

Potencijalno neuroprotektivno djelovanje dehidroepiandrosterona (DHEA) i njegovog sulfata (DHEAS) u modelu ozljede mozga

Blažanović, Suzana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:507952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Suzana Blažanović

Potencijalno neuroprotektivno djelovanje dehidroepiandrosterona (DHEA) i njegovog sulfata (DHEAS) u modelu ozljede mozga

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Suzana Blažanović

Potential neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate (DHEAS) in brain injury model

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

Najveću zahvalu dugujem dragoj mentorici dr. sc. Matei Nikolac Perković na pruženoj prilici i povjerenju, stručnom vodstvu, svim savjetima, brizi, strpljenju, nesebičnoj podršci i brzim odgovorima pri izradi ovog rada.

Hvala suvoditeljici doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević na konkretnim komentarima i razumijevanju.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju na IRB-u, a posebno Barbari Vuić i Marceli Konjevod, na svim savjetima i pomoći te ugodnoj radnoj atmosferi tijekom mog laboratorijskog iskustva.

Mojim roditeljima, Mati i Klaudiji, posebno hvala na beskrajnoj i bezuvjetnoj podršci, strpljenju i ljubavi tijekom cijelog mog školovanja. Hvala im što su mi sve omogućili i vjerovali u mene onda kada ja nisam.

Od srca zahvaljujem mojim sestrama, Marini i Vanesi, što su uz mene u najsretnijim i najtežim trenucima, bez njih ništa ne bi imalo smisla.

Hvala mojoj baki Ruži na svakoj izgovorenoj molitvi i bezuvjetnoj ljubavi.

Na kraju, veliko hvala svim mojim dragim prijateljima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Potencijalno neuroprotektivno djelovanje dehidroepiandrosterona (DHEA) i njegovog sulfata (DHEAS) u modelu ozljede mozga

Suzana Blažanović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Neurosteroid dehidroepiandrosteron (DHEA) ključan je u modulaciji neurogeneze, metabolizma neurona i njihovog preživljenja, a uključen je i u regulaciju važnih moždanih funkcija poput neuralne plastičnosti, učenja, pamćenja i ponašanja. Dosadašnja istraživanja pokazala su da DHEA i njegov sulfat (DHEAS) ublažavaju posljedice ekscitotoksičnosti i oštećenja prouzrokovanih oksidativnim stresom te imaju potencijalno protektivno djelovanje u slučaju ishemijske ozljede mozga. Deprivacija glukoze, smanjen protok krvi te hipometabolizam glukoze povezuju se s degeneracijom i smrtni neurona kod ishemijskog moždanog udara, ali i kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova te Parkinsonova bolest. Sve navedeno upućuje na to da bi DHEA i DHEAS mogli biti obećavajući kandidati za istraživanja usmjerena prema zaštiti neurona, odnosno prema smanjenju oštećenja i odumiranja neurona koji prate različita akutna stanja, kronične neurodegenerativne bolesti te normalno starenje. Cilj ovog diplomskog rada je istražiti i razjasniti potencijalne učinke neurosteroida DHEA i DHEAS u prevenciji neuronske smrti i promicanju preživljavanja neurona uporabom *in vitro* pristupa, odnosno uporabom modela deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGD/R) koji vrlo dobro oponaša ishemijske uvjete i s tim povezana patološka stanja. Rezultati istraživanja upućuju na to da ispitivani neurosteroidi imaju potencijal u liječenju i prevenciji ozljeda izazvanih ishemijom, kao i onih uzrokovanih neurodegeneracijom.

(73 stranica, 23 slike, 8 tablica, 119 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: moždani udar, demencija, ishemijsko - reperfuzijska ozljeda, neurosteroidi, humane neuroblastoma stanice, mišji neuroni

Voditelj: dr. sc. Matea Nikolac Perković, znan. suradnik, IRB

Suvoditelj: dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc., PMF

Ocjenitelji:

dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc., PMF

dr.sc. Inga Urlić, izv. prof., PMF

dr.sc. Antun Alegro, red. prof., PMF

Zamjena:

dr. sc. Ana Galov, izv. prof., PMF

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Potential neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate (DHEAS) in brain injury model

Suzana Blažanović
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) is crucial in modulating neurogenesis, neuronal metabolism, and survival, and is involved in the regulation of important brain functions such as neural plasticity, learning, memory, and behavior. Previous research has shown that DHEA and its sulfate (DHEAS) alleviate the effects of excitotoxicity and damage caused by oxidative stress and have potentially protective effects in the case of ischemic brain injury. Glucose deprivation, decreased blood flow and glucose hypometabolism are associated with degeneration and death of neurons in ischemic stroke, but also in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. All of the above suggests that DHEA and DHEAS could be promising candidates for research aimed at protecting neurons, i.e. reducing the damage and death of neurons that accompany various acute conditions, chronic neurodegenerative diseases and normal aging. The aim of this thesis is to investigate and clarify the potential effects of the neurosteroid DHEA and DHEAS in preventing neuronal death and promoting neuronal survival using an *in vitro* approach, i.e. using a model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion (OGD/R) that mimics very well ischemic conditions and related pathological conditions. Pretreatment and posttreatment with DHEA (S) proved to be neuroprotective. The results of the study suggest that the studied neurosteroids have potential in the treatment and prevention of injuries caused by ischemia, as well as those caused by neurodegeneration.

(73 pages, 23 figures, 8 tables, 119 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: stroke, dementia, ischemic - reperfusion injury, neurosteroids, human neuroblastoma cells, mouse neurons

Supervisor: dr. Matea Nikolac Perković, Research Associate, RBI

Co-supervisor: dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof., Faculty of Science

Reviewers:

dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof., Faculty of Science

dr. Inga Urlić, Assoc. Prof., Faculty of Science

dr. Antun Alegro, Prof., Faculty of Science

Replacement:

dr. Ana Galov, Assoc. Prof., Faculty of Science

Thesis accepted:

KRATICE

ATP - adenzin trifosfat (od eng. *adenosine triphosphate*)

NMDA - N-metil-D aspartat (od eng. *N-methyl-D-aspartate*)

AMPA - α -amino-3 hidroksi-5 metil-4-izoksazon-proprionska kiselina (od eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)

RKV - reaktivne kisikove vrste

A β – amiloidni beta protein

nNOS - neuralna sintaza dušikova oksida (od eng. *neuronal nitric oxide synthase*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH, od eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

4-HNE - aldehida 4-hidroksinonenala (od eng. *4-hydroxynonenal*)

NF κ B - nuklearni faktor *kappa* B

HIF- 1 α - čimbenik induciran hipoksijom 1 α (od eng. *hypoxia-inducible factor*)

TNF- α - čimbenik nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*)

PAF - čimbenik aktivacije trombocita (od eng. *platelet activating factor*)

TIA - privremena ishemija

MCA - srednja cerebralna arterija

MCAO - začepljenje srednje cerebralne arterije

ET-1 - endotelin-1

ADP - adenzin difosfat

OGD - deprivacija glukoze i kisika (od eng. *oxygen-glucose deprivation*)

GD - deprivacija glukoze (od eng. *glucose deprivation*)

BBB - krvno moždana barijera

PI - propidijev jodid

AD - Alzheimerova bolest (od eng. *Alzheimer's disease*)

MCI - Bago kognitivno oštećenje (od eng. *mild cognitive impairment*)

TBI - Traumatska ozljeda mozga (od eng. *traumatic brain injury*)

APP - protein prekursora amiloida (od eng. *amyloid precursor protein*)

DLB - Demencija s Lewyjevim tijelima (od eng. *dementia with Lewy bodies*)

FTD - Frontotemporalna demencija (od eng. *frontotemporal dementia*)

DHEA- Dehidroepiandrosteron

DHEAS - Dehidroepiandrosteron sulfat

P450c17 - enzim 17 α -hidroksilaza/c-17 α ,20 liaza

P450scc - dezmolaza

P450c17 - 17 α -hidroksilaza/c17,20-lijaza

3 β HSD - 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza

HST, SULT2A1 - hidroksisteroid sulfotransferaza

GABA - γ -aminomaslačne kiseline (od eng. *γ -amino-butiric acid*)

