

Polimorfizam gena SULT2A1 i koncentracija dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) u plazmi osoba s neurokognitivnim poremećajem

Balić, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:651986>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikola Balić

**Polimorfizam gena *SULT2A1* i koncentracija
dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) u
plazmi osoba s neurokognitivnim
poremećajem**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Nikola Balić

**Polymorphism of *SULT2A1* gene and plasma
levels of dehydroepiandrosterone sulfate
(DHEAS) in individuals with neurocognitive
disorder**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Švob Štrac, više znanstvene suradnice, te komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović, sa Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta "Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji", financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišni magistar eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizam gena *SULT2A1* i koncentracija dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) u plazmi osoba s neurokognitivnim poremećajem

Nikola Balić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Neurosteroid dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) uključen je u brojne moždane funkcije, uključujući učenje, pamćenje, ponašanje, neurogenezu, neuralnu plastičnost i neuroprotekciju. Istraživanja su utvrdila povezanost između endogenih koncentracija DHEAS-a i demencije, te kognitivnih sposobnosti osoba tijekom starenja. Međutim, u osoba s demencijom utvrđene su snižene, ali i povišene koncentracije DHEAS-a povezane s kognitivnim disfunkcijama, dok je pozitivan učinak DHEAS-a na kognitivne funkcije primijećen samo u nekim studijama. Cilj rada bio je istražiti razlike u plazmatskoj koncentraciji DHEAS-a te raspodjeli genotipova polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*, koji kodira za enzim sulfotransferazu 2A1, odgovornu za pretvorbu dehidroepiandrosterona u sulfatni oblik, u 213 osoba s blagim i 91 osobe s velikim neurokognitivnim poremećajem. Također sam istražio utječu li varijacije u genu *SULT2A1* na koncentraciju DHEAS-a u plazmi te postoji li njihova povezanost s težinom neurokognitivnog poremećaja. Dijagnoza demencije postavljena je prema DSM-5 kriterijima, a kognitivni simptomi evaluirani su testovima procjene mentalnog stanja. Iz krvi osoba izolirao sam plazmu i DNA. U plazmi sam odredio koncentraciju DHEAS-a metodom ELISA, dok sam genotipizaciju proveo metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Istraživanje nije utvrdilo značajne razlike u plazmatskoj koncentraciji DHEAS-a između osoba s blagim i velikim neurokognitivnim poremećajem, kao niti značajnu povezanost *SULT2A1* polimorfizma s težinom neurokognitivnog poremećaja.

Ključne riječi: neurosteroid, demencija, kognicija, sulfotransferaza 2A1, SNP, genotipovi (60 stranica, 19 slika, 10 tablica, 184 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znan. suradnica

Komentor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović
prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Rad prihvaćen: 7. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Polymorphism of *SULT2A1* gene and plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in individuals with neurocognitive disorder

Nikola Balić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is involved in numerous brain functions, including learning, memory, behavior, neurogenesis, neural plasticity, and neuroprotection. Research suggested association of endogenous DHEAS concentrations with dementia and cognitive functions during aging. However, in dementia patients, both decreased and increased DHEAS concentrations were associated with cognitive dysfunctions, while DHEAS beneficial effects on cognition were observed only in some studies. The study aim was to investigate differences in DHEAS plasma concentration and genotype distribution of rs2637125 polymorphism in *SULT2A1* gene, coding for enzyme sulfotransferase 2A1, responsible for conversion of dehydroepiandrosterone into its sulfate form, in 213 people with mild and 91 people with severe neurocognitive disorder. I also investigated whether variations in *SULT2A1* gene affect plasma DHEAS concentration and their association with neurocognitive disorder severity. Dementia was diagnosed according to DSM-5 criteria, and cognitive symptoms were evaluated using mental state examination tests. Plasma and DNA were isolated from blood of subjects. Plasma DHEAS concentration was determined using ELISA method, while genotyping was performed using real time polymerase chain reaction. The study did not find any significant differences in DHEAS plasma concentration between individuals with mild and severe neurocognitive disorder, or any significant association of *SULT2A1* polymorphism with severity of neurocognitive disorder.

Keywords: neurosteroid, dementia, cognition, sulfotransferase 2A1, SNP, genotypes
(60 pages, 19 figures, 10 tables, 184 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Dubravka Švob Štrac, Senior Research Associate
Co-mentor: Prof. Dubravka Hranilović

Reviewers: Associate Prof. Dubravka Hranilović, PhD
Full Prof. Martina Šeruga Musić, PhD
Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Thesis accepted: September 07th 2023.

Zahvale

Ovom prilikom želim iskazati svoju iskrenu zahvalost svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Švob Štrac na pruženoj prilici, stručnoj pomoći, strpljenju i savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem i svim dugim djelatnicima Laboratorija za neuropsihijatriju na predivnom iskustvu koje sam imao tijekom boravka u njemu. Želim izraziti svoje riječi zahvale i dr. sc. Luciji Tudor i dr. sc. Marceli Konjevod na bezrezervnoj pomoći i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada. Hvala Vam za svaku šalu i osmijeh.

Svoju najdublju zahvalnost želim iskazati i komentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović za veliku podršku tijekom izrade ovog rada, ali i samog studiranja. Hvala Vam što što ste mi posvetili svoje vrijeme i pažnju te što ste mi prenijeli znanja i ljubav prema neuroznanosti.

Mojim roditeljima, Marini i Zdravku, zahvaljujem od srca na bezuvjetnoj ljubavi, podršci te na svim odricanjima i trudu koji su nesebično uložili u mene i moje obrazovanje. Vi ste poticaj i razlog mojih uspjeha i inspiracija mojih nastojanja!

Veliko hvala mom bratu Toniju i nevjesti Marini na osloncu i ljubavi kroz čitav period studiranja. Hvala i nećakinji Vani na pruženom razumijevanju prilikom učenja i pisanja rada, jer je igra tada bila u drugom planu.

Hvala mojim kolegama na pomoći i podršci tijekom studiranja. Posebno hvala mojim kolegama, Nori B., Ivani D., Doris J. i Bruni Ž., koji su usput postali i prijatelji. Hvala vam što ste me uvijek tjerali da budem najbolja verzija sebe!

Hvala mojim prijateljima koji su uvijek tu za mene – Bruni I., Gabrijelu G., Tei N. i Tomislavu N.

Od srca, VELIKO HVALA!

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Neurokognitivni poremećaji	1
1.1.1. Blagi neurokognitivni poremećaj (MiNCD)	3
1.1.2. Veliki neurokognitivni poremećaj (MNCD)	3
1.2. Podvrste demencije.....	4
1.2.1. Alzheimerova bolest (AB).....	5
1.2.2. Vaskularna demencija (VaD).....	8
1.2.3. Ostale neurodegenerativne demencije.....	10
1.3. Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni ester (DHEAS).....	13
1.3.1. Biosinteza DHEA(S)-a.....	14
1.3.2. Mehanizmi djelovanja DHEA(S)-a.....	15
1.3.3. Neurobiološko djelovanje DHEA(S)-a	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Uzorci krvi.....	21
3.2. Izdvajanje plazme i genomske DNA	22
3.3. Određivanje genotipova metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (<i>real-time</i> PCR).....	23
3.4. Određivanje koncentracije DHEAS-a u plazmi.....	26
3.5. Statistička obrada podataka	29
4. REZULTATI.....	30
5. RASPRAVA	36
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. LITERATURA.....	42

POPIS KRATICA

AB - Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

ACD - dekstroza citratne kiseline (engl. *Acid Citrate Dextrose*)

AChEI - inhibitori acetilokolinesteraze

ADAS/ADAS-Cog - skala procjene Alzheimerove bolesti (engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) / kognitivna podskala (ADAS-Cog)

AICD - membranski vezana APP unutarstanična domena (engl. *Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain*)

ApoE - apolipoprotein E

APP - amiloidni prekursorski protein (engl. *Amyloid precursor protein*)

APP - amiloidni prekursorski protein

A β - amiloid- β peptid

BACE – beta sekretaza

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

bvFTD - bihevioralni tip frontotemporalne demencije (engl. *Behavioural-variant Frontotemporal Dementia*)

CADASIL - cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom

CDT - test crtanja sata (engl. *Clock Drawing Test*)

CJB - Creutzfeldt-Jakobova bolest (engl. *Creutzfeldt-Jakob Disease*)

CT - kompjutorizirana tomografija

CYP11A1/P450_{scc} - dezmolaza

CYP17A1 - citokrom P450_{c17}

CYP17A1– 17a-hidroksilaza/c17,20-lijaza

DHEA – dehidroepiandrosteron (engl. *Dehydroepiandrosterone*)

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

DLB - demencija s Lewyjevim tjelešcima (engl. *Dementia with Lewy bodies*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

DS - Downov sindrom (engl. *Down Syndrome*)

DSM-5 - dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje“ (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*)

EDTA - etilen-diamin-tetraoctena kiselina

FTD - frontotemporalna demencija (engl. *Frontotemporal Dementia*)

GABA - gama-aminomaslačna kiselina (engl. γ -*Amino-Butiric Acid*)

GRN - granulin

HB - Huntingtonova bolest (engl. *Huntington's disease*)

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)

HSD3 β 2 - 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza

HWE - Hardy-Weinbergova ravnoteža

IGF-1 - inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *Insulin Like Growth Factor 1*).

LPA - logopenična progresivna afazija (engl. *Logopenic Progressive Aphasia*)

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

MAP2 - protein povezan s mikrotubulima 2 (engl. *Microtubule Associated Protein 2*)

MAPT - gen za *tau* protein vezan s mikrotubulima (engl. *Microtubule Associated Protein Tau*)

MCI - blago kognitivno oštećenje (engl. *Mild Cognitive Impairment*)

mDBS - membransko vezno mjesto za DHEA-u (engl. *Membrane DHEA Binding Site*)

MiNCD - blagi neurokognitivni poremećaj (engl. *Mild Neurocognitive Disorder*)

MMSE - test procjene mentalnog stanja (engl. *Mini-mental state examination*)

MNCD - veliki neurokognitivni poremećaj (engl. *Major Neurocognitive Disorder*)

MRI - magnetska rezonanca

mRNA-glasnička RNA (engl. *Messenger RNA*)

mTOR - meta rapamicin kod sisavaca

NaCl - natrijev klorid

NCD - neurokognitivni poremećaj (engl. *Neurocognitive Disorder*)

NFT - neurofibrilarni snopići (engl. *Neurofibrillary Tangles*)

NF- κ B - nuklearni faktor kapa-B

NIA-AA – Nacionalni institut za starenje i Udruga za Alzheimerovu bolest

NINCDS-ADRDA - Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje

NMDA - N-metil-D-aspartat

p70S6k - ribosomalni protein S6 kinaza beta-1

p75NTR - p75 neurotrofinski receptor

PB - Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*)

PBD - Parkinsonova bolest s demencijom

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PI3K - fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-Kinases*)

PNFA - progresivna nefluentna afazija (engl. *Progressive Nonfluent Aphasia*)

PPA - primarna progresivna afazija (engl. *Primary Progressive Aphasia*)

PSEN1 - presenilin 1

PSEN2 - presenilin 2

real-time PCR - lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

RBD - poremećaj ponašanja u REM fazi sna (engl. *REM sleep behaviour disorder*)

RCLB - pufer za lizu eritrocita (engl. *Red Cell Lysis Buffer*)

SD - semantička demencija (engl. *Semantic Dementia*)

SDS - natrij-dodecil sulfat (engl. *Sodium Dodecil Sulphate*),

SE pufer - natrij-EDTA pufer (engl. *Sodium EDTA*)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

TE pufer - tris-EDTA pufer (engl. *Tris-EDTA*)

SSRI - selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*)

SULT1E1 - enzim sulfotransferaza 1E1 (engl. *Sulfotransferase Family 1E Member 1*)

SULT2A1 - enzim sulfotransferaza 2A1 (engl. *Sulfotransferase Family 2A Member 1*)

SULT2B - enzim sulfotransferaza 2B (engl. *Sulfotransferase Family 2B Member 1*)

SŽS - središnji živčani sustav

TBI - traumatska ozljeda mozga (engl. *Traumatic Brain Injury*)

TMB - tetrametilbenzidin

Trk - tirozin kinazni receptor

Trk-A - tropomiozin receptor kinaza

VaD - vaskularna demencija (engl. *Vascular Dementia*)

VCI - vaskularno kognitivno oštećenje (engl. *Vascular Cognitive Impairment*)

VCP - gen koji kodira protein koji sadrži valozin (engl. *Valosin Containing Protein*)

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

α -syn - α -sinkulein (engl. *Alpha-Synuclein*)

σ 1 - sigma receptori tipa 1

1. UVOD

1.1. Neurokognitivni poremećaji

Neurokognitivni poremećaji (NCD, engl. *Neurocognitive Disorder*) jedan su od glavnih zdravstvenih problema koji utječu na sposobnost pojedinca da funkcionira samostalno i bitna su odrednica kvalitete života (Depp i sur., 2006). Kod odraslih osoba, kognitivna funkcija uvelike varira sa starenjem. Dok su neke kognitivne funkcije u procesu starenja relativno stabilne, uključujući fond riječi i znanje o svjetskim događajima (Baltes, 1993), druge izvršne funkcije, poput brzine mentalne obrade, pažnje i radne memorije, opadaju s dobi (Park i sur., 2002).

Trenutno više od 55 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od nekog oblika demencije, a svake godine dijagnosticira se gotovo 10 milijuna novih slučajeva. Demencija je sedmi vodeći uzrok smrti i jedan od glavnih uzroka invaliditeta među starijim osobama u svijetu (WHO, 2023), te bi prepoznavanje i liječenje pacijenata s NCD-om trebao biti javnozdravstveni prioritet.

U petom izdanju „Dijagnostičkog i statističkog priručnika za duševne poremećaje“ (DSM-5, engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*), objavljenom 2013. god. u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), a 2014. god. u Hrvatskoj, definicija demencije izmijenjena je te se naziva veliki neurokognitivni poremećaj (MNCD, engl. *Major Neurocognitive Disorder*). Međutim, zbog uobičajene primjene pojma demencija u društvu i medicinskoj literaturi, u ovom će se radu koristiti oba naziva.

Prema starijoj DSM-IV klasifikaciji, razlikovala su se četiri kognitivna poremećaja: delirij, demencija, amnestički poremećaji i drugi kognitivni poremećaji. Ove četiri kategorije zamijenjene su s tri kategorije u novoj DSM-5 klasifikaciji, a to su delirij, blagi NCD (MiNCD, engl. *Mild Neurocognitive Disorder*) i MNCD. Dijagnoza delirija služi kao kriterij za isključenje bolesnika s nekim drugim NCD-om. Nadalje, dok je DSM-IV klasifikacija za definiranje demencija koristila domene kognitivnih oštećenja, kao što su apraksija, agnozija, afazija, izvršna disfunkcija i oštećenje pamćenja, DSM-5 kriteriji koriste specifične kognitivne domene kao što su izvršne funkcije, jezik, složena pažnja, učenje i pamćenje, društvena kognicija (spoznaja) i perceptivno-motoričke sposobnosti (Američka psihijatrijska udruga (APA), 2013).

Kriteriji koji se nalaze u DSM-5 klasifikaciji (Tablica 1.) pokrivaju širi spektar kognitivnih poremećaja, bez ograničavanja na poremećaje koji pogađaju isključivo starije osobe. Definicija NCD-a u DSM-5 klasifikaciji, uključuje NCD-ove koji se pojavljuju i kod mlađih pacijenata, a koje su uglavnom ne-neurodegenerativnog podrijetla (Emmady i sur., 2022).

Tablica 1. DSM-5 kriteriji za dijagnozu MNCD-a (ranije demencija). (Preuzeto i modificirano prema APA: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed.*, 2013).

DSM-5 KRITERIJI ZA BLAGE I TEŠKE NEUROKOGNITIVNE POREMEĆAJE	
A	<p>Dokaz kognitivnog pada u odnosu na prethodnu razinu izvedbe u jednoj ili više kognitivnih domena (izvršna funkcija, jezik, složena pažnja, učenje i pamćenje, društvena kognicija (spoznaja) i perceptivno-motoričke sposobnosti) na temelju:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Zabrinutosti pojedinca, upućenog informatora ili kliničara da je došlo do značajnog pada kognitivnih funkcija i; 2. Oštećenje kognitivnih sposobnosti, po mogućnosti dokumentirano standardiziranim neuropsihološkim testiranjem ili, u nedostatku, drugom kvantificiranom kliničkom procjenom.
B	<p>Veliki neurokognitivni poremećaj – MNCD – Kognitivni nedostaci ometaju neovisnost u svakodnevnim aktivnostima (u najmanju ruku, osobe zahtijevaju pomoć u složenim instrumentalnim aktivnostima svakodnevnog života kao što je plaćanje računa ili upravljanje lijekovima).</p> <p>Blagi neurokognitivni poremećaj – MildNCD – Kognitivni nedostaci ne ometaju sposobnost neovisnosti u svakodnevnim aktivnostima (očuvane su složene instrumentalne aktivnosti svakodnevnog života kao što su plaćanje računa ili uzimanje lijekova, ali može biti potreban veći napor, kompenzacijske strategije ili prilagođavanje).</p>
C	Kognitivni deficiti ne javljaju se isključivo u kontekstu delirija.
D	Kognitivni deficiti nisu bolje objašnjeni drugim mentalnim poremećajem (npr. veliki depresivni poremećaj, shizofrenija).

1.1.1. Blagi neurokognitivni poremećaj (MiNCD)

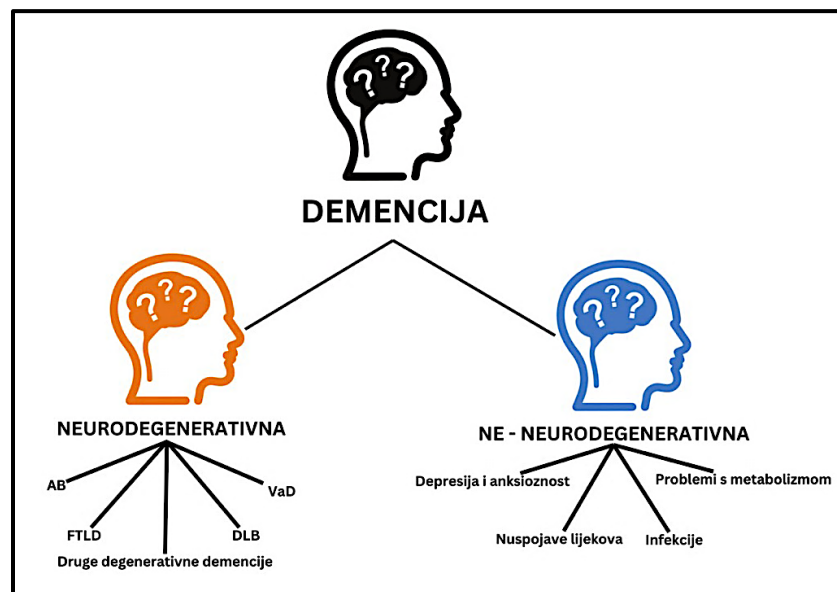
Prema DSM-5 klasifikaciji, dijagnoza MiNCD-a definirana je smanjenjem kognitivnih sposobnosti u odnosu na prethodnu razinu i zahtijeva od osobe da uključi kompenzacijske strategije i prilagodbe kako bi održala neovisnost i obavljala aktivnosti u svakodnevnom životu. Dakle, radi se o kognitivnim poteškoćama koje nisu karakteristične za normalno starenje, ali ne ograničavaju sposobnost osobe da živi samostalno. Blagi neurokognitivni pad može prethoditi naknadnoj pojavi ozbiljnijeg pada (MNCD), ali to nije nužni slijed događaja (Stokin i sur., 2015). Uobičajena dijagnoza blagog kognitivnog oštećenja (MCI, engl. *Mild Cognitive Impairment*) u kliničkoj praksi, vrlo je slična DSM-5 definiciji MiNCD-a. Definicija MCI-a prema smjernicama Nacionalnog instituta za starenje i Udruge za Alzheimerovu bolest (NIA-AA) uključuje promjenu kognitivnih funkcija koju su prijavili pacijent ili kliničar. MCI podrazumijeva oštećenja u jednoj ili više domena, ali uz očuvanje funkcionalnih sposobnosti (Albert i sur., 2011). Dakle, MCI se koristi kao opisni pojam kliničkog stanja u graničnoj zoni, između normalne kognicije i demencije, koji ne ometa svakodnevni život i neovisnost pojedinca. Smatra se da otprilike 50 – 80 % pacijenata s MCI-om, s vremenom razvije demenciju (Petersen i sur., 1999). Međutim, MCI može biti posljedica i drugih uzroka, primjerice vaskularnih lezija mozga ili depresije (Schmidtke i Hermeneit 2008). MCI se za razliku od MiNCD-a, odnosi uglavnom na starije odrasle osobe, dok MiNCD uključuje sve dobne skupine (Stokin i sur., 2015).

1.1.2. Veliki neurokognitivni poremećaj (MNCD)

Prema DSM-5 kriterijima, MNCD obilježava ozbiljno oštećenje pamćenja, orijentacije, prosuđivanja i kognicije koji su uglavnom stečeni, a ne urođeni. Postoje dvije važne značajke koje MNCD razlikuju od dijagnoze demencije prema DSM-IV kriterijima. Prvo, oštećenje pamćenja nije nužan uvjet za dijagnozu MNCD-a, što omogućuje dijagnosticiranje drugih oblika kognitivnog oštećenja ili demencije koji ne uključuju poteškoće u pamćenju. Primjerice, takva su oštećenja posljedica moždanog udara, frontotemporalne degeneracije, traumatske ozljede mozga, cerebrovaskularne bolesti i Parkinsonove bolesti. Drugo, kod MNCD-a oštećenje u jednoj kognitivnoj domeni dovoljno je za dijagnozu, dok je prema prethodnoj klasifikaciji za dijagnozu demencije bilo potrebno oštećenje pamćenja i barem još jedne kognitivne domene (Sherman i Schnyer, 2016).

