staničnih kultura odsisala medij, a potom stanice isprala 2 x 3 mL PBS-a kako bih uklonila čitav stari medij. Zatim sam u posudu dodala 0,5 mL 0,05% tripsina u svrhu odvajanja stanica od podloge. Odvojene stanice sam resuspendirala u 5 mL novog medija te sam dio stanične suspenzije ostavila u posudi za daljnje održavanje kulture s kojima je prethodno navedeni postupak nastavio biti ponavljan, a dio nasadila na pločice za uzgoj stanica od 96 ili 12 jažica.

3.2.2. Brojanje stanica

Kako bih mogla nasaditi stanice u broju koji je potreban za eksperiment te kako bih uopće znala s kojim brojem stanica raspolazem, prvo sam brojala stanice. U tu svrhu, napravila sam suspenziju za brojanje stanica koja se sastojala od 40 μ L stanične suspenzije (talog stanične suspenzije dobiven centrifugiranjem 5 min na 300 g resuspendiran u 5 mL medija), 60 μ L medija i 100 μ L tripanskog modrila. Tripansko modrilo omogućava razlikovanje živih od mrtvih stanica jer vijabilne stanice ostaju bezbojne zato što tripansko modrilo ne može prodrijeti u njih zbog netaknute stanične membrane. Za brojanje stanica korištena je Bürker-Türkova komorica.

Stanice sam brojala pod invertnim mikroskopom u četiri vidna polja označena crvenom bojom na Slici 9. od kojih se svako sastoji od 16 manjih polja, a stanice sam razrijedila na željeni volumen nakon što sam odredila njihov broj u mililitru prema formuli:

$$N (\text{broj stanica u mL}) = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{ukupan broj polja}} * 5 (\text{razrjeđenje}) * 250 * 10^3$$



Slika 9. Mreža za brojanje stanica.

A- četiri vidna polja, B- uvećano polje i prikaz načina brojanja stanica

(Preuzeto sa: <https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html>)

3.2.3. Tretman stanica

3.2.3.1. Lijekovi

100 μL stanične suspenzije koja je sadržavala $0,5 \times 10^5$ stanica sam nasadila u svaku jažicu pločice s 96 jažica te 1 mL iste stanične suspenzije u svaku jažicu pločice s 12 jažica. Pojedinačne pločice od 96 i 12 jažica su korištene za SH-SY5Y stanice i pojedinačne za N27 stanice. Nakon 24 sata, nasadene stanice sam tretirala lijekovima DHEA (konačna koncentracija u mediju - 100 nM), DHEAS (konačna koncentracija u mediju – 100 nM) i BDNF (konačna koncentracija u mediju – 100 ng/mL) pojedinačno te u kombinaciji (DHEA+BDNF, DHEAS+BDNF) 16 sati prije ozljede (predtretman). Kombinacije koncentracija sam nanosila u 6 replika u slučaju pločice od 96 jažica te u 2 replike u slučaju pločice od 12 jažica. Pločice sam stavila u inkubator (37 °C i 5% CO_2) na 16 sati do nastavka eksperimenta.

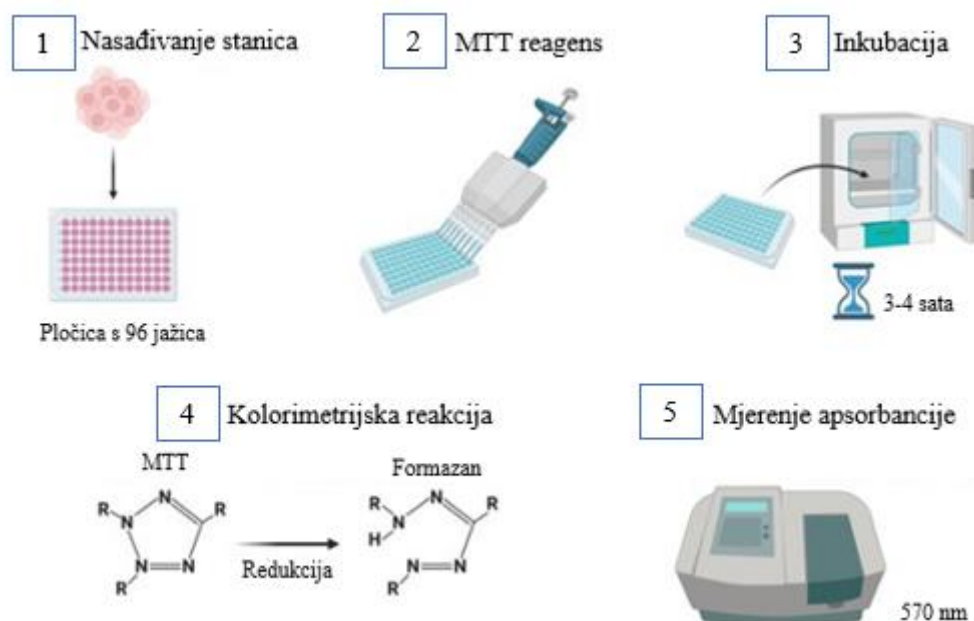
3.2.3.2. Ozljeda

Za induciranje *in vitro* modela Parkinsonove bolesti, stanice sam ozlijedila rotenonom (konačna koncentracija u mediju – 1 μM) i 6-OHDA (konačna koncentracija u mediju – 75 μM) 16 sati nakon primjene lijekova. Kod ozljede, na svaku jažicu dodan je odgovarajući medij s rotenonom ili 6-OHDA, do željene koncentracije od 1 μM u slučaju rotenona i 75 μM u slučaju 6-OHDA. Pločice sam ostavila 24 sata u inkubatoru (37 °C i 5% CO_2) do mjerenja preživljenja stanica MTT testom, parametara oksidativnog stresa i detekcije stanične smrti.

U svakom eksperimentu postojala je grupa stanica koje nisu tretirane lijekovima, ali su ozlijeđene rotenonom ili sa 6-OHDA. Kao kontrolnu grupu koristila sam stanice koje nisu tretirane lijekovima niti su ozlijeđene.

3.2.4. MTT test

MTT je kolorimetrijski test koji se koristi za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju redukcije MTT tetrazolijeve soli u netopljive ljubičaste kristale formazana djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza. Što je otopina tamnija, to je veći broj metabolički aktivnih stanica, a otopina se kvantificira mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 570 nm (Slika 10). Očitana apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u uzorku.



Slika 10. Shematski prikaz provođenja MTT testa; na slici su označeni brojevima: 1) Nasadiavanje određenog broja stanica na pločicu s 96 jažica 2) Dodavanje MTT reagensa u svaku jažicu 3,4) Inkubacija pločice u inkubatoru unutar kojeg se odvija kolorimetrijska reakcija 5) Mjerenje apsorbancije pri 570 nm

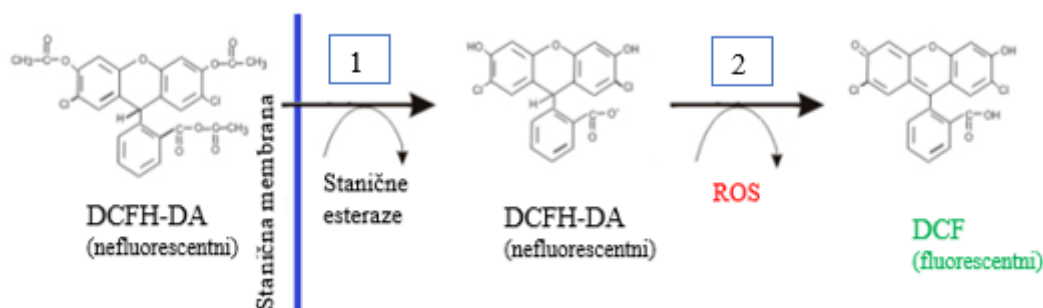
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

(Preuzeto sa: <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/>)

Nakon inkubacije od 24 sata, stanicama sam odisala medij te dodala 40 μL radne otopine MTT-a (0,5 mg/ml), koju sam pripremila otapanjem matične otopine MTT-a u odgovarajućem mediju (DMEM ili RPMI), u svaku jažicu pločice od 96 jažica. Pločice sam vratila u inkubator (37 °C i 5% CO_2) na četiri sata. Nakon toga, u svaku jažicu sam dodala 160 μL dimetil sulfoksida (Sigma) u svrhu topljenja kristala formazana te stavila pločice na miješalicu nekoliko minuta. Potom sam rezultate očitala pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Thermo LabSystems Multiskan EX Microplate Reader) pri apsorbanciji od 570 nm.

3.2.5. Detekcija parametara oksidativnog stresa

Pomoću DCFH-DA testa mjeri se ukupna razina ROS-a u stanicama, a temelji se na oksidaciji nefluorescentnog DCFH-DA u fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF) pomoću ROS-a te se fluorescencija mjeri pri valnoj duljini pobude od 485 nm i valnoj duljini emisije od 530 nm (Slika 11). Razina fluorescencije je proporcionalna razini ROS-a u stanicama.



Slika 11. Shematski prikaz principa DCFH-DA testa; na slici su označeni brojevima: 1) DCFH-DA kao nefluorescentni reagens propustan za stanice se deacetilira staničnim esterazama u DCFH-DA nakon difuzije u stanicu 2) DCFH-DA se oksidira djelovanjem ROS-a u fluorescentni DCF

DCFH-DA - 2',7'-diklorodihydrodifluorescein-diacetat, ROS - reaktivne kisikove vrste

(Preuzeto i prilagođeno prema: Nova i sur. 2020)

Nakon inkubacije od 24 sata, stanicama sam odsisala medij, isprala ih jednom u odgovarajućem mediju (200 μ L) te dodala 200 μ L 10 μ M otopine DCFH-DA u odgovarajućem mediju (DMEM ili RPMI) u svaku jažicu pločice od 96 jažica. Pločice sam zatim vratila u inkubator (37 $^{\circ}$ C i 5% CO_2) na 30 min. Stanicama sam uklonila čitavu radnu otopinu, isprala ih dva puta s 200 μ L PBS-a te dodala PBS (200 μ L) prije očitavanja fluorescencije pomoću čitača mikrotitarskih ploča Infinite M200 PRO (Tecan) pri valnoj duljini pobude od 485 nm i valnoj duljini emisije od 530 nm.

3.2.6. Detekcija stanične smrti

Hoechst 33342 i propidij jodid su fluorescentne boje koje se koriste za detekciju apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica. Hoechst 33342 je boja koja prolazi staničnu membranu te se veže na regije DNA bogate timinom i adeninom te boji jezgre stanica, odnosno boji kondenzirani kromatin apoptotičnih stanica svijetlije od kromatina neapoptotičnih stanica. Emitira plavu svjetlost valne duljine 460-490 nm nakon ekscitacije ultraljubičastim svjetlom. Propidij jodid je crvena interkalirajuća boja koja se veže isključivo za DNA mrtvih stanica jer, za razliku od Hoechst 33342, ne može proći netaknutu membranu živih stanica. Emitira na valnoj duljini od 617 nm, a ekscitira se valnom duljinom od 488 nm.

Za provedbu ovog dijela eksperimenta, stanice sam nasadila te tretirala lijekovima i ozlijedila po prethodno navedenom postupku na pločicama s 12 jažica. U svaku jažicu sam dodala 1 μ L Hoechst 33342 i 1 μ L propidij jodida te inkubirala u mraku na sobnoj temperaturi nekoliko minuta kako bi boja ušla u stanice. Rezultate sam vizualizirala pomoću EVOS Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher

Scientific) te naknadno prebrojala. Za detekciju fluorescencije korišten je plavi filter za Hoechst 33342 (ekscitacija 357 nm, emisija 447 nm) i crveni filter za propidij jodid (ekscitacija 531 nm, emisija 593 nm).