ACh - acetilkolin

PKC - protein kinaza C

SŽS - središnji živčani sustav

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

DMEM - (od eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

HBSS - Hankova solna otopina (od eng. *Hanks balanced saline solution*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Ozljeda mozga	1
1.1.1. Mehanizam ishemijsko-reperfuzijske ozljede.....	2
1.1.2. <i>In vivo</i> modeli za istraživanje ishemijskog moždanog udara.....	6
1.1.3. <i>In vitro</i> modeli za istraživanje ishemijskog moždanog udara.....	8
1.1.3.1. Model deprivacije kisika i glukoze, uz reperfuziju.....	9
1.1.3.2. Model kemijske ili enzimatske inhibicije metabolizma.....	9
1.1.3.4. Model ekscitotoksičnosti	10
1.2. Neurodegeneracija kao posljedica traumatske ozljede mozga.....	12
1.2.1. Alzheimerova bolest	13
1.2.1. Vaskularna demencija	14
1.2.2. Blago kognitivno oštećenje.....	15
1.2.3. Demencija s Lewyjevim tijelima	15
1.2.4. Frontotemporalna demencija	16
1.3. DHEA i DHEAS	17
1.3.1. Biosinteza DHEA(S).....	19
1.3.2. DHEA(S) u središnjem živčanom sustavu.....	20
1.3.3. Mehanizam djelovanja DHEA(S).....	20
1.4. Neuroprotektivno djelovanje i terapijski potencijal DHEA i DHEAS	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJALI METODE	25

3.1. Materijali.....	25
3.1.1. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y	25
3.1.2. Primarna kultura mišjih neurona.....	26
3.1.3. Uzgoj stanica.....	27
3.1.4. Lijekovi.....	28
3.1.5. Materijali za određivanje vijabilnosti stanica	29
3.2. Metode	29
3.2.1. Izolacija primarnih mišjih neurona	29
3.2.1.1. Oblaganje ploča za uzgoj stanica poli-D-lizinom.....	29
3.2.1.2. Izolacija neurona i nasađivanje na ploče za uzgoj stanica	30
3.2.2. Kultivacija SH-SY5Y stanica	30
3.2.2.1. Odmrzavanje SH-SY5Y stanica	30
3.2.2.2. Presađivanje stanica.....	31
3.2.3. Nasađivanje stanica i održavanje staničnih kultura	31
3.2.3.1. Brojanje stanica.....	31
3.2.3.2. Održavanje kulture stanica SH-SY5Y i primarne kulture neurona	32
3.2.4. Deprivacija glukoze i kisika, te reperfuzija	32
3.2.5. Primjena tretmana	33
3.2.6. Mjerenje vijabilnosti stanica	34
3.2.6.1. MTT test.....	34
3.2.6.2. Kvantitativna analiza Muse® Count & Viability testom.....	35
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	37

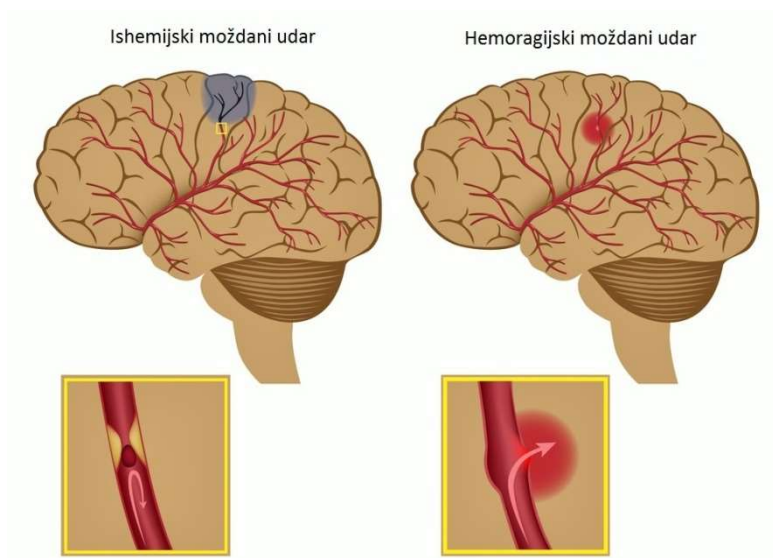
4. REZULTATI.....	38
4.1. Vijabilnost stanica nakon OGD-a: test MTT	38
4.1.1. Primarna kultura mišjih neurona.....	39
4.1.1.1. Vijabilnost neurona određena testom MTT nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS	39
4.1.1.2. <i>Vijabilnost neurona određena testom MTT nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	40
4.1.1.3. <i>Usporedba vijabilnosti neurona nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	41
4.1.2. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y	42
4.1.2.1. <i>Vijabilnost stanica određena testom MTT nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	42
4.1.2.2. <i>Vijabilnost stanica određena testom MTT nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	43
4.1.2.3. <i>Usporedba vijabilnosti stanica nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	44
4.2.1. Primarna kultura mišjih neurona.....	47
4.2.1.1. <i>Vijabilnost neurona određena Muse® Count & Viability testom nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	47
4.2.1.2. <i>Vijabilnost neurona određena Muse® Count & Viability testom nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	48
4.2.1.3. <i>Usporedba vijabilnosti neurona nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	49
4.2.2. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y	51
4.2.2.1. <i>Vijabilnost stanica određena Muse® Count & Viability testom nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	51
4.2.2.2. <i>Vijabilnost stanica određena Muse® Count & Viability testom nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	52

4.2.2.3. <i>Usporedba vijabilnosti stanica predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS</i>	53
5. RASPRAVA	55
6. ZAKLJUČAK	60
7. LITERATURA	61
8. ŽIVOTOPIS	73

1. UVOD

1.1. Ozljeda mozga

Moždani udar je cerebrovaskularna bolest koja, prema Svjetskoj organizaciji za moždani udar, doseže razmjere epidemije. Stručnjaci upozoravaju da će na globalnoj razini svaka četvrta odrasla osoba starija od 25 godina doživjeti moždani udar tijekom svog života, a broj smrtnih slučajeva će doseći 6,7 milijuna godišnje (<https://www.world-stroke.org/>). Trenutno postoji relativno mali broj terapija kojim bi se smanjilo oštećenje tkiva nakon moždanog udara (Woodruff i sur. 2011), a liječenje je otežano ukoliko se ne reagira unutar nekoliko sati. Simptomi moždanog udara variraju ovisno o tome koja je regija mozga i u kojoj mjeri pogođena. Dolazi do gubitka osjeta na jednoj strani tijela ili paralize, poteškoća u govoru i njegovom razumijevanju, gubitka vida na jednom oku i vrtoglavice, te u konačnici trajnog oštećenja mozga i smrti ukoliko ne dođe do uspostavljanja normalnog protoka krvi (Nour i sur. 2012). Razlikuje se hemoragijski moždani udar, uzrokovan intracerebralnim krvarenjem (Woodruff i sur. 2011), i ishemijski tip moždanog udara (Slika 1.).