1.2. Podvrste demencije

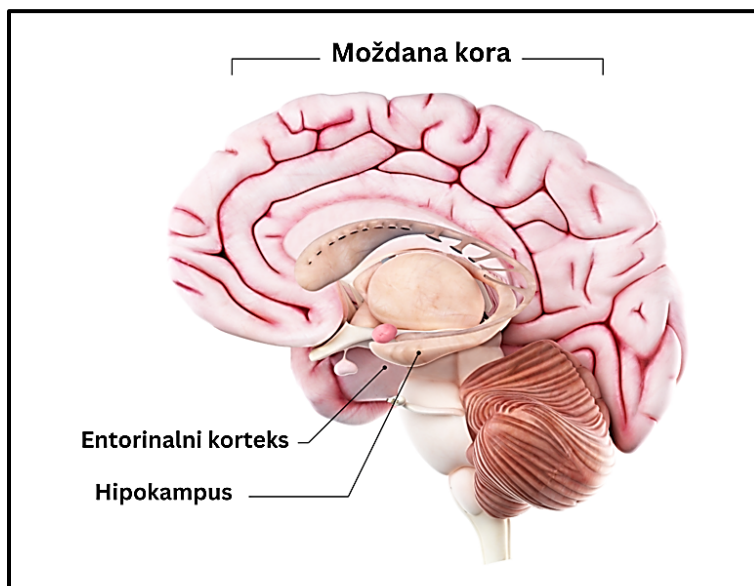
Demencija je objedinjujući pojam koji se koristi za opisivanje progresivnog kognitivnog opadanja, ali se njezine podvrste klasificiraju prema uzroku demencije. Mogu se razlikovati dvije glavne kategorije demencije: 1) neurodegenerativna (ireverzibilna); i 2) ne-neurodegenerativna (potencijalno reverzibilna) (Slika 1). Prema DSM-5 klasifikaciji razlikujemo NCD izazvan Alzheimerovom bolešću (AB, eng. *Alzheimer's disease*), vaskularnom demencijom (VaD, engl. *Vascular Dementia*), frontotemporalnom demencijom (FTD, engl. *Frontotemporal Dementia*), demencijom s Lewyjevim tjelešcima (DLB, engl. *Dementia with Lewy bodies*), traumatskom ozljedom mozga (TBI, engl. *Traumatic Brain Injury*), infekcijom virusom humane imunodeficijencije (HIV, engl. *Human Immunodeficiency Virus*) i prionskom bolešću. NCD može također biti uzrokovan Parkinsonovom (PB, engl. *Parkinson's disease*) i Huntingtonovom bolešću (HB, engl. *Huntington's disease*), kao i primjenom supstanci/lijekova, a postoji i NCD izazvan drugim zdravstvenim stanjima, višestrukim etiologijama, te nespecificirani NCD (Sadock, 2015).



Slika 1. Kategorizacija demencija. Neurodegeneracija se smatra primarnim uzrokom demencije kod odraslih ljudi. Degenerativne demencije među ostalim uključuju AB, VaD, FTLD i DLB. S druge strane, metabolički problemi kao što su nedovoljna aktivnost štitnjače (hipotireoza), kronična konzumacija alkohola i lijekova, subduralni hematomi, tumori mozga, te psihijatrijske bolesti poput depresije, mogu biti odgovorni za ne-neurodegenerativno kognitivno oštećenje (Preuzeto i modificirano prema Malik i sur., 2022).

1.2.1. Alzheimerova bolest (AB)

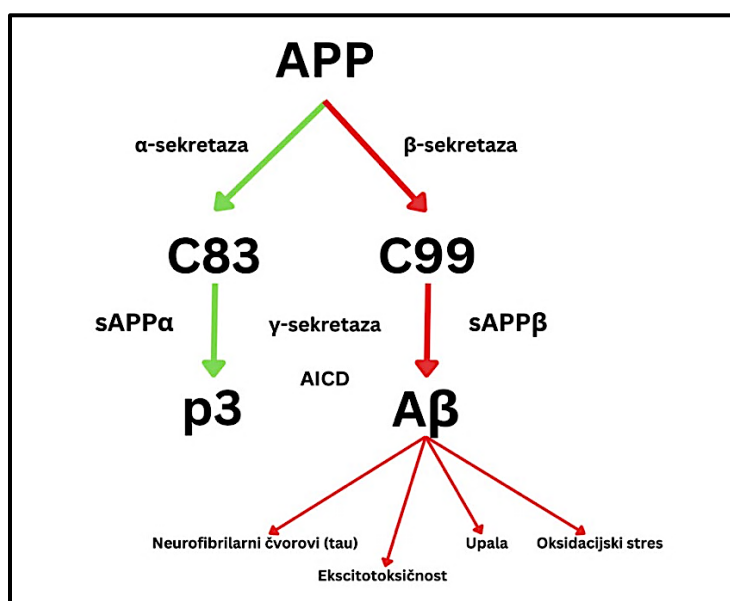
AB je ireverzibilni i progresivni neurodegenerativni poremećaj središnjeg živčanog sustava (SŽS), koji rezultira kognitivnim oštećenjem i gubitkom pamćenja. AB predstavlja najčešći oblik neurodegenerativne demencije, a njegova prevalencija raste s dobi (u više od 40% osoba starijih od 85 godina) (Beydoun i sur., 2014). Karakteriziran je neuropatološkim obilježjima poput nakupljanja izvanstaničnih plakova amiloid- β ($A\beta$) peptida i unutrastaničnih neurofibrilarnih snopića (NFT, engl. *Neurofibrillary Tangles*) građenih od hiperfosforiliranog proteina tau, uslijed čega dolazi do smrti neurona, i to najprije u područjima mozga koji su uključeni u pamćenje i druge kognitivne funkcije - entorinalnom korteksu i hipokampusu (Nacionalni institut za zdravlje (NIH), 2017), a zatim postepeno i u cijelom mozgu (Isacson i sur., 2002) (Slika 2). Progresivno propadanje neurona dovodi do neravnoteže između različitih neurotransmiterskih sustava (npr. acetilkolina, dopamina i serotonina) i posljedično do kognitivnih nedostataka (Yiannopoulou i Papageorgiou, 2013).



Slika 2. Prikaz medijalnog temporalnog režnja, entorinalnog korteksa i hipokampusa, regija mozga koje su najranije zahvaćene promjenama uslijed AB-a (Preuzeto i modificirano prema Nacionalni institut za zdravlje (NIH) - Nacionalni institut za starenje (NIA), 2017).

Prema hipotezi amiloidne kaskade nakupljanje izvanstaničnih plakova $A\beta$ peptida u mozgu glavni je uzrok AB-a (Slika 3). Amiloidni prekursorski protein (APP, eng. *Amyloid precursor*

protein) je transmembranski protein koji je sastavni dio membrane živčanih stanica. U SŽS, APP se može cijepati u dva različita puta. U prvom, tzv. neamiloidnom putu, APP se prvo cijepa enzimom α -sekretazom, što rezultira stvaranjem izvanstaničnog proteina sAPP α i C83, membranskog C-terminalnog fragmenta od 83 aminokiseline. Daljnjim cijepanjem C83 fragmenta enzimom γ -sekretazom nastaje fragment p3 (peptid od 24 ili 26 aminokiselina) i membranski vezana APP unutarstanična domena (AICD, eng. *Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain*). U drugom, tzv. amiloidnom putu, cijepanjem APP-a β -sekretazom nastaje izvanstanični produkt sAPP β i C99, membranski C-terminalni fragment od 99 aminokiselina. Daljnjim cijepanjem C99 γ -sekretazom nastaje izvanstanični A β peptid i AICD (Querfurth i Laferla, 2010).

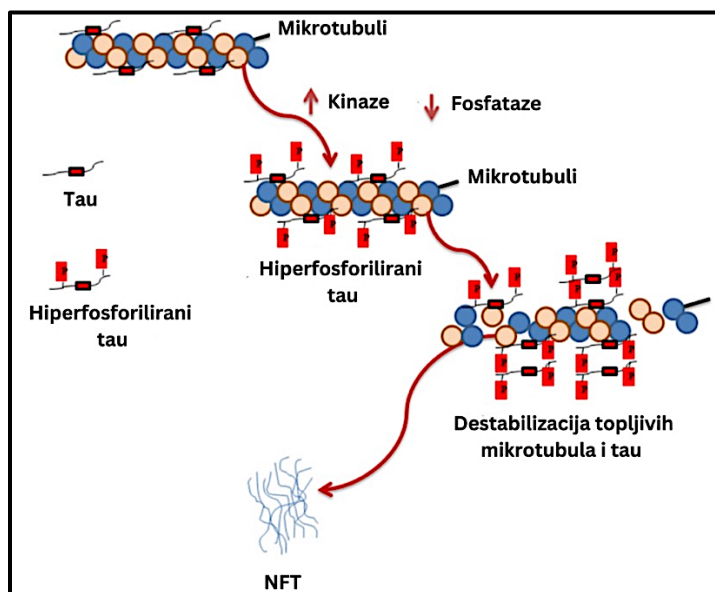


Slika 3. Hipoteza amiloidne kaskade. APP se cijepa ili α -sekretazom što rezultira stvaranjem sAPP α i C83 (neamiloidni put, zelene strelice) ili β -sekretazom što rezultira nastankom sAPP β i C99 (amiloidni put, crvene strelice). Naknadno cijepanje C99 fragmenta γ -sekretazom rezultira stvaranjem i izvanstaničnim sekrecijom A β peptida. Smatra se da je A β peptid toksičan za stanice (Preuzeto i modificirano prema Léger i Massoud, 2013).

Vjeruje se da povećano stvaranje A β peptida, uzrokuje njegovo agregiranje u oligomere i amiloidne fibrile, koji tvore plakove. Duljina proizvedenog A β peptida je promjenjiva, od 37 do 42 aminokiseline. Primjećena je veća mogućnost formiranja agregata, odnosno veća toksičnost dulje izoforme A β ₄₂. Smatra se da agregacija A β peptida potiče hiperfosforilaciju proteina tau, što dovodi do nastanka NFT-ova, upale, oksidativnog stresa i ekscitotoksičnosti (Cummings, 2004), a

posljedično do stanične smrti i poremećaja u neurotransmisiji posebice acetilkolina, kao jednog od ranih simptoma AB-a (Francis i sur., 1999).

Tau je topljivi protein, koji se uglavnom eksprimira u neuronima, veže se na mikrotubule, stabilizira mikrotubularni sklop i tako utječe na rast i razvoj aksona. U normalnim uvjetima postoji ravnoteža između fosfataza i kinaza povezanih s mikrotubulima, odgovornih za fosforilaciju i defosforilaciju tau proteina. No, u patološkim uvjetima, dolazi do smanjene aktivnosti fosfataza i pojačane aktivnosti kinaza, što uzrokuje hiperfosforilaciju tau proteina i njegovo nakupljanje u spiralne, netopljive filamente, NFT (Slika 4), a posljedično dovodi do degeneracije neurona i sinaptičke disfunkcije (Dolan i Johnson, 2010).



Slika 4. Stvaranje NFT-a tijekom AB-a (Preuzeto i modificirano prema Kumar i sur., 2018).

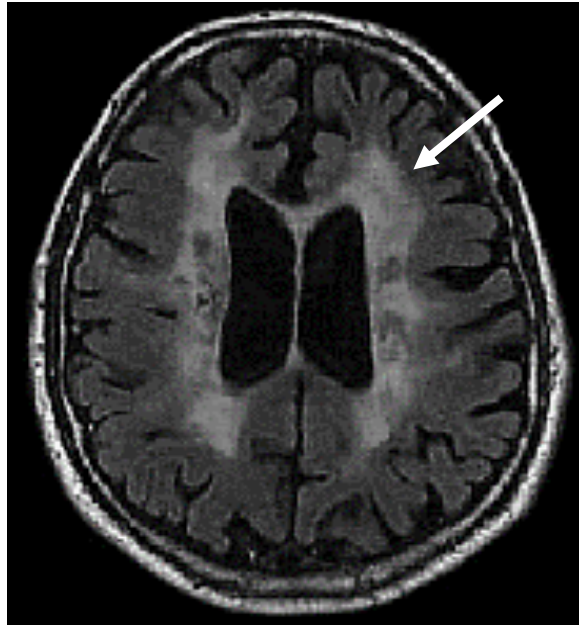
NFT-ovi nastaju u tijelu neurona, ali tijekom progresije AB-a nakon smrti neurona oslobađaju se u međustanični prostor, gdje ih „hvataju“ astrociti i stanice mikroglije (Mawal-Dewan i sur., 1996). Tijekom AB-a, NFT-ovi se mogu detektirati u hipokampusu, entorinalnom korteksu, amigdali, dorzalnim jezgrama raphe i Meynertovoj bazalnoj jezgri (D’Amelio i Rossini, 2012). Osim u AB-u, nakupljanje NFT-ova također ima ulogu u patogenezi drugih neuroloških i neurodegenerativnih poremećaja, kao što su Downov sindrom (DS, engl. *Down Syndrome*), Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB, engl. *Creutzfeldt-Jakob Disease*) i FTD.

Kao i u slučaju drugih neurodegenerativnih oštećenja koja se javljaju u odrasloj dobi, AB se smatra multifaktorijalnom bolešću, koju možemo podijeliti na obiteljski/nasljedni i sporadični oblik. Identificirana su četiri gena povezana s razvojem AB-a: geni za presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2), amiloidni prekursorski protein (APP) i apolipoprotein E (ApoE), čije se mutacije povezuju s poremećenom obradom APP-a (St George-Hyslop i Petit, 2004). Mutacije u genima koji kodiraju APP, PSEN1 i PSEN2 odgovorne su za rani početak autosomno-dominantnog oblika bolesti i čine ~1 % slučajeva AB-a. Za češći i složeniji oblik AB-a, s kasnim početkom, alel ϵ -4 gena koji kodira ApoE prepoznat je kao glavni genetski rizični čimbenik (Vilatela i sur., 2012).

Za liječenje AB-a odobreni su inhibitori acetilokolinesteraze (AChEI): donepezil, galantamin i rivastigmin, koji povećavaju koncentraciju acetilkolina u sinapsama, a koji su klinički korisni kao simptomatski tretman u odgađanju kognitivnog pada osoba s AB-om (Cummings i sur., 2019). Još jedan terapijski agens odobren za simptomatski tretman umjerene do teške AB je nekompetitivni antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora - memantin. Memantin sprječava prekomjernu aktivaciju glutamatnih receptora i omogućuje njihovu normalnu aktivnost. Na taj način ublažavaju se opasni učinci povišenih razina glutamata, koji mogu dovesti do neuralne disfunkcije (Kuns i sur., 2023). Dva anti-amiloidna monoklonska antitijela, lecanemab i aducanumab nedavno su odobrena za liječenje AB-a u SAD-u i prvi su lijekovi koji usporavaju napredovanje AB-a, no imaju niz negativnih nuspojava te najbolju učinkovitost pokazuju u ranom ili srednjem stadiju AB-a (Cummings, 2023). Stoga, još uvijek ne postoji primjerena terapija koja bi liječila bolest ili spriječila njezin nastanak.

1.2.2. Vaskularna demencija (VaD)

Vaskularne bolesti drugi su najčešći uzrok demencije (Schneider i sur., 2007). Vaskularno kognitivno oštećenje (VCI, engl. *Vascular Cognitive Impairment*) je sindrom u kojem se kognitivno oštećenje, koje obuhvaća i demenciju i blaže oblike oštećenja, pripisuje vaskularnoj bolesti (Moorhouse i Rockwood, 2008). Razlikuju se dva klinička oblika: (1) VCI uzrokovan simptomatskim moždanim udarom; i (2) VCI uzrokovan prikrivenom vaskularnom ozljedom mozga (primjerice tihi infarkt mozga ili krvarenje i lezije bijele tvari) koja se može utvrditi samo snimanjem mozga ili autopsijom (Smith, 2016). U kliničkoj praksi slikovne tehnike prikaza mozga (kompjutorizirana tomografija - CT i magnetska rezonanca - MRI) imaju ključnu ulogu u dijagnozi VCI (Slika 5) (Wardlaw i sur., 2013).



Slika 5. MRI mozga, aksijalni presjek. Prisutne su teške i opsežne promjene bijele tvari u bolesnika s VaD (označeno bijelom strelicom) (Preuzeto i modificirano prema Van Straaten i sur., 2004).

Kognitivni deficiti u VCI-u, mogu se podijeliti prema ozbiljnosti na MCI ili demenciju (VaD), odnosno MiNCD i MNCD prema DSM-5 klasifikaciji (Sachdev i sur., 2014). Čimbenici rizika za nastanak VaD-a su starija dob, hipertenzija, pušenje, bolesti srca, dijabetes, hiperlipidemija i psihološki stres. To su ujedno i čimbenici rizika za moždani udar, koji je glavni, ali ne i jedini način koji povezuje cerebrovaskularnu bolest s VaD-om (Hebert i sur., 2000).

VaD je drugi najčešći tip demencije, koji obuhvaća 15% do 20% slučajeva demencije u Sjevernoj Americi i Europi (Wolters i Ikram, 2019). Podtipovi su definirani prirodom vaskularne patologije, brojem zahvaćenih intrakranijalnih žila, anatomskim mjestom i vremenom početnog vaskularnog događaja. Podtipovi VaD-a uključuju: (1) demenciju nakon moždanog udara; (2) multiinfarktenu demenciju; (3) supkortikalnu demenciju; (4) mješovitu demenciju; i (5) CADASIL (cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom) (Kalaria, 2018).

Trenutno ne postoje posebni lijekovi odobreni za liječenje VaD-a (Sun 2018). Klinička ispitivanja donepezila, trenutno korištenog kod pacijenata s AB, nisu bila obećavajuća u VaD-u, jer se pokazao kao puno manje učinkovit (Roman i sur., 2010).

1.2.3. Ostale neurodegenerativne demencije

Frontotemporalna demencija (FTD) očituje se neuronskom degeneracijom frontalnog i prednjeg temporalnog režnja mozga (Slika 6). U bolesnika starijih od 65 godina, FTD je treći najčešći uzrok demencije, te drugi najčešći uzrok rane demencije (dob <65). Obično pogađa osobe između 45 i 65 godina starosti (Kurz i sur., 2014). FTD je povezan s ventromedijalnim i dorzolateralnim frontalnim i anteriornim temporalnim gubitkom sive tvari (Schroeter i sur., 2008), odnosno zahvaća područja mozga koja su odgovorna za ponašanje, učenje jezika, osobnost, motivaciju, izvršnu funkciju i apstraktno mišljanje. Najprije nastupaju promjene u ponašanju i jezične poteškoće (sintaksa i fluentnost), nakon kojih slijedi gubitak izvršnih funkcija i kognitivnih sposobnosti (Chan i sur., 2011).



Slika 6. Vanjski prikaz desne moždane hemisfere pacijenta s dijagnosticiranim FTD-om. Vidljivo je skupljanje vijuga u frontalnom (crvene strelice) i temporalnom (žuta strelica) režnju. Gornji temporalni girus pokazuje izraženu atrofiju prednje jedne trećine mozga, dok su stražnje dvije trećine normalnog izgleda (Preuzeto i modificirano prema Lawrence i sur., 2003).

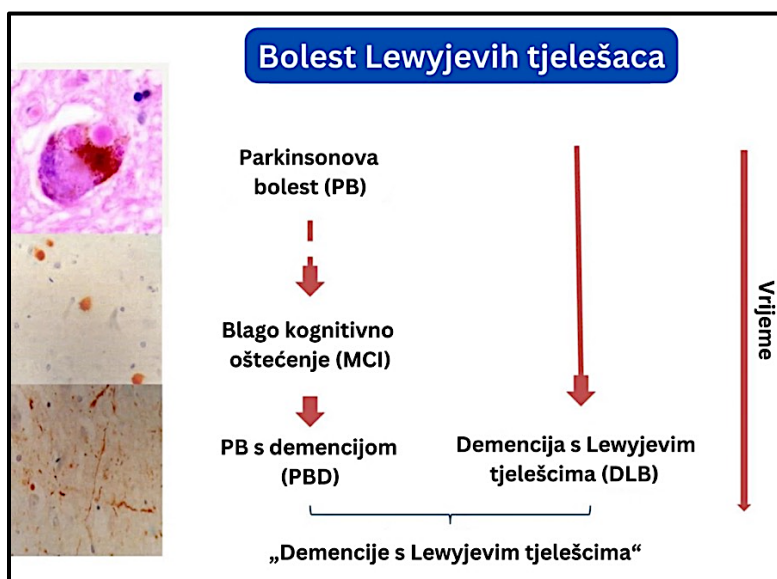
FTD se može manifestirati u dva klinička podtipa, zasnovano na promjenama u ponašanju i osobnosti ili jezičnim poremećajima. Bihevioralni tip FTD-a (bvFTD, engl. *Behavioural-variant Frontotemporal Dementia*) pogađa više od 50% pacijenata s FTD-om a karakteriziraju ga promjene u ponašanju i osobnosti kao što su apatija, gubitak empatije ili stereotipno ponašanje (Josephs i sur., 2011). Ako pacijent ima jezičnih poteškoća, postavlja se dijagnoza primarne progresivne afazije (PPA, engl. *Primary Progressive Aphasia*). Posljednjih godina PPA se dijeli u tri varijante:

1) progresivna nefluentna afazija (PNFA, engl. *Progressive Nonfluent Aphasia*); 2) semantička demencija (SD, engl. *Semantic Dementia*); i 3) logopenična progresivna afazija (LPA, engl. *Logopenic Progressive Aphasia*). PNFA je druga najzastupljenija prezentacija FTD-a, koju ima 25 % pacijenata (Johnson i sur., 2005). Agramatizam koji se sastoji od kratkih, jednostavnih fraza i izostavljanja gramatičkih morfema, kao i naporan (spor) govor, ključni su kriteriji za uspostavljanje dijagnoze PNFA. Za postavljanje dijagnoze SD-a, bitne su pojava anomalije te oštećenje razumijevanja i pojmovnog znanja, pri čemu govorna produkcija nije oštećena (Gorno-Tempini i sur., 2011).