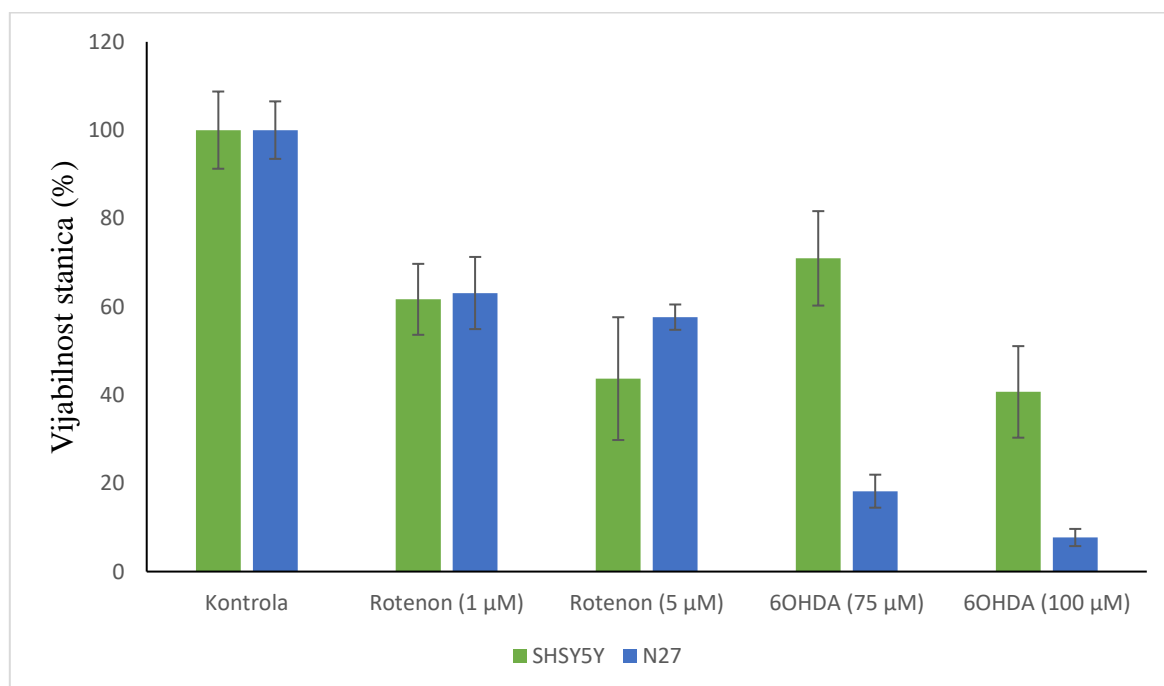
3.2.7. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka koristila sam program GraphPad Prism verzija 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD). Grafički prikaz podataka je napravljen pomoću GraphPad Prism verzije 4.00 i Microsoft Excela 2020. Statistički test koji sam koristila za usporedbu tri ili više skupina podataka je Kruskal-Wallis test jer su podatci odstupali od normalne razdiobe, a u slučaju usporedbe dvije skupine koristila sam Mann-Whitney U test. U slučaju Kruskal-Wallis testa, kada je utvrđena značajna razlika između pojedinih skupina, napravila sam Dunn-Bonferroni *post-hoc* analizu kako bi međusobno usporedila pojedine skupine. Razinu značajnosti α sam za sve analize postavila na 0,05, a svi korišteni testovi su dvosmjerni. Podatke sam grafički prikazala kao medijan, interkvartilni raspon između 25. i 75. percentila te raspon između minimuma i maksimuma. Rezultate bojanja s Hoechstom 33342 i propidij jodidom sam dobila manualnim prebrojavanjem stanica pomoću programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4. REZULTATI

4.1. Preživljenje stanica

Stanice SH-SY5Y i N27 su tretirane različitim dozama rotenona (1 μM i 5 μM) i 6-OHDA (75 μM i 100 μM) 24 sata prije provođenja MTT testa u svrhu odabira doze neurotoksina za daljnje postupke (Slika 12). Isprobane doze su odabrane prema literaturi. Za daljnje eksperimente odabran je 1 μM rotenon te 75 μM 6-OHDA kao doze pri kojima se uočava optimalno toksičan učinak na preživljenje SH-SY5Y i N27 stanica. Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica (%) \pm standardna devijacija (Slika 12).



Slika 12. Vijabilnost SH-SY5Y i N27 stanica ozlijeđenih rotenonom i 6-OHDA u različitim dozama.

SH-SY5Y i N27 stanice su tretirane s DHEA(S) (100 nM) i s neurotrofinom BDNF (100 ng/mL) pojedinačno i u kombinaciji (DHEA+BDNF, DHEAS+BDNF) 16 sati prije ozljede rotenonom (1 μM) ili 6-OHDA (75 μM) te je preživljenje stanica 24 sata nakon ozljede određeno MTT testom koji mjeri metaboličku aktivnost stanica čiji je broj proporcionalan očitanoj apsorbanciji. Rezultati su prikazani kao % vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu koja nije tretirana lijekovima niti ozlijeđena, a računa se prema formuli:

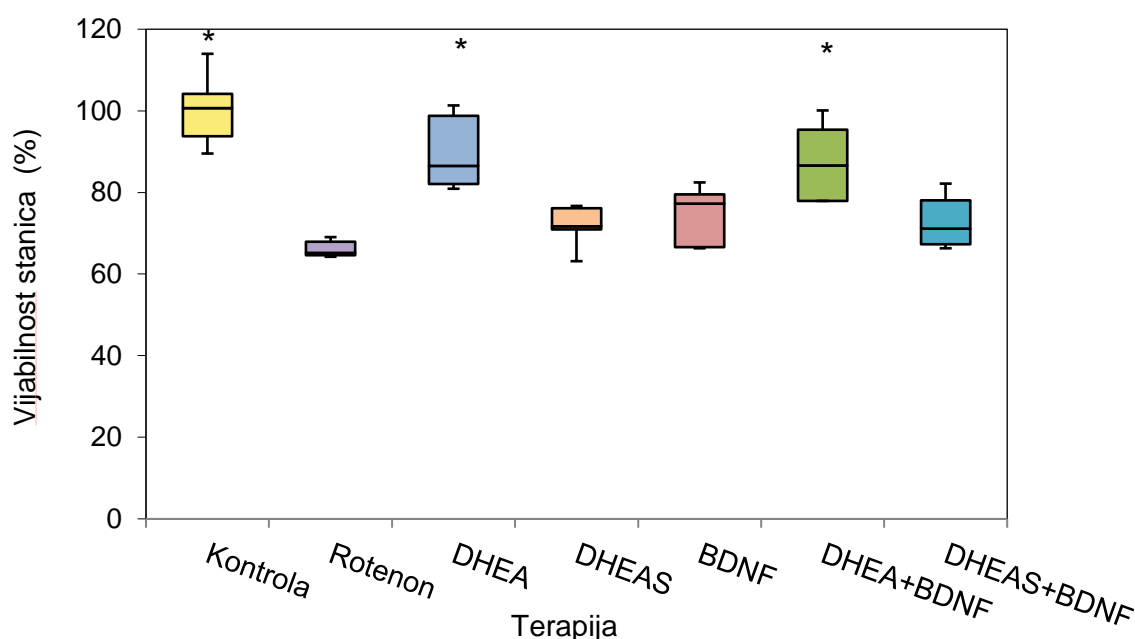
$$\% \text{ vijabilnih stanica} = \frac{A(\text{test}) - A(\text{negativna kontrola})}{A(\text{kontrola}) - A(\text{negativna kontrola})} * 100$$

gdje je A apsorbancija, a negativna kontrola jažica bez nasađenih stanica (prosječna pozadinska apsorbancija).

4.1.1. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost SH-SY5Y stanica ozlijeđenih rotenonom

Rezultati MTT testa nakon predtretmana SH-SY5Y stanica ozlijeđenih rotenonom su prikazani na Slici 13. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u udjelu vijabilnih stanica ($H = 27,11$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Iz rezultata je vidljivo da rotenon primijenjen u koncentraciji od $1 \mu\text{M}$ uzrokuje statistički značajan ($p < 0,001$) pad vijabilnosti stanica za $34,8\%$, odnosno u usporedbi s kontrolnom skupinom (medijan; minimum-maksimum; $100,7$; $89,5 - 114,0$) iznosilo je $65,2$ ($64,2 - 69,1$). Statistički značajno povećanje vijabilnosti nakon ozljede je dobiveno tretmanom s 100 nM DHEA ($p \leq 0,001$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pojedinačno i 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF ($p = 0,004$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) u kombinaciji. Najučinkovitiji tretman je bio s DHEA pri čemu je postotak vijabilnosti koji je u ozljedi iznosio $65,2$ ($64,2 - 69,1$) povećan na $86,5$ ($80,1 - 101,3$), dok su DHEA+BDNF u kombinaciji povećali vijabilnost na $86,6$ ($77,9 - 100,1$) u odnosu na ozljedu. Trend povećanja vijabilnosti u odnosu na ozljedu uočen je i u tretmanu s 100 nM DHEAS i 100 ng/mL BDNF pojedinačno te 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji, ali nije statistički značajan ($p = 0,230$; $p = 0,163$; $p = 0,290$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test).



Slika 13. Vijabilnost rotenonom ozlijeđenih SH-SY5Y stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

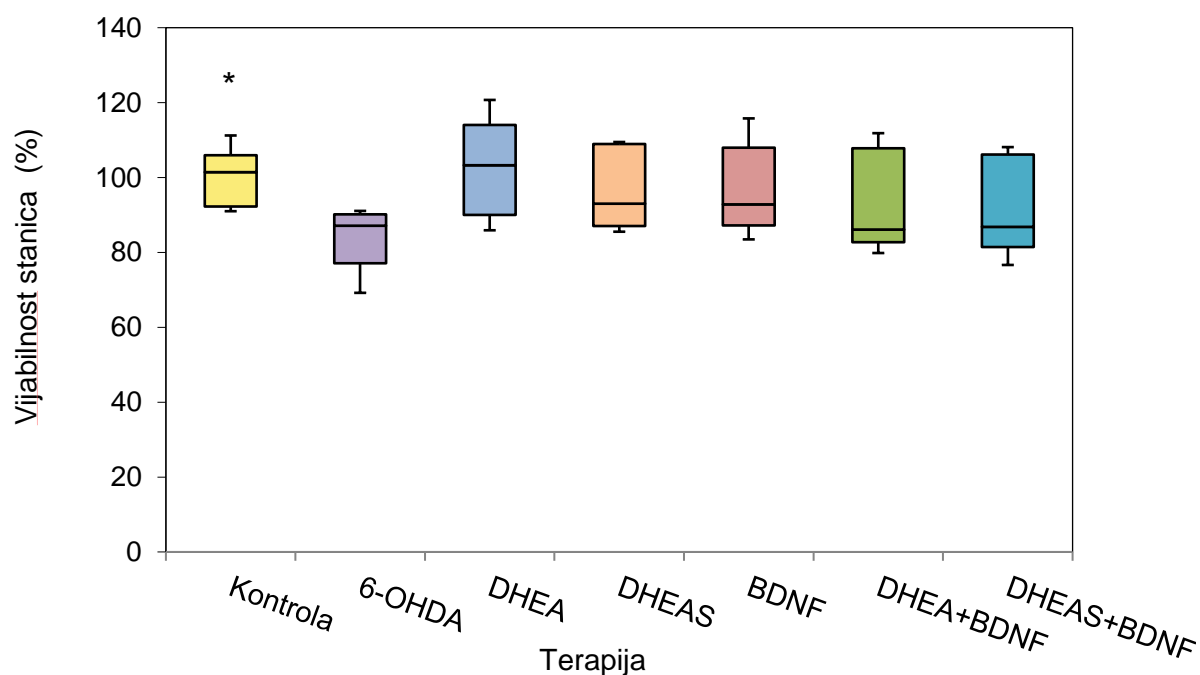
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti.

* $p < 0,050$ vs. rotenon (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.1.2. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost SH-SY5Y stanica ozlijeđenih 6-OHDA

Rezultati MTT testa nakon predtretmana SH-SY5Y stanica ozlijeđenih 6-OHDA su prikazani na Slici 14. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa ne postoji statistički značajna razlika u udjelu vijabilnih stanica ($H = 10,43$; $df = 6$; $p = 0,108$).

Međutim, u usporedbi s kontrolom, primjena $75 \mu\text{M}$ 6-OHDA je uzrokovala statistički značajno ($U = 1,00$; $p < 0,001$; Mann-Whitney U test) smanjenje vijabilnosti stanica. U uzorcima koji su isključivo ozlijeđeni sa 6-OHDA, % vijabilnosti je iznosio $87,1$ ($69,2 - 91,1$), a u kontrolnoj skupini % vijabilnosti iznosio je $100,0$ ($91,0 - 111,2$). Iako su predtretmani s 100 nM DHEA, 100 nM DHEAS, 100 ng/mL BDNF pojedinačno i s 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF i 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji povećali vijabilnost stanica u usporedbi s ozljedom, to povećanje nije doseglo razinu statističke značajnosti ($H = 10,43$; $df = 6$; $p = 0,108$; Kruskal-Wallis test). Iako nije statistički značajno, najveće povećanje vijabilnosti od $18,56\%$, u odnosu na ozljedu, zabilježeno je kod pojedinačne primjene DHEA (Slika 14).