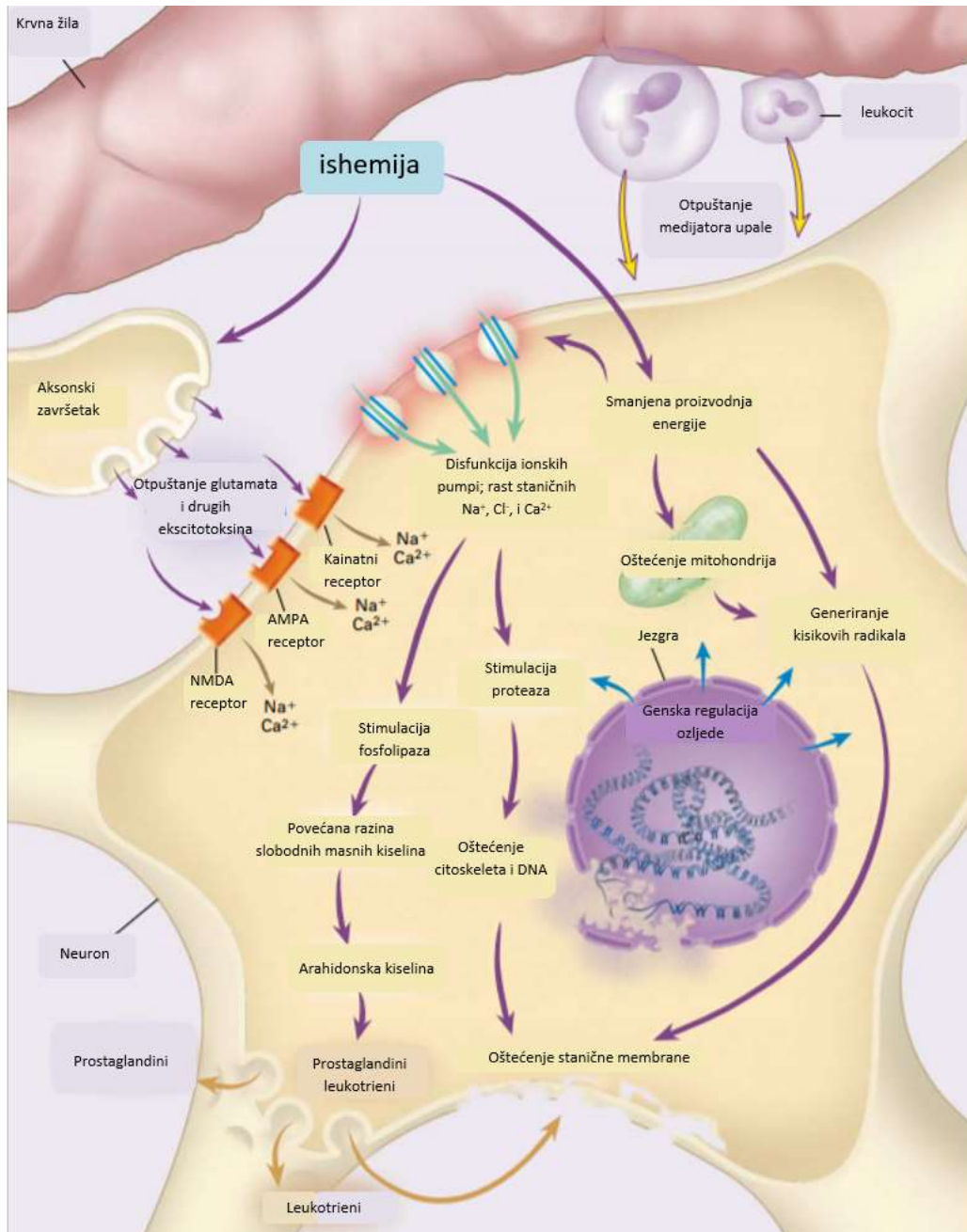
Slika 1. Shema ishemijskog i hemoragijskog moždanog udara.
(preuzeto s <http://mozdanival.hr/mozdani-udar/>).

Ishemijski moždani udar nastaje stvaranjem krvnog ugruška u moždanoj arteriji, pri čemu taj dio mozga privremeno ostaje bez kisika i hranjivih tvari, a stanice okolnog tkiva mogu odumirati. Hemoragijski tip nastaje izljevom krvi u dio mozga, uzrokovan prsnućem arterije. Krv se nakuplja i oštećuje neurone uzrokujući njihovu smrt. Ishemijski, koji čini 87% slučajeva, uzrokovan je trombozom, embolijom ili sistemskom hipoperfuzijom zbog čega je ograničen protok krvi u mozgu te narušena stanična homeostaza nedovoljnom isporukom kisika i glukoze (Yang i sur. 2011, Doyle i sur. 2008).

1.1.1. Mehanizam ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Patofiziologija ishemijskog moždanog udara složena je i uključuje brojne procese: energetska pad, poremećenu staničnu homeostazu, acidozu, povećanu unutarstaničnu razinu kalcija, ekscitotoksičnost, toksičnost posredovanu slobodnim radikalima, stvaranje produkata arahidonske kiseline, citotoksičnost posredovanu citokinima, aktivaciju komplementa, poremećaj krvno-moždane barijere, aktivaciju glija stanica i infiltraciju leukocita (Woodruff i sur. 2011, Eltzschig i Eckle 2011). Svaki proces ima različit vremenski okvir, uz određena preklapanja. Ekscitotoksičnost i periinfarktna depolarizacija događaju se unutar nekoliko minuta, upala satima, dok apoptoza traje danima, uzrokujući ozljede neurona, glija stanica i endotelnih stanica. Metabolička neravnoteža unutar organa zahvaćenog ishemijom rezultira dubokom hipoksijom tkiva i mikrovaskularnom disfunkcijom. Naknadna reperfuzija dodatno pojačava aktivaciju urođene i stečene imunosti, sustava komplementa, trombocita, čimbenika koagulacije te mehanizama stanične smrti. Prema tome, izravni nedostatak kisika i hranjivih tvari uzrokuju primarne ishemijske ozljede stanica, dok imunološki odgovor na ozljedu uzrokuje sekundarne reperfuzijske posljedice moždanog udara. Unutar jezgre ishemičnog područja, gdje je protok krvi najograničeniji, ekscitotoksična i nekrotična smrt stanica nastupa za nekoliko minuta. Na periferiji ishemijskog područja kolateralni protok krvi može ublažiti pune učinke moždanog udara. Stupanj ishemije i vrijeme reperfuzije, tijekom koje se reoksigenira tkivo i obnavljaju krvne žile (Eltzschig i Eckle 2011), određuju ishod za pojedine stanice (Yang i sur. 2011, Doyle i sur. 2008).

Da bi stvorio metabolite bogate energijom, mozak je isključivo ovisan o oksidativnoj fosforilaciji. Nakon ishemije dolazi do velikog gubitka kisika i glukoze. U roku od nekoliko minuta energetske ovisne stanične pumpe zakazuju zbog pada količine dostupnog adenozin trifosfata (ATP, od eng. *adenosine triphosphate*) ovisnog o glukozi, što rezultira ulaskom iona u stanicu i gubitkom membranskog potencijala (Slika 2.). Neuron i glija stanice bubre osmozom i postaju depolarizirani, aktiviraju se Ca^{2+} kanali ovisni o naponu i ligandima te dolazi do otpuštanja glutamata koji je u većim količinama neurotoksičan. Ca^{2+} djeluje kao univerzalni drugi i treći glasnik te indukcijom enzima aktivira više citoplazmatskih i nuklearnih kaskada: proteolitičke enzime (kalpain) s naknadnom razgradnjom citoskeleta, strukturne proteine (aktin, laminin, spektrin, proteini povezani s mikrotubulima), ksantin oksidaze i fosfolipaze (kao što je fosfolipaza A2), što dovodi do razgradnje membrane, te ciklooksigenaze, što dovodi do stvaranja slobodnih radikala (Martin i sur. 1994, Eltzhig i Collard 2004, Woodruff i sur. 2011, Nour i sur. 2012). Aktivira se niz proteaza, kinaza, lipaza i endonukleaza, pokrećući unutarnji apoptotski put i rezultirajući staničnom smrću. Ekscitacijske aminokiseline akumuliraju se u sinaptičkoj pukotini i stalno induciraju aktivaciju tri različita ligandom vezana receptora glutamata: N-metil-D aspartat (NMDA, od eng. *N-methyl-D-aspartate*) receptor, α -amino-3 hidroksi-5 metil-4-izoksazolopropionska kiselina (AMPA, od eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) i receptor kainata. Uz navedene, postoje i metabotropni receptori povezani s G-proteinima (Endres i Dirnagl 2003, Woodruff i sur. 2011). Kao posljedica aktivacije navedenih receptora, dolazi do nakupljanja izvanstaničnih iona Na^+ i Cl^- koji se akumuliraju unutarstanično i dovode do citotoksičnog edema. Zbog nedostatka kisika metabolizam glukoze mijenja se u anaerobnu glikolizu što dovodi do nakupljanja laktata i tkivne acidoze. NMDA receptori inaktiviraju se na niskim razinama pH štiteći neurone od daljnjeg ulaska Ca^{2+} (Endres i Dirnagl 2003).



Slika 2. Molekularni događaji u moždanom tkivu pokrenuti akutnom cerebralnom ishemijom.

Prekid cerebralnog krvotoka rezultira smanjenom proizvodnjom energije, što uzrokuje zakazivanje ionskih pumpi, oštećenje mitohondrija, aktivaciju leukocita, stvaranje kisikovih radikala i oslobađanje ekscitotoksina. Povećana stanična razina iona Na^+ , Cl^- i Ca^{2+} rezultira stimulacijom fosfolipaza i proteaza, stvaranjem i oslobađanjem prostaglandina i leukotriena, razgradnjom DNA i citoskeleta, i na kraju, razgradnjom stanične membrane. DNA regulira elemente kaskade kako bi se ublažio stupanj ozljede (preuzeto i prilagođeno prema Brott i Bogousslavsky 2000).