U osoba s FTD-om utvrđene su abnormalnosti serotoniniskog (Franceschi i sur., 2005) i dopaminskog sustava u mozgu (Rinne i sur., 2002), dok se čini da je funkcija kolinergičkog sustava relativno sačuvana. Identificirano je pet gena čije mutacije se povezuju s FTD-om: gen za *tau* protein vezan s mikrotubulima (MAPT, engl. *Microtubule Associated Protein Tau*), C9orf72 (engl. *Chromosome 9 Open Reading Frame 72*), granulin (GRN), gen koji kodira protein koji sadrži valozin (VCP, engl. *Valosin Containing Protein*) i CHMP2B (engl. *Charged Multivesicular Body Protein 2B*) gen (Cruts i sur., 2012). Liječenje je uglavnom simptomatsko. Dok za kognitivna oštećenja u FTD-u nije utvrđena učinkovita terapija, za bihevioralne simptome mogu biti učinkoviti selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI, engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*), a za motoričke simptome (parkinsonizam ili bolest motoričkih neurona), indicirana je terapija riluzolom (benztiazol) (Tsai i Boxer, 2014).

Demencija s Lewyjevim tjelešcima (DLB) je neurodegenerativni poremećaj kojeg, kao i ostale α -sinukleinopatije, karakterizira nakupljanje proteina α -sinkuleina (α -syn, engl. *Alpha-Synuclein*) u sferične, citoplazmatske inkluzije u neuronima, tzv. Lewyjeva tjelešca (Outeiro i sur., 2019). Izvorno su se Lewyjeva tjelešca smatrala obilježjem PB-a i nisu bila povezana s demencijom u kasnoj životnoj dobi. Kasnije se pokazalo da se Lewyjeva tjelešca pojavljuju u moždanom deblu i korteksu 15-25% pacijenata s demencijom (McKeith i sur., 1996) i da patologiju DLB-a karakterizira progresivna akumulacija Lewyjevih tjelešaca i neurita u moždanom deblu, limbičkim i neokortikalnim regijama (Ferman i sur., 2011). Mehanizmi agregacije i toksičnosti α -sinukleina nisu u potpunosti razjašnjeni, ali je pokazano da ovaj protein prolazi kroz post-translacijske modifikacije i međudjeluje s drugim brojnim proteinima, hormonima, neurotransmiterima i metalima koji mogu modulirati njegovu sklonost agregaciji (Paleologou i El-Agnaf, 2012).

U osoba s DLB-om često su prisutni problemi s pažnjom i vizualno-prostornom sposobnošću, što može rezultirati poteškoćama u crtanju oblika predmeta ili u kopiranju figura. Dijagnoza DLB-a zahtijeva simptome demencije i najmanje dvije od četiri kliničke značajke (dobro oblikovane i detaljne vizualne halucinacije, fluktuirajuću kognitivnu sposobnost s izraženim varijacijama u pažnji i budnosti, motoričke značajke karakteristične za parkinsonizam poput akinezije, rigidnosti i tremora, te poremećaj ponašanja u REM fazi sna (RBD, eng. *REM sleep behaviour disorder*)) (Ferman i sur., 2011). Dok je u bolesnika s DLB-om klinička slika demencije praćena parkinsonizmom, u oboljelih od PB s demencijom (PBD), prvo su prisutni znakovi parkinsonizma, nakon kojeg slijedi demencija (McKeith i sur., 2005) (Slika 7). U DSM-5 klasifikaciji, DLB i PBD nazivaju se veliki i blagi neurokognitivni poremećaj s Lewyjevim tjelešcima, odnosno uzrokovan Parkinsonovom bolešću (APA, 2013).

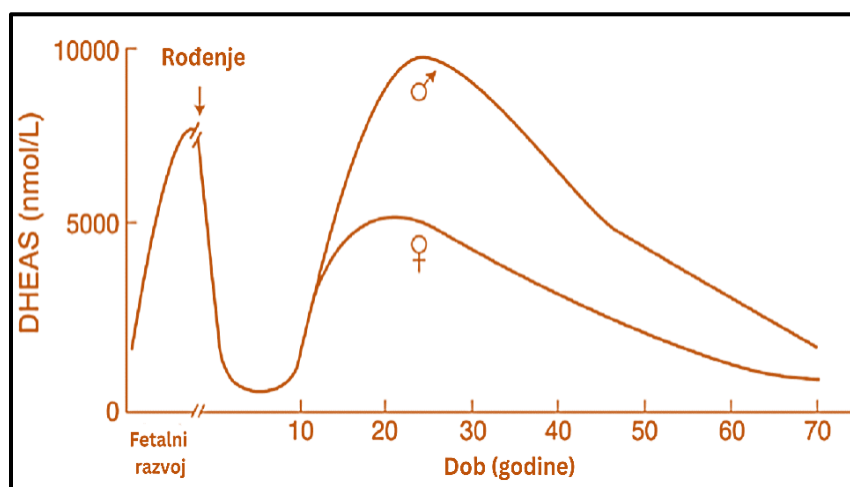


Slika 7. Podjela bolesti Lewyjevih tjelešaca. PBD se dijagnosticira kada se kognitivno oštećenje razvije najmanje godinu dana nakon pojave parkinsonizma. DLB se dijagnosticira kada se kognitivni simptomi pojave bez parkinsonizma ili manje od 1 godine nakon pojave parkinsonizma (Preuzeto i modificirano prema Donaghy i McKeith, 2014).

Istraživanja koja pokušavaju usporediti napredovanje neurodegeneracije kod α -sinukleinopatija prvenstveno upućuju na učinke primjene donepezila i rivastigmina (Taylor i sur., 2020), no ona su usredotočena prvenstveno na osobe s PBD-om, dok za DLB nema odgovarajuće terapije.

1.3. Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni ester (DHEAS)

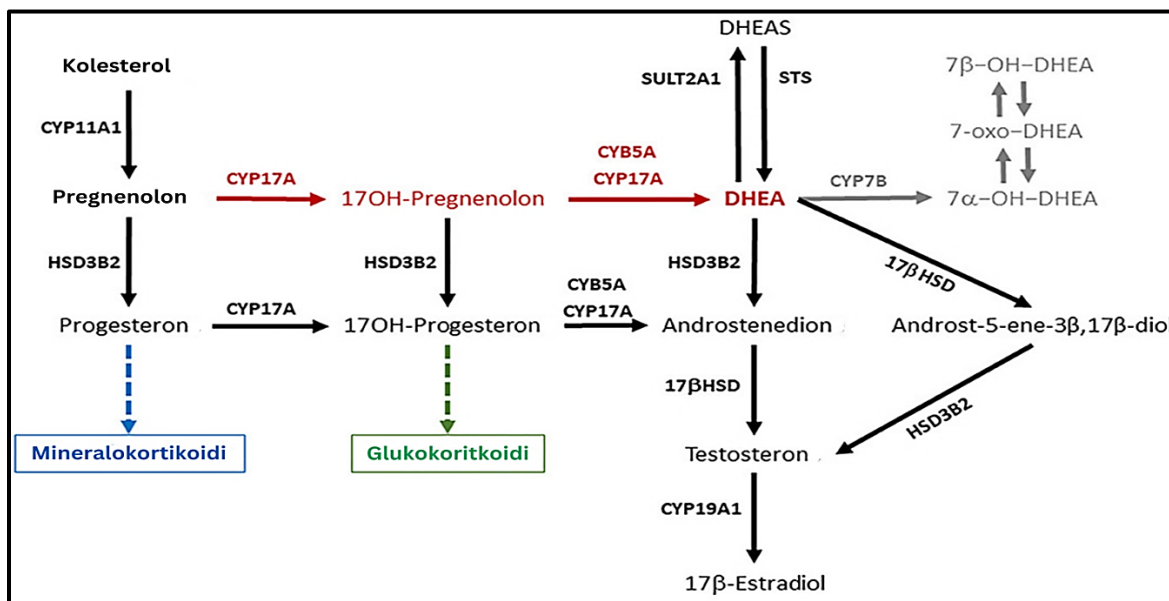
Steroidi su važan dio endogene signalizacije u organizmu. Steroidogeneza se odvija uglavnom u perifernim organima, kao što su nadbubrežne žlijezde, gonade i placenta. No, i druga tkiva i organi, primjerice mozak, također mogu sintetizirati steroide i djelovati autokrino i parakrino (Giatti i sur., 2020). Steroidi koji ostvaruju svoje učinke u SŽS-u nazivaju se neuroaktivni steroidi, dok se neurosteroidima nazivaju oni koji se tamo i sintetiziraju (Corpéchet i sur., 1981, Baulieu, 1998). Dehidroepiandrosteron (DHEA) najzastupljeniji je steroidni hormon u ljudskoj krvi koji se pretežno sintetizira u nadbubrežnim žlijezdama. Enzim sulfotransferaza 2A1 (SULT2A1) pretvara DHEA u sulfatni ester, poznat kao dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) (Maninger i sur., 2009). Nadbubrežna žlijezda proizvodi velike količine DHEA i DHEAS-a (zajedno u daljnjem tekstu DHEA(S)) tijekom fetalnog razvoja, koje naglo opadaju nakon rođenja i ostaju niske tijekom prvih 5-7 godina života. Koncentracije DHEA(S)-a tada rastu i dosežu vrhunac tijekom drugog desetljeća života, nakon čega slijedi postepeni pad ovisan o dobi, da bi u starijoj životnoj dobi (65-70 godina) pala samo na 20% maksimalne koncentracije. Postoje i jasne spolne razlike u cirkulirajućim razinama DHEA(S)-a, pri čemu muškarci imaju više razine od žena (Slika 8) (Rainey i sur., 2002). DHEA je prekursor androgenih i estrogenih hormona i sintetizira se u manjoj mjeri i u spolnim žlijezdama, testisima i jajnicima (Nieschlag i sur., 1973). Osim toga, DHEA(S) se sintetizira *de novo* u mozgu, gdje su njegove koncentracije čak 6 puta veće nego u plazmi (Guazzo i sur., 1996), te je stoga nazvan neurosteroidom.



Slika 8. Varijacije u razinama cirkulirajućeg DHEAS-a tijekom ljudskog života (Preuzeto i modificirano prema Seely i sur., 2005).

1.3.1. Biosinteza DHEA(S)-a

DHEA je steroid koji se sintetizira iz kolesterola u *zoni reticularis* kore nabubrežne žlijezde, jajnicima ili testisima, te u glijalnim i živčanim stanicama mozga. Prvi i odlučujući korak u sintezi steroidnih hormona je pretvorba kolesterola u pregnenolon uz pomoć CYP11A1 enzima unutarnje mitohondrijske membrane, poznatog kao dezmolaza (citokrom P450_{scc}). DHEA se sintetizira iz pregnenolona u dva koraka, a oba su posredovana enzimom CYP17A1 (citokrom P450_{c17}), koji se natječe za pregnenolon s 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazom (HSD3B2), enzimom potrebnim za proizvodnju mineralokortikoida i glukokortikoida. Sposobnost steroidnog tkiva da sintetizira DHEA-u ovisi o ekspresiji i aktivnosti CYP17A i HSD3B2. Slika 9 prikazuje puteve sinteze i metabolizma DHEA(S)-a. U primata, DHEA cirkulira u krvi uglavnom u svom sulfatnom obliku (DHEAS) u mikromolarnim razinama, pri čemu je koncentracija DHEAS-a posebno visoka u ljudi i čimpanza (Rege i sur., 2019). Pretvorbu DHEA-e u DHEAS prvenstveno katalizira enzim sulfotranferaza SULT2A1 (Gabai i sur., 2020), iako to mogu i SULT1E1 i SULT2B. Budući da *zona reticularis* nadbubrežnih žlijezda čovjeka i drugih primata eksprimira SULT2A1 u velikoj koncentraciji, a nema HSD3B2, odgovorna je za ogromnu sintezu DHEAS-a (Mueller i sur., 2015).



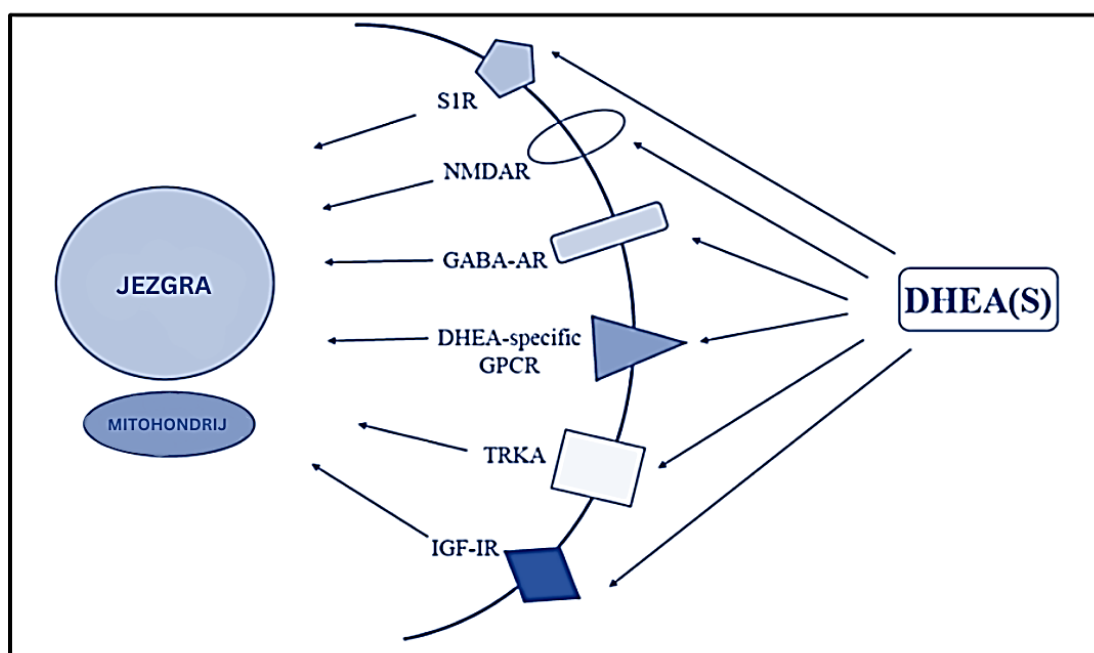
Slika 9. Sinteza DHEA(S)-a. DHEA se sintetizira iz pregnenolona putem $\Delta 5$ puta (crvene strelice). CYP11A1 – dezmolaza, HSD3 β 2 – 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza, CYP17A1– 17 α -hidroksilaza/c17,20-lijaza, SULT2A1 – sulfotranferaza 2A1 pretvara DHEA-u u DHEAS (Preuzeto i modificirano prema Gabai i sur., 2020).

1.3.2. Mehanizmi djelovanja DHEA(S)-a

DHEA-u su u mozgu identificirali Baulieu i sur. i definirali ga kao glavni neuroaktivni steroid koji ima širok raspon bioloških učinaka (Baulieu i Robel, 1996). Izraz "neuroaktivni steroidi" odnosi se na steroidne hormone koji djeluju u SŽS-u. Osim što je prekursor spolnih steroida, DHEA(S) se veže na androgene i estrogene receptore, nuklearne i razne receptore u plazmatskoj membrani i naponske kalcijeve kanaliće, te aktivira brojne signalne putove (Prough i sur., 2016) (Slika 10). Pokazano je DHEA i DHEAS u plazmatskoj membrani aktiviraju specifične receptore povezane s G-proteinima (Charalampopoulos i sur., 2006), dok su Liang i sur. (2016) pokazali da DHEA povećava broj receptora za IGF-1 (eng. *Insulin Like Growth Factor*). Različite studije utvrdile su da DHEA(S) može izravno modulirati brojne membranske receptore, kao što su NMDA receptori, GABA_A receptori za γ -aminomaslačnu kiselinu (GABA, engl. γ -*Amino-Butiric Acid*), sigma receptori tipa 1 (σ_1), kao i Ca²⁺ kanale (Lapchak i sur., 2000; Compagnone i Mellon, 1998). DHEA i DHEAS uglavnom djeluju kao nekompetitivni antagonisti GABA_A receptora, s tim da je antagonističko djelovanje DHEAS jače od djelovanja DHEA (Majewska, 1990). S obzirom da GABA u hipokampusu ima inhibicijski učinak na stvaranje dugoročne potencijacije (LTP, od eng. *Long Term Potentiation*), odnosno konsolidacije pamćenja, smatra se da antagonisti GABA_A receptora, poput DHEA(S)-a imaju pozitivan učinak na pamćenje i kogniciju (Foeller i sur., 2005.). Oba neurosteroda djeluju i kao pozitivni alosterički modulatori glutamatnih NMDA receptora, vjerojatnije posredstvom σ_1 receptora čiji su agonisti (Baulieu, 1998). NMDA receptori imaju značajnu ulogu u plastičnosti sinapsi i učenju a njihovom aktivacijom u hipokampusu pospješuje se stvaranje sinapsi i LTP (Kostakis i sur., 2013.).

Nadalje, otkrivena je interakcija DHEA i DHEAS s dopaminskim i serotoninimskim sustavom (Pérez-Neri i sur., 2008), te ovi neurosterodi potenciraju oslobađanje noradrenalina (Monnet i sur., 1995). Pokazano je također da DHEAS pojačava otpuštanje hipokampalnog acetilkolina *in vivo* za gotovo tri puta (Rhodes i sur., 1997) i time pojačava kolinergičku funkciju, što također objašnjava njegovu ulogu u poboljšavanju pamćenja (George i sur., 2006). Ostali potencijalni receptori za DHEA(S) uključuju protein povezan s mikrotubulima 2 (MAP2, engl. *Microtubule Associated Protein 2*) (Laurine i sur., 2003), membransko vezno mjesto za DHEA-u (mDBS, engl. *Membrane DHEA Binding Site*) (Charalampopoulos i sur., 2008), te receptore u plazmatskoj membrani tropomiozin receptor kinazu (Trk)-A i p75 neurotrofinski receptor (p75NTR) (Lazaridis i sur.

2011). Uočena je i interakcija DHEA(S)-a s biosintezom dušikovog oksida i ionskim kanalčićima (Chakraborti i sur., 2011), naponskim Ca^{2+} kanalima T-tipa (Chevalier i sur., 2012) i funkcijom mitohondrija (Grimm i sur., 2014). Djelovanje DHEA(S) povezuje se sa modulacijom signalne kaskade serin-treoninske kinaze i Akt signalnog puta (Zhang i sur., 2002), kao i sa aktivacijom $\text{NF-}\kappa\text{B}$ koja potiče transkripciju anti-apoptotskih proteina Bcl-2 porodice, aktivaciju imunološkog sustava i zaštitu stanica od toksina (Mao i Barger, 1998; Suzuki i sur., 2004), smanjujući oksidacijski stres i ROS (Iwasaki i sur., 2004). Jedan od mogućih mehanizama poticanja neurogeneze i preživljavanja neurona DHEA(S)-om (Karishma i Herbert, 2002; Suzuki i sur., 2004; Compagnone i sur., 1998; Ulmann i sur. 2009) je promjena koncentracije BDNF u različitim regijama mozga (Naert i sur., 2007; Pluchino i sur. 2013; Rahmani i sur. 2013; Sakr i sur. 2014). Neuroprotektivno djelovanje DHEA(S) možda je posredovano PI3K signalnim putem (Li i sur., 2010) koji je u mozgu moduliran tirozin kinaznim receptorima (Trk) za BDNF (Gupta i sur., 2013).



Slika 10. Djelovanje DHEA(S) putem različitih receptora u plazmatskoj membrani. DHEA(S) aktiviraj različite receptore u plazma membrani, uključujući NMDA i GABA_A receptore, središnje σ_1 receptore, IGF-1 receptore, Trk-A receptore, kao i razne specifične receptore spregnute s G-proteinima, koji utječu na ekspresiju gena i mitohondrijsku funkciju stanice (Preuzeto i modificirano prema Svob Strac i sur., 2020).