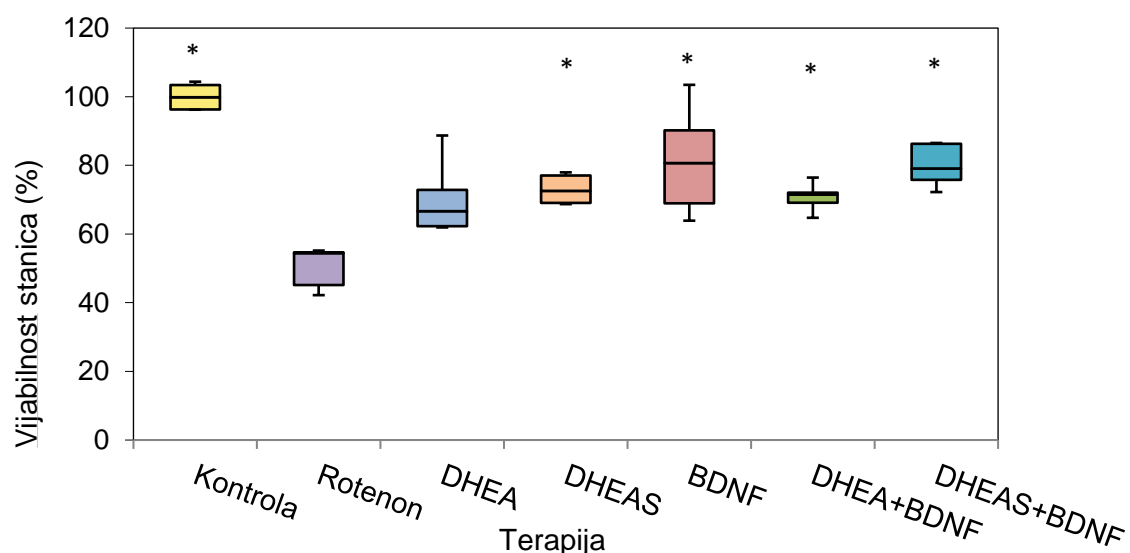
Slika 14. Vijabilnost 6-OHDA ozlijeđenih SH-SY5Y stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ vs. 6-OHDA (Mann-Whitney U test)

4.1.3. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost N27 stanica ozlijeđenih rotenonom

Rezultati MTT testa nakon predtretmana N27 stanica ozlijeđenih rotenonom su prikazani na Slici 15. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u udjelu vijabilnih stanica ($H = 24,83$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Prema rezultatima (Slika 15) MTT testa, u slučaju ozljede $1 \mu\text{M}$ rotenonom je došlo do statistički značajnog ($p < 0,001$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: 99,8%; 96,2 - 104,4% vs. rotenon: 54,4%; 42,2 - 55,2%). Statistički značajno povećanje je uzrokovao tretman s 100 nM DHEAS ($p = 0,035$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) i 100 ng/mL BDNF ($p = 0,003$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pojedinačno te 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF ($p = 0,050$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) i 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF ($p = 0,003$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) u kombinaciji u usporedbi s vijabilnošću izmjerenom u isključivo ozlijeđenim N27 stanicama. Stanicama tretiranim s DHEAS, povećana je vijabilnost na 72,6% (68,7 – 78,0%), a stanicama tretiranim s BDNF na 80,6% (63,9 – 103,4%). Primjena DHEA + BDNF i DHEAS + BDNF u kombinaciji je povećala vijabilnost na 71,5% (64,7 – 90,1%), odnosno na 79,1% (72,2 – 86,5%). BDNF primijenjen samostalno se pokazao kao najučinkovitiji tretman s povećanjem vijabilnosti za 48,21% u odnosu na ozljedu. U slučaju tretmana s DHEA, vidljiv je trend poboljšanja vijabilnosti u odnosu na ozljedu, ali nije statistički značajan ($p = 0,111$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test).



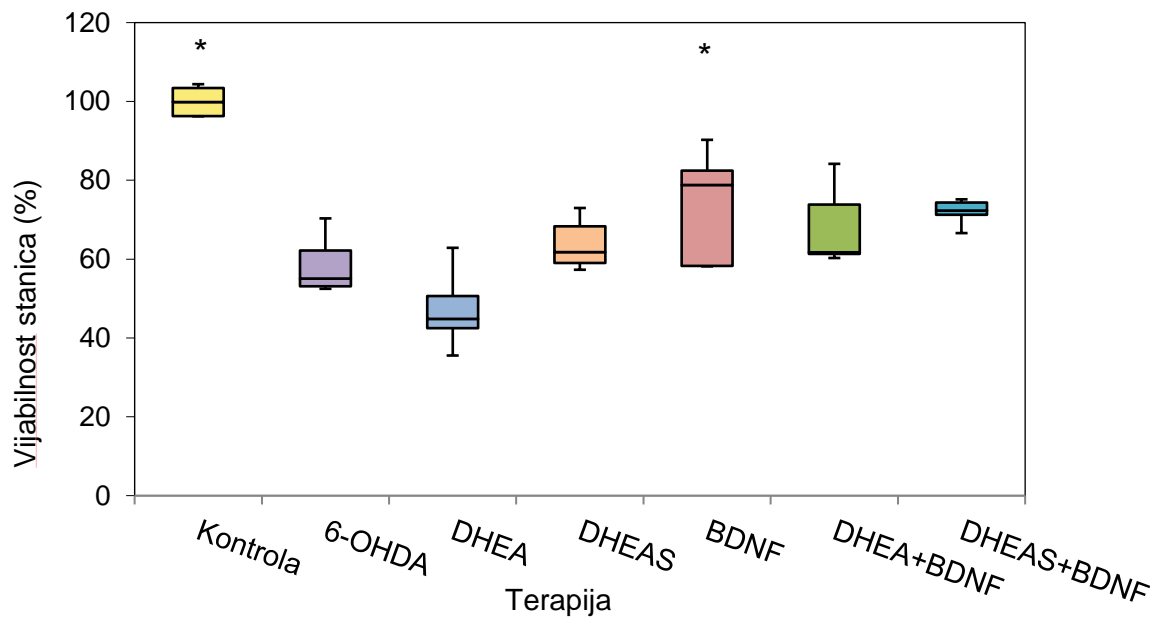
Slika 15. Vijabilnost rotenonom ozlijeđenih N27 stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ vs. rotenon (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.1.4. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na vijabilnost N27 stanica ozlijeđenih 6-OHDA

Rezultati MTT testa nakon predtretmana N27 stanica ozlijeđenih sa 6-OHDA su prikazani na Slici 16. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u udjelu vijabilnih stanica ($H = 25,24$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Prema rezultatima (Slika 16) MTT testa, u slučaju ozljede sa $75 \mu\text{M}$ 6-OHDA je došlo do statistički značajnog ($p < 0,001$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: 99,8%; 96,2 – 104,4% vs. 6-OHDA: 55,1%; 52,5 – 70,3%). U slučaju učinka terapije, trend povećanja vijabilnosti stanica u odnosu na ozljedu vidljiv je isključivo kod tretmana s 100 ng/mL BDNF ($p = 0,069$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test). Tretman s BDNF-om povećao je vijabilnost s 55,1% (52,5 – 70,3%) na 78,8% (58,2 – 90,3%). Tretman s 100 nM DHEAS pojedinačno te 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF i 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji su povećali vijabilnost, ali to povećanje nije doseglo razinu statističke značajnosti ($p = 0,497$; $p = 0,222$; $p = 0,143$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test). Kada je korišteno 100 nM DHEA pojedinačno, uočen je toksični učinak na stanice, odnosno pad vijabilnosti stanica na 44,8% (35,5 – 72,7%).



Slika 16. Vijabilnost 6-OHDA ozlijeđenih N27 stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti.

* $p < 0,050$ vs. 6-OHDA (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

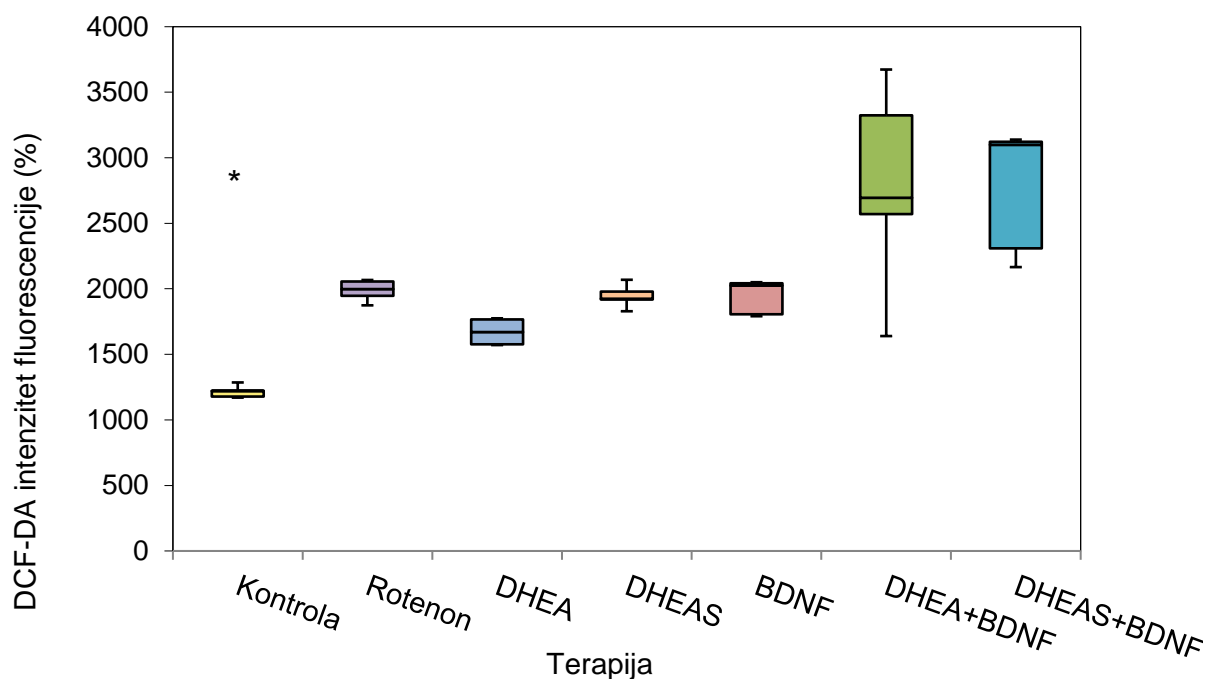
4.2. Parametri oksidativnog stresa

Nakon što sam ispitala preživljenje SH-SY5Y i N27 stanica tretiranih s DHEA(S) (100 nM) i BDNF (100 ng/mL) pojedinačno i u kombinaciji (DHEA+BDNF, DHEAS+BDNF) 16 sati prije ozljede rotenonom (1 μ M) i 6-OHDA (75 μ M) MTT testom, istražila sam učinak ozljede i navedenih lijekova na nakupljanje unutarstaničnog ROS-a pomoću DCFH-DA testa. Razina ROS-a u stanicama kolerira s intenzitetom fluorescencije DCF-DA produkta koji nastaje redukcijom DCFH-DA. Rezultati su izraženi kao prosječni intenzitet fluorescencije svake grupe stanica umanjen za prosječni pozadinski signal (negativna kontrola bez nasađenih stanica).

4.2.1. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenima rotenonom

Rezultati DCFH-DA testa nakon predtretmana SH-SY5Y stanica ozlijeđenih rotenonom su prikazani na Slici 17. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u proizvodnji ROS-a ($H = 25,99$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Iz rezultata je vidljivo da u slučaju ozljede 1 μ M rotenonom je došlo do statistički značajnog ($p = 0,009$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) povećanja razine ROS-a u odnosu na kontrolu (medijan; minimum - maksimum; kontrola: 1220,1; 1170,1 – 1331,1 vs. rotenon: 1998,1; 1874,1 – 2067,5). Niti jedan od tretmana (100 nM DHEA, 100 nM DHEAS, 100 ng/mL BDNF, 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF, 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF) nije uzrokovao statistički značajno povećanje/smanjenje proizvodnje ROS-a u usporedbi s ozljedom. Tretman s DHEA ($p = 0,103$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test), DHEAS ($p = 0,657$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) i BDNF-om ($p = 0,775$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) uzrokovali su smanjenje proizvodnje ROS-a, ali ono nije bilo statistički značajno. Za razliku od pojedinačne primjene lijekova, lijekovi u kombinaciji, DHEA + BDNF ($p = 0,266$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) i DHEAS + BDNF (0,120; Dunn-Bonferroni *post hoc* test), čak su djelovali toksično na stanice, odnosno potaknuli su stvaranje ROS-a u usporedbi s ozljedom. Iako nije statistički značajno, najveće smanjenje razine ROS-a od 16.4%, u odnosu na ozljedu, zabilježeno je kod pojedinačne primjene DHEA (Slika 17).



Slika 17. DCFH-DA intenzitet fluorescencije rotenonom ozlijeđenih SH-SY5Y stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti.

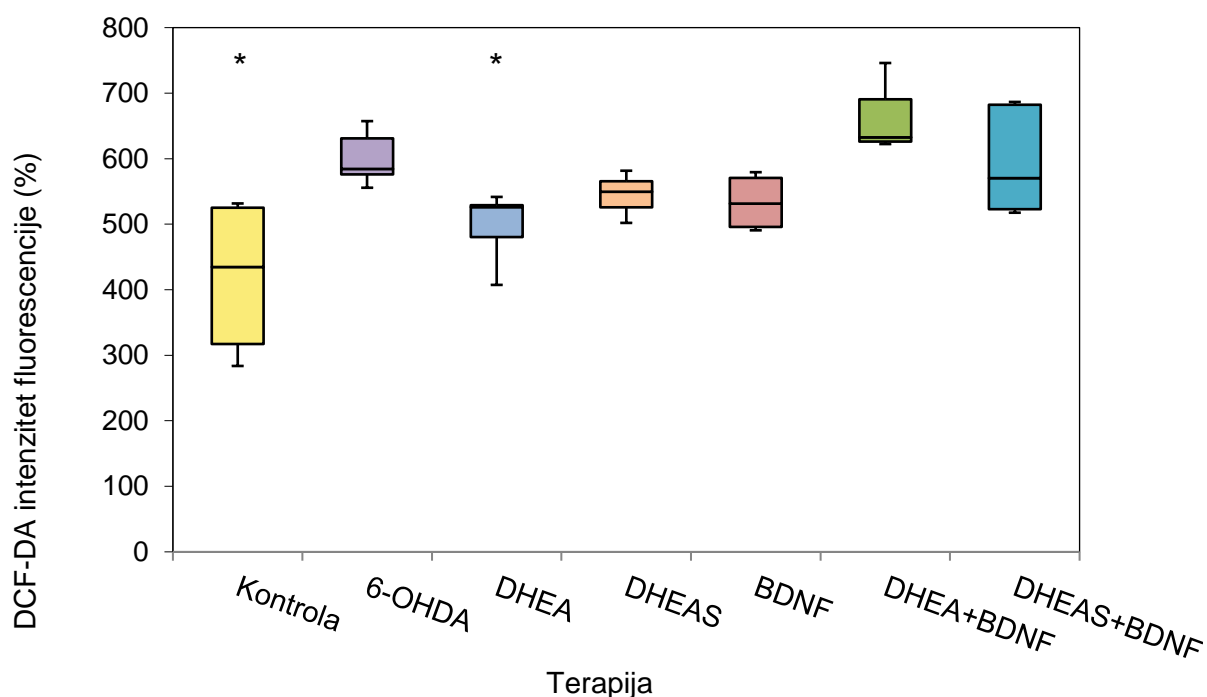
* $p < 0,050$ vs. rotenon (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.2.2. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenima 6-OHDA

Rezultati DCFH-DA testa nakon predtretmana SH-SY5Y stanica ozlijeđenih 6-OHDA su prikazani na Slici 18. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u proizvodnji ROS-a ($H = 17,34$; $df = 6$; $p = 0,008$).