Neuroni su normalno izloženi osnovnoj razini oksidacijskog stresa iz egzogenih i endogenih izvora, kao i sve stanice u tijelu. Zbog poremećaja oksidativne fosforilacije, mitohondriji stvaraju superoksidne anionske radikale tijekom procesa prijenosa elektrona u stanici, uzrokujući oksidacijski stres, pri čemu su i oni oštećeni pa nastaje začarani krug. Unutarnja membrana mitohondrija značajno je oštećena stvaranjem radikala, što dovodi do bubrenja i prestanka proizvodnje ATP-a. Reaktivne kisikove vrste (RKV) oštećuju DNA, proteine i lipide zbog čega se stimulira proizvodnja proteina p53 i suprimira transkripcija anti-apoptotskih proteina iz porodice Bcl-2 (Shen i sur. 2003, Woodruff i sur. 2011). Nakupljanje Ca^{2+} aktivira neuralnu sintazu dušikova oksida (nNOS, od eng. *neuronal nitric oxide synthase*) koja s nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom (NADPH, od eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) stvara RKV (Suh i sur. 2008). U postishemijskim neuronima superoksidi nastaju metabolizmom arahidonske kiseline putem ciklooksigenaze i lipooksigenaze. Nakon reperfuzije tkiva zahvaćenog ishemijom, aktivirane mikroglija stanice proizvode RKV putem sustava NADPH oksidaze. Ova oksidacija uzrokuje daljnja oštećenja tkiva i smatra se važnim okidačem za apoptozu nakon ishemijskog moždanog udara. Dušikov oksid (NO) se generira iz L-arginina kroz jedan od nekoliko izoformi NO sintaze (NOS). NO difundira slobodno kroz membrane i može reagirati sa superoksidom na mjestu stvaranja da bi proizveo peroksitnitrit (ONOO-), drugu vrlo reaktivnu vrstu kisika. Slobodni radikali dobiveni iz kisika i reaktivne dušikove vrste sudjeluju u aktiviranju nekoliko puteva stanične smrti i upale uzrokovane moždanim udarom. Smanjenje opskrbe kisikom također dovodi do nakupljanja laktata putem anaerobne glikolize uzrokujući acidozu. Citokrom c oslobađa se u citosol kao specifični okidač za pokretanje kaskade proteolitičkih enzima kaspaza i, u konačnici, apoptoze.

Osim stvaranja različitih vrsta kisikovih radikala, acidoza također ometa unutarstaničnu sintezu proteina. Mehanizam kojim peroksidacija lipida membrane inducira neuronsku apoptozu uključuje stvaranje aldehida 4-hidroksinonenala (4-HNE, od eng. *4-hydroxynonenal*), koji kovalentno modificira prijenosnike na membrani, kao što su Na^+/K^+ ATP-aza te prijenosnici glukoze i glutamata, čime narušava njihovu funkciju. Iako potencijalno štete svojim izravnim djelovanjem, Ca^{2+} i slobodni radikali mogu aktivirati neuroprotektivne transkripcijske čimbenike, poput nuklearnog faktora *kappa* B (NFκB), čimbenika induciraniog hipoksijom 1α

(HIF- 1α , od eng. *hypoxia-inducible factor*) i interferona 1b. Mogu inicirati proizvodnju nekoliko medijatora upale, uključujući proupalne citokine TNF- α (od eng. *tumor necrosis factor*), interleukin 1 i 6 te kemokine interleukin 8 i čimbenik aktivacije trombocita (PAF, od eng. *platelet activating factor*) (Ridder i Schwaninger 2009, Woodruff i sur. 2011).

Međustanične i vaskularne adhezijske molekule, kao i različiti selektini, posreduju u adheziji i migraciji leukocita kroz krvožilnu stijenku. U prvom valu dolaze neutrofilni nakon čega slijede makrofagi i monociti koji sprječavaju širenje ozljede. Aktivacija komponenti komplementa i čimbenika zgrušavanja krvi uzrokuje upalu stanica endotela, povećava se propusnost krvnih žila zbog čega može nastati edem. Smanjena funkcija krvno-moždane barijere, nastala pod utjecajem RKV, može dovesti do potencijalnog širenja toksina u mozak (Eltzschig i Collard 2004, Yilmaz i Granger 2010).

1.1.2. *In vivo* modeli za istraživanje ishemijskog moždanog udara

In vivo i *in vitro* modeli ishemijskog moždanog udara uspostavljeni su kako bi oponašali stanje ljudskog moždanog udara i omogućili istraživanje patofizioloških mehanizama te razvoj antiishemijskih tretmana (Yang i sur. 2011). Mnogi eksperimentalni modeli koriste se za proučavanje ovog tipa ozljede, a mehanizmi uključeni u ozljedu stanica istražuju se ispitivanjem učinaka različitih manipulacija na opseg staničnog stresa ili smrti u bilo kojem modelu. Izbor vrsta za proučavanje moždanog udara na životinjama obično je ograničen na laboratorijske vrste, poput glodavaca. Mnogo je prednosti korištenja malih životinja, kao što su štakori i miševi, budući da su te vrste relativno dostupne i njihova anatomija kranijalnog krvotoka slična je onoj kod ljudi. Prednost ovakvih modela je i ta što omogućuju kontrolu težine, trajanja i mjesta začepjenja krvne žile. Fiziološki čimbenici mogu se dobro kontrolirati, a histopatologija omogućuje procjenu ishemijske patogeneze i infarkta tkiva (Endres i Dirnagl 2003, Durukan i Tatlisumak 2007, Woodruff i sur. 2011). Miševi, štakori i kunići koriste se za modele kojima nije potrebna kraniotomija, a moždani udar izazvan je embolijom, intraluminalnim šavom, trombozom i endotelinom-1 (Tablica 1.). Primati, svinje, mačke, psi i kunići koriste se u modelima moždanog udara tijekom kojeg je potrebno napraviti kraniotomiju, a fiziološki parametri sličniji su onima kod ljudi (Durukan i Tatlisumak 2007, Yang i sur. 2011).

Tablica 1. Češće korišteni *in vivo* modeli ishemijske ozljede mozga (preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur. 2020).

Model	Metoda	Značajke	Uporaba	Uporaba u TIA	Detalji induciranja TIA
<i>Model kraniotomije</i>	Mehanički prekida distalni protok krvi MCA	Dobra reproducibilnost, vizualna potvrda uspješne MCAO	Histopatološko proučavanje TIA	Da	Blokira distalnu MCA mikrovaskularnom kopčom 15 minuta
<i>Model MCAO intraluminalnog šava</i>	Šavom se blokira MCA	Visoko kontrolirana ishemijsko reperfuzijska ozljeda	Histopatološko proučavanje TIA	Da	Različito trajanje blokiranja
<i>Model fototromboze</i>	Zračenje izložene lubanje nakon ubrizgavanja fotoaktivne boje	Željene ishemijske lezije mozga	Proučavanje antitrombocitne, antikoagulacijske i endotelne zaštitne terapije	Da	Ubrizgavanje Rose Bengal (koncentracija 10 mg / ml) u repnu venu pri 0,2 ml / 100 g tjelesne težine i osvjetljenje 3 minute pomoću 5 mW, 532 nm CW laserskog svjetla
<i>Endotelin-1 model</i>	Ubrizgavanje ET-1 u moždani parenhim	Jasna ishemijska ozljeda, lokalizirana i specifična lezija	Histopatološko proučavanje cerebralne ishemijske	Ne	/
<i>Model embolije</i>	Ubrizgavanje svježih ugrušaka ili lipidnih mikročestica u karotidnu arteriju	Poblize oponaša ljudsku TIA	Proučavanje tretmana TIA-e	Da	Ubrizgavanje 0,5 mg rastopljenih čvrstih lipidnih mikročestica (promjera 75–90 μm) putem katetera karotidne arterije
<i>Model agregacije trombocita</i>	Infuzija kolagenih fibrila ili ADP u karotidnu arteriju	Varijabilnost u eksperimentalnim ishodima	Proučavanje mehanizama TIA	Da	Infuzija ADP (8 mg u minuti tijekom 5 minuta) u karotidnu arteriju

TIA – privremena ishemija, MCA - srednja cerebralna arterija, MCAO - začepljenje srednje cerebralne arterije, ET-1 - endotelin-1, ADP - adenzin difosfat

Tri glavna tipa *in vivo* modela moždanih udara su globalna ishemija, žarišna ishemija i hipoksija/ishemija. Posljednja spomenuta metoda, kod koje se začepljenje žila kombinira s

udisanjem hipoksične plinovite smjese, gotovo se isključivo koristi kod mladih životinja (Woodruff i sur. 2011).