1.3.3. Neurobiološko djelovanje DHEA(S)-a

DHEA i DHEAS imaju brojne fiziološke funkcije u različitim sustavima, uključujući SŽS (Perez Neri i sur., 2008), imunološki sustav (Chen i Parker, 2004), kao i u tjelesnom rastu i razvoju (Arquitt i sur., 1991). Djelovanja DHEA(S)-a uključuju pozitivne učinke protiv demencije, starenja, upale, dijabetesa, pretilosti, raka, ateroskleroze, osteoporoze i brojne druge (Nawata i sur., 2002; Leowattana, 2004). Pretpostavlja se da DHEA(S) poboljšava neuralnu plastičnost i podražljivost, te da ima neuroprotektivna svojstva (Wolf i Kirschbaum, 1999), odnosno da modulira smrt i preživljavanje neurona (Zhang i sur., 2002, Kurata i sur., 2004; Taylor i sur., 2014), osobito tijekom razvoja mozga (Mellon, 2007). Mnoge studije su, osim o neuroprotektivnim (Kurata i sur., 2004; Kaasik i sur., 2001; Li i sur., 2001; Fiore i sur., 2004), izvjestile i o antioksidativnim i protuupalnim učincima DHEA(S)-a (Bocuzzi i sur., 1997; Iwasaki i sur., 2004). Neurodegenerativne bolesti uključujući AB i PB općenito su popraćene neuroinflamacijom, pri čemu su povećana upala i povišene razine upalnih citokina povezani s kognitivnim padom. Pokazano je da neuroupala može utjecati na sintezu DHEA(S)-a i obrnuto da DHEA(S) može modulirati proupalne molekule i imunološki odgovor u demencijama (Yilmaz i sur., 2019, Dillon, 2005). Osim toga, pokazalo se da DHEA(S) igra značajnu ulogu u modulaciji raspoloženja, emocija i ponašanja (Fedotova i Sapronov, 2004; Maayan i sur., 2006; Nicolas i sur., 2001), kao i pamćenja i kognitivnih funkcija (Millman i sur., 2008, de Bruin i sur., 2002). Ovi podaci upućuju na DHEA i DHEAS kao potencijalne mete za prevenciju i liječenje raznih neuropsihijatrijskih i kognitivnih poremećaja, uključujući demenciju (Wolf i Kirschbaum, 1999, Pérez-Neri i sur., 2008; Ben Dor i sur., 2015; Söndergaard i sur., 2002; Strous i sur., 2003; Hillen i sur., 2000).

1.3.4. Terapijski potencijal DHEA(S)-a u demenciji

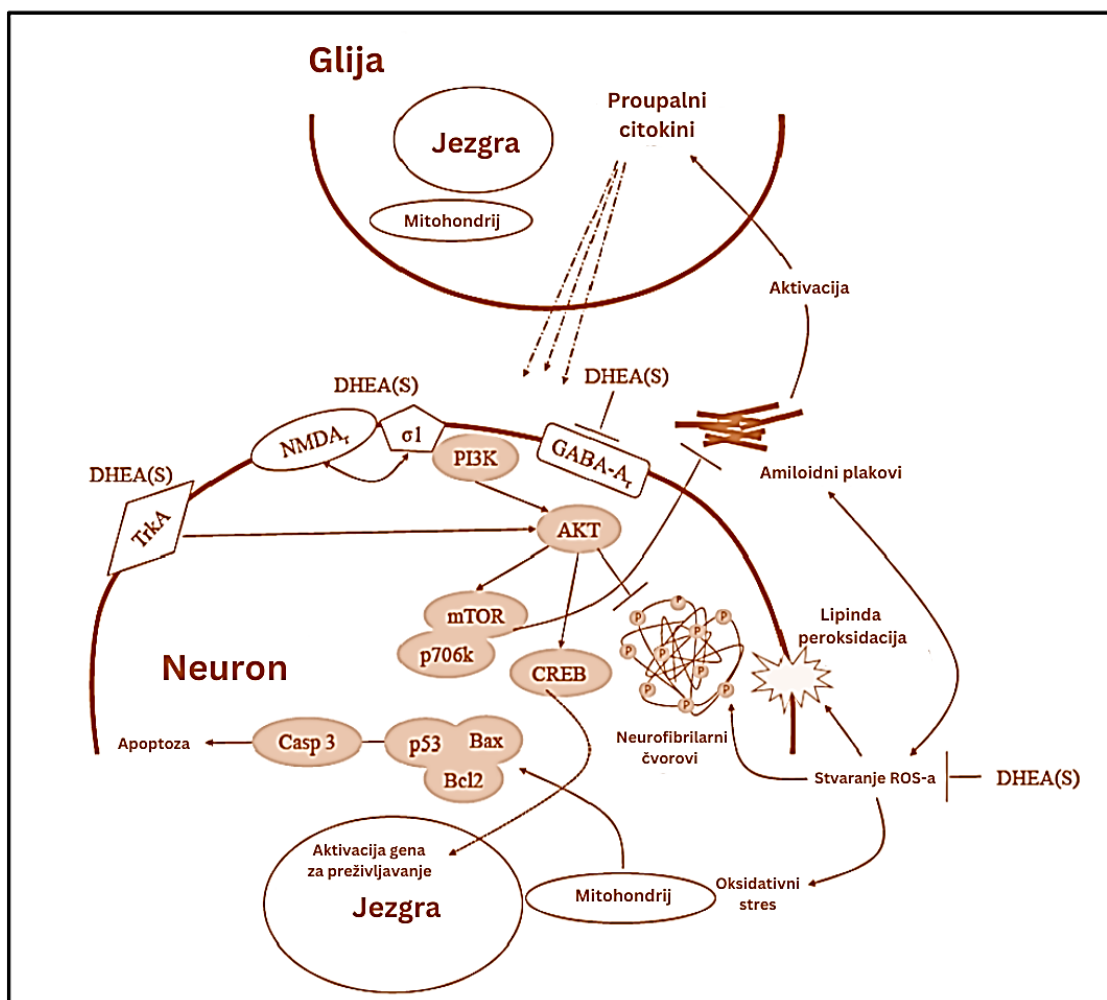
Pokazano je da DHEA(S) ostvaruje neuroprotektivan i pozitivan učinak na pamćenje i kogniciju (Foeller i sur., 2005; Vallee i sur., 2001; Flood i sur., 1992; Meunier i Maurice, 2004; Kaasik i sur., 2001; 2003; Kurata i sur., 2004). Protektivni učinci DHEA(S)-a utvrđeni su *in vitro* kod A β -toksičnosti u B104 stanica, kultiviranih hipokampalnih neurona štakora i mišjih hipokampalnih HT-22 stanica (El Bitar i sur., 2014; Kato-Negishi i Kawahara, 2008; Cardounel i sur., 1999), kao i *in vivo* u miševa (Maurice i sur., 2000; Farr i sur., 2004). U NT2 neuronima izloženim oksidacijskom stresu, DHEA smanjuje ekspresiju i aktivnost BACE, enzima uključenog u stvaranje A β (Bastianetto i sur., 1999; Tamagno i sur., 2003). U APP/PS1 transgeničnih miševa

DHEA je imala povoljan učinak na rast i preživljenje neurona (Xu i sur., 2012), dok je u AB modelu štakora tretiranih $AlCl_3$ ostvarila neuroprotektivan učinak smanjenjem apoptoze i oksidacijskog stresa, te poticanjem ekspresije BDNF-a i kolinergične transmisije u mozgu (Aly i sur., 2011). Pokazano je i da primjena DHEA(S) poboljšava pamćenje u miševa (Roberts i sur., 1987) i štakora (Yoo i sur., 1996).

Iako se razina cirkulirajućeg DHEA(S)-a smanjuje u ljudi starošću, većina je istraživanja pokazala da su razine DHEA(S)-a u plazmi, serumu i likvoru osoba s AB-om niže, nego u zdravih kontrolnih osoba iste dobi (Sunderland i sur. 1989; Yanase i sur. 1996; Genedani i sur., 2004; Cho i sur., 2006; Aldred i Mecocci, 2010; Armanini i sur., 2003). Hillen i sur. (2000) sugerirali su da je snižena koncentracija DHEA(S) u plazmi rizični čimbenik za razvoj AB-a. Sugerirano je da su niže razine DHEA(S)-a u mozgu pacijenata s AB-om, obrnuto povezane s prisutnošću fosforiliranog tau i β -amiloida, što upućuje na moguću neuroprotektivnu ulogu ovih neurosteroida u AB-u (Weill-Engerer i sur., 2002). Pretpostavlja se da neravnoteža DHEA(S)-a ima ulogu u napredovanju poremećaja neurotransmisije, te na taj način potiče stvaranje izvanstaničnih A β plakova i unutarstaničnih NFT-ova (Arbo i sur., 2018). Međutim, Yanase i suradnici (1996) također su pronašli niže vrijednosti DHEAS-a i omjera DHEAS/DHEA u ispitanika s AB-om i VaD-om, što ukazuje da smanjene koncentracije DHEAS-a u serumu predstavljaju uobičajeni fenomen u demencija.

Međutim, pojedine studije utvrdile su i povišene koncentracije DHEA(S)-a u cirkulaciji (Rammouz i sur., 2011; Rasmuson i sur., 2011; Brown i sur., 2003; Naylor i sur., 2008; Kim i sur., 2003), kao i u nekoliko moždanih regija oboljelih od AB-a (Brown i sur., 2003; Marx i sur., 2006). Kognitivne disfunkcije bile su povezane i sa sniženim i sa povišenim razinama DHEA(S)-a, dok neke studije nisu utvrdile promjene (Carlson i sur. 1999; Vallee i sur., 2001; Bo i sur. 2006; Wolkowitz i sur., 2003; De Bruin i sur., 2002). Usprkos pozitivnim rezultatima u osoba s demencijom (Wolf i sur., 1998), malo je dokaza da DHEA(S) povećava mentalne sposobnosti i pamćenje u zdravih osoba (Morales i sur., 1994; Alhaj i sur., 2006; Grimley Evans i sur., 2006). Pozitivan učinak DHEA(S)-a na kognitivne funkcije učenja i pamćenja utvrđen je u osoba s niskim koncentracijama DHEAS-a, iako to druge studije nisu utvrdile (Vallee i sur., 2001; Wolkowitz i sur., 2003). Kako povećava koncentraciju serotonina u hipotalamusu (Abadie i sur., 1993, Svec i Porter, 1997), DHEA(S), putem metabolizma neurotransmitora (serotonina, dopamina), može

smanjiti i simptome depresije (Schmidt i sur., 2005), česte u osoba sa demencijama i povezane sa sniženom razinom DHEA(S) u mozgu (Strous i sur., 2003).



Slika 11. Potencijalno djelovanje DHEA(S)-a u Alzheimerovoj bolesti. Preko receptora u plazmatskoj membrani, DHEA(S) pokazuje neuroprotektivna svojstva modulirajući PI3K-Akt-mTOR-p70S6k signaliziranje, te utječe na nakupljanje A β plakova, hiperfosforilaciju tau proteina i stvaranje neurofibrilarnih snopića. DHEA(S) također djeluje antioksidativno, sprječavajući stvaranje ROS-ova, smanjujući lipidnu peroksidaciju i štiteći funkcije mitohondrija. DHEA(S) također inhibira apoptozu povećavajući ekspresiju anti-apoptotskog Bcl-2 gena i drugih gena za preživljavanje, kao i smanjujući mRNA razine Bax-a, kaspaze-9 i kaspaze-3. Osim toga, DHEA(S) pokazuje povoljne učinke na neuroinflamaciju tako što smanjuje izlučivanje različitih proupalnih citokina (Preuzeto i modificirano prema Svob Strac i sur., 2020).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*, te u plazmatskoj koncentraciji DHEAS-a, između osoba sa blagim i velikim neurokognitivnim poremećajem. Također će se istražiti utječu li varijacije u genu *SULT2A1* na koncentraciju DHEAS-a u plazmi te postoji li njihova povezanost s težinom neurokognitivnog poremećaja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci krvi

U ovom istraživanju korišteni su uzorci krvi 304 ispitanika (135 žena i 169 muškaraca), koji su liječeni u Klinici za psihijatriju Vrapče u Zagrebu. Krv je uzeta ispitanicima hrvatskog porijekla, kojima je dijagnosticiran veliki neurokognitivni poremećaj (demencija), uglavnom povezan s mogućom AB-om, VaD-om, FTD-om te DLB-om ili blagi neurokognitivni poremećaj (MCI, komparativna skupina). Dijagnozu su postavili iskusni psihijatri (N. Mimica, S. Uzun i O. Kozumplik) iz Klinike za psihijatriju Vrapče u Zagrebu, prema kriterijima DSM-V (APA, 2013) i NINCDS-ADRDA (Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje) (McKhann i sur., 1984).

Kognitivni simptomi ispitanika evaluirani su od strane psihijataru prvenstveno testom procjene mentalnog stanja (MMSE, eng. *Mini-mental state examination*) (Cockrell i Folstein, 1988; Arevalo-Rodriguez i sur., 2013), prema kojoj broj bodova od 21 do 24 upućuje na blago, 10 do 20 na umjereno i 9 ili manje na teško kognitivno oštećenje, dok se vrijednost od 23 i manje bodova preporuča za dijagnozu demencije (Folstein i sur., 1975). U evaluaciji kognitivnih simptoma korišteni su još test crtanja sata (CDT, engl. *Clock Drawing Test*) (Lin i sur., 2013) i ljestvica procjene Alzheimerove bolesti (ADAS, engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) - kognitivna podskala (ADAS-Cog) (Rosen i sur., 1984).

U okviru projekta „Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji“ (Hrzz IP-04-2019), svim ispitanicima ili njihovim skrbnicima objašnjena je svrha i postupak istraživanja te su potpisali informirani pristanak. Za istraživanje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Klinike za psihijatriju Vrapče i Instituta Ruđer Bošković i provelo se u skladu s Helsinškom deklaracijom (1964). U Klinici za psihijatriju Vrapče, svim ispitanicima izvađen je uzorak od 8 ml krvi koji je pohranjen u plastične *Vacutainer* epruvete s 2 ml otopine protiv zgrušavanja krvi (ACD, engl. *Acid Citrate Dextrose*). Uzorkovanje krvi je provedeno ujutro, natašte. Svi uzorci su dostavljeni na Institut Ruđer Bošković u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju, isti dan nakon uzorkovanja.

3.2. Izdvajanje plazme i genomske DNA

Uzorci krvi su se obradili u roku od 24 sata, te su iz njih uklonjeni plazma i trombociti, a zaostali su eritrociti i leukociti. Serijom centrifugiranja iz pune krvi prvo sam izdvojio plazmu (3 min na 1100 x g), a zatim iz plazme trombocite (15 min na 5087 x g) kao bi se dobila plazma siromašna trombocitima. Plazma, trombociti i preostali dio krvi s leukocitima za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *Deoxyribonucleic Acid*) pohranjeni su na -20°C za daljnje analize. Genomsku DNA izolirao sam iz leukocita metodom isoljavanja (engl. *salting-out DNA extraction*) (Miller i sur. 1998). Popis korištenih kemikalija prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije korištene za izolaciju genomske DNA iz krvi.

KEMIKALIJE	VOLUMEN (na 300 µl krvi)
Pufer za lizu eritrocita (RCLB, engl. <i>Red Cell Lysis Buffer</i>): 10 mM Tris, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, pH=7.6	900 µl
SE (engl. <i>Sodium EDTA</i>) pufer: natrij-EDTA pufer; 75 mM NaCl, 25 mM, pH=8.0	300 µl
Natrij dodecil sulfat (SDS, engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate</i>), 10%, pH=7.2	30 µl
Proteinaza K (20 mg/ml)	1.5 µl
NaCl, 5 M otopina	160 µl
Izopropanol	800 µl
Etanol, 75%	250 µl
TE (engl. <i>Tris-EDTA</i>) pufer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8.0	100 µl

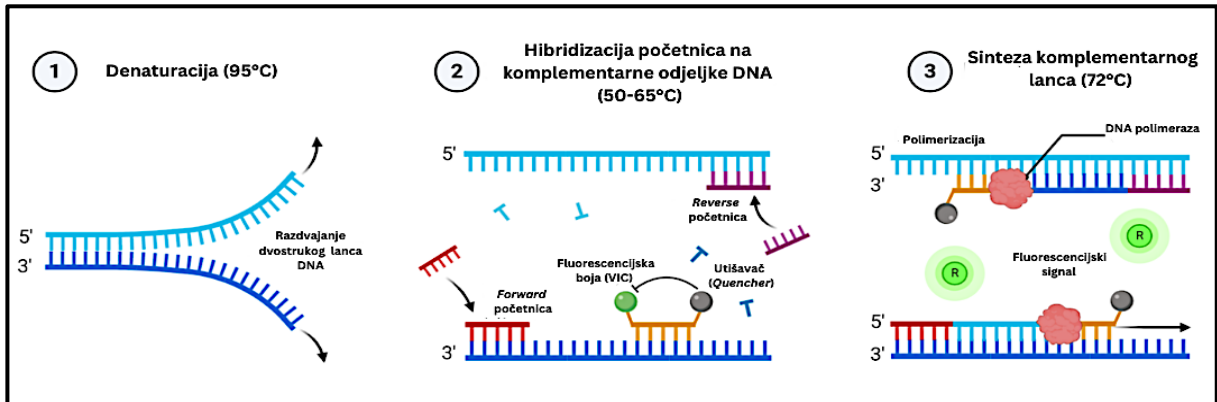
Uzorke krvi sam odmrznuo te stavio na valjkastu miješalicu (engl. *Roller Mixer*) radi miješanja na 16-20 minuta. Dodao sam zatim, 300 µl uzorka i 900 µl hladnog RCLB-a (engl. *Red Cell Lysis Buffer*), u sterilnu *Eppendorf* epruvetu. Sadržaj sam tijekom 20 sekundi promiješao na rotacijskoj miješalici (vorteks), a potom pohranio na led 10 minuta. Sadržaj s liziranim eritrocitima sam stavio centrifugirati (2 min. na 13 400 x g, pri 4°C), a potom supernatant (u kojem se nalaze lizirani

eritrociti) odvojio od taloga. Talog s leukocitima sam sačuvao i dodatno pročistio trostrukim ponavljanjem postupka resuspendiranja u RCLB-u i centrifugiranja. Zatim sam kako bi lizirao stanice, na talog dodao 300 µl SE pufera i kratko promiješao na rotacijskoj miješalici, a potom dodao 30 µl 10% SDS-a (engl. *Sodium Dodecil Sulphate*) i 1,5 µl proteinaze K. SDS otapa lipidne membrane i djeluje kao aktivator proteinaze K, koja razgrađuje proteine i enzime (primjerice nukleaze), te tako omogućuje da DNA neoštećena izađe iz stanice. Lagano sam promiješao sadržaj i ostavio inkubirati pri 56°C, tijekom 2 sata na miješalici. Uzorcima sam zatim dodao 120 µl NaCl-a (5 M), promiješao na rotacijskoj miješalici i centrifugirao (5 min. na 13 400 x g, pri 20°C). Supernatant u kojem je otopljena DNA sam prebacio u novu mikroeprevetu i dodao 800 µl hladnog izopropanola. Laganim miješanjem došlo je do precipitacije DNA, koja postaje vidljiva. Ponovo sam centrifugirao (2 min. na 12 000 x g, pri 20°C), supernatant odlio, a u talog sam dodao 250 µl 75%-tnog etanola, koji otklanja ostatke NaCl-a i dodatno pročišćava talog. Nakon centrifugiranja (2 min. na 12 000 x g, pri 20°C), supernatant sam odlio, a talog ostavio sušiti na zraku 15 minuta, kako bi sav alkohol ishlapio. Talogu sam dodao 100 µl tris-EDTA pufera (pH 8.0) i ostavio tijekom jednog sata na 37°C da se otapa izolirana DNA. Uzorke sam potom pohranio na +4°C.

3.3. Određivanje genotipova metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real-time PCR*)

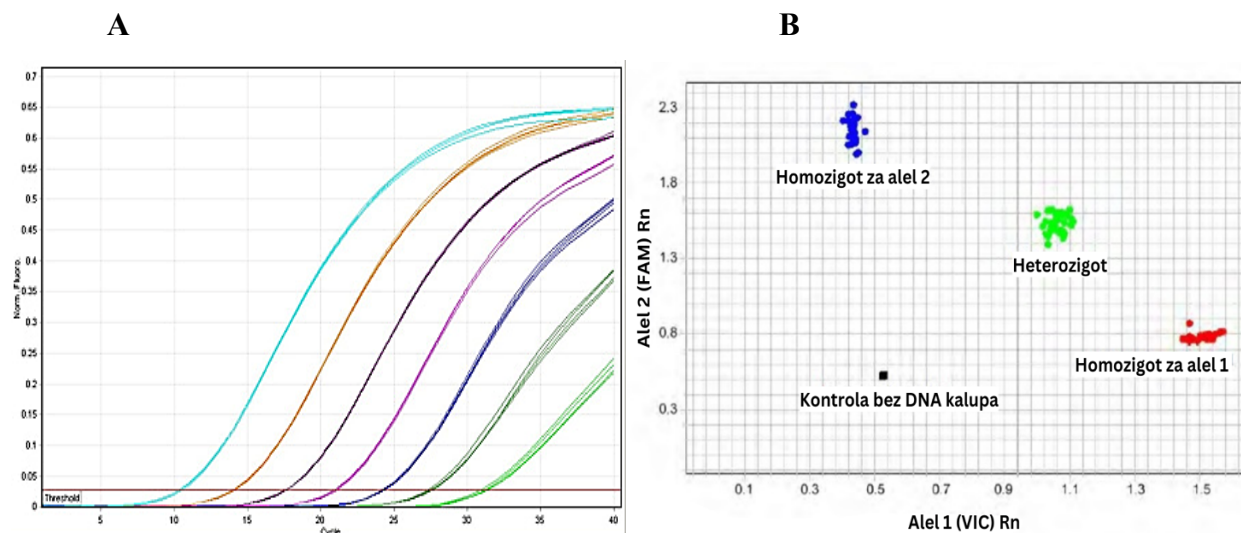
Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*) oblik su genetske varijacije koji se javlja s učestalošću od približno 1 na 1000 parova baza, a predstavljaju zamjenu jednog nukleotida. SNP-ovi mogu utjecati na predispoziciju za neku bolest, promijeniti opseg ili težinu bolesti ili utjecati na odgovor na lijekove i učinkovitost liječenja kao i pojavu određenih nuspojava. Prilikom genotipizacije koristili smo specijalno dizajnirane sonde tvrtke Applied Biosystems® (SAD), koje se vežu na određeni alel i mogu detektirati prilikom umnažanja DNA u lančanoj reakciji polimeraze (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), što omogućuje otkrivanje i analizu SNP-a. Tako dizajnirane sonde su komplementarne segmentu ciljne regije DNA, a sama metoda se temelji na aktivnosti *Taq* DNA polimeraze, odnosno njenoj 5' nukleaznoj aktivnosti. Sonda je oligonukleotid koji na svom 5' kraju ima vezanu fluorescencijsku boju - VIC ili FAM (engl. *Reporter*), a na 3' kraju utišavač (engl. *Quencher*). Blizina utišivača smanjuje fluorescencijski signal koji daje obilježavajuća boja, kao rezultat prijenosa energije (FRET, engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) i fluorescentni signal izostaje. Kada je

komplementarna DNA sekvenci, dolazi do hibridizacije, te *Taq* DNA polimeraza svojom 5' nukleaznom aktivnošću oslobađa fluorescentnu boju sa sonde i opaža se fluorescencija (Dymond, 2013) (Slika 12).