U usporedbi s kontrolom, primjena $75 \mu\text{M}$ 6-OHDA je uzrokovala statistički značajno ($p = 0,009$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) povećanje razine ROS-a. U uzorcima koji su isključivo ozlijeđeni s 6-OHDA, intenzitet fluorescencije je iznosio 584,4 (555,7 – 657,31), a u kontroli 434,7 (283,7 – 531,7). Statistički značajno smanjenje u odnosu na ozljedu je uzrokovao isključivo tretman s 100 ng/mL DHEA ($p = 0,016$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) koji je smanjio razinu ROS-a s 584,4 (555,7 – 657,31) na 526,1 (293,5 – 541,7). Tretman s 100 nM DHEAS i 100 ng/mL BDNF pojedinačno te 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji su smanjili razine ROS-a, ali to smanjenje nije doseglo razinu statističke značajnosti ($p = 0,224$; $p = 0,096$; $p = 0,578$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test).

Kada je korišteno 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji, uočen je statistički neznačajan ($p = 0,476$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test), ali toksični učinak na stanice.



Slika 18. DCFH-DA intenzitet fluorescencije 6-OHDA ozlijeđenih SH-SY5Y stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

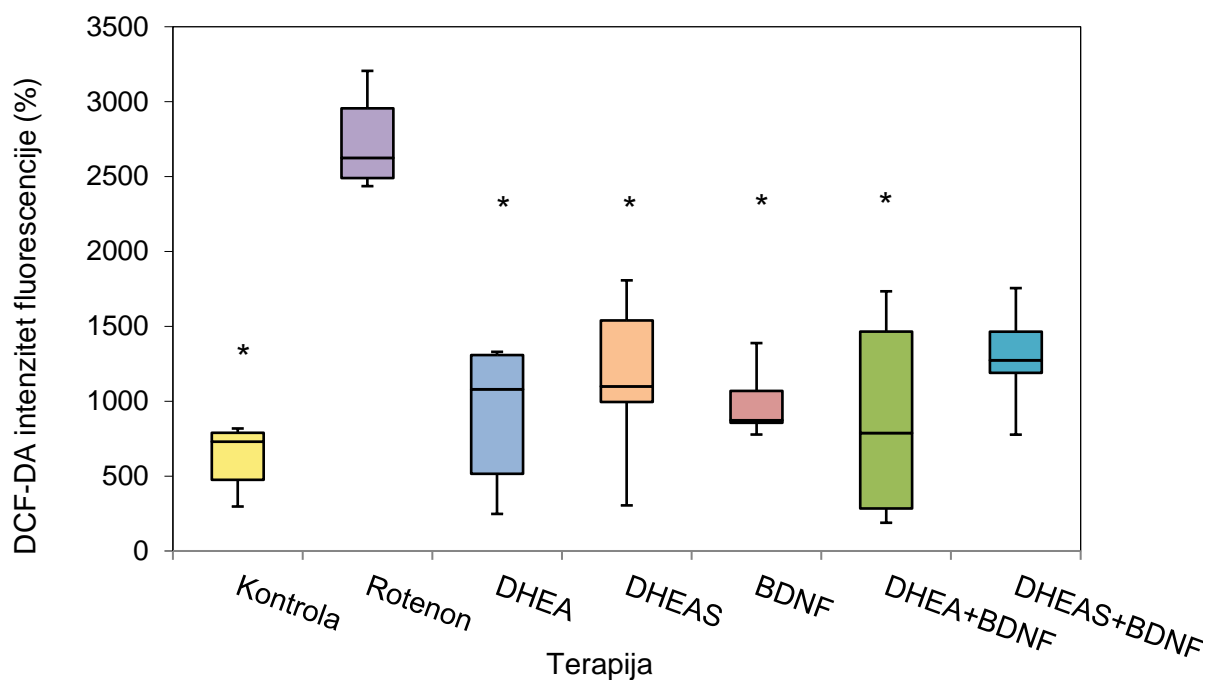
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ vs. 6-OHDA (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.2.3. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u N27 stanicama ozlijeđenima rotenonom

Rezultati DCFH-DA testa nakon predtretmana N27 stanica ozlijeđenih rotenonom su prikazani na Slici 19. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u proizvodnji ROS-a ($H = 16,73$; $df = 6$; $p = 0,010$).

Prema rezultatima (Slika 19) DCFH-DA testa, u slučaju ozljede 1 μM rotenonom došlo je do statistički značajnog ($p < 0,001$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) povećanja razine ROS-a u odnosu na kontrolu (kontrola: 729,7; 297,0 – 817,9 vs. rotenon: 2624,4; 2435,9 – 3205,4). Statistički značajno smanjenje je uzrokovao tretman s 100 nM DHEA ($p = 0,007$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test), s 100 nM DHEAS ($p = 0,043$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) i 100 ng/mL BDNF ($p = 0,019$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pojedinačno te 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF ($p = 0,008$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test).

test) u kombinaciji u usporedbi s razinom ROS-a izmjenom u isključivo ozlijeđenim N27 stanicama. Stanicama tretiranim s DHEA razina ROS-a je smanjena na 1079,6 (247,4 – 1329,6), s DHEAS razina ROS-a je smanjena na 1098,9 (304,4 – 1807,0), a stanicama tretiranim s BDNF na 872,7 (777,5 – 1623,4). Primjena DHEA + BDNF u kombinaciji je smanjila razinu ROS-a na 787,4 (188,5 – 1733,7). DHEA + BDNF primijenjeni u kombinaciji se pokazalo kao najučinkovitiji tretman za smanjenje razine ROS-a za 70% u odnosu na ozljedu (Slika 19).



Slika 19. DCFH-DA intenzitet fluorescencije rotenonom ozlijeđenih N27 stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

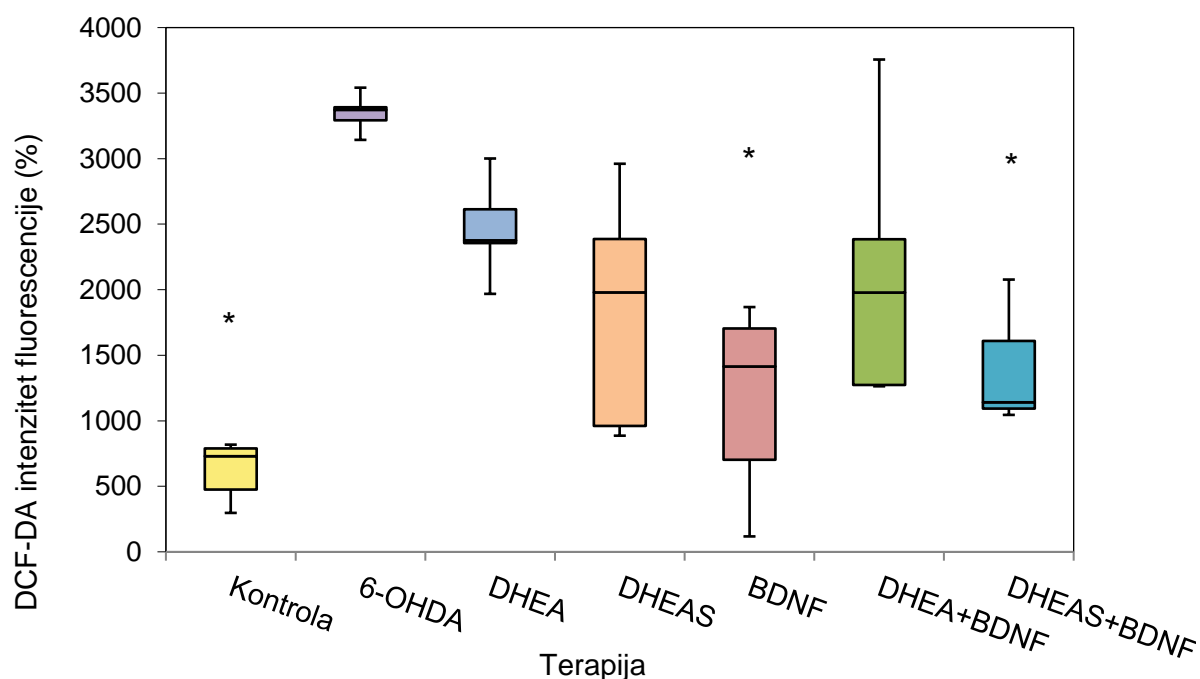
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ vs. rotenon (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.2.4. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na nakupljanje ROS-a u N27 stanicama ozlijeđenima 6-OHDA

Rezultati DCFH-DA testa nakon predtretmana N27 stanica ozlijeđenih sa 6-OHDA su prikazani na Slici 20. Kruskal-Wallis test pokazao je da između ispitivanih grupa postoji statistički značajna razlika u proizvodnji ROS-a ($H = 23,53$; $df = 6$; $p = 0,001$).

Prema rezultatima (Slika 20) DCFH-DA testa, u slučaju ozljede 75 μM 6-OHDA došlo je do statistički značajnog ($p < 0,001$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) povećanja razine ROS-a u odnosu na

kontrolu (kontrola: 729,7; 297,0 – 817,9 vs. 6-OHDA: 3372,4; 2744,9 – 3581,6). Statistički značajno smanjenje je dobiveno tretmanom s 100 ng/mL BDNF ($p = 0,007$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) pojedinačno te 100 nM DHEAS + 100 ng/mL BDNF ($p = 0,033$; Dunn-Bonferroni *post hoc* test) u kombinaciji u usporedbi s razinom ROS-a izmjerenom u isključivo ozlijeđenim N27 stanicama. Najučinkovitiji tretman je bio s DHEAS+BDNF pi čemu je razina ROS-a, koja je u ozljedi iznosila 3372,4 (2744,9 – 3581,6), smanjena na 1141,0 (1044,9 – 2077,4) dok je tretman s BDNF razinu ROS-a smanjio na 1414,1 (117,7 – 1867,7). Tretman s 100 nM DHEA i 100 nM DHEAS pojedinačno te 100 nM DHEA + 100 ng/mL BDNF u kombinaciji su smanjili koncentraciju unutarstaničnog ROS-a, ali to smanjenje nije doseglo razinu statističke značajnosti ($p = 0,339$; $p = 0,060$; $p = 0,113$).



Slika 20. DCFH-DA intenzitet fluorescencije 6-OHDA ozlijeđenih N27 stanica tretiranih s DHEA(S) i BDNF pojedinačno i u kombinaciji.

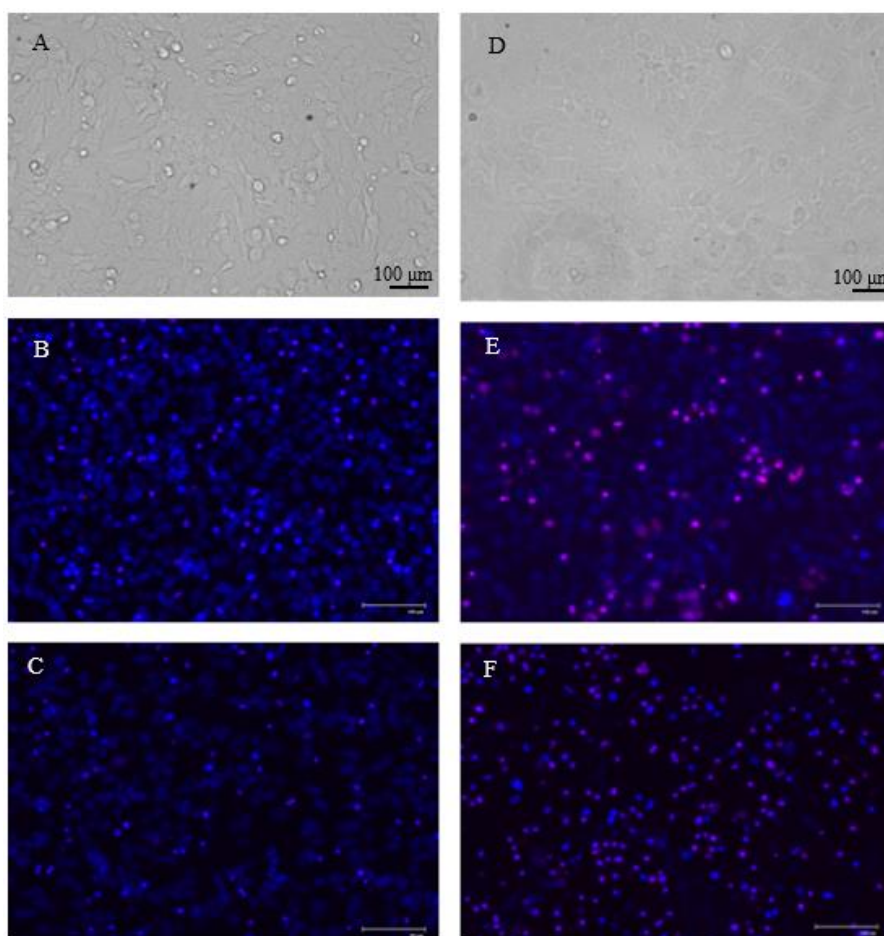
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije predstavljaju minimalne i maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ vs. 6-OHDA (Dunn-Bonferroni *post hoc* test)

4.3. Detekcija stanične smrti

U nastavku eksperimenta, istražila sam utjecaj predtretmana s 100 nM DHEA(S) i 100 nM BDNF pojedinačno i ozljede rotenonom (1 μ M) i 6-OHDA (75 μ M) na razini stanične smrti. Primijenjeni lijekovi i ozljeda uzrokuju nakupljanje ROS-a u stanicama što uzrokuje oksidativni stres i

posljedično smanjenje preživljenja stanica, odnosno dolazi do stanične smrti procesom apoptoze ili nekroze. Jedna od glavnih karakteristika apoptotičnih stanica je kondenzacija kromatina što sam pratila bojanjem stanica fluorescentnom Hoechst 33342 bojom (1 mg/ μ L). Osim Hoechst 33342, koristila sam i crvenu boju propidij jodid (1 mg/ μ L) koja ne može proći netaknutu membranu živih stanica te iz tog razloga boji jezgre samo onih stanica koje imaju oštećenu membranu tj. jezgre mrtvih stanica.