Globalna ishemijska ozljeda najčešće nastaje višestrukim začepljenjem žila, a rjeđe potpunim zastojem cirkulacije u mozgu. U modelima žarišnog ishemijskog moždanog udara, najčešće je začepljena srednja moždana arterija, koja se može začeptiti trajno ili prolazno, a oštećenja su rezultat ishemije i reperfuzije (McBean i Kelly 1998, Traystman 2003). Kolateralni protok krvi može utjecati na smanjenje početnog utjecaja začepljenja. Intracerebralno krvarenje često prati ishemijski moždani udar, uglavnom zbog prekida integriteta krvno-moždane barijere. Modeli žarišnog ishemijskog moždanog udara, bilo kod većih sisavaca (poput mačaka, pasa, primata) ili glodavaca, obično uključuju začepljenje jedne srednje moždane arterije. Postoje dva modela žarišnog ishemijskog moždanog udara, prolazna žarišna ishemija i trajna žarišna ishemija. U prolaznim modelima žarišne ishemije, krvne žile su začepljene do 3 sata, nakon čega slijedi produljena reperfuzija. Kod trajne žarišne ishemije arterijska blokada održava se tijekom eksperimenta, obično jedan ili više dana. Žarišna se ishemija razlikuje od globalne ishemije na dva načina. Prvo, čak i u srži lezije, protok krvi je gotovo uvijek veći nego tijekom globalne ishemije, tako da su za nanošenje štete potrebne dugotrajnije ozljede nego za globalnu ishemiju. Drugo, postoji značajna gradacija ishemije od jezgre lezije do krajnje vanjske granice, zbog čega su prisutni različiti metabolički uvjeti unutar zahvaćenog mjesta. Zbog svog trajanja i heterogenosti, ozljeda koja prati žarišnu ishemiju mnogo je složenija nego ona u globalnoj ishemiji, ali se žarišna ishemija smatra neprocjenjivim i realnim modelom za moždani udar te je stoga i široko proučavana (Woodruff i sur. 2011).

1.1.3. *In vitro* modeli za istraživanje ishemijskog moždanog udara

Prezezi mozga, posebno hipokampusa, i primarne kulture neurona/glija stanica korteksa, hipokampusa i malog mozga embrionalnih ili perinatalnih štakora i miševa postali su široko korišteni modeli za proučavanje ozljeda sličnih ishemiji (Tablica 2.) (Yu i sur. 2001, Endres i Dirnagl 2003, Holloway i Gavins, 2016). U organskim prezezima su zadržani svi stanični i anatomske odnosi pa su pogodniji za istraživanja u odnosu na primarnu staničnu kulturu (Stoppini i sur. 1991). Astrociti su vrsta glija stanica u mozgu, a imaju ulogu osigurati strukturu i

metaboličku potporu neuronima te ih zaštititi od ozljeda, otporniji su na ishemiju pa se njihova uloga u moždanom udaru ispituje u *in vitro* uvjetima (Yu i sur. 2001).

1.1.3.1. Model deprivacije kisika i glukoze, uz reperfuziju

Deprivacija kisika i glukoze u *in vitro* uvjetima, uz naknadnu reperfuziju (OGDR eng. oxygen-glucose deprivation/reperfusion), prihvaćen je kao dobar model za oponašanje ishemijskih uvjeta i nastalih patoloških stanja (Mattson i sur. 2000, Kaasik i sur. 2001) te testiranje potencijalnih neuroprotektivnih supstanci (Goldberg i Choi 1993) na primarnim staničnim kulturama i staničnim linijama (Malagelada i sur. 2005, Canas i sur. 2006, Shi i Liu 2006, Fordel i sur. 2007).

Uvjeti slični ishemiji nastaju zamjenom normalnog uravnoteženog O₂/CO₂ medija s medijem u kojem je kisik zamijenjen dušikom (N₂/CO₂) te se stanične kulture obično drže u inkubatoru koji sadrži atmosferu N₂/CO₂. Kod hipoksije se glukoza održava u anoksičnom puferu, dok se kod *in vitro* ishemije ili nedostatka kisika/glukoze (OGD, od eng. *oxygen-glucose deprivation*) izostavlja glukoza (Woodruff i sur. 2011). Sama deprivacija glukoze (GD, od eng. *glucose deprivation*) također može inducirati neuronsku smrt s nekim značajkama sličnim onima koje su uočene u *in vivo* modelima ishemije (Martin i sur. 1994).

1.1.3.2. Model kemijske ili enzimatske inhibicije metabolizma

Kemijska hipoksija stvara više slobodnih radikala, a može se izazvati tretmanom cijanidom (NaCN ili KCN) ili inkubacijom u anoksičnoj atmosferi (Woodruff i sur. 2011). Za inhibiciju transportnog lanca elektrona koriste se rotenon, antimicin i natrijev azid. Sustav glukoza oksidaze i katalaze s 2-deoksiglukozom, izomerom L-glukoze koji se ne može metabolizirati, koristi se za enzimatsku ozljedu (Holloway i Gavins, 2016).

1.1.3.4. Model ekscitotoksičnosti

In vitro modeli također omogućuju proučavanje ekscitotoksičnosti u izolaciji ishemijske ozljede, primjenom agonista receptora glutamata poput NMDA ili glutamata. Upotreba specifičnih agonista omogućuje istraživanje udjela podtipova glutamatnih receptora u ekscitotoksičnim promjenama (Holloway i Gavins, 2016).

Određivanje razina ishemijske ozljede u *in vitro* modelima bazira se na određivanju vijabilnosti stanica primjenom kolorimetrijskih testova kao što je MTT ili bojanjem stanica pomoću tripanškog modrila koje ulazi isključivo u mrtve stanice zbog oštećenja i povećane propusnosti membrana. MTT je kolorimetrijska metoda koja se koristi za mjerenje metaboličke aktivnosti stanica, odnosno za utvrđivanje metaboličke aktivnosti mitohondrijskog enzima sukcinat dehidrogenaze koji cijepa žutu tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid), rezultirajući nastankom netopivih ljubičastih kristala formazana u citosolu stanica (Kaasik i sur. 2011, Stoddart i sur. 2011). Intenzitet nastalog obojenja očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini 570 nm te je uvijek proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica.

Stanice koje su podvrgnute apoptozi ili nekrozi nakon OGD ozljede *in vitro* mogu se vizualizirati i pomoću fluorescentnih boja poput propidijevog jodida (PI) i Hoechst 33258. Slično triptanskom modrilu, PI boja samo apoptotične i nekrotične stanice u crveno. Hoechst 33258 je s druge strane nuklearna boja, i boja jezgre živih i mrtvih stanica (Nicoletti i sur. 1991, Woodruff i sur. 2011).

Tablica 2. Stanične platforme korištene u *in vitro* modelima ozljede mozga (preuzeto i prilagođeno prema Holloway i Gavins, 2016).