Slika 12. Shematski prikaz *real-time* PCR reakcije uz korištenje sonde označene fluorescencijskom bojom VIC (Preuzeto i modificirano prema <https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/real-time-pcr-qpcr/>).

Stvaranje fluorescencijskog signala proporcionalno nakupljanju PCR produkta detektira se uređajem ABI Prism 7000 Sequencing Detection System u stvarnom vremenu, a prisutnost određenog VIC i/ili FAM signala dokazuje prisutnost odgovarajućih alela (Slika 13).



Slika 13. Jačanje fluorescencijskog signala u ovisnosti o broju PCR ciklusa (A) i alelna diskriminacija (B) (Preuzeto i modificirano prema <https://www.gene-g.com/what-is-allelic-discrimination-genotyping>).

Postupak genotipizacije:

Metodom *real-time* PCR u uzorcima DNA svih ispitanika genotipizirao sam polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* primjenom *TaqMan SNP genotyping assay* na uređaju ABI Prism7300 Real time PCR System (Applied Biosystems Inc., SAD), u skladu s uputama proizvođača. Uzorke izolirane DNA razrijedio sam destiliranom vodom (dH₂O) do konačne koncentracije 1,8 ng/μl. U PCR pločicu (96 jažica) dodao sam u svaku jažicu po 4,5 μl razrijeđenog uzorka DNA, 5 μl *TaqMan* univerzalne mješavine za genotipizaciju (engl. *Taqman Genotyping Mastermix*) i 0,5 μl *TaqMan* mješavine početnica i sonde obilježenih fluorescencijskim bojama VIC i FAM (Tablica 3). Za negativnu kontrolu, umjesto uzorka DNA, u prethodno opisanu smjesu, dodao sam dH₂O. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 10 μl.

Tablica 3. Kemikalije korištene za genotipizaciju polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* metodom *real-time* PCR-a.

Kemikalije	Volumen u jažici
Genomska DNA razrijeđena u dH ₂ O	4,5
2 x <i>Taqman</i> mješavina za genotipizaciju	5 μl
40 x <i>Taqman</i> mješavina početnica i sonde	0.5 μl

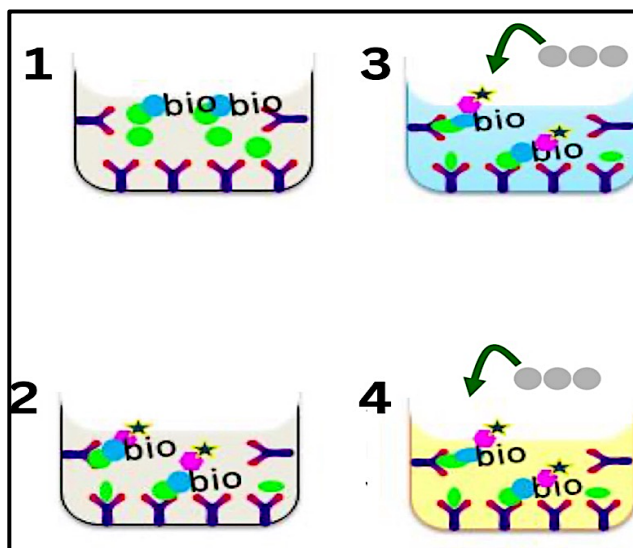
PCR pločicu sam stavio u uređaj ABI Prism7300 Real time PCR System (Applied Biosystems Inc., SAD), i proveo umnažanje u skladu s uputama proizvođača. Početna denaturacija DNA provodila se kroz 10 minuta na temperaturi od 95°C, a nakon toga slijedilo je 40 ciklusa denaturacije (15 sekundi pri 92°C). U toj fazi se sparni lanci DNA razdvajaju, i služe kao kalupi za amplifikaciju. Kako bi se vezale početnice i omogućilo produljivanje komplementarnih dijelova DNA, temperatura je snižena na 60°C u trajanju od 1 minute. Ciklusi od denaturacije do elongacije DNA ponavljaju se 50 puta (Tablica 4). Detektiran je porast razine fluorescencije FAM i/ili VIC, ovisno o odgovarajućem alelu, u stvarnom vremenu. Na homozigotnost jednog alela ukazuje fluorescencija jedne boje, odnosno na heterozigotnost upućuje fluorescencija obje boje.

Tablica 4. Uvjeti *real-time* PCR-a primjenjeni za genotipizaciju polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*.

	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	95°C	10 min
Denaturacija	50	92°C	15 s
Vežanje i produljivanje početnica		60°C	1 min

3.4. Određivanje koncentracije DHEAS-a u plazmi

Za određivanje koncentracije DHEAS-a u plazmi korišten je ELISA komplet (ELK8370) tvrtke ELK Biotechnology, Inc. (SAD i Kanada). Ovaj test bazira se na tehnici imunološkog testa kompetitivne inhibicije enzima (Slika 14).



Slika 14. Shematski prikaz određivanja koncentracije DHEAS-a u plazmi pomoću komercijalnog ELISA kompleta tvrtke ELK Biotechnology, Inc. (SAD i Kanada). 1. Vežanje DHEAS-a iz plazme na monoklona protutijela koja su imobilizirana u mikropločici; 2. Ispiranje puferom te dodatak Streptavidin-HRP radne otopine (vežanje na postojeći kompleks imobiliziranog protutijela i DHEAS-a); 3. Ispiranje puferom te dodatak TMB supstrata; 4. Dodatak reagensa za zaustavljanje reakcije i bilježenje optičke gustoće na 450 nm, te izračun rezultata (Preuzeto i modificirano prema ELK Biotechnology, Inc.).

Mikrotitarska pločica u ovom kompletu obložena je proteinom DHEAS. Tijekom reakcije, DHEAS iz uzorka plazme veže se na monoklonalno protutijelo kojim je mikropločica obložena. Nevezani uzorak (ili višak konjugata) se ispiru, a zatim se u svaku jažicu doda drugo monoklonalno antitijelo koje sadrži enzim – avidin konjugiran s peroksidazom iz hrena (HRP) i inkubira. Nakon toga doda se otopina TMB (tetrametilbenzidin) supstrata. Reakcija enzim-supstrat prekida se dodatkom stop otopine i boja se mijenja iz plave u žutu. Optička gustoća (OD, engl. *Optical Density*) mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm ± 10 nm. Koncentracija DHEAS-a u testiranim uzorcima plazme može se izračunati usporedbom OD uzoraka sa standardnom krivuljom.

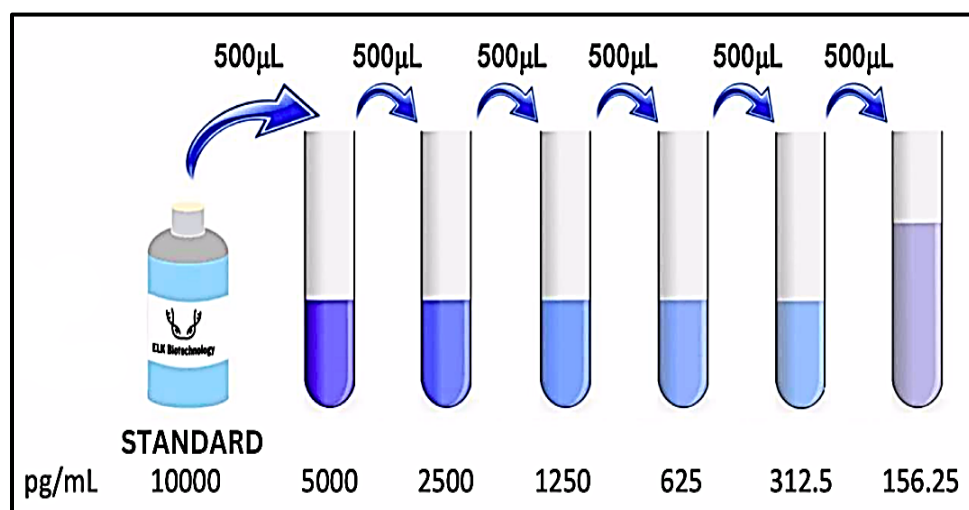
Postupak određivanja koncentracije DHEAS-a u plazmi:

Koncentraciju DHEAS-a u plazmi, odredio sam imunokemijskom metodom ELISA, primjenom komercijalno dostupnoga seta reagenasa (ELK8370) tvrtke ELK Biotechnology, Inc. (SAD i Kanada). Jažice mikrotitarske pločice, presvučene su monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže DHEAS iz plazme. Prema uputstvima proizvođača pripremio sam razrjeđenja standarda kako bih dobio seriju razrjeđenja različitih koncentracija (Slika 15). U 7 jažica određenih za razrijeđene standarde dodao sam 50 µL standardne radne otopine. U jažicu za slijepu probu dodao sam 50 µL standardnog razrjeđivača, a u ostale po 50 µL uzorka plazme. Zatim sam odmah dodao 50 µL radne otopine biotiniziranog konjugata (1×) u svaku jažicu. Sve standarde, uzorke i slijepu probu, dodao sam u duplikatima. Pločicu s dodanim sadržajem dobro sam izmiješao, pokrio folijom te inkubirao 1 sat na 37°C. Nakon inkubacije, izlio sam tekućinu iz svih jažica te isprao svaku jažicu, dodatkom 200 µL pufera za ispiranje (engl. *Wash Buffer*) (1x) i dekantirao tekućinu. Kako bih potpuno uklonio preostalu tekućinu iz svih jažica pločicu sam lagano prisionio na upijajući papir. Ponovio sam postupak ispiranja tri puta. Nakon toga dodao sam 100 µL Streptavidin-HRP radne otopine (1×) u svaku jažicu, pokrio folijom i inkubirao 1 sat pri 37°C. Zatim sam pločicu ponovo ispirao pet puta, kao što je provedeno nakon prve inkubacije. U svaku jažicu dodao sam 90 µL otopine TMB supstrata, pokrio novom, adhezivnom folijom te inkubirao 20 minuta na 37°C u mraku. Tekućina u jažicama postala je plava dodatkom TMB supstrata. Dodao sam potom u svaku jažicu 50 µL reagensa za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*) i lagano protresao sadržaj pločice dok tekućina nije požutjela. Zatim sam na ELISA čitaču mikropločica (Biosan Hipo MPP 96 Microplate Photometer) proveo mjerenje OD na 450 nm. Prema uputama proizvođača,

usporedbom izmjerene OD uzoraka i razrijeđenja standardne radne otopine određena je koncentracija DHEAS-a u plazmi.

Kemikalije i materijal:

- Mikropločica (96 jažica)
- Liofilizirana standardna radna otopina
- Biotinilirani konjugat (100×)
- Streptavidin-HRP (100×)
- Pufer za razrjeđivanje standarda/uzorka
- Razrjeđivač biotiniliranog konjugata
- HRP razrjeđivač
- Pufer za ispiranje (engl. *Wash buffer*) (25×)
- TMB otopina supstrata
- Reagens za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*)



Slika 15. Priprema standardne radne otopine DHEAS-a. Koncentracija standarda u osnovnoj otopini je 10 000 pg/mL. Pripremi se šest epruveta koje sadrže 0,5 mL pufera za razrjeđivanje standarda i naprave se serijska razrijeđenja radne otopine u duplikatu (Preuzeto i modificirano prema ELK Biotechnology, Inc.).

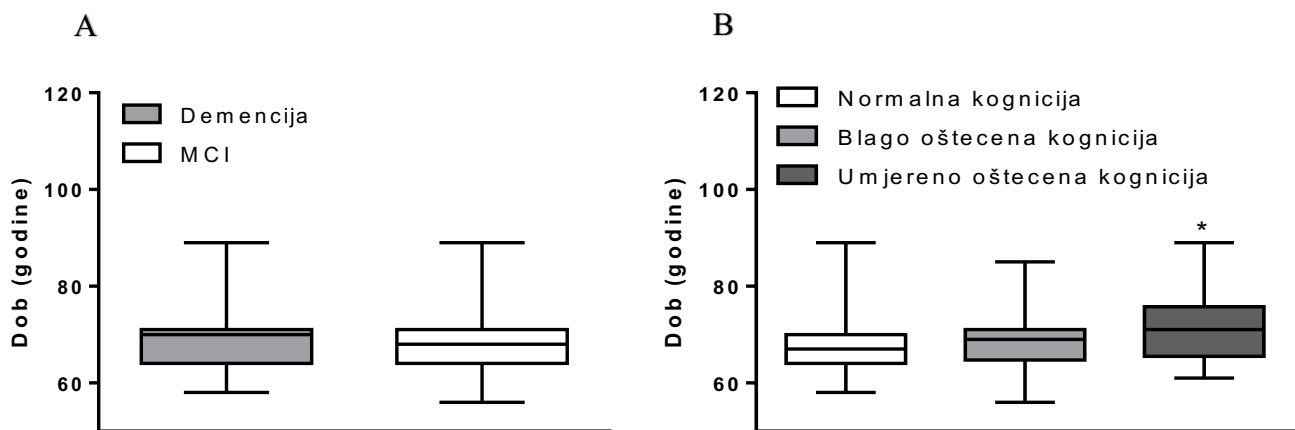
3.5. Statistička obrada podataka

Podaci u tablicama pokazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška ili kao broj i postotak, dok su grafički podaci prikazani kao medijan i raspon između minimuma i maksimuma. Rezultati su obrađeni računalnim programom *GraphPad Prism* verzija 4.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD). Normalnost raspodjele različitih parametara procijenjena je D'Agostino & Pearsonovim testom normalnosti. Za usporedbu dvije skupine, koristio se neparametrijski test (Mann-Whitney U test), jer podaci nisu bili normalno raspoređeni. Za usporedbu tri ili više skupina zbog nenormalne raspodjele podataka koristio se neparametrijski Kruskal-Wallis test sa Dunnovim post-hoc testom. Frekvencije genotipova i alela, kao i Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWE), evaluirani su χ^2 -testom i Fisherovim testom. Korelacije su ispitane neparametrijskim Spearmanovim testom, zbog odstupanja od normalne razdiobe podataka. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 0,05.

4. REZULTATI

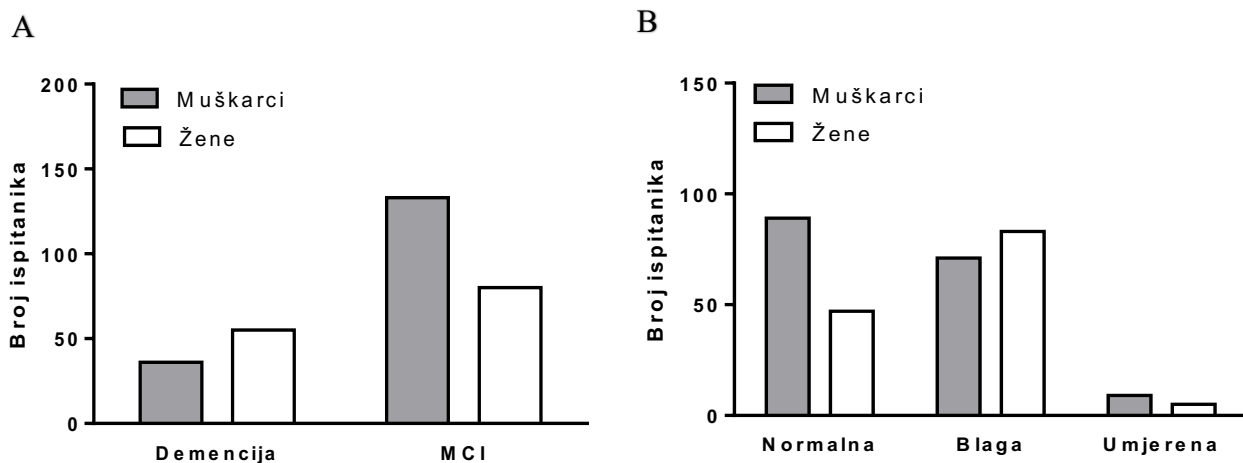
4.1. Demografski i klinički podaci ispitanika

U istraživanje je uključeno ukupno 304 ispitanika; od čega 91 ispitanika sa dijagnozom teškog neurokognitivnog poremećaja (demencije) i 213 ispitanika sa dijagnozom blagog neurokognitivnog poremećaja (MCI) kao kontrolne skupine. Srednje vrijednosti dobi oboljelih od demencije i kontrolnih ispitanika nisu se statistički značajno razlikovale ($p=0,079$, $U=8463$; Mann-Whitney test) (Slika 16A). Kada su ispitanici prema broju MMSE bodova, podijeljeni na osobe s normalnom kognicijom, blagim, umjerenim i teškim kognitivnim oštećenjem, utvrdila se značajna razlika u dobi između ispitanika s umjerenom demencijom u odnosu na ispitanike s normalnom kognicijom ($p=0,028$; Dunnov post-hoc test nakon Kruskal-Wallisovog testa) (Slika 16B).



Slika 16. Dob ispitanika s demencijom i blagim kognitivnim poremećajem (MCI) (A), te ispitanika podijeljenih na osobe s normalnom kognicijom, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem (B) * $p < 0,03$ vs ispitanici s normalnom kognicijom.

U skupini ispitanika s demencijom bio je značajno veći udio žena ($p=0,0003$, Fisherov test), nego u skupini ispitanika s MCI (Slika 17A). Kada su ispitanici podijeljeni na osobe s normalnom kognicijom, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem, primjećeno je više žena nego muškaraca ($p=0,003$, $\chi^2=11,39$; χ^2 -test) u skupini ispitanika s blagim kognitivnim oštećenjem u odnosu na ostale skupine ispitanika u kojima su prevladavali muškarci (Slika 17B).



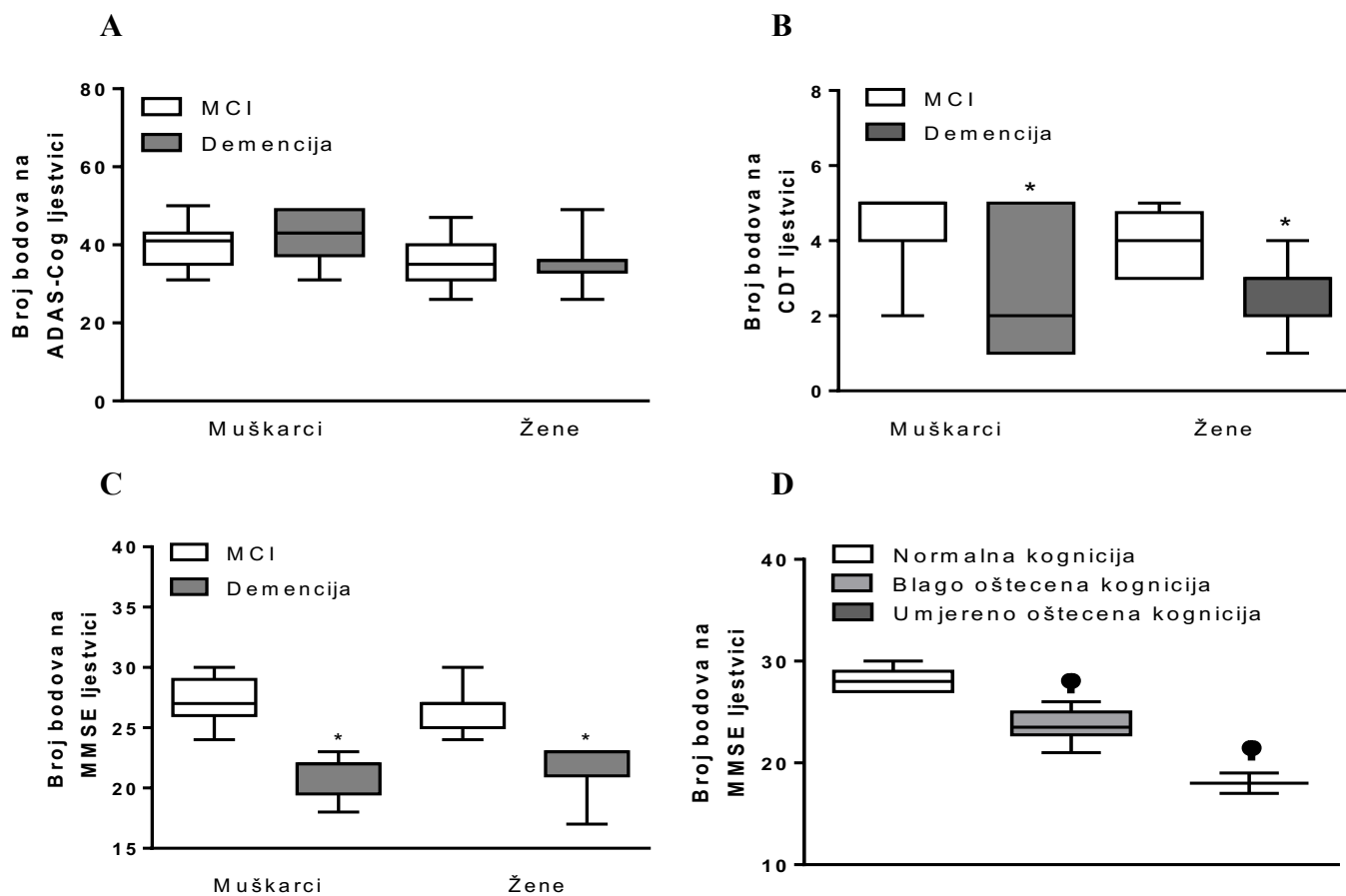
Slika 17. Raspodjela ispitanika s demencijom i blagim kognitivnim poremećajem (MCI) (A); te ispitanika s normalnom kognicijom, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem (B) prema spolu.