Stanice su vizualizirane i slikane pomoću fluorescentnog mikroskopa EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) (Slika 21). Slike su slikane zasebno odgovarajućim filterom i preklapljene pomoću softvera EVOS FLoid Cell Imaging Station-a. Ljubičasta boja nekrotičnih stanica i stanica u završnoj fazi apoptoze potječe od preklapajućeg efekta korištenih fluorescentnih boja.

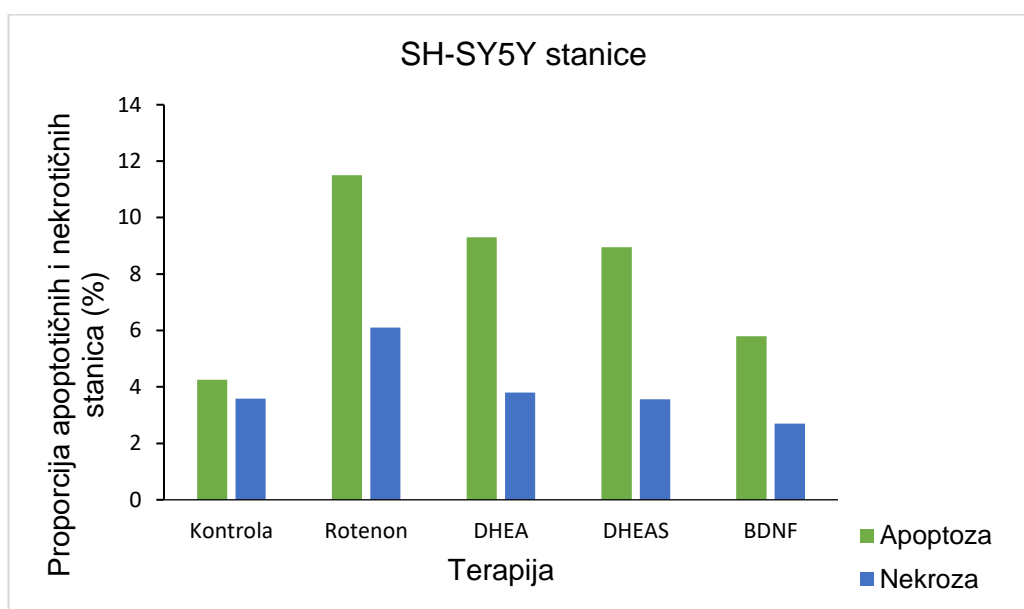


Slika 21. Rotenomom i 6-OHDA ozlijeđene SH-SY5Y i N27 stanice bojane fluorescentnim bojama Hoechst 33342 i propidij jodidom. Slike B, C, E i F su prikazane kao preklapljena slika bojanja s Hoechst 33342 i propidij jodidom (Napomena: Nedostatak crvene fluorescencije mrtvih stanica obojenih propidij jodidom je posljedica male rezolucije slika).

A – kontrolne SH-SY5Y stanice, B – SH-SY5Y stanice ozlijeđene rotenom obojane Hoechst 33342 i propidij jodidom, C – SH-SY5Y stanice ozlijeđene 6-OHDA obojane Hoechst 33342 i propidij jodidom, D – kontrolne N27 stanice, E – N27 stanice ozlijeđene rotenom obojane Hoechst 33342 i propidij jodidom, F – N27 stanice ozlijeđene 6-OHDA obojane Hoechst 33342 i propidij jodidom

4.3.1. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod rotenonom ozlijeđenih SH-SY5Y stanica

Primjena 1 μM rotenona je uzrokovala staničnu smrt apoptozom kao i nekrotične promjene u SH-SY5Y stanicama. Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost (%) apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica (%) unutar jedne jažice za svaku skupinu (kontrola, ozljeda rotenonom, ozljeda rotenonom + DHEA, ozljeda rotenonom + DHEAS, ozljeda rotenonom + BDNF) unutar koje su prebrojane sve stanice (Slika 22). Udio stanica s apoptotičnim, odnosno nekrotičnim promjenama je u slučaju ozljede rotenonom iznosio 11,5%, odnosno 6,1%. Predtretmani s 100 nM DHEA(S) i 100 ng/mL BDNF su smanjili proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u usporedbi s ozljedom (Slika 22). Najznačajnije smanjenje udjela apoptotičnih stanica za 49,56% te nekrotičnih za 55,74% vidljivo je u slučaju tretmana s BDNF-om (Slika 22).

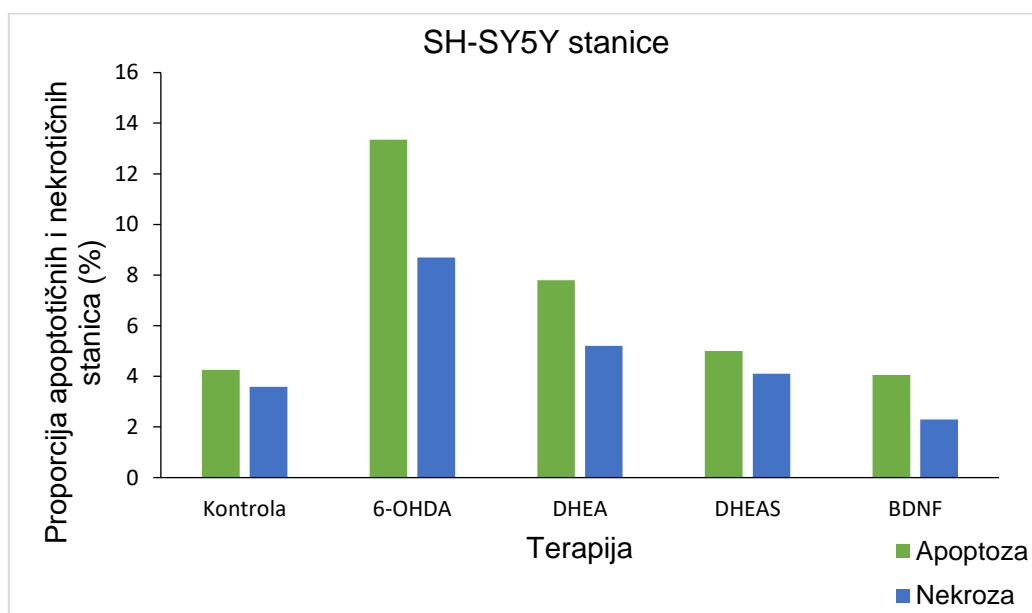


Slika 22. Udio apoptotičnih i nekrotičnih SH-SY5Y stanica nakon ozljede rotenonom i tretmana s DHEA(S) i BDNF pojedinačno.

4.3.2. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod 6-OHDA ozlijeđenih SH-SY5Y stanica

Primjena 75 μM 6-OHDA je uzrokovala staničnu smrt apoptozom kao i nekrotične promjene u SH-SY5Y stanicama. Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost (%) apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica (%) unutar jedne jažice za svaku skupinu (kontrola, ozljeda 6-OHDA, ozljeda 6-OHDA + DHEA, ozljeda 6-OHDA + DHEAS, ozljeda 6-OHDA + BDNF) unutar koje su prebrojane

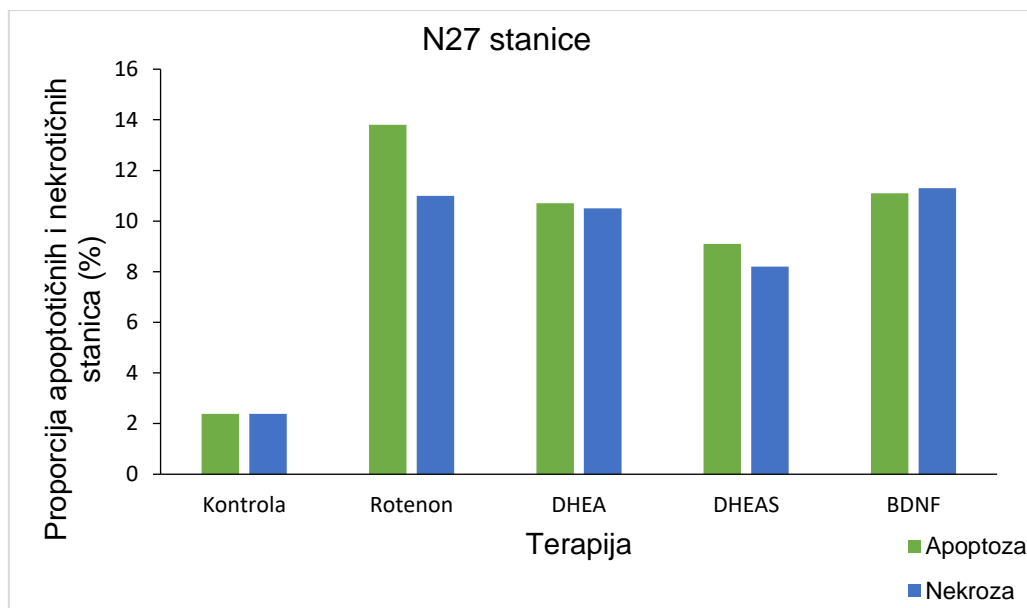
sve stanice (Slika 23). Udio stanica s apoptotičnim, odnosno nekrotičnim promjenama je u slučaju ozljede iznosio 13,35%, odnosno 8,7%. Predtretmani s 100 nM DHEA(S) i 100 ng/mL BDNF su smanjili proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u usporedbi s ozljedom (Slika 23). Najznačajnije smanjenje udjela apoptotičnih stanica za 69,66% te nekrotičnih za 73,56% vidljivo je u slučaju tretmana s BDNF-om (Slika 23).



Slika 23. Udio apoptotičnih i nekrotičnih SH-SY5Y stanica nakon ozljede sa 6-OHDA i tretmana s DHEA(S) i BDNF pojedinačno.

4.3.3. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod rotenonom ozlijeđenih N27 stanica

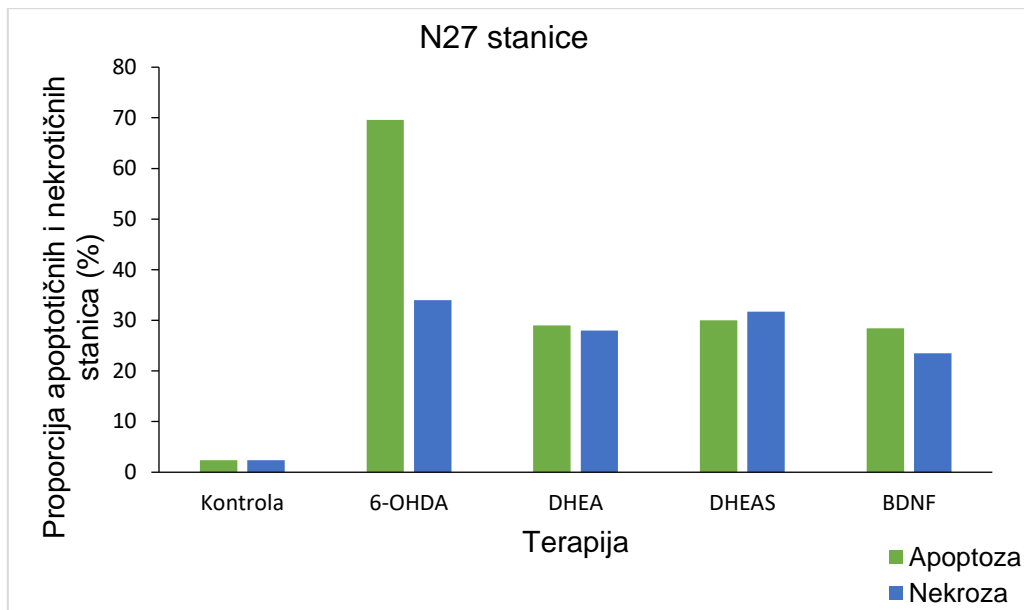
Primjena 1 μ M rotenona je uzrokovala staničnu smrt apoptozom kao i nekrotične promjene u N27 stanicama. Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost (%) apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica (%) unutar jedne jažice za svaku skupinu (kontrola, ozljeda rotenonom, ozljeda rotenonom + DHEA, ozljeda rotenonom + DHEAS, ozljeda rotenonom + BDNF) unutar koje su prebrojane sve stanice (Slika 24). Udio stanica s apoptotičnim, odnosno nekrotičnim promjenama je u slučaju ozljede iznosio 13,8%, odnosno 11%. Predtretmani s 100 nM DHEA(S) i 100 ng/mL BDNF su smanjili proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u usporedbi s ozljedom (Slika 24). Najznačajnije smanjenje udjela apoptotičnih stanica za 34,06% te nekrotičnih za 25,45% vidljivo je u slučaju tretmana s DHEAS (Slika 24).