Stanične platforme	Propusnost	Dostupnost ljudskih stanica	Fiziološka točnost	Strukturna složenost	Mogućnost korištenja za istraživanje ishemije	Komentar
<i>Prerezi mozga</i>	Ne	Jako ograničena	Visoka	Visoki stupanj	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost	Oštećenje tkiva tijekom pripreme može uzrokovati abnormalni rad
<i>Organotipska stanična kultura</i>	Ne	Ograničena	Visoka	Do određenog stupnja	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost	Oštećenje tkiva tijekom pripreme može uzrokovati abnormalni rad
<i>Primarne stanice</i>	Ne	Ograničena	Visoka	Zahtjeva umjetno uređenje	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost, model BBB, tromboza i leukocitni odgovor	Ograničena sposobnost proliferacije
<i>Stanične linije</i>	Da	Neograničena	Niska	Zahtjeva umjetno uređenje	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost, BBB	Prisutni onkogeni, velik broj pasaža može ograničiti fiziološku točnost
<i>Embrijske matične stanice</i>	Djelomično	Jako ograničena	Potencijalno visoka	Zahtjeva umjetno uređenje	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost, BBB	Ograničena uporaba zbog etičkih razloga
<i>Inducirane pluripotentne matične stanice</i>	Da	Potencijalno neograničena	Potencijalno visoka	Zahtjeva umjetno uređenje	OGD, kemijska ishemija, ekscitotoksičnost, BBB	Mogući pojedinačni donorski modeli relevantnih rizičnih populacija

BBB – krvno moždana barijera, OGD – deprivacija kisika i glukoze

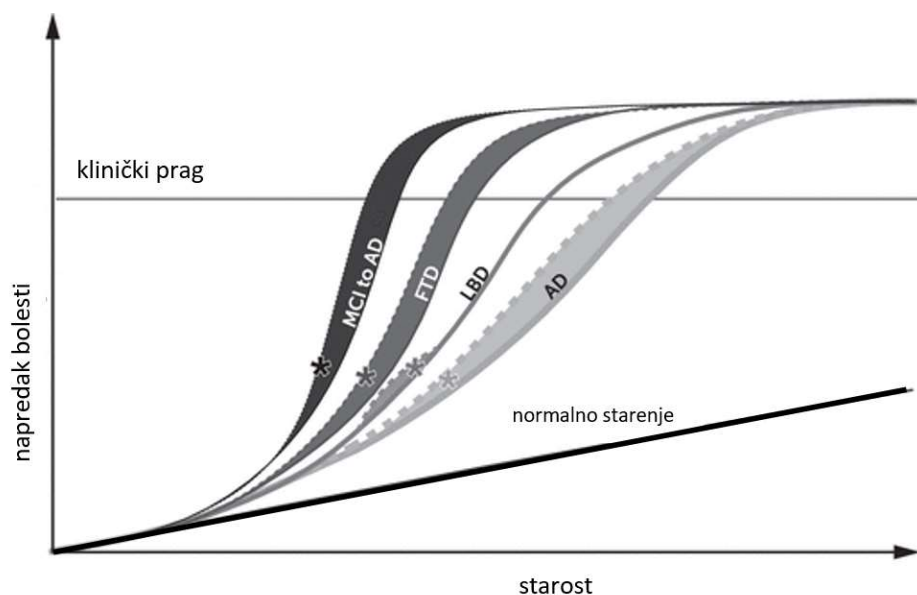
In vitro modeli razlikuju se od *in vivo* modela u nekoliko aspekata. Potrebno je prilično dulje trajanje anoksične ili hipoksične ozljede da bi se *in vitro* uzrokovala smrt neurona. Nedostatak ATP-a manje je značajan, a oslobađanje glutamata odgođeno je u usporedbi s ishemijom *in vivo* (Woodruff i sur. 2011). Odsutnost krvnih žila i protok krvi u *in vitro* uvjetima eliminira važne strukturne i funkcionalne komponente procesa ozljede koje su prisutne *in vivo*, uključujući infiltraciju upalnih stanica. Uz to, sastav i reakcija glija stanica *in vitro* razlikuju se od one u netaknutom mozgu (Stoppini i sur. 1991). Međutim, i *in vitro* modeli mogu pružiti vrlo vrijedne informacije o mehanizmima koji se nalaze u podlozi ishemijske ozljede te predložiti nove potencijalne terapijske mete. Doprinos *in vitro* modela mogao bi biti značajan i u praćenju sigurnosti lijekova jer ovakav pristup dopušta ekonomski isplativije probirne testove (Antonic i sur. 2012).

1.2. Neurodegeneracija kao posljedica traumatske ozljede mozga

Neurodegenerativne bolesti su stanja povezana sa starosti, koja karakterizira nekontrolirana smrt neurona što dovodi do progresivnog pada moždanih funkcija. Te neizlječive i iscrpljujuće bolesti povezane su sa širokim spektrom kliničkih simptoma, uključujući kognitivni pad i/ili gubitak lokomotornih funkcija. Demencije su brojna stanja koja karakteriziraju kognitivni deficiti, uključujući Alzheimerovu bolest (AD, od eng. *Alzheimer's disease*), vaskularnu demenciju, frontotemporalnu demenciju, mješovitu demenciju i demenciju s Lewyjevim tijelima (Slika 3.) (Slanzi i sur. 2020).

Traumatska ozljeda mozga (TBI, od eng. *traumatic brain injury*) često se smatra rizičnim čimbenikom za kasniji razvoj neurodegenerativnih stanja. Iako mehanička veza ostaje nepoznata, utvrđeno je da TBI inicira nakupljanje patoloških procesa povezanih s nekoliko neurodegenerativnih poremećaja. Dokazano je da se u oštećenim aksonima nakupljaju velike količine proteina prekursora amiloida (APP, od eng. *amyloid precursor protein*) i A β (amiloidni beta protein). Razine APP-a u temporalnom korteksu povećavaju se u roku od nekoliko sati nakon ozbiljne TBI, i uzrokuju otekline aksona, neurita i staničnih tijela, u odsutnosti akutne neurofibrilarne patologije. Povećana razina i nakupljanje APP-a marker je difuzne ozljede

aksona nakon TBI-a, što značajno povećava rizik od neurotoksičnih razina A β (DeKosky i Asken 2017).



Slika 3. Potencijalna uloga traumatske ozljede mozga u razvoju neurodegenerativne demencije.

Y os predstavlja patološki razvoj bolesti. * predstavlja traumatsku ozljedu mozga. MCI to AD = razvoj vaskularne demencije s progresijom prema Alzheimerovoj bolesti, FTD = frontotemporalna demencija, LBD = demencija s Lewyjevim tijelima, AD = Alzheimerova bolest (preuzeto i prilagođeno prema LoBue i sur. 2018).

1.2.1. Alzheimerova bolest

AD je neurodegenerativni poremećaj koji se obično sastoji od atrofije mozga koja započinje u sljepoočnim režnjevima, a zatim napreduje do frontalnih i tjemenih regija prije nego što se proširi na okcipitalne režnjeve. Plakovi amiloid- β peptida i neurofibrilarni snopići nastali nakupljanjem hiperfosforiliranog proteina tau patološka su obilježja AD-a. Klasična klinička prezentacija AD-a uključuje naglašene promjene u učenju i pamćenju te aspektima govora praćene globalnim kognitivnim pogoršanjem kako se bolest širi. (Yang i sur. 2015, LoBue i sur. 2018). Neurodegenerativne promjene i difuzna bolest bijele tvari važan su uzrok demencije u bolesnika s malim infarktom, kao i hiperintenzivne lezije u bazalnim ganglijima bolesnika s vaskularnom demencijom. Moždani udar može biti uzrok čak 50% slučajeva AD u starijim

dobnim skupinama. Procjenjuje se da je tri puta veća vjerojatnost nastanka AD-a kod starijih osoba nakon epizode moždanog udara ili prolaznog ishemijskog napada. Kod 87% pacijenata koji su sudjelovali u ispitivanju vaskularne demencije, uključujući demenciju nakon moždanog udara, na obdukciji je uočena prisutnost AD-a samostalno (58%) ili u kombinaciji s cerebrovaskularnom bolešću (42%). Stoga je utvrđeno da svi bolesnici sa znakovima cerebrovaskularne bolesti imaju neku popratnu neurodegenerativnu bolest (Kalaria i Ballard 2001).

1.2.1. Vaskularna demencija

Vaskularna demencija (VaD) je najčešći oblik demencije nakon AD-a (Román, 2002), a cerebrovaskularne bolesti mogu pridonijeti pogoršanju demencije (Román i sur., 1993). Kognitivne promjene u VaD-u mnogo su varijabilnije nego kod drugih poremećaja poput AD-a i uvelike ovise o određenim supstratima neurona na koje utječe vaskularna patologija. Budući da je subkortikalna vaskularna patologija često prisutna, zbog prekidanja frontostrijatnih krugova, uočavaju se dominantni nedostaci pažnje, obrade informacija i izvršne funkcije (O'Brien i sur. 2003, Stebbins i sur. 2008). Ostale funkcije poput pamćenja, govora i pokreta mnogo su varijabilnije zahvaćene vaskularnom demencijom. Studije su pokazale značajno preklapanje neuropsihijatrijskih značajki AD-a i VaD-a (Lyketsos i sur. 2002), iako su neki simptomi, posebno depresija i apatija, istaknutiji kod osoba oboljelih od VaD, s rjeđe uočenim deluzijama i halucinacijama (Lyketsos i sur. 2002, Gupta i Dasgupta 2014). Pronalaženje točnog doprinosa cerebrovaskularne patologije kognitivnom padu i demenciji je otežano svojstvenom heterogenom prirodom vaskularne patologije, u kojoj ateroskleroza velikih i malih arterija (i druge vaskularne bolesti - npr. Cerebralna amiloidna angiopatija) mogu dovesti do infarkta korteksa i subkorteka, ishemijskih lezija podinfarkta (mikroinfarkti u sivoj tvari i lezije bijele tvari), te velikih i malih cerebralnih krvarenja (mikrokrvarenja). Navedene patološke promjene mogu se dogoditi u cijelom mozgu i mogu pridonijeti VaD-u (O'Brien i Thomas 2015).