Osobe s MCI-em imale su značajno veći broj MMSE ($p < 0,0001$, $U = 0,0$; Mann-Whitneyev test) i CDT ($p < 0,0001$, $U = 3059$; Mann-Whitneyev test) bodova od osoba s demencijom, dok u slučaju ADAS-Cog ljestvice, nisu utvrđene značajne razlike ($p = 0,769$, $U = 9485$; Mann-Whitneyev test) u broju bodova između skupine osoba s demencijom i MCI-em (Tablica 5).

Tablica 5. Bodovi na MMSE, CDT i ADAS-Cog ljestvicama u ispitanika s demencijom i MCI-em.

Dijagnoza - N (%)	Demencija - 91 (29,93 %)	MCI - 213 (70,07 %)
Bodovi prema MMSE ljestvici	21,64 ± 0,18	27,00 ± 0,12*
Bodovi prema CDT ljestvici	4,27 ± 0,05	2,66 ± 0,13*
Bodovi prema ADAS-Cog ljestvici	38,38 ± 0,38	38,62 ± 0,67

Kao što je prikazano na slici 18B i C, muškarci ($p < 0,0001$) i žene ($p < 0,0001$) s demencijom imali su značajno manji broj MMSE, odnosno CDT bodova u usporedbi s muškarcima i ženama s MCI-em (Dunnov post-hoc test nakon Kruskal-Wallisovog testa). Na ADAS-Cog ljestvici nije bilo značajne razlike u broju bodova između ispitanika s demencijom i MCI-em podijeljenih po spolu (Slika 18A). Nadalje, Dunnetov test nakon Kruskal-Wallis testa pokazao je značajne razlike ($p < 0,0001$) u broju bodova na MMSE ljestvici između ispitanika podijeljenih na osobe s normalnom kognicijom, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem (Slika 18D).



Slika 18. Broj MMSE (A), CDT (B), ADAS-Cog (C) bodova u ispitanika s demencijom i blagim kognitivnim poremećajem (MCI) podijeljenih prema spolu, te broj MMSE bodova u ispitanika s normalnom kognicijom, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem (D). * $p < 0,0001$ vs osobe s MCI-em, □ $p < 0,0001$ vs osobe s normalnom kognicijom.

4.2. Koncentracija DHEAS-a u plazmi

Između ispitanika s demencijom i MCI-em nisu utvrđene značajne razlike u vrijednosti koncentracije DHEAS-a u plazmi ($p=0,287$, $U=8438$; Mann-Whitneyev test) (Tablica 6). Kada smo ispitanike podijelili prema spolu, također nismo utvrdili značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi između muškaraca i žena u skupini ispitanika s demencijom i MCI-em ($p=0,315$; Kruskal-Wallisov test) (Tablica 6).

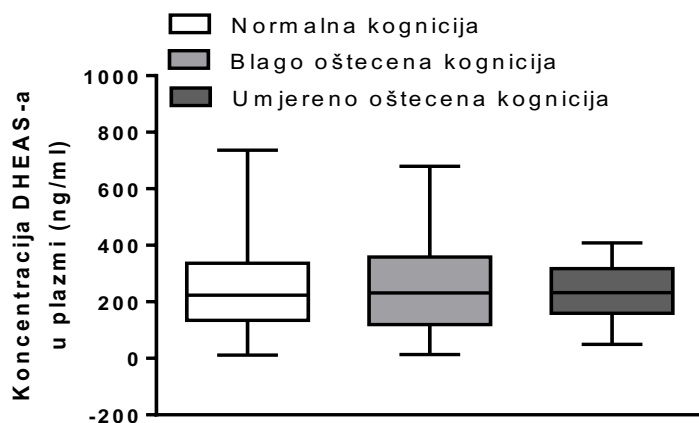
Također nije utvrđena niti značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i dobi ispitanika ($r_s=0,044$; $p=0,450$).

Tablica 6. Koncentracija DHEAS-a u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili MCI-a podijeljenih prema spolu.

Dijagnoza N (%)	Demencija 86 (28,76 %)		MCI 213 (71,24 %)	
Koncentracija DHEAS-a (ng/ml)	253,9 ± 15,05		239,4 ± 10,22	
Spol N (%)	Muškarci 32 (37,21 %)	Žene 54 (62, 81 %)	Muškarci 133 (62,44 %)	Žene 80 (37,56 %)
Koncentracija DHEAS-a (ng/ml)	226,5 ± 21,57	270,1 ± 20,11	243,7 ± 12,06	232,4 ± 18,46

Povezanost koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja bodova na MMSE, CDT i ADAS-Cog ljestvicama u ispitanika istražena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (r_s), jer su podaci odstupali od normalne razdiobe. Nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja MMSE bodova u svih ispitanika ($r_s=0,003$; $p=0,958$), kao niti u skupini ispitanika s demencijom ($r_s=0,100$; $p=0,358$) i MCI-em ($r_s=0,094$; $p=0,171$). Također, nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja CDT bodova u svih ispitanika ($r_s=0,024$; $p=0,674$), te ispitanika s demencijom ($r_s=0,019$; $p=0,864$) i MCI-em ($r_s=0,128$; $p=0,063$). I u slučaju ADAS-Cog ljestvice nije bilo značajne korelacije između broja bodova i koncentracije DHEAS-a u plazmi u svih ispitanika ($r_s=-0,097$; $p=0,094$) i ispitanika s MCI-em ($r_s=-0,042$; $p=0,537$), ali negativna korelacija utvrđena u ispitanika s demencijom ($r_s=-0,241$; $p=0,025$).

Nadalje, u muških ($r_s=0,038$; $p=0,627$) i ženskih ($r_s=0,067$; $p=0,443$) ispitanika nije bilo značajne korelacije između koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja MMSE bodova. Nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja CDT bodova, niti kod muškaraca ($r_s=0,047$; $p=0,548$) niti kod žena ($r_s=0,0008$; $p=0,992$). Također, nije bilo značajne korelacije niti između broja ADAS-Cog bodova i koncentracije DHEAS-a u plazmi muškaraca ($r_s=0,149$; $p=0,056$) i žena ($r_s=-0,053$; $p=0,543$). U ispitanika podijeljenih na osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima, blagim kognitivnim oštećenjem i umjerenim kognitivnim oštećenjem nismo utvrdili značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi ($p=0,944$; Kruskal-Wallisov test) (Slika 19).



Slika 19. Koncentracija DHEAS-a u plazmi ispitanika s normalnom kognicijom, blagim kognitivnim oštećenjem i umjerenim kognitivnim oštećenjem.

4.3. Polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1*

Raspodjela genotipova s obzirom na polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s dijagnozom demencije i MCI-om bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (Tablica 7). Utvrđeno je da nema značajne razlike u raspodjeli genotipova ($p=0,326$, $\chi^2=2,241$; χ^2 -test) i alela ($p=0,813$; Fisherov test) (Tablica 8) između ovih skupina ispitanika.

Tablica 7. Dobivene i očekivane vrijednosti za genotipove polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s demencijom i MCI-em

<i>SULT2A1</i> rs2637125 genotip		AA (N, %)	AG (N, %)	GG (N, %)	Statistika
Demencija	Dobiveno	53 (64,63)	27 (32,93)	2 (2,44)	p=0,503; $\chi^2=0,449$;χ^2-test
	Očekivano	54 (65,85)	25 (30,49)	3 (3,66)	
MCI	Dobiveno	147 (69,01)	55 (25,82)	11 (5,16)	p=0,061; $2=3,496$;χ^2-test
	Očekivano	143 (67,14)	63 (29,58)	7 (3,29)	

ukoliko je $P < 0,05$ rezultat nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom

Također, kada su s obzirom na polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1*, ispitanici podijeljeni na homozigotne nosioce genotipa AA naspram nosioca alela G ($p=0,527$; Fisherov test) (Tablica 9), odnosno na homozigotne nosioce genotipa GG naspram nosioca alela A ($p=0,489$; Fisherov test) (Tablica 9), nije utvrđena značajna razlika u njihovoj učestalosti.

Tablica 8. Raspodjela genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s demencijom i MCI-em.

<i>SULT2A1</i> rs2637125 Genotip/Alel	Demencija N (%)	MCI N (%)	Statistika
AA	2 (2,44 %)	11 (5,16 %)	p=0,326, $\chi^2=2,241$ χ^2-test
AG	27 (32,93 %)	55 (25,82 %)	
GG	53 (64,63 %)	147 (69,02 %)	
A	31 (18,90 %)	77 (18,08 %)	p=0,813; Fisherov test
G	133 (81,10 %)	349 (81,92 %)	

Tablica 9. Raspodjela nosioca genotipa AA naspram nosioca alela G, te nosioca genotipa GG naspram nosioca alela A polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u osoba s demencijom i MCI-em

<i>SULT2A1</i> rs2637125 nosioci	Demencija N(%)	MCI N(%)	Statistika
AA	2 (2,44 %)	11 (5,16 %)	p=0,527; Fisherov test
G	80 (97,56 %)	202 (94,84 %)	
GG	53 (64,63 %)	147 (69,01 %)	p=0,489; Fisherov test
A	29 (35,37 %)	66 (30,99 %)	

Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi između nosioca različitih genotipova polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s MCI-em ($p=0,792$; Kruskal-Wallisov test) i ispitanika s demencijom ($p=0,944$; Kruskal-Wallisov test) (Tablica 10).

Tablica 10. Koncentracija DHEAS-a u plazmi kontrolnih i dementnih ispitanika raznih genotipova.

<i>SULT2A1</i> rs2637125	Genotipovi	AA	GA	GG
Koncentracija DHEAS-a (ng/ml)	Demencija	213,9 ± 32,90	221,6 ± 18,65	245,1 ± 12,91
	MCI	242,3 ± 183,0	246,1 ± 29,33	231,5 ± 16,65

5. RASPRAVA

DHEA i njegov sulfatni oblik DHEAS, zajednički nazvani DHEA(S), najzastupljeniji su steroidni hormoni u ljudskoj cirkulaciji i ostvaruju brojne fiziološke učinke. DHEA(S) se sintetizira u nadbubrežnim žlijezdama, gonadama, ali i u ljudskom mozgu, gdje su njegove koncentracije čak 6 puta veće od koncentracija u plazmi (Guazzo i sur., 1996), te je stoga nazvan neurosteroidom. Razne studije pokazale su da DHEA(S) može proći krvno-moždanu barijeru (Qaiser i sur., 2017; Guazzo i sur., 1996; Kishimoto i Hoshi, 1972). Zahvaljujući enzimatskoj aktivnosti sulfotransferaze *SULT2A1*, DHEA se pretvara u DHEAS koji predstavlja glavni oblik ovog neurosteroida u cirkulaciji. Razine DHEA(S)-a smanjuju se starenjem (oko 10 % po desetljeću), dostižući najnižu razinu nakon osamdesete godine (Havelock i sur. 2004). S obzirom da su pojedine studije sugerirale da su snižene koncentracije DHEA(S)-a u plazmi rizični čimbenik za razvoj demencije, te da DHEA(S) ostvaruje neuroprotektivan i pozitivan učinak na pamćenje i kogniciju, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u plazmatskoj koncentraciji DHEAS-a, između osoba s blagim i velikim neurokognitivnim poremećajem, te njenu potencijalnu povezanost s težinom neurokognitivnog poremećaja. Razlog zašto je za istraživanje odabran DHEAS, a ne DHEA, leži u činjenici da za razliku od DHEA-e, kojoj je vrijeme poluraspada ispod 1 sata i koja pokazuje značajne dnevne varijacije, koncentracije DHEAS-a su stabilne i imaju dulji poluživotni vijek, od 7 do 22 sati, zbog čega ih je lakše mjeriti.

U istraživanje je uključeno ukupno 304 ispitanika; od čega 91 ispitanik s dijagnozom teškog neurokognitivnog poremećaja (demencije) i 213 ispitanika s dijagnozom blagog neurokognitivnog poremećaja (MCI) kao kontrolne skupine. U skupini ispitanika s demencijom bio je značajno veći udio žena nego u skupini ispitanika s MCI-em, što je u skladu s značajno višom prevalencijom i incidencijom demencija u žena nego u muškaraca. Skupine ispitanika s demencijom i MCI-em nisu se značajno razlikovale po dobi, međutim kad su ispitanici prodijeljeni na osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima, blagim te umjerenim kognitivnim oštećenjem, utvrđeno je da su ispitanici s dijagnozom umjerene demencije bili značajno stariji od ispitanika s normalnom kognicijom. Nadalje, više žena bilo je u skupini ispitanika s blagim kognitivnim oštećenjem u odnosu na ostale skupine ispitanika u kojima su prevladavali muškarci.

U sklopu istraživanja, kognitivni simptomi ispitanika evaluirani su testom procjene mentalnog stanja (MMSE), testom crtanja sata (CDT), i skalom procjene Alzheimerove bolesti -kognitivna

podskala (ADAS-Cog). U skladu s dijagnozom, skupina ispitanika s demencijom (i muškarci i žene) imala je značajno niži broj bodova na MMSE i CDT ljestvicama u usporedbi s skupinom ispitanika s MCI-em. Očekivano ispitanici s blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem imali su niži broj MMSE bodova od osoba s normalnom kognicijom. Međutim, u broju bodova na ADAS-Cog ljestvici nije utvrđena značajna razlika između skupina ispitanika s demencijom i MCI-em. Ovi rezultati upućuju da su MMSE i CDT testovi bolji u razlikovanju blagog od teškog neurokognitivnog poremećaja od ADAS-Cog testa, koji je primarno razvijen za procjenu kognitivnih funkcija u ispitanika s umjerenom do teškom demencijom, pri čemu u ovom istraživanju nije bilo ispitanika s teškim kognitivnim oštećenjem. Naime, iako je primjena ADAS-Cog ljestvice proširena na studije preddemencije odnosno MCI-a, Kueper i suradnici (2018) pokazali su da ADAS-Cog test nije optimalan za kognitivno testiranje u takvih osoba, zbog smanjene sposobnosti otkrivanja promjena u ranijim fazama progresije demencije kada su prisutni blaži simptomi.

Suprotno očekivanom, značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi nisu utvrđene između ispitanika s demencijom i MCI-em, kao niti između muškaraca i žena. Iako su u nekim istraživanjima primijećene niže razine DHEA(S)-a u plazmi, serumu i likvoru osoba s demencijom (Sunderland i sur., 1989; Yanase i sur., 1996; Genedani i sur., 2004; Cho i sur., 2006; Armanini i sur., 2003; Aldred i Mecocci, 2010; Hillen i sur. 2000; Kim i sur., 2003), u skladu s našim rezultatima drugi autori nisu uspjeli utvrditi značajne razlike u cirkulirajućim koncentracijama DHEA(S)-a između bolesnika s demencijom i kontrolne skupine (Leblhuber i sur., 1990; Cuckle i sur., 1990; Birkenhager-Gillesse i sur., 1994; Carlson i sur. 1999). Pojedine studije utvrdile su čak i povišene koncentracije DHEA(S)-a u cirkulaciji (Rammouz i sur., 2011; Rasmuson i sur., 2011; Brown i sur., 2003; Naylor i sur., 2008; Kim i sur., 2003), kao i u nekoliko moždanih regija oboljelih od AB-a (Brown i sur., 2003; Marx i sur., 2006), ukazujući na vrlo oprečne rezultate u literaturi.

Također nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i broja bodova na MMSE i CDT ljestvicama, u svih ispitanika oba spola, kao niti u ispitanika s demencijom i MCI-em, upućujući na izostanak povezanosti između cirkulirajuće razine DHEAS-a praćenih kognitivnih disfunkcija. U slučaju ADAS-Cog ljestvice nije bilo značajne korelacije između broja bodova i koncentracije DHEAS-a u plazmi u svih ispitanika oba spola, kao i u

ispitanika s MCI-em, ali je utvrđena njihova negativna korelacija u ispitanika s demencijom, što također ide u prilog boljoj prilagođenosti ADAS-Cog ljestvice za procjenu kognitivnih funkcija u ispitanika s umjerenom do teškom demencijom.

U ispitanika podijeljenih na osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem, također nismo utvrdili značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi. Moguće je da bi se značajno niže koncentracije DHEAS-a u plazmi utvrdile u ispitanika s teškim kognitivnim oštećenjem, odnosno kasnom fazom demencije, međutim takvih ispitanika nije bilo u ovom istraživanju. U ispitanika s blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem zbog postepenog opadanja razina DHEA(S)-a, moguće je da dolazi do povećane sinteze DHEAS-a kao kompenzacijskog mehanizma, koji u kasnoj fazi demencije nije dovoljan za održavanje normalne razine DHEAS-a u cirkulaciji. Također, čimbenici koji mogu utjecati na koncentracije DHEAS-a, kao što su indeks tjelesne mase, pušenje, pijenje alkohola i krvni tlak nisu istraženi u ovom istraživanju.

Nije utvrđena niti značajna korelacija između koncentracije DHEAS-a u plazmi i dobi ispitanika, što je suprotno istraživanjima koja pokazuju značajni pad cirkulirajućih razina DHEA(S)-a s starenjem. Međutim, treba naglasiti da su svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje relativno stariji sa srednjom vrijednoću godina oko 68, te bi se značajni pad u koncentraciji DHEAS-a u plazmi možda mogao utvrditi kod ispitanika većeg raspona godina.

Još jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je istražiti razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* između osoba s blagim i velikim neurokognitivnim poremećajem, kao i utječu li varijacije u genu *SULT2A1* na koncentraciju DHEAS-a u plazmi. Enzim sulfotranferaza *SULT2A1*, kodirana genom *SULT2A1*, katalizira prvenstveno pretvorbu DHEA-e, kao i pregnanolona, u njihov sulfatni oblik u nadbubrežnim žlijezdama, dok je u jetri ovaj enzim bitan za detoksifikaciju ksenobiotika (Falany i Rohn-Glowacki, 2013; Gabai i sur., 2020). gen *SULT2A1* snažno je eksprimiran u *zoni retikularis* i *zoni fasciculata* nadbubrežne žlijezde i jetri. U mozgu, *SULT2A1* ekspresija je detektirana u talamusu i hipotalamusu, a ne i u drugim regijama mozga (Shimizu i Tamura, 2002). U cjelogenomskoj asocijacijskoj studiji (GWAS, engl. *Genome-Wide Association Studs*) provedenoj na 14846 pojedinaca, polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* identificiran je kao jedna od osam uobičajenih genskih varijanti, povezanih s varijacijama u serumskim razinama DHEAS-a (Zhai i sur., 2011). U svom istraživanju,

García-Anguita i suradnici (2013) također su otkrili da je polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* povezan sa smanjenim razinama DHEAS-a u djece stare 12-16 godina. Ove i slične studije ukazale su da polimorfizmi *SULT2A1* imaju važne uloge u homeostazi DHEA-e i DHEAS-a.

U ovom istraživanju raspodjela genotipova s obzirom na polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s demencijom i MCI-om bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Hardy-Weinbergova jednadžba koristi se za izračunavanje genske varijacije u populaciji koja je u ravnoteži. Frekvencije genotipova i alela će ostati stalne i u ravnoteži ukoliko je križanje u populaciji nasumično i bez ometajućih okolnosti, odnosno u odsutnosti uznemirujućih čimbenika, što je izgleda slučaj za ovo istraživanje. Nisu utvrđene značajne razlike u raspodjeli genotipova, alela, nosioca genotipa AA naspram nosioca alela G, kao ni nosioca genotipa GG naspram nosioca alela A, između ovih skupina ispitanika. Ovi rezultati upućuju da polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* nije povezan s razvojem demencije.