Slika 24. Udio apoptotičnih i nekrotičnih N27 stanica nakon ozljede rotenonom i tretmana s DHEA(S) i BDNF pojedinačno.

4.3.4. Učinak neurosteroida DHEA(S) i neurotrofina BDNF na mehanizam stanične smrti kod 6-OHDA ozlijeđenih N27 stanica

Primjena 75 μM 6-OHDA je uzrokovala staničnu smrt apoptozom kao i nekrotične promjene u N27 stanicama. Rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost (%) apoptotičnih, odnosno nekrotičnih stanica (%) unutar jedne jažice za svaku skupinu (kontrola, ozljeda 6-OHDA, ozljeda 6-OHDA + DHEA, ozljeda 6-OHDA + DHEAS, ozljeda 6-OHDA + BDNF) unutar koje su prebrojane sve stanice (Slika 25). U usporedbi s rotenonom, 6-OHDA je djelovao toksičnije na N27 stanice. Udio stanica s apoptotičnim, odnosno nekrotičnim promjenama je u slučaju ozljede iznosio 69,6%, odnosno 34%. Predtretmani s 100 nM DHEA(S) i 100 ng/mL BDNF su smanjili proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u usporedbi s ozljedom (Slika 25). Najznačajnije smanjenje udjela apoptotičnih stanica za 59,2% te nekrotičnih za 30,88% vidljivo je u slučaju tretmana s BDNF-om (Slika 25).



Slika 25. Udio apoptotičnih i nekrotičnih N27 stanica nakon ozljede sa 6-OHDA i tretmana s DHEA(S) i BDNF pojedinačno.

5. RASPRAVA

Parkinsonova bolest je najčešća neurodegenerativna bolest koja zahvaća lokomotorni sustav za koju je karakteristično propadanje dopaminergičkih neurona nigrostrijatalnog puta te pojava Lewyjevih tjelešaca i neurita što uzrokuje heterogenu kliničku sliku bolesti (JelLinger 2014). Unatoč uložnim naporima, danas ne postoji terapija koja u potpunosti zaustavlja neurodegeneraciju i progresiju Parkinsonove bolesti te se iz tog razloga javlja potreba za razvojem novih odgovarajućih neuroprotektivnih terapija usmjerenih na smanjenje oksidativnog stresa i toksičnih učinaka i/ili na poticanje rasta i oporavka neurona (Alexander 2004).

Neurosteroidi poput DHEA(S), kao i neurotrofini poput BDNF-a imaju važnu ulogu u brojnim funkcijama mozga poput neuroprotekcije, neurogeneze, neuralne plastičnosti, diferencijacije i rasta neurona te djeluju antioksidativno i protuupalno (Svob Strac i sur. 2020; Miranda i sur. 2019; Bathina i Das 2015; Benarroch 2015, Lu i sur. 2014). Iz tog razloga, cilj ovog istraživanja je bio istražiti neuroprotektivni potencijal DHEA(S) i BDNF-a u *in vitro* modelu Parkinsonove bolesti u kojem je ozljeda inducirana rotenonom ili 6-OHDA na staničnoj liniji humanoga neuroblastoma SH-SY5Y te na kulturi animalnih dopaminergičkih neurona N27. U istraživanju se pratio potencijal DHEA(S) i BDNF-a u prevenciji stanične smrti dopaminergičkih neurona kroz praćenje vijabilnosti stanica (MTT test), nakupljanje ROS-a (DCFH-DA test) i detekciju stanične smrti apoptozom (bojanje stanica fluorescentnom bojom Hoechst 33342) ili nekrozom (bojanje stanica propidij jodidom).

Glavni rezultati ovog istraživanja pokazali su da kada se prati vijabilnost stanica MTT testom, u slučaju ozljede animalnih dopaminergičkih neurona N27 rotenonom ili 6-OHDA, najbolji terapijski učinak ima BDNF. U slučaju stanične linije humanoga neuroblastoma SH-SY5Y, kod ozljede rotenonom pozitivan učinak na vijabilnost stanica ima terapija s neurosteroidom DHEA i kombinacija DHEA i BDNF. Međutim, u slučaju ozljede stanica SH-SY5Y sa 6-OHDA ni jedan se terapijski pristup nije pokazao učinkovit. Kada je istraživani učinak ozljede i navedenih lijekova na nakupljanje unutarstaničnog ROS-a pomoću DCFH-DA testa, u slučaju stanične linije N27 kod ozljede rotenonom najznačajnije smanjenje proizvodnje ROS-a postignuto je tretmanom DHEA u kombinaciji s BDNF-om, dok je u slučaju ozljede sa 6-OHDA najbolji učinak postignut tretmanom BDNF-om pojedinačno i u kombinaciji s DHEAS. U slučaju ozljede stanica SH-SY5Y sa 6-OHDA jedino je učinkovit bio tretman neurosteroidom DHEA, a kod ozljede stanica SH-SY5Y s rotenonom ni jedan se terapijski pristup nije pokazao učinkovit. Kako bi dodatno istražili mehanizam djelovanja pojedinih terapijskih pristupa, DHEA(S) i BDNF, na mehanizam stanične smrti koju uzrokuju ozljede rotenonom i 6-OHDA, stanice su bojane fluorescentnim bojama Hoechst 33342 i propidij jodidom. Rezultati upućuju na to da je kod oba tipa ozljede češći mehanizam stanične smrti apoptoza u odnosu na nekrozu. Također, svi tretmani su imali značajniji učinak na smanjenje udjela apoptotičnih stanica nego stanica u nekrozi te je u pravilu kod oba tipa stanica i oba tipa ozljeda najznačajnije smanjenje udjela apoptotičnih i nekrotičnih stanica vidljivo

u slučaju tretmana s BDNF-om. Iznimka navedenog je samo kod rotenonom ozlijeđenih N27 stanica gdje je bolji učinak od BDNF-a imao tretman s DHEAS.

Mitochondriji su stanični organeli povezani s preživljavanjem i smrću stanica te je promjena u njihovoj funkciji povezana s razvojem Parkinsonove bolesti, odnosno s gubitkom dopaminergičkih neurona. S obzirom da je mitohondrijski kompleks I važno mjesto proizvodnje ROS-a, njegova inhibicija dovodi do povećanog stvaranja ROS-a. Sami mitochondriji su osjetljivi na nakupljanje ROS-a zbog čega ih povišene razine oštećuju te uzrokuju promjene u permeabilnosti mitohondrijske membrane što dovodi do aktivacije kaspaza koje predstavljaju glavne medijatore u smrti stanica procesom apoptoze u neurodegenerativnim bolestima (Hao i sur. 2017).

Rezultati su pokazali da u obje stanične linije ozlijeđene rotenonom (1 μ L) ili 6-OHDA (75 μ L) postoji značajna razlika u staničnoj vijabilnosti i razini ROS-a u odnosu na kontrolu. Tretman rotenonom ili 6-OHDA je smanjio vijabilnost i povećao proizvodnju ROS-a što ukazuje na toksično i prooksidacijsko djelovanje navedenih neurotoksina. Taj rezultat je u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja su koristila rotenon i 6-OHDA za induciranje *in vitro* Parkinsonove bolesti (Simões i sur. 2022; Mehdizadeh i sur. 2019; Hao i sur. 2017; Giordano i sur. 2012; Latchoumycandane i sur. 2011). Rotenon i 6-OHDA su djelovali manje toksično na SH-SY5Y stanice što ukazuje na njihovu veću otpornost na neurotoksine u odnosu na N27 stanice gdje je ozljeda rotenonom smanjila preživljenje za gotovo 50% u odnosu na kontrolu. U usporedbi rotenona i 6-OHDA, rotenon je više smanjio vijabilnost u obje stanične linije. Mogući razlog tome je drugačiji mehanizam djelovanja. Rotenon je lipofilna molekula koja prolazi staničnu membranu bez potrebe za specifičnim membranskim transporterima te djeluje na način da ireverzibilno inhibira mitohondrijski kompleks I. S druge strane, 6-OHDA inhibira mitohondrijske komplekse I i IV, lako se oksidira i proizvodi slobodne radikale (Simões i sur. 2022). Veća toksičnost rotenona u usporedbi s 6-OHDA je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Giordano i sur. (2012) na staničnoj kulturi SH-SY5Y stanica. Prema njima, rotenon i 6-OHDA uzrokuju staničnu smrt različitim mehanizmima te različito utječu na staničnu bioenergetiku pri čemu 6-OHDA ima slabiji utjecaj.

DHEA(S) kao neurosteroid ima brojne neurobiološke funkcije od kojih je jedna od najvažnijih neuroprotekcija. Rezultati MTT testa su pokazali bolji učinak DHEA (100 nM) na SH-SY5Y stanice izložene rotenonu, dok je DHEAS (100 nM) imao bolji učinak na N27 stanice izložene rotenonu. Različita istraživanja se bave ovom tematikom, a rezultati su vrlo varijabilni što je posljedica korištenja različitih eksperimentalnih modela (Gil-ad i sur. 2001) i mogućih različitih mehanizama neuroprotekcije DHEA i DHEAS (Maninger i sur. 2009).

Rezultati istraživanja Gil-ada i sur. (2001) ukazuju na utjecaj DHEA(S) na smanjenje vijabilnosti stanica pri čemu DHEA(S) (1 nM – 10 μ M), primijenjen isključivo u kombinaciji, pokazuje neuroprotektivni učinak u primarnim mišjim kulturama neurona i SK-N-SH neuroblastoma stanicama

dok DHEA primijenjen pojedinačno djeluje neurotoksično. Slično tome, neurotoksičan učinak je uzrokovala primjena 100 nM DHEA pojedinačno na N27 stanice ozlijeđene 6-OHDA u mom istraživanju. Slične rezultate su dobili i Safiulina i sur. (2006) te Bologna i sur. (1987) u *in vitro* istraživanjima te je prema Safiulina i sur. (2006) razlog neurotoksičnosti inhibiranje kompleksa I mitohondrija kao posljedica povišenih koncentracija DHEA.

Nadalje, *in vivo* istraživanje provedeno od strane Choe i sur. (2011) je ispitalo može li DHEA oporaviti mišićnu atrofiju u animalnom modelu Parkinsonove bolesti induciranom 6-OHDA. 20 µg 6-OHDA (4 µg/µL) je ubrizgano direktno u lijevi striatum štakora te im je tijekom tri tjedna davano 0,34 mmol/kg DHEA intraperitonealno. Kao rezultat, DHEA je uzrokovao povećanje broja TH pozitivnih neurona te ojačao atrofirane mišiće što omogućava oporavak lokomotorne funkcije. Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost korištenja DHEA u svrhu povećanja mišićne snage starijih i oboljelih od Parkinsonove bolesti.

Osim neuroprotektivnog učinka DHEA(S), rezultati MTT testa su pokazali pozitivan neuroprotektivni učinak BDNF-a (100 ng/mL) na N27 stanice ozlijeđene rotenonom i 6-OHDA. BDNF je neurotrofin koji potiče preživljavanje i diferencijaciju dopaminergičkih neurona što ukazuje na mogućnost upotrebe BDNF-a kao neuroprotektivne terapije za Parkinsonovu bolest. Dobiveni rezultat je u skladu s podacima istraživanja Hyman i sur. (1991) u kojem su *in vitro* ispitivanjem potvrdili pozitivan utjecaj BDNF-a na preživljenje mezencefalnih dopaminergičkih neurona.

Nadalje, Levivier i sur. (1995) su u *in vivo* istraživanju koristili fibroblaste genetički modificirane da proizvode BDNF što je povećalo preživljenje dopaminergičkih neurona nigrostrijatalnog puta kod animalnog modela Parkinsonove bolesti inducirano pomoću 6-OHDA. Prema tome, BDNF čini dopaminergičke neurone otpornijima na 6-OHDA tako što potiče jaču aktivnost obrambenih mehanizama stanica u vidu uklanjanja ROS-a.