1.2.2. Blago kognitivno oštećenje

Bago kognitivno oštećenje (MCI, od eng. *mild cognitive impairment*) često je prijelazna faza između normalnog starenja i AD-a, što predstavlja razdoblje tijekom kojeg se pacijent žali na kognitivne poteškoće uz prisustvo suptilnog neuropsihološkog pada, ali kriteriji za demenciju nisu ispunjeni. MCI stoga predstavlja raniji prag prije početka kliničke demencije, a nedavno je objavljeno da TBI također može biti povezan s razvojem MCI-a (McKeith, 2007, LoBue i sur. 2018). LoBue i sur. (2018) usporedili su ispitanike kojima je dijagnosticiran MCI (N = 3.187) s grupom sudionika s normalnim kognitivnim funkcijama (N = 3.244) iz nacionalne baze podataka. Otkrili su da je povijest TBI-a s gubitkom svijesti bez kroničnog deficita, koja se javlja više od godinu dana ranije, povezana s 1,3 puta povećanim rizikom za dijagnozu MCI-a. Taj je odnos ostao i nakon obrade sociodemografskih (dobi i obrazovanja), genetskih (apolipoprotein $\epsilon 4$) i vaskularnih čimbenika, iako su na povezanost TBI-a i MCI-a jako utjecali povijest depresije i, u manjoj mjeri, spol. Razlozi za to nisu jasni, ali moguće objašnjenje je povezanost TBI-a i depresije, (Rogers i Read 2007) budući da je uočena veća prevalencija povijesti depresije u onih s TBI-em. Nadalje, osobama s poviješću TBI-a i gubitka svijesti dijagnosticiran je MCI otprilike 2,5 godine ranije od onih bez povijesti TBI-a, što ukazuje da povijest TBI-a može biti povezana s ranijim početkom MCI-a koji potencijalno može rezultirati smanjenjem kognitivnih funkcija ili pridonosenjem patoloških procesa povezanih s neurodegeneracijom (Li i sur. 2016).

1.2.3. Demencija s Lewyjevim tijelima

Demencija s Lewyjevim tijelima (DLB, od eng. *dementia with Lewy bodies*) neurodegenerativni je poremećaj povezan s difuznom akumulacijom Lewyjevih tijela, odnosno proteina α -sinukleina u mozgu. Klasična klinička prezentacija DLB-a uključuje oslabljenu i fluktuirajuću kogniciju, razvoj ekstrapiramidalnih simptoma i vizualne halucinacije. Iako je DLB druga najčešća demencija, o TBI, kao mogućem uzroku, vrlo malo se zna. Boot i sur. (2013) proveli su istraživanje na 147 ispitanika te uočili da TBI u anamnezi nije povezana s povećanim rizikom za dijagnozu DLB-a u usporedbi s kontrolama ili pacijentima s AD-om. Međutim, Crane i sur. (2016) proučavali su osobe u dobi od 50 godina i više iz tri skupine ispitanika (N = 1.652) i ustanovili da je povijest TBI-a s gubitkom svijesti manje od jednog sata povezana s prisutnošću

Lewyjevih tijela u frontalnim i temporalnim dijelovima mozga na obdukciji, dok prisutnost TBI-a s gubitkom svijesti više od jednog sata nije bila povezana sa spomenutim patološkim promjenama. Zanimljivo je da je ova povezanost bila obrnuta kada su autori ispitali samo osobe s ozljedama koje su se dogodile nekoliko desetljeća ranije (prije 25. godine života), ali bilo je samo četiri slučaja s težim ozljedama i prisutnošću bilo kakve patologije DLB-a. Stoga nije jasno je li povijest TBI-a povezana s kasnijim razvojem DLB-a (LoBue i sur. 2018).

1.2.4. Frontotemporalna demencija

Frontotemporalna demencija (FTD, od eng. *frontotemporal dementia*) obuhvaća tri glavna srodna tipa demencije, uključujući bihevioralnu varijantu FTD-a, primarnu progresivnu afaziju i progresivnu nefluentnu afaziju, ovisno o tome koja su područja mozga najviše pogođena. Pojedinci mogu imati promjene u osobnosti i emocionalnom izražavanju, postaju impulzivni, socijalno neprikladni i apatični (bihevioralna varijanta), uz prisutne promjene u artikulaciji govora (primarna progresivna afazija) ili gubitak semantičkog pamćenja (progresivna nefluentna afazija). FTD uključuje degeneraciju frontalnih režnjeva i prednjih sljepoočnih dijelova, pri čemu gotovo svi slučajevi patološki karakteriziraju nakupljanje inkluzija TAR DNA-vezujućeg proteina ili tau. Zbog nepravilne unutarnje površine lubanje i smještaja mozga unutar intrakranijalnog luka, TBI može utjecati na prednje i temporalne dijelove mozga, što je potaknulo nekoliko grupa znanstvenika da istraže potencijalni utjecaj TBI-a na razvoj ovog oblika demencije (LoBue i sur. 2018).

Deutsch, Mendez i Tang (2015) ispitali su uzorak ispitanika (N = 1.016) s bihevioralnom varijantom FTD-a, primarnom progresivnom afazijom i progresivnom nefluentnom afazijom iz skupa podataka Nacionalnog centra za koordinaciju Alzheimerove bolesti (NACC) u Sjedinjenim Američkim Državama. Kod ispitanika koji su sami prijavili povijest TBI-a, koja se dogodila najmanje godinu dana prije testiranja, utvrđen je 1,7 puta veći rizik za oboljenje od FTD-a od onih bez povijesti TBI-a. Na temelju hipoteze da neke osobe s poviješću TBI-a mogu pokazati povećanu vjerojatnost za kasniji pad kognitivnih sposobnosti, autori su ispitali je li moguće da osobe s poviješću TBI-a pokažu i izraženije kognitivno oštećenje. Međutim, nisu uočene neuropsihološke razlike među ispitanicima sa i bez povijesti TBI-a kojima je

dijagnosticirana primarna progresivna afazija ili progresivna nefluentna afazija, dok su ispitanici s dijagnozom bihevioralne varijante FTD-a pokazali manje izražene simptome demencije. Iako su autori zaključili da ovaj nalaz možda nije klinički važan, budući da su sve ostale neuropsihološke performanse slične, kada se ovaj nalaz kombinira s onim iz ostalih podtipova, čini se da prisutnost TBI-a u anamnezi nije povezana s većim razinama kognitivnih oštećenja kod FTD-a.