Također, nije bilo značajnih razlika u koncentraciji DHEAS-a u plazmi između nosioca različitih genotipova polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u ispitanika s demencijom i MCI-om. Ovi rezultati upućuju da polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* ne utječe na koncentraciju DHEAS-a u plazmi, te su u skladu s prethodnim studijama, u kojima također nije utvrđen utjecaj varijanti *SULT2A1* alela na razinu DHEA(S)-a u serumu među afroameričkim muškarcima (Wilborn i sur. 2006), ženama sa sindromom policističnih jajnika (Goodarzi i sur. 2007) ili finskom predpubertetskom djecom (Utriainen i sur., 2012). Haring i suradnici (2013) su zaključili da varijante *SULT2A1* gena nemaju učinak na pojedinačne koncentracije DHEA-e i DHEAS-a ili na DHEA/DHEAS omjer kao biljeg kapaciteta sulfonacije DHEA-e. S druge strane, postoji mogućnost da značajna povezanost ovog *SULT2A1* polimorfizma s koncentracijom DHEAS-a u plazmi nije utvrđena zbog relativno malog broja uključenih ispitanika, s obzirom da genetska istraživanja povezanosti zahtjevaju velik broj ispitanika.

Osim genetskih čimbenika i pojedini okolišni čimbenici mogu utjecati na *SULT2A1* ekspresiju. Prethodne studije koje su istraživale regulatorne mehanizme ekspresije *SULT2A1* mRNA, identificirale su nekoliko mogućih inhibitora. Primjerice, otkriveno je da transformirajući čimbenik rasta- β (TGF- β , engl. *Transforming Growth Factor- β*) i čimbenik nekroze tumora- α (TNF- α , engl. *Tumor Necrosis Factor- α*) snižavaju razine *SULT2A1* mRNA nadbubrežnih stanica (Parker i sur.,

1998), dok je smanjena razina *SULT2A1* primijećena u pacijenata s akutnom sepsom (Arlt i sur., 2006). Ovi podaci upućuju na značajne inhibicijske učinke pro-upalnih čimbenika na *SULT2A1* ekspresiju i posljedično razinu DHEAS-a. S obzirom da neuroupala predstavlja jedan od važnih čimbenika u patofiziologiji demencije, pri čemu su povećana upala i povišene razine upalnih citokina povezane s kognitivnim padom, ne iznenađuje da su pojedini autori sugerirali smanjenu aktivnost periferne sulfotransferaze u demenciji (Yanase i sur., 1996). U skladu sa smanjenom aktivnošću sulfotransferaze, Pan i suradnici (2019) u svojoj meta-analizi utvrdili su značajno sniženu koncentraciju DHEAS-a, ali ne i DHEA-e, u plazmi pacijenata s AB-om u usporedbi s zdravim kontrolama. Osim što je pokazano da neuroupala može utjecati na sintezu DHEA(S)-a i, obrnuto, DHEA(S) može modulirati proupalne molekule i imunološki odgovor u demencijama (Yilmaz i sur., 2019, Dillon, 2005). Međutim, u ovom istraživanju nije određivana koncentracija enzima *SULT2A1*, niti je istraživana utjecaj određenih upalnih čimbenika na razine *SULT2A1* i DHEA(S)-a.

U svrhu detaljnijeg razumijevanja uloge DHEAS-a i *SULT2A1* gena u razvoju demencije potrebna su daljnja, opširnija istraživanja koja će točno razlikovati tipove demencija, te uključiti mnogo veći broj ispitanika različitog podrijetla, posebice osoba s težim kognitivnim oštećenjima. Uz dob i spol, također je potrebno kontrolirati i druge čimbenike koji mogu utjecati na koncentracije DHEAS-a u plazmi, poput indeksa tjelesne mase, pušenja, konzumacije alkohola, krvnog tlaka, itd. Osim spomenutog polimorfizma rs2637125, potrebne su i analize drugih polimorfizama i mutacija gena *SULT2A1* kako bi se detaljnije istražila njegova uloga u patofiziologiji demencija. U budućim istraživanjima također je poželjno istražiti koncentracije enzima *SULT2A1*, kao i utjecaj određenih upalnih čimbenika na razine *SULT2A1* i DHEA(S)-a. Nadalje, bilo bi dobro odrediti i koncentracije DHEA-e, s obzirom da DHEA i DHEAS kontinuirano prelaze jedan u drugoga. Naime, iako DHEAS predstavlja glavni oblik ovog neurosteroida u cirkulaciji, smatra se da DHEA zbog svoje lipofilne prirode lakše prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, te je moguće da koncentracija DHEA u plazmi bolje odražava promjene u mozgu.

6. ZAKLJUČAK

1. Skupine ispitanika s demencijom i MCI-em značajno su se razlikovale po spolu, ali ne i po dobi, iako su ispitanici s dijagnozom umjerene demencije bili značajno stariji od ispitanika s normalnom kognicijom. U usporedbi sa ispitanicima s MCI-em, skupina ispitanika s demencijom (i muškarci i žene) imala je značajno niži broj bodova na MMSE i CDT ljestvicama, ali ne i na ADAS-Cog ljestvici, dok su ispitanici s blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem imali niži broj MMSE bodova od osoba s normalnom kognicijom.
2. Značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi nisu utvrđene između ispitanika s demencijom i MCI-em, između osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima, blagim i umjerenim kognitivnim oštećenjem, kao niti između muškaraca i žena. U ispitanika s demencijom i MCI-em oba spola, nije utvrđena značajna korelacija koncentracije DHEAS-a u plazmi s dobi i bodovima na kognitivnim ljestvicama, osim s brojem bodova na ADAS-Cog ljestvici u ispitanika s demencijom. Ovi rezultati upućuju da koncentracija DHEAS-a u plazmi nije povezana sa dobi, spolom i težinom kognitivnog oštećenja ispitanika.
3. Dobiveni rezultati koji pokazuju da u ispitanika s demencijom i MCI-em nije bilo značajnih razlika u raspodjeli genotipova, alela i nosioca, kao ni u koncentraciji DHEAS-a u plazmi između nosioca različitih genotipova, upućuju da polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* ne utječe na koncentraciju DHEAS-a u plazmi i da nije povezan s razvojem demencije.
4. U svrhu detaljnijeg razumijevanja uloge DHEAS-a i gena *SULT2A1* u razvoju demencije potrebna su daljnja, opširnija istraživanja koja će uključiti mnogo veći broj ispitanika različitog podrijetla, te kontrolirati brojne čimbenike koji mogu utjecati na koncentraciju DHEAS-a u plazmi, uključujući i koncentraciju enzima *SULT2A1* i neurosteroida DHEA-e, kao i druge polimorfizme i mutacije gena *SULT2A1*.

7. LITERATURA

Abadie J.M., Wright B., Correa G., Browne E.S., Porter J.R., Svec F. (1993): Effect of dehydroepiandrosterone on neurotransmitter levels and appetite regulation of the obese Zucker rat. The Obesity Research Program. *Diabetes*. 42(5), 662–669.

Albert M.S., DeKosky S.T., Dickson D., Dubois B., Feldman H.H., Fox N.C., Phelps C.H. (2011): The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease. Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7(3), 270-279.

Aldred S., Mecocci P. (2010): Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Archives of gerontology and geriatrics*. 51(1), 16–18.

Alhaj H.A., Massey A.E., McAllister-Williams R. H. (2006): Effects of DHEA administration on episodic memory, cortisol and mood in healthy young men: a double-blind, placebo-controlled study. *Psychopharmacology*. 188(4), 541–551.

Aly H.F., Metwally F.M., Ahmed H.H. (2011): Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model of Alzheimer's disease. *Acta Biochim. Pol*. 58(4), 513-520.

APA, American Psychiatric Association. (2013): *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Washington, DC.

Arbo B.D., Ribeiro F.S., Ribeiro M.F. (2018): Astrocyte neuroprotection and dehydroepiandrosterone. *Vitam. Horm*. 108, 175–203.

Arevalo-Rodriguez I., Pedraza O.L., Rodriguez A. (2013): Alzheimer's disease dementia guidelines for diagnostic testing: A systematic review. *Am J Alzheimer's Dis Other Demen*. 28(2), 111-119.

Arlt W., Hammer F., Sanning P., Butcher S.K., Lord J.M., Allolio B., Annane D., Stewart P.M.(2006): Dissociation of serum dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in septic shock. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91(7), 2548–2554.

- Armanini D., Vecchio F., Basso A., Milone F. F., Simoncini M., Fiore C. (2003): Alzheimer's disease: pathophysiological implications of measurement of plasma cortisol, plasma dehydroepiandrosterone sulfate, and lymphocytic corticosteroid receptors. *Endocrine*. 22(2), 113–118.
- Arquitt A.B., Stoecker B.J., Hermann J.S., Winterfeldt E.A. (1991): Dehydroepiandrosterone sulfate, cholesterol, hemoglobin, and anthropometric measures related to growth in male adolescents. *J. Am. Diet. Assoc.* 91(5), 575-579.
- Baltes P. B. (1993): The aging mind: potential and limits. *The Gerontologist*. 33(5), 580–594.
- Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., Quirion R. (1999): Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 66(1-2), 35–41.
- Baulieu E.E. (1998): Neurosteroids: a novel function of the brain, *Psychoneuroendocrinology*. 23(8), 963–987.
- Baulieu E.E., Robel P. (1998): Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(8), 4089–4091.
- Ben Dor R., Marx C.E., Shampine L.J., Rubinow D.R., Schmidt P.J. (2015): DHEA metabolism to the neurosteroid androsterone: a possible mechanism of DHEA's antidepressant action. *Psychopharmacology*. 232(19), 3375-3383.
- Birkenhager-Gillesse E. C., Derksen J., Lagaay A. M. (1994): Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in the oldest old, age 85 and over. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719, 543–552.
- Bo M., Massaia M., Zannella P., Cappa G., Ferrario E., Rainero I., Arvat E., Giordano R., Molaschi M. (2006): Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and Alzheimer's dementia in older subjects. *International journal of geriatric psychiatry*. 21(11), 1065–1070.
- Bocuzzi G., Aragno M., Seccia M., Brignardello E., Tamagno E., Albano E., Danni O., Bellomo G. (1997): Protective effect of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radic. Biol. Med.* 22(7), 1289–1294.

Brown R.C., Han Z., Cascio C., Papadopoulos V. (2003): Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of aging*. 24(1), 57–65.

Cardounel A., Regelson W., Kalimi M. (1999): Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). 222(2), 145–149.

Carlson L. E., Sherwin B. B., Chertkow H. M. (1999): Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Hormones and behavior*, 35(3), 254–263.

Chakraborti A., Gulati K., Ray A. (2011): Involvement of nitric oxide in the protective effects of dehydroepiandrosterone sulphate on stress induced neurobehavioral suppression and brain oxidative injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 652(1-3), 55-59.

Chan D.K., Reutens S., Liu D.K., Chan R.O. (2011) Frontotemporal dementia - features, diagnosis and management. *Aust. Fam. Physician*. 40(12), 968-972.

Charalampopoulos I., Alexaki V.I., Lazaridis I., Dermitzaki E., Avlonitis N., Tsatsanis C. i sur. (2006): G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J.* 20(3), 577-579.

Charalampopoulos I., Margioris A.N., Gravanis A. (2008): Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane mediated, integrated genomic and non-genomic prosurvival signaling pathways. *J Neurochemistry*. 107(5), 1457-1469.

Chen C.C., Parker C.R.Jr. (2004): Adrenal androgens and the immune system. *Semin Reprod Med*. 22(4), 369-377.

Chevalier M., Gilbert G., Lory P., Marthan R., Quignard J.F., Savineau J.P.. Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 83(11), 1530-1539.

Cho S. H., Jung B.H., Lee W.Y., Chung B. C. (2006): Rapid column-switching liquid chromatography/mass spectrometric assay for DHEA-sulfate in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Biomedical chromatography. BMC.* 20(10), 1093–1097.

Cockrell J.R., Folstein M.F. (1988): Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacology bulletin.* 24(4), 689–692.

Compagnone N. A., Mellon S. H. (1998): Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(8), 4678-4683.

Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjövall J., Baulieu E. E. (1981): Characterization and Measurement of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Rat Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 4704–4707. *Human mutation.* 33(9), 1340 – 1344.

Cruts M., Theuns J., Van Broeckhoven C. (2012): Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation.* 33(9), 1340 – 1344.

Cuckle H., Storn R., Smith D., Wald N., Brammer M. Hajimo- hammedreza I., Levy R., Chard T., Perry L. (1990): Dehydroepiandrosterone sulphate in Alzheimer's Disease. *Lancet.* 336, 449 – 450.

Cummings J, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Cheng F. (2023): Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimer's Dement.* 9(2), e12385.

Cummings J., Lee G., Ritter A., Sabbagh M., Zhong K. (2019): Alzheimer's disease drug development pipeline. *Alzheimers Dement.* 5, 272-293.

Cummings JL. (2004): Dementia with Lewy bodies: molecular pathogenesis and implications for classification. *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.* 17(3), 112–119.

D'Amelio M., Rossini P.M. (2012): Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. *Prog. Neurobiol.* 99(1), 42–60.

de Bruin V.M., Vieira M.C., Rocha M.N., Viana G.S. (2002): Cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate plasma levels and their relationship to aging, cognitive function, and dementia. *Brain Cogn.* 50(2), 316–323.

de Bruin V.M., Vieira M.C., Rocha M.N., Viana G.S. (2002): Cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate plasma levels and their relationship to aging, cognitive function, and dementia. *Brain and cognition*. 50(2), 316–323.

Depp C. A., Jeste, D.V. (2006): Definitions and predictors of successful aging: a comprehensive review of larger quantitative studies. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. 14(1), 6–20.

Dillon J.S. (2005): Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 4(3), 377–385.

Dolan P.J., Johnson G.V. (2010): The role of tau kinases in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev*. 13(5), 595 – 603.

Donaghy P.C., McKeith I.G. (2014): The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis. *Alz. Res. Therapy*. 6(4), 46.

Dymond J.S. (2013): PCR-based random mutagenesis. *Methods in enzymology*. 529, 249–258.

El Bitar F., Meunier J., Villard V., Almeras M., Krishnan K., Covey D.F. i sur. (2014): Neuroprotection by the synthetic neurosteroid enantiomers ent-PREGS and ent-DHEAS against Aβ₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in vitro and in vivo in mice. *Psychopharmacology*. 231(17), 3293-3312.

Emmady P.D., Schoo C., Tadi P. (2022): Major Neurocognitive Disorder (Dementia). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing.

Falany C. N., Rohn-Glowacki K. J. (2013): SULT2B1: Unique Properties and Characteristics of a Hydroxysteroid Sulfotransferase Family. *Drug Metab. Rev*. 45(4), 388–400.

Farr S.A., Banks W.A., Uezu K., Gaskin F.S., Morley J.E. (2004): DHEAS improves learning and memory in aged SAMP8 mice but not in diabetic mice. *Life Sci*. 75(23), 2775-2785.

Fedotova J., Sapronov N. (2004): Behavioral effects of dehydroepiandrosterone in adult male rats. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*. 28(6), 1023-1027.

Ferman T., Boeve B., Smith G., Lin S., Silber M., Pedraza O. (2011): RBD improves the diagnostic classification of dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 77(9), 875–882.

Fiore C., Inman D.M., Hirose S., Noble L.J., Igarashi T., Compagnone N.A. (2004): Treatment with the neurosteroid dehydroepiandrosterone promotes recovery of motor behavior after moderate contusive spinal cord injury in the mouse. *J. Neurosci. Res.* 75(3), 391-400.

Flood J. F., Morley J. E., Roberts E. (1992): Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(5), 1567–1571.

Foeller E., Celikel T., Feldman D.E. (2005): Inhibitory Sharpening of Receptive Fields Contributes to Whisker Map Plasticity in Rat Somatosensory Cortex. *Journal of Neurophysiology*. 94(6), 4387-4400.

Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R. (1975): “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 12(3), 189-198.

Franceschi M., Anchisi D., Pelati O. (2005): Glucose metabolism and serotonin receptors in the frontotemporal lobe degeneration. *Ann. Neurol.* 57(2), 216–225.

Francis P.T., Palmer A.M., Snape M., Wilcock G.K. (1999): The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 66(2), 137–147.

Gabai G., Mongillo P., Giaretta E., Marinelli L. (2020): Do Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulfate (DHEAS) Play a Role in the Stress Response in Domestic Animals? *Frontiers in Veterinary Science*. 7, 588835.

García-Anguita A., Ortega L., Garcés C. (2013): Relationship of dehydroepiandrosterone sulfate with overweight and insulin sensitivity in 12–16-year-old Spanish children. *Horm Metab Res*. 45(7), 545–547.

Genedani S., Rasio G., Cortelli P., Antonelli F., Guidolin D., Galantucci M. (2004): Studies on Homocysteine and Dehydroepiandrosterone Sulphate Plasma Levels in Alzheimer's Disease Patients and in Parkinson's Disease Patients. *Neurotox Res*. 6(4), 327–332.

George O., Vallée M., Le Moal M., Mayo W. (2006): Neurosteroids and cholinergic systems: implications for sleep and cognitive processes and potential role of age-related changes, *Psychopharmacology* (Berlin). 186(3), 402–413.

Giatti, S., Diviccaro S., Serafini M. M., Caruso D., Garcia-Segura L. M., Viviani B. (2020): Sex Differences in Steroid Levels and Steroidogenesis in the Nervous System: Physiopathological Role. *Front. Neuroendocrinology*. 56, 100804.

Goodarzi M.O., Antoine H.J., Azziz R. (2007): Genes for enzymes regulating dehydroepiandrosterone sulfonation are associated with levels of dehydroepiandrosterone sulfate in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 92(7), 2659–2664.

Gorno-Tempini M.L., Hillis A.E., Weintraub S., Kertesz A., Mendez M., Cappa S.F., Ogar J.M., Rohrer J.D., Black S., Boeve B.F., Manes F., Dronkers N.F., Vandenberghe R., Rascovsky K., Patterson K., Miller B.L., Knopman D.S., Hodges J.R., Mesulam M.M., Grossman M. (2011): Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 76(11), 1006–1014.

Grimley Evans J., Malouf R., Huppert F., van Niekerk J.K. (2006): Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognitive function in healthy elderly people. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006(4), CD006221.

Grimm A., Schmitt K., Lang U.E., Mensah-Nyagan A.G., Eckert A. (2014): Improvement of neuronal bioenergetics by neurosteroids: Implications for age-related neurodegenerative disorders. *Mol. Bas. Dis.* 1842(12), 2427-2438.

Guazzo E. P., Kirkpatrick P. J., Goodyer I. M., Shiers H. M., Herbert, J. (1996): Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 81(11), 3951–3960.

Gupta V.K., You Y., Gupta V.B., Klistorner A., Graham S.L. (2013): TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *International journal of molecular sciences*. 14(5), 10122–10142.

Haring R., Wallaschofski H., Teumer A., Kroemer H., Taylor A. E., Shackleton C. H. L., Nauck M., Völker U., Homuth G., Arlt W. (2013): A SULT2A1 genetic variant identified by GWAS as associated with low serum DHEAS does not impact on the actual DHEA/DHEAS ratio. *Journal of Molecular Endocrinology*. 50(1), 73-77.

Havelock J.C., Auchus R.J., Rainey W.E. (2004): The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche, *Semin. Reprod. Med.* 22(4), 337–347.

Hebert R., Lindsay J., Verreault R., Rockwood K., Hill G., Dubois M.F. (2000): Vascular dementia: incidence and risk factors in the Canadian study of health and aging. 31(7), 1487–1493.

Hillen T., Lun A., Reischies F.M., Borchelt M., Steinhagen-Thiessen E. i sur. (2000): DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 47(2), 161-163.

Isacson O., Seo H., Lin L., Albeck D., Granholm A. (2002): Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and Ach. *Trends Neuroscience*. 25(2), 79–84.

Iwasaki Y., Asai M., Yoshida M., Nigawara T., Kambayashi M., Nakashima N. (2004): Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor kappa B dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 89(7), 3449-3454.

Johnson J.K., Diehl J., Mendez M.F. (2005): Frontotemporal Lobar Degeneration: Demographic Characteristics of 353 Patients. *Arch. Neurol.* 62(6), 925–930.

Josephs K., Hodges J., Snowden J., Mackenzie I., Neumann M., Mann D., Dickson D. (2011): Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* 122(2), 137–153.

Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A. (2001): Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience*. 102(2), 427-432.

Kalaria R.N. (2018): The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology*. 134(Pt B), 226–239.

Karishma K.K., Herbert, J. (2002): Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *European Journal of Neuroscience*. 16(3), 445-453.

Kato-Negishi M., Kawahara M. (2008): Neurosteroids block the increase in intracellular calcium level induced by Alzheimer's β -amyloid protein in long-term cultured rat hippocampal neurons. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 4(1), 209-218.

Kim S.-B., Hill M., Kwak Y.-T., Hampl R., Jo D.-H., Morfin R. (2003): Neurosteroids: Cerebrospinal Fluid Levels for Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Diagnostics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(11), 5199–5206.

Kishimoto Y., Hoshi M. (1972): Dehydroepiandrosterone sulphate in rat brain: incorporation from blood and metabolism in vivo. *Journal of neurochemistry*. 19(9), 2207–2215.

Kostakis E., Smith C., Jang M., Martin S.C., Richards K.G., Russek S.J., Farb, D.H. (2013): The Neuroactive Steroid Pregnenolone Sulfate Stimulates Trafficking of Functional N-Methyl D-Aspartate Receptors to the Cell Surface via a Noncanonical, G Protein, and Ca²⁺-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology*. 84(2), 261-274.

Kueper J. K., Speechley M., Montero-Odasso M. (2018): The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 63(2), 423–444.

Kumar K., Kumar A., Keegan R.M., Deshmukh R. (2018): Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 98, 297–307.

Kuns B., Rosani A., Varghese D. (2022): Memantine. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing.

Kurata K., Takebayashi M., Morinobu S., Yamawaki S. (2004): Beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 311(1), 237-245.

Kurz A., Kurz C., Ellis K., Lautenschlager N.T. (2014): What is frontotemporal dementia? *Maturitas*. 79(2), 216-219.