Primjena DHEA (100 nM) + BDNF (100 ng/mL) u kombinaciji je uzrokovala neuroprotektivni učinak na N27 i SH-SY5Y stanice izložene rotenonu. Dostupna literatura o istraživanjima koja koriste DHEA i BDNF u kombinaciji je ograničena. Međutim, istraživanja provedena od strane Wu i sur. (2020) i Sakr i sur. (2014) su ispitala mogući utjecaj DHEA na modulaciju proizvodnje BDNF-a. Prema rezultatima, DHEA djeluje neuroprotektivno putem povećane ekspresije BDNF-a što potiče zaštitu, preživljavanje i proliferaciju neurona. Nadalje, kod oboljelih od Parkinsonove bolesti zabilježene su niže razine BDNF-a u odnosu na zdravu kontrolu, što je povezano s razvojem kliničkih simptoma bolesti i povećanim rizikom od degeneracije neurona (Wang i sur. 2016; Scalzo i sur. 2010; Howells i sur. 2000). Prema tome, primjena DHEA u kombinaciji s BDNF-om pokazuje značajan terapijski potencijal jer, osim pozitivnog učinka DHEA, DHEA može utjecati na proizvodnju BDNF-a, a time i na povišenje razine BDNF-a kod oboljelih.

S jedne strane, niska razina ROS-a je potrebna za normalno funkcioniranje neurona, a s druge, njihov suvišak uzrokuje oksidativni stres popraćen mitohondrijskom disfunkcijom, apoptozom i ekscitotoksičnošću što doprinosi razvoju neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove. Osim antioksidansa, važnu ulogu u sprječavanju oštećenja neurona, koje nastaje kao posljedica oksidativnog stresa, imaju i druge molekule poput DHEA(S) i BDNF-a (Chen i sur. 2017).

Prema rezultatima DCFH-DA testa, razine ROS-a su niže u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenima 6-OHDA i tretiranim s DHEA kao i u N27 stanicama ozlijeđenima rotenonom ili 6-OHDA tretiranim s DHEA, DHEAS i BDNF pojedinačno ili u kombinaciji. Poznato je da DHEA(S) djeluje antioksidativno. Bastianetto i sur. (1999) su istražili antioksidativno djelovanje DHEA (10 – 100 μ M) u *in vitro* modelu oksidativnog stresa u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona pri čemu je predtretman s DHEA učinkovito zaštitio od toksičnosti inducirane pomoću H₂O₂ i natrijevim nitroprusidom nerazjašnjenim mehanizmom djelovanja. Također, DHEA djeluje zaštitno protiv toksičnosti uzrokovane amiloid β (A β) proteinom koji je važan za razvoj Alzheimerove bolesti (Cardounel i sur. 1999). Nastajanje A β posreduje enzim beta sekretaza (BACE), a predtretman NT₂ neurona s DHEA je u istraživanju Tamagno i sur. (2003) smanjio ekspresiju BACE i razinu proteina što u konačnici smanjuje razinu A β putem inhibicije enzima BACE. Hernandez i Camargo (2021) su uočili da DHEAS neutralizira ekstracelularni H₂O₂ u *C. elegans* u uvjetima hipoksije što uzrokuje nakupljanje ROS-a. Hacıoglu Gulay i sur. (2016) su izlagali stresu BDNF *knock-down* miševe te su zaključili da su oni osjetljiviji na oksidativni stres u odnosu na kontrolu, što ukazuje na povezanost oksidativnog stresa te djelovanja i razine BDNF-a u mozgu, ali mehanizam djelovanja ostaje nepoznat.

Stanična smrt se u neurodegenerativnim bolestima odvija apoptozom ili nekrozom. Oba procesa karakteriziraju morfološke promjene te je za apoptozu karakteristična kondenzacija kromatina, fragmentacija jezgre i kondenzacija citoplazme, a za proces nekroze bubrenje jezgre i citoplazme te gubitak cjelovitosti membrane (Blum i sur. 2001). U svrhu razlikovanja apoptoze i nekroze, stanice su bojane Hoechst 33342 (apoptoza; plava boja) i propidij jodidom (nekroza; crvena boja).

Bojanje s Hoechst 33342 i propidij jodidom je pokazalo da rotenon i 6-OHDA uzrokuju promjene karakteristične za jezgre apoptotičnih stanica kao i kasne apoptotične/nekrotične promjene u SH-SY5Y i N27 stanicama. Skupina tretirana isključivo rotenonom i 6-OHDA je imala najveći broj apoptotičnih i nekrotičnih stanica, a u usporedbi rotenona i 6-OHDA, ozljeda 6-OHDA je uzrokovala veći broj apoptotičnih i nekrotičnih stanica, osobito u N27 stanicama. Prema Callizot i sur. (2019), 6-OHDA uzrokuje rani oksidativni stres jer brzo ulazi u stanice zbog prisutnosti DAT-a te u nekoliko minuta od primjene povećava unutarstaničnu razinu ROS-a u primarnoj kulturi mezencefalnih neurona. Dok su za 6-OHDA zabilježili staničnu smrt isključivo procesom apoptoze, rotenon je uzrokovao smrt apoptozom i nekrozom ovisno o dozi i vremenu primjene pri čemu je niska koncentracija pokretala apoptozu, a visoka (>10 nmol/L) nekrozu.

Predtretmani s 100 nM DHEA(S) i 100 ng/mL BDNF su smanjili proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u usporedbi s ozljedom. Slične rezultate su dobili i Charalampopoulos i sur. (2004) koji su ispitali antiapoptotičko djelovanje DHEA(S) na PC12 staničnoj liniji te zaključili da su glavni medijatori učinka antiapoptotički Bcl-2 proteini, nuklearni faktor kappa b (NF- κ B) i antiapoptoska kinaza (PKC) α/β . U jednom istraživanju, uočeno je smanjenje postotka apoptotičnih stanica nakon primjene DHEA (50 i 100 nM) u kulturi proliferirajućih neuralnih prekursora. Mehanizam koji je podloga djelovanja uključuje aktivaciju serin-treonin proteinske kinaze Akt koja je ključna za signalizaciju staničnog preživljavanja. U istom istraživanju, primjena DHEAS (50 i 100 nM) je uzrokovao povećanje broja apoptotičnih stanica kroz smanjenu aktivaciju kinaze Akt (Zhang i sur. 2002). Slično tome, DHEA je u kulturi P19-N neurona uzrokovao smanjenje broja apoptotičnih stanica dok djelovanje DHEAS nije bilo značajno (Xilouri i Papazafiri 2006). Činjenica da DHEA i DHEAS utječu različito na preživljavanje neurona sugerira da ravnoteža između njih ima važnu ulogu u razvoju i održavanju živčanog sustava (Maninger i sur. 2009).

Osim toga, slične rezultate su dobili i Kubo i sur. (1995) koji su zaključili da BDNF smanjuje apoptozu u staničnim kulturama cerebelarnih granula te Hetman i sur. (1999) koji su uočili da BDNF štiti kortikalne neurone od apoptoze. Mehanizam kojim BDNF utječe na apoptozu se sastoji od kompleksne kaskade aktivacije TrkB/MAPK/ERK1/2/IP3K/Akt puta (Palasz i sur. 2020).

6. ZAKLJUČAK

- Neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) te moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) pokazuju neuroprotektivni učinak u *in vitro* modelu Parkinsonove bolesti
- Neurotoksini rotenon (1 μ M) i 6-OHDA (75 μ M) uzrokuju značajno smanjenje stanične vijabilnosti i povišenje razine ROS-a u stanicama humanih neuroblastoma SH-SY5Y i štakorskih N27 dopaminergičkih neurona u odnosu na netretiranu kontrolu
- Predtretmani s 100 nM DHEA, 100 nM DHEAS i 100 ng/mL BDNF pojedinačno i DHEA + BDNF, DHEAS + BDNF u kombinaciji u obje stanične linije povećavaju preživljenje stanica pri čemu je najučinkovitiji tretman s BDNF pojedinačno u slučaju N27 stanica ozlijeđenih i rotenonom i 6-OHDA te tretman s DHEA pojedinačno u SH-SY5Y stanicama ozlijeđenih i rotenonom i 6-OHDA
- Predtretmani s 100 nM DHEA, 100 nM DHEAS i 100 ng/mL BDNF pojedinačno i DHEA + BDNF, DHEAS + BDNF u kombinaciji smanjuju razinu unutarstaničnog ROS-a u obje stanične linije
- Predtretmani s 100 nM DHEA, 100 nM DHEAS i 100 ng/mL BDNF pojedinačno smanjuju proporciju apoptotičnih/nekrotičnih stanica u obje stanične linije
- Dobiveni rezultati istraživanja se mogu upotrijebiti kao temelj za daljnja istraživanja o terapijskom potencijalu DHEA(S) i BDNF-a u *in vitro* modelu Parkinsonove bolesti te o mogućim pozitivnim učincima tretmana s DHEA(S) i BDNF u kontekstu preživljenja stanica, oksidativnog stresa i stanične smrti općenito

7. POPIS LITERATURE

- Alexander, G. E. (2004) 'Biology of Parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder', *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), pp. 259–280. doi:10.31887/dcns.2004.6.3/galexander.
- Ball, N., Teo, W.-P., Chandra, S. i sur. (2019) 'Parkinson's disease and the environment', *Frontiers in Neurology*, 10. doi: 10.3389/fneur.2019.00218.
- Bastianetto, S., Ramassamy, C., Poirier, J. i sur. (1999) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage', *Molecular Brain Research*, 66(1–2), pp. 35–41. doi: 10.1016/S0169-328X(99)00002-9.
- Bathina, S. i Das, U. N. (2015) 'Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications', *Archives of Medical Science*, 11(6), pp. 1164–1178. doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
- Baulieu, E. E. i Robel, P. (1998) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), pp. 4089–4091. doi: 10.1073/pnas.95.8.4089.
- Benarroch, E. E. (2015) 'Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance', *Neurology*, 84(16), pp. 1693–1704. doi: 10.1212/wnl.0000000000001507.
- Bloem, B. R., Okun, M. S. i Klein, C. (2021) 'Parkinson's disease', *The Lancet*, 397(10291), pp. 2284–2303. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N. i sur. (2001) 'Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease', *Progress in Neurobiology*, 65(2), pp. 135–172. doi: 10.1016/S0301-0082(01)00003-X.
- Bologa, L., Sharma, J. i Roberts, E. (1987) 'Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures', *Journal of Neuroscience Research*, 17(3), pp. 225–234. doi: 10.1002/jnr.490170305.
- Borowicz, K. K., Piskorska, B., Banach, M. i sur. (2011) 'Neuroprotective actions of neurosteroids', *Frontiers in Endocrinology*, 2, pp. 1–10. doi: 10.3389/fendo.2011.00050.
- Cagle, B. S., Sturgeon, M.L., O'Brien, J.B. i sur. (2021) 'Stable expression of the human dopamine transporter in N27 cells as an in vitro model for dopamine cell trafficking and metabolism', *Toxicology in Vitro*, 76, p. 105210. doi: 10.1016/j.tiv.2021.105210.
- Callizot, N., Combes, M., Henriques, A. i sur. (2019) 'Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins', *PLoS ONE*, 14(4), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0215277.
- Cardounel, A., Regelson, W. i Kalimi, M. (1999) 'Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: Mechanism of action', *Experimental Biology and Medicine*, 222(2), pp. 145–149. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-124.x.
- Charalampopoulos, I., Tsatsanis, C., Dermitzaki, E. i sur. (2004) 'Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), pp. 8209–8214. doi: 10.1073/pnas.0306631101.

- Chen, S.D., Wu, C.L., Hwang, W.C. i sur. (2017) ‘More insight into BDNF against neurodegeneration: Anti-apoptosis, anti-oxidation, and suppression of autophagy’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), pp. 1–12. doi: 10.3390/ijms18030545.
- Choe, M.A., An, G.J., Koo, B.S. i sur. (2011) ‘Effect of DHEA on Recovery of Muscle Atrophy Induced by Parkinson’s Disease’, *Journal of Korean Academy of Nursing*, 41(6), p. 834. doi: 10.4040/jkan.2011.41.6.834.
- Dave, K. D., De Silva, S., Sheth, N.P. i sur. (2014) ‘Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson’s disease’, *Neurobiology of Disease*, 70, pp. 190–203. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.009.
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T. i Dinter, E. (2016) ‘Cellular models for Parkinson’s disease’, *Journal of Neurochemistry*, 139, pp. 121–130. doi: 10.1111/jnc.13618.
- Ferrari, E., Cardinale, A., Picconi, B. i sur. (2020) ‘From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson’s Disease’, *Journal of Neuroscience Methods*, 340, p. 108741. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108741.
- Fiore, C., Inman, D.M., Hirose, S. i sur. (2004) ‘Treatment with the Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Promotes Recovery of Motor Behavior after Moderate Contusive Spinal Cord Injury in the Mouse’, *Journal of Neuroscience Research*, 75(3), pp. 391–400. doi: 10.1002/jnr.10821.
- Gao, L., Zhou, W., Symmes, B. i sur. (2016) ‘Re-cloning the N27 dopamine cell line to improve a cell culture model of Parkinson’s disease’, *PLoS ONE*, 11(8), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0160847.
- Gil-ad, I., Shtaf, B., Eshet, R. i sur. (2001) ‘Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture’, *Israel Medical Association Journal*, 3(9), pp. 639–643.
- Giordano, S. Lee, J., Darley-Usmar, V.M. i sur. (2012) ‘Distinct Effects of Rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on Cellular Bioenergetics and Cell Death’, *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0044610.
- Guo, J. D., Zhao, X., Li, Y. i sur. (2018) ‘Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson’s disease (Review)’, *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), pp. 1817–1825. doi: 10.3892/ijmm.2018.3406.
- Hacioglu, G., Senturk, A., Ince, I. i sur. (2016) ‘Iranian Journal of Basic Medical Sciences Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mi’, *Iranian Journal of Basic Medical sciences*, 19(19), pp. 388–393. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4887711/pdf/IJBMS-19-388.pdf>.
- Hao, X. M., Li, L.D., Duan, C.L. i sur. (2017) ‘Neuroprotective effect of α -mangostin on mitochondrial dysfunction and α -synuclein aggregation in rotenone-induced model of Parkinson’s disease in differentiated SH-SY5Y cells’, *Journal of Asian Natural Products Research*, 19(8), pp. 833–845. doi: 10.1080/10286020.2017.1339349.
- Hernandez, L. i Camargo, G. (2021) ‘Role of dehydroepiandrosterone sulfate as a scavenging antioxidant: The evidence from *Caenorhabditis elegans*’ nervous system under hypoxia’, *Neural Regeneration Research*, 16(8), pp. 1537–1538. doi: 10.4103/1673-5374.303022.
- Herrera, A., Muñoz, P., Steinbusch, H.W.M. i sur. (2017) ‘Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson’s Disease?’, *ACS Chemical Neuroscience*, 8(4), pp. 702–711. doi: 10.1021/acschemneuro.7b00034.

- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E. i sur. (1999) 'Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), pp. 22569–22580. doi: 10.1074/jbc.274.32.22569.
- Howells, D. W. Porritt, M.J., Wong, J.Y. i sur. (2000) 'Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra', *Experimental Neurology*, 166(1), pp. 127–135. doi: 10.1006/exnr.2000.7483.
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.A. i sur. (1991) 'BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra.', *Nature*, 350(6315), pp. 230–232.
- Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S.D. i sur. (2016) 'Evaluation of models of Parkinson's disease', *Frontiers in Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00503.
- Jellinger, K. A. (2014) 'Parkinson's Disease', *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, pp. 2021–2035. doi: 10.1016/B978-0-12-386456-7.04605-0.
- Lu, J.-J., Yang, M., Sun, Y. i sur. (2014) 'Synthesis, Trafficking and Release of BDNF', in *Handbook of Neurotoxicity*, pp. 1–2371. doi: 10.1007/978-1-4614-5836-4.
- Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E. i sur. (2016) 'The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. doi: 10.1155/2016/9730467.
- Kaasik, A., Kalda, A., Jaako, K. i sur. (2001) 'Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture', *Neuroscience*, 102(2), pp. 427–432. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00489-9.
- Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C. i sur. (2009) 'Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice', *Journal of Neurochemistry*, 111(3), pp. 696–702. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06350.x.
- Klöcker, N., Kermer, P., Weishaupt, J.H. i sur. (2000) 'Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling', *Journal of Neuroscience*, 20(18), pp. 6962–6967. doi: 10.1523/jneurosci.20-18-06962.2000.
- Kouli, A., Torsney, K.M., Kuan, W.L. (2018) 'Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis', in *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, pp. 3–26. doi: DOI: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E. i sur. (2018) 'BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), pp. 579–593. doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
- Kubo, T., Nonomura, T., Enokido, Y. i sur. (1995) 'Brain-derived neurotrophic factor (bDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture', *Developmental Brain Research*, 85(2), pp. 249–258. doi: 10.1016/0165-3806(94)00220-T.
- Lapchak, P. A., Chapman, D.F., Nunez, S.Y. i sur. (2000) 'Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: Possible involvement of GABA(A) receptors', *Stroke*, 31(8), pp. 1953–1957. doi: 10.1161/01.STR.31.8.1953.

- Latchoumycandane, C., Anantharam, V., Jin, H. i sur. (2011) 'Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), pp. 314–323. doi: 10.1016/j.taap.2011.07.021.
- Latif, S., Jahangeer, M., Maknoon Razia, D. i sur. (2021) 'Dopamine in Parkinson's disease', *Clinica Chimica Acta*, 522(June), pp. 114–126. doi: 10.1016/j.cca.2021.08.009.
- Levivier, M., Przedborski, S., Bencsics, C. i sur. (1995) 'Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease', *Journal of Neuroscience*, 15(12), pp. 7810–7820. doi: 10.1523/jneurosci.15-12-07810.1995.
- Li, H., Klein, G., Sun, P. i sur. (2001) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia', *Brain Research*, 888(2), pp. 263–266. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03077-8.
- Li, Y., Liu, W., Oo, T.F. i sur. (2009) 'Mutant LRRK2R1441G BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease', *Nature Neuroscience*, 12(7), pp. 826–828. doi: 10.1038/nn.2349.
- Lopes, F. M., Schröder, R., da Frota, M.L. Jr. i sur. (2010) 'Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies', *Brain Research*, 1337, pp. 85–94. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.102.
- Maninger, N., Wolkowitz, O.M., Reus, V.I. i sur. (2009) 'Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1), pp. 65–91. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.11.002.
- Marx, C. E., Jarskog, L.F., Lauder, J.M. i sur. (2000) 'Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia', *Brain Research*, 871(1), pp. 104–112. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02452-5.
- Mehdizadeh, A., Shahnaz Aali, B., Hajializadeh, Z. i sur. (2019) 'Neurosteroid dehydroepiandrosterone attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in a cell model of Parkinson's disease', *Physiology and Pharmacology (Iran)*, 23(3), pp. 166–173.
- Melrose, H. L., Dächsel, J.C., Behrouz, B. i sur. (2010) 'Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice', *Neurobiology of Disease*, 40(3), pp. 503–517. doi: 10.1016/j.nbd.2010.07.010.
- Miranda, M., Morici, J.F., Zanoni, M.B. i sur. (2019) 'Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(August), pp. 1–25. doi: 10.3389/fncel.2019.00363.
- Nova, Z., Skovierova, H., Strnad, J. i sur. (2020) 'Short-term versus long-term culture of A549 cells for evaluating the effects of lipopolysaccharide on oxidative stress, surfactant proteins and cathelicidin LL-37', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms21031148.
- Nummenmaa, L., Seppälä, K. i Putkinen, V. (2020) 'Molecular imaging of the human emotion circuit', *Social and Affective Neuroscience of Everyday Human Interaction - From Theory to Methodology*, pp. 1–18. doi: 10.31234/osf.io/5w63q.

- Oliveras-Salvá, M., Van der Perren, A., Casadei, N. i sur. (2013) 'RAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration', *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/1750-1326-8-44.
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiórowska, A. i sur. (2020) 'BDNF as a promising therapeutic agent in parkinson's disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi: 10.3390/ijms21031170.
- Prensa, L., Giménez-Amaya, J. M., Parent, A. i sur. (2009) 'The Nigrostriatal Pathway: Axonal Collateralization and Compartmental Specificity.', in *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra*, pp. 49–58. doi: 10.1007/978-3-211-92660-4.
- Quinn, T. A., Robinson, S. R. i Walker, D. (2018) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA Sulfate: Roles in Brain Function and Disease', *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases*. doi: 10.5772/intechopen.71141.
- Van Rompuy, A. S., Lobbestael, E., Van der Perren, A. i sur. (2014) 'Long-term overexpression of human wild-type and T240R mutant Parkin in rat substantia nigra induces progressive dopaminergic neurodegeneration.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 73(2), pp. 159–174. doi: 10.1097/nen.0000000000000039.
- Prediger, R.D., Bortolanza, M., Castro Issy, A.C. i sur. (2014) 'Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease', in *Handbook of Neurotoxicity*, pp. 753–788. doi: 10.1007/978-1-4614-5836-4.
- Safiulina, D., Peet, N., Seppet, E. i sur. (2006) 'Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations', *Toxicological Sciences*, 93(2), pp. 348–356. doi: 10.1093/toxsci/kfl064.
- Sakr, H. F., Khalil, K.I., Hussein, A.M. i sur. (2014) 'Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(1), pp. 41–53.
- Sanchez, G., Varaschin, R.K., Büeler, H. (2014) 'Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice', *PLoS ONE*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0094826.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Bretas, T.L. i sur. (2010) 'Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease', *Journal of Neurology*, 257(4), pp. 540–545. doi: 10.1007/s00415-009-5357-2.
- Simões, R. F., Oliveira, P.J., Cunha-Oliveira, T. i sur. (2022) 'Evaluation of 6-Hydroxydopamine and Rotenone In Vitro Neurotoxicity on Differentiated SH-SY5Y Cells Using Applied Computational Statistics', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6). doi: 10.3390/ijms23063009.
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B. i sur. (2020) 'In vitro Models of Neurodegenerative Diseases', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May). doi: 10.3389/fcell.2020.00328.
- Strac, D. S., Konjevod, M., Perkovic, M.N. i sur. (2020) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its Sulphate (DHEAS) in Alzheimer's Disease', *Current Alzheimer Research*, 17(2), pp. 141–157. doi: 10.2174/1567205017666200317092310.
- Sveinbjornsdottir, S. (2016) 'The clinical symptoms of Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*, pp. 318–324. doi: 10.1111/jnc.13691.

- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Bardini, P. i sur. (2003) 'Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT 2 neurons exposed to oxidative stress', *Neurobiology of Disease*, 14(2), pp. 291–301. doi: 10.1016/S0969-9961(03)00131-1.
- Tanaka, J.-i., Horiike, Y., Matsuzaki, M. i sur. (2008) 'Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines', *Spring*, 319(5870)(September), pp. 1683–1688.
- Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., (2008) 'New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease', *Brain Research Reviews*, 59(1), pp. 201–220. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.07.007.
- Tel, B. C. i Çakmakli, G. Y. (2017) 'Parkinson ' s Disease', in *Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors*, pp. 241–269. doi: 10.1016/B978-0-12-803796-6/00013-7.
- Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime ,E. i sur. (2010) 'Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of α -synuclein, and apoptotic cell death in aged mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), pp. 9879–9884. doi: 10.1073/pnas.1004676107.
- Tysnes, O. B. i Storstein, A. (2017) 'Epidemiology of Parkinson's disease', *Journal of Neural Transmission*, 124(8), pp. 901–905. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.
- Wang, Y., Liu, H., Zhang, B.S. i sur. (2016) 'Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease', *Parkinsonism and Related Disorders*, 29, pp. 66–71. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.05.023.
- Wu, S., Ye, M., Li, Z. i sur. (2020) 'Long-term supplementation of dehydroepiandrosterone improved depressive-like behaviors by increasing BDNF expression in the hippocampus in ovariectomized rats', *Heliyon*, 6(10), p. e05180. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05180.
- XIE Hong-rong, H. L. i L. G. (2010) 'SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease', *Chinese Medical Journal*, 123(8), pp. 1086–92.
- Xilouri, M. i Papazafiri, P. (2006) 'Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons', *European Journal of Neuroscience*, 23(1), pp. 43–54. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04548.x.
- Yamaguchi, H. i Shen, J. (2007) 'Absence of dopaminergic neuronal degeneration and oxidative damage in aged DJ-1-deficient mice', *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/1750-1326-2-10.
- Zarneshan, S.N., Fakhri, S., Khan, H. (2022) 'Targeting Akt/CREB/BDNF signaling pathway by ginsenosides in neurodegenerative diseases: A mechanistic approach', *Pharmacol Res*, 177:106099. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106099.
- Zeng, X. S., Geng, W. S. i Jia, J. J. (2018) 'Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment', *ASN Neuro*, 10. doi: 10.1177/1759091418777438.
- Zhang, L., Li, B.s., Ma, W. i sur. (2002) 'Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways', *Molecular Brain Research*, 98(1–2), pp. 58–66. doi: 10.1016/S0169-328X(01)00315-1.
- Zhang, S., Wang, R. i Wang, G. (2019) 'Impact of Dopamine Oxidation on Dopaminergic Neurodegeneration', *ACS Chemical Neuroscience*, 10(2), pp. 945–953. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00454.

<https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html> (Pristupljeno: 26.08.2022.)

<https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/> (Pristupljeno: 26.08.2022.)

Rasband, W. *ImageJ*. Dostupno na: <https://imagej.nih.gov/ij/> (Pristupljeno: 05.09.2022.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.11.1998. u Osijeku gdje sam završila Prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Nakon srednjoškolskog obrazovanja, 2017. godine upisujem preddiplomski studij Biologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku te titulu prvostupnika biologije stječem 2020. godine. Odmah po završetku preddiplomskog studija, upisujem diplomski studij Eksperimentalne biologije (Modul: Fiziologija i imunobiologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Laboratorijska stručna praksa

- 01/06/2022-01/08/2022
Erasmus+ stručna praksa
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija
Laboratorij za reproduktivnu endokrinologiju i signaling (Mentorica: prof. dr. sc. Silvana Andrić)

- 11/2021-06/2022
Izrada diplomskog rada
Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska
Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju (Mentorica: dr. sc. Matea Nikolac Perković, znanstveni suradnik)

- 03/2021-05/2021
Laboratorijska stručna praksa
Institut za istraživanje mozga, Zagreb, Hrvatska
Laboratorij za neuroonkologiju (Mentorica: prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus)

- 12/2020-03/2021
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska
Jedinica za medicinu rada i okoliša (Mentorica: dr. sc. Željka Babić, znanstveni suradnik)

Dodatno

- 10/2022 -
Stipendist BioTechMed Lab Rotation Programa
Med Uni Graz, Graz, Austrija

- 02/2022
Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; LabAnim A

- 02/2021-09/2021

Erasmus+ projekt „PROMISE – Personalized Medicine Inquiry-Based Education“

- 2017-2020

Aktivno sudjelovanje na projektima popularizacije znanosti („Biolog-i-ja“, Tjedan mozga)