Lapchak P.A., Chapman D.F., Nunez S.Y., Zivin J.A. (2000): Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model possible involvement of gabaa receptors. *Stroke*. 31(8), 1953–1957.

Laurine E., Lafitte D., Grégoire C., Séréé Loret E., Douillard S. i sur. (2003): Specific binding of of Dehydroepiandrosterone to the N Terminus of the Microtubule-associated Protein MAP2. *J. Biol. Chem.* 278(32), 29979-29986.

Lawrence S. Honig i sur. (2003): Frontotemporal Dementia. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2003, dn1-dn1.

Lazaridis I., Charalampopoulos I., Alexaki V.I., Avlonitis N., Pediaditakis I., Efstathopoulos P. i sur. (2011): Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis. *PLoS Biol.* 9, e1001051.

Leblhuber F., Windhager E., Reisecker R., Steinparz F. X., Dienstl E. (1990): Dehydroepiandrosterone sulphate in Alzheimer's Disease. *Lancet*. 336(8712), 449-450.

Léger G. C., Massoud F. (2013): Novel disease-modifying therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 6(4), 423–442.

Leowattana W. (2004): DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin. Chim. Acta.* 341(1-2), 1-15.

Li H., Klein G., Sun P., Buchan A.M. (2001): Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain Res.* 888(2), 263-266.

Li L., Xu B., Zhu Y., Chen L., Sokabe M., Chen L. (2010): DHEA prevents A β 25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology*. 59(4-5), 323-333.

Liang X., Glowacki J., Hahne J., Xie L., LeBoff M.S., Zhou S. (2016): Dehydroepiandrosterone Stimulation of Osteoblastogenesis in Human MSCs Requires IGF-I Signaling. *J. Cell Biochem.* 117(8), 1769-1774.

Lin J.S., O'Connor E., Rossom R.C. (2013): Screening for cognitive impairment in older adults: A systematic review for the U.S. preventive services task force. *Annals of Internal Medicine*. 159(9), 601-612.

Maayan R., Touati-Werner D., Ram E., Strous R., Keren O., Weizman A. (2006): The protective effect of frontal cortex dehydroepiandrosterone in anxiety and depressive models in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(2), 415-421.

Majewska M.D., Demirgören S., Spivak C.E. (1990): London, The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor, *Brain Res.* 526(1), 143–146.

Malik R., Kalra S., Bhatia S., Al Harrasi A., Singh G., Mohan S., Makeen H.A., Albratty M., Meraya A., Bahar B., Tambuwala M.M. (2022): Overview of therapeutic targets in management of dementia, *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 152, 0753-3322.

Maninger N., Wolkowitz O. M., Reus V. I., Epel E. S., Mellon, S. H. (2009): Neurobiological and Neuropsychiatric Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA Sulfate (DHEAS). *Front. Neuroendocrinology.* 30(1), 65–91.

Mao X., Barger S.W. (1998): Neuroprotection by dehydroepiandrosterone sulfate. *NeuroReport.* 9(4), 759-763.

Marx C.E., Shampine L.J., Duncan G.E., VanDoren M.J., Grobin A.C., Massing M.W., Madison R.D., Bradford D.W., Butterfield M.I., Lieberman J.A., Morrow A.L. (2006): Clozapine markedly elevates pregnenolone in rat hippocampus, cerebral cortex, and serum: candidate mechanism for superior efficacy? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84(4), 598–608.

Maurice T., Phan V., Sandillon F., Urani A. (2000): Differential effect of dehydroepiandrosterone and its steroid precursor pregnenolone against the behavioural deficits in CO-exposed mice. *European journal of pharmacology.* 390(1-2), 145–155.

Mawal-Dewan M., Trojanowski J., Lee V.Y. (1996): Tau Phosphorylation and Dephosphorylation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Springer.* 17, 109–126.

McKeith I.G., Dickson D.W., Lowe J., Emre M., O'Brien J.T., Feldman H., Cummings J., Duda J.E., Lippa C., Perry E.K., Aarsland D., Arai H., Ballard C.G., Boeve B., Burn D.J., Costa D., Del Ser T., Dubois B., Galasko D., Gauthier S., Goetz C.G., Gomez-Tortosa E., Halliday G., Hansen L.A., Hardy J., Iwatsubo T., Kalaria R.N., Kaufer D., Kenny R.A., Korczyn A. (2005): Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology.* 65(12), 1863-1872.

McKeith I.G., Galasko D., Kosaka K., Perry E.K., Dickson D.W., Hansen L.A., Salmon D.P., Lowe J., Mirra S.S., Byrne E.J., Lennox G., Quinn N.P., Edwardson J.A., Ince P.G., Bergeron C., Burns A., Miller B.L., Lovestone S., Collerton D., Jansen E.N.H., Ballard C., de Vos R.A.I., Wilcock G.K., Jellinger K.A., Perry R.H. (1996): Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB). *Neurology*. 47(5), 1113–1124.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34(7), 939-944.

Mellon S.H. (2007): Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol. Ther.* 116(1), 107-124.

Meunier J., Maurice T. (2004): Beneficial effects of the sigma1 receptor agonists igmesine and dehydroepiandrosterone against learning impairments in rats prenatally exposed to cocaine. *Neurotoxicology and teratology*. 26(6), 783–797.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3), 1215.

Milman A., Zohar O., Maayan R., Weizman R., Pick C.G. (2008): DHEAS repeated treatment improves cognitive and behavioral deficits after mild traumatic brain injury. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18(3), 181-187.

Monnet F.P., Mahé V., Robel P., Baulieu E.E. (1995): Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(2), 3774-3778.

Morales A.J., Nolan J.J., Nelson J.C., Yen S.S. (1994): Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 78(6), 1360–1367.

Mueller J.W., Gilligan L.C., Idkowiak J., Arlt W., Foster P.A. (2015): The regulation of steroid action by sulfation and desulfation. *Endocr. Rev.* 36(5), 526–563.

Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois, L. (2007): Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32(8-10), 1062-1078.

Nawata H., Yanase T., Goto K., Okabe T., Ashida K. (2002): Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech. Ageing Dev.* 123(8), 1101-1106.

Naylor J.C., Hulette C.M., Steffens D.C., Shampine L.J., Ervin J.F., Payne V.M., Massing M. W., Kilts J.D., Strauss J.L., Calhoun P.S., Calnaido R.P., Blazer D.G., Lieberman J.A., Madison R.D., Marx C.E. (2008): Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer's disease, and related to neuropathological disease stage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 93(8), 3173–3178.

Nicolas L.B., Pinoteau W., Papot S., Routier S., Guillaumet G., Mortaud S. (2001): Aggressive behavior induced by the steroid sulfatase inhibitor COUMATE and by DHEAS in CBA/H mice. *Brain Res.* 922(2), 216-222.

Nieschlag E., Loriaux D.L., Ruder H.J., Zucker I.R., Kirschner M.A., Lipsett M.B. (1973): The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man, *J Endocrinol.* 57(1), 123–134.

Outeiro T.F., Koss D.J., Erskine D., Walker L., Kurzawa-Akanbi M., Burn D. (2019) Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol. Neurodegener.* 14(1), 5.

Paleologou K.E., El-Agnaf O.M. (2012): α -synuclein aggregation and modulating factors. *Subcell Biochem.* 65, 109–164.

Pan X., Wu X., Kaminga A. C., Wen S. W., Liu A. (2019): Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in aging neuroscience.* 11, 61.

Park D. C., Lautenschlager G., Hedden T., Davidson N. S., Smith A.D., Smith, P.K. (2002): Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychology and aging.* 17(2), 299–320.

- Parker C.R. Jr, Stankovic A.K., Faye-Petersen O., Falany C.N., Li H., Jian M. (1998): Effects of ACTH and cytokines on dehydroepiandrosterone sulfotransferase messenger RNA in human adrenal cells. *Endocrine Research*. 24(3-4), 669–673.
- Pérez-Neri I., Montes S., Ojeda-López C., Ramírez-Bermúdez J., Ríos, C. (2008): Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: Mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 32(5), 1118-11130.
- Petersen R.C., Smith G.E., Waring A.C., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Kokmen E. (1999): Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of Neurology*. 56(3), 303–308.
- Prough R., Clark B.J., Klinge C.M. (2016): Novel mechanisms for DHEA action. *J. Mol. Endocrinol*. 56(3), 139-155.
- Qaiser M.Z., Dolman D.E.M., Begley D.J., Abbott N.J., Cazacu- Davidescu M., Corol D.I. i sur. (2017): Uptake and metabolism of sulphated steroids by the blood-brain barrier in the adult male rat. *J. Neurochemistry*. 142(5), 672-685.
- Querfurth H.W., LaFerla F.M. (2010): Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 362(4), 329–344.
- Rainey W.E., Carr B.R., Sasano H., Suzuki T., Mason J.I. (2002): Dissecting human adrenal androgen production. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 13(6), 234–239.
- Rammouz G., Lecanu L., Aisen P., Papadopoulos V. (2011): A lead study on oxidative stress-mediated dehydroepiandrosterone formation in serum: the biochemical basis for a diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*. 24(2), 5-16.
- Rasmuson S., Näsman B., Olsson T. (2011): Increased serum levels of dehydroepiandrosterone (DHEA) and interleukin-6 (IL-6) in women with mild to moderate Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics*. 23(9), 1386–1392.
- Rege J., Garber S., Conley A.J., Elsey R.M., Turcu A.F., Auchus R.J., Rainey W.E. (2019): Circulating 11-oxygenated androgens across species. *J. Steroid Biochem Mol. Biol*. 190, 242–249.

Rhodes M. E., Li P. K., Burke A. M., Johnson D. A. (1997): Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition. *Brain Res.* 773(1-2), 28–32.

Rinne J.O., Laine M., Kaasinen V., Norvasuo-Heila M.K., Nagren K., Helenius H. (2002): Striatal dopamine transporter and extrapyramidal symptoms in frontotemporal dementia. *Neurology.* 58(10), 1489–1493.

Roberts E., Bologna L., Flood J.F., Smith G.E. (1987): Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. *Brain Research.* 406(1-2), 357–362.

Roman G.C., Salloway S., Black S.E., Royall D.R., Decarli C., Weiner M.W. (2010): Randomized, placebo-controlled, clinical trial of donepezil in vascular dementia: differential effects by hippocampal size. *Stroke.* 41(6), 1213–1221.

Rosen W.G., Mohs R.C., Davis K.L. (1984): A new rating scale for Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry.* 141(11), 1356-1364

Sachdev P., Kalaria R., O'Brien J., Skoog I., Alladi S., Black S.E. (2014): Diagnostic criteria for vascular cognitive disorders. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 28(3), 206–218.

Sadock B.J., Sadock M.A., Pedro R. (2015): Kaplan and Sadock's Comprehensive Text Book of Psychiatry. 11, 270.

Schmidt P.J., Daly R.C., Bloch M., Smith M.J., Danaceau M.A., Clair L.S., Rubinow D.R. (2005): Dehydroepiandrosterone Monotherapy in Midlife-Onset Major and Minor Depression. *Arch Gen Psychiatry Archives of General Psychiatry.* 62(2), 154-162.

Schmidtke K., Hermeneit S. (2008): High rate of conversion to Alzheimer's disease in a cohort of amnesic MCI patients. *Int. Psychogeriatr.* 20(1), 96-108.

Schroeter M. L., Raczka K., Neumann J., von Cramon D. Y. (2008): Neural networks in frontotemporal dementia - meta-analysis. *Neurobiol. Aging.* 29(3), 418–426.

Seely J., Amigh K., Mayhew B., Sasano H., Giguère V., Laganier J., Carr B., Rainey W. (2005): Transcriptional Regulation of Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (SULT2A1) by Estrogen-Related Receptor. *Endocrinology.* 146(8), 3605-3613.

Sherman S.M., Schnyer D.M. (2016): Major and Mild Neurocognitive Disorders. *Encyclopedia of Mental Health*. 2, 33-38.

Shimizu M., Tamura H.O. (2002): Identification and Localization of Two Hydroxysteroid Sulfotransferases in the Human Brain. *J. Health Sci.* 48(5), 467–472.

Söndergaard H.P., Hansson L.O., Theorell T. (2002): Elevated blood levels of dehydroepiandrosterone sulphate vary with symptom load in posttraumatic stress disorder: findings from a longitudinal study of refugees in Sweden. *Psychother. Psychosom.* 71(5), 298-303.

St George-Hyslop P. H., Petit A. (2005): Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *Comptes rendus biologies.* 328(2), 119–130.

Stokin G.B., Krell-Roesch J., Petersen R.C. (2015): Mild neurocognitive disorder: an old wine in a new bottle. *Harv Rev Psychiatry.* 23(5), 368–376.

Strac D.S., Konjevod M., Perkovic M.N., Tudor L., Erjavec G.N., Pivac N. (2020): Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its Sulphate (DHEAS) in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 17(2), 141-157.

Strous R.D., Maayan R., Lapidus R., Stryjer R., Lustig M., Kotler M. i sur. (2003): Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* 60(2), 133-141.

Sun M.K. (2018): Potential therapeutics for vascular cognitive impairment and dementia. *Curr. Neuropharmacol.* 16(7), 1036–1044.

Sunderland T., Merril C. R., Harrington M. G., Lawlor B. A., Molochan S. E., Martinez R., Murphy D. L. (1989): Reduced plasma DHEA concentrations in Alzheimer's Disease. *Lancet.* 2(8662), 570.

Suzuki M., Wright L. S., Marwah P., Lardy H.A., Svendsen C. N. (2004): Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101(9), 3202-3207.

Svec F., Porter J. (1997): The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on zucker rat food selection and hypothalamic neurotransmitters. *Psychoneuroendocrinology.* 22(1), 57-62.

Tamagno E., Aragno M., Boccuzzi G., Gallo M., Parola S., Fubini B. i sur. (1998): Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepian- drosterone. *Cell Biochem. Funct.* 16(1), 57-63.

Taylor J.P., McKeith I.G., Burn D.J. (2020): New evidence on the management of Lewy body dementia. *Lancet Neurol.* 19(2), 157–169.

Taylor M.K., Stone M., Laurent H.K., Rauh M.J., Granger D.A. (2014): Neuroprotective neurotrophic effect of endogenous dehydroepiandrosterone sulfate during intense stress exposure. *Steroids.* 87, 54-58.

Tsai R. M., Boxer A. L. (2014): Treatment of frontotemporal dementia. Current treatment options in neurology. 16(11), 319.

Utriainen P., Laakso S., Jaaskelainen J., Voutilainen R. (2012): Polymorphisms of POR, SULT2A1 and HSD11B1 in children with premature adrenarche. *Metabolism.* 61(9), 1215–1219.

Vallée M., Mayo W., Le Moal M. (2001): Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain research. Brain research reviews.* 37(1-3), 301–312.

Vilatela M.E.A., López M., Yescas-Gómez P. (2012): Genetics of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research.* 43(8), 622-631.

Weill-Engerer S., David J.-P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., (2002): Neurosteroid Quantification in Human Brain Regions: Comparison between Alzheimer's and Nondemented Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(11), 5138–5143.

Wilborn T.W., Lang N.P., Smith M., Meleth S., Falany C.N. (2006): Association of SULT2A1 allelic variants with plasma adrenal androgens and prostate cancer in African American men. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 99(4-5), 209–214.

Wolf O.T., Kirschbaum C. (1999): Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans, *Brain Research Reviews.* 30(3), 264-288.

Wolf O.T., Kudielka B.M., Hellhammer D.H., Hellhammer J., Kirschbaum C. (1998): Opposing effects of DHEA replacement in elderly subjects on declarative memory and attention after exposure to laboratory stressor. *Psychoneuroendocrinology*. 23(6), 617-629.

Wolkowitz O. M., Kramer J. H., Reus V. I., Costa M.M., Yaffe K., Walton P., Raskind M., Peskind E., Newhouse P., Sack D., De Souza E., Sadowsky C., Roberts E., DHEA-Alzheimer's Disease Collaborative Research. (2003): DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*. 60(7), 1071–1076.

Wolters F.J., Ikram M.A. (2019): Epidemiology of vascular dementia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39(8), 1542–1549.

Xu Y., Tanaka M., Chen L., Sokabe M. (2012): DHEAS induces short-term potentiation via the activation of a metabotropic glutamate receptor in the rat hippocampus. *Hippocampus*. 22(4), 707-722.

Yanase T., Fukahori M., Taniguchi S., Nishi Y., Sakai Y., Takayanagi R. (1996): Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia. *Endocrine Journal*. 43(1), 119–123.

Yiannopoulou K.G., Papageorgiou S.G. (2013): Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 6(1), 19-33.

Yilmaz C., Karali K., Fodelianaki G., Gravanis A., Chavakis T., Charalampopoulos I. (2019): Neurosteroids as Regulators of Neuroinflammation. *Front. Neuroendocrinology*. 55, 91-3022.

Yoo A., Harris J., Dubrovsky B. (1996): Dose-response study of dehydroepiandrosterone sulfate on dentate gyrus long-term potentiation. *Experimental neurology*. 137(1), 151–156.

Zhai G., Teumer A., Stolk L., Perry J.R., Vandenput L., Coviello A.D., Koster A., Bell J.T., Bhasin S., Eriksson J., Eriksson A., Ernst F., Ferrucci L., Frayling T.M., Glass D., Grundberg E., Haring R., Hedman A.K., Hofman A., Kiel D.P., Kroemer H.K., Liu Y., Lunetta K.L., Maggio M., Lorentzon M., Mangino M., Melzer D., Miljkovic I., Nica A., Penninx B.W., Vasan R.S., Rivadeneira F., Small K.S., Soranzo N., Uitterlinden A.G., Volzke H., Wilson S.G., Xi L., Zhuang W.V., Harris T.B., Murabito J.M., Ohlsson C., Murray A., de Jong F.H., Spector T.D.,

Wallaschowski H. (2011): Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms. PLoS Genet. 7(4), e1002025.

Zhang L., Li Bs, Ma W., Barker J.L., Chang Y.H., Zhao W., i sur. (2002): Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. Brain Res. Mol. Brain Res. 98(1-2), 58-66.

<https://www.nia.nih.gov/health/what-alzheimers-disease> (Pristupljeno: 19. 07. 2023.)

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (Pristupljeno: 19. 07. 2023.)

<https://www.escardio.org/The-ESC/Press-Office/Press-releases/Clock-drawing-cognitive-test-should-be-done-routinely-in-patients-with-high-blood-pressure> (Pristupljeno: 23. 07. 2023.)

<https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/real-time-pcr-qpcr/> (Pristupljeno: 26. 07. 2023.)

<http://www.elkbiotech.com/pro/77398> (Pristupljeno: 04. 08. 2023.)

<https://www.gene-g.com/what-is-allelic-discrimination-genotyping> (Pristupljeno: 05. 08. 2023.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 01. 12. 1998. god. u Splitu, gdje sam završio srednju Prirodoslovnu školu. Preddiplomski studij Biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisao sam 2017. god. 2021. god. obranio sam završni rad pod nazivom „Oksidacijski i antioksidacijski status skeletnog mišića pretilih Sprague-Dawley štakora“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Rosemary Vuković te stekao titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.). Iste godine upisao sam diplomski studij Eksperimentalne biologije (Modul: Fiziologija i imunobiologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad sam započeo 2023. god. u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, Zavoda za molekularnu medicinu, na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Švob Štrac, više znan. suradnice i komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović.

Laboratorijska stručna praksa:

02/2022 – 05/2022

„Korištenje in vivo modela u imunohistokemijskim analizama. Jedinica za molekularnu toksikologiju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI), Zagreb, Hrvatska.

Mentor: dr. sc. Dean Karaica

02/2023 – 07/2023

Izrada diplomskog rada, Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju, Zavod za molekularnu medicinu Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znan. suradnica.

02/2023

Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim A.

Dodatno:

Tijekom studiranja bio sam demonstrator na kolegijima Biokemija 1 i Biokemija 2.

2019. god. sudjelovao sam u projektu popularizacije znanosti „18. tjedan mozga“ gdje sam s kolegicom N. Bacelj održao predavanje pod nazivom „Možemo li izliječiti psihopatiju?“ u Auli Rektorata Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

2023. god. na „22. tjednu mozga“ održavam online predavanje na temu „Dobročudni tumori mozga“. Dostupno na mrežnim stranicama Hrvatskog društva za neuroznanost (HDN) - <https://hdn.hr/zanimljivosti-o-mozgu/>

U međuvremenu aktivno sam volontirao na projektima kao što su „Noć biologije“, „Biolog-i-ja“ na Odjelu za biologiju, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku i Prirodoslovno – matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Pasivno sam sudjelovao u raznim konferencijama i kongresima, primjerice „Brain-Gut Axis“ na Medicinskom i Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te Hrvatskom institutu za istraživanje mozga; „Women Who Are Changing Science“ na Mediteranskom institutu za istraživanje života u Splitu; „Mozak voli zdravo 2023. - eStudent“; „Hrvatski studentski simpozij o bioetici – Dostignuća medicinski potpomognute oplodnje“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i dr.

Član sam studentske udruge - Hrvatska akademska zajednica (HAZ), u sklopu koje sam osnovao i vodio projekt „Health Hack“, a cilj projekta bio je potaknuti razvoj znanstvenog gledišta zdravlja s osvrtnom na tradicionalni i suvremeni koncept. 2023. god. imenovan sam povjerenikom Hrvatske akademske zajednice na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Član sam i Udruge studenata biologije (BIUS, Zagreb), u sklopu koje sam osnovao i vodio Sekciju za onkologiju.

Vrlo dobro se služim engleskim jezikom u govoru i pismu.