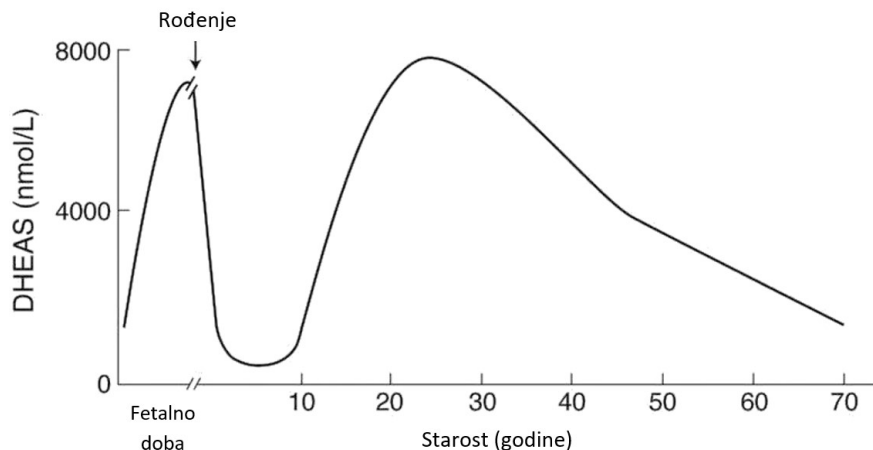
1.3. DHEA i DHEAS

Dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) najzastupljeniji je steroid u krvi ljudi (Kaasik 2001, Maninger i sur. 2009). Nastaje iz dehidroepiandrosterona (DHEA), kojeg sintetizira nadbubrežna kora, a u manjoj mjeri nastaje *de novo* u mozgu i akumulira se u živčanom sustavu. Pokazalo se da je značajan pad DHEA i DHEAS (u daljnjem tekstu DHEA(S) kad se odnosi na oba spoja) koji je vidljiv kod ljudi tijekom starenja povezan s procesom neurotoksičnosti (Baquer i sur. 2009) te da se može povezati s procesom neurodegeneracije koji je prisutan kod starijih ljudi koji boluju od različitih oblika demencije, poput Alzheimerove bolesti. Stoga se DHEA smatra neuroaktivnom farmakološkom tvari s potencijalnim anti-aging svojstvima. Smatra se da smanjene razine DHEAS-a može pridonijeti povećanoj ranjivosti ljudskog mozga na ishemiju, pogotovo kod starijih osoba. Budući da su dokazani mnogi blagotvorni učinci, nadomjesna terapija DHEAS-om, kao kompenzacija za značajno smanjenje razine ovog hormona povezano s godinama ili bolestima, privukla je pažnju znanstvene zajednice i javnosti posljednjih godina. Ipak, nema izravnih dokaza da DHEAS ima neuroprotektivni učinak u slučaju ishemijske ozljede mozga (Kaasik 2001, Maninger i sur. 2009). Ovakva promatranja, zajedno s osnovnim i pretkliničkim dokazima bioloških učinaka DHEA, pružila su nadu da bi vraćanje DHEA na razinu nalik onoj u ranijoj životnoj dobi moglo produžiti ljudski život, zaštititi mozak i usporiti starenje (Maninger i sur. 2009).

Razine DHEA(S) variraju u različitim dijelovima tijela pri čemu ih u mozgu ima 6 puta više nego u krvnoj plazmi (Lanthier i Patwardhan 1986, Liere i sur. 2004), dok su najniže koncentracije izmjerene u cerebrospinalnoj tekućini, gotovo 20 puta manje nego u krvnoj plazmi

(Guazzo i sur. 1996). Zbog veće koncentracije u mozgu i pretpostavke da se tamo sintetiziraju *de novo*, nazvani su neurosteroidima (Maninger i sur. 2009).

Koncentracija neurosteroida DHEA(S) mijenja se tijekom cijelog života (Slika 4.). Tijekom trudnoće, fetalna zona nadbubrežne žlijezde izlučuje velike koncentracije DHEAS-a. Nakon rođenja, koncentracije DHEA(S) opadaju tijekom prvih šest mjeseci i ostaju niske do 6. godine života, kod dječaka i djevojčica, kad kora nadbubrežne žlijezde počinje sintetizirati DHEA(S), a koncentracije u krvi počinju rasti. Odrasli ljudi izlučuju DHEA(S) iz *zone reticularis* kore nadbubrežne žlijezde, te DHEA iz jajnika i testisa. Koncentracije u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini dosežu vrhunac sredinom 20-ih godina (Nieschlag i sur. 1973, Parker i Odell 1980, Nawata i sur. 2002, Maninger i sur. 2009), a zatim postupno opadaju s godinama i kod muškaraca i kod žena, približavajući se najnižoj vrijednosti (približno 20%) u 70-im godinama, dobi u kojoj učestalost mnogih bolesti povezanih sa starenjem naglo raste. U muškaraca se koncentracija DHEAS u plazmi smanjuje u prosjeku za 1–4% godišnje u dobi od 40 do 80 godina i za 2% godišnje u žena (Tannenbaum i sur. 2004).

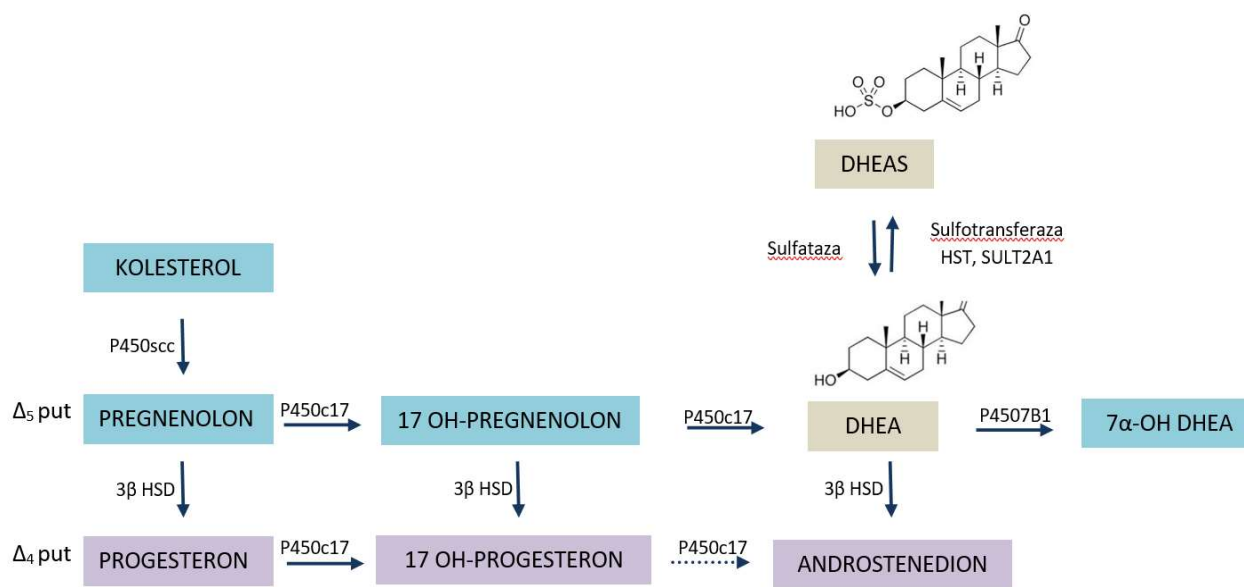


Slika 4. Promjene koncentracije DHEAS tijekom života.

Maksimalnu vrijednost doseže neposredno prije rođenja te u 20.-im godinama života (preuzeto i prilagođeno prema Rainey i Nakamura 2008).

1.3.1. Biosinteza DHEA(S)

DHEAS je preteča približno 50% androgena u odraslih muškaraca, 75% aktivnih estrogena u žena u premenopauzi i gotovo 100% aktivnih estrogena nakon menopauze (Quinn i sur 2018). DHEA je steroid koji se sintetizira *de novo* u mozgu, jajnicima ili testisima te iz kolesterola u *zoni reticularis* pomoću dva enzima za metabolizam steroida. Ljudi i glodavci (štakori i miševi) razlikuju se u putovima sinteze steroida. Dok Δ_4 put prevladava kod glodavaca, aktivnost ljudskog enzima 17α -hidroksilaza/c- $17\alpha,20$ liaza (P450c17) snažno preferira Δ_5 put (Maninger i sur. 2009). Prvi korak koji ograničava brzinu i hormonski je reguliran u sintezi svih steroidnih hormona je pretvaranje kolesterola u pregnenolon cijepanjem bočnog lanca kolesterola pomoću mitohondrijskog enzima citokrom P450scc (Nawata i sur. 2002, Auch 2004). Pregnenolon se enzimom citokrom P450c17 prevodi u DHEA (Slika 5.).



Slika 5. Kemijska struktura i sinteza DHEA(S).

Kratice označavaju enzime koji kataliziraju reakcije: P450scc – dezmolaza, P450c17 – 17α -hidroksilaza/c $17,20$ -lijaza, 3β HSD – 3β -hidroksisteroid dehidrogenaza, HST, SULT2A1 – hidroksisteroid sulfotransferaza. Isprekidana strjelica označava reakciju koja se ne događa kod ljudi (preuzeto i prilagođeno prema Maninger i sur. 2009).

Ovaj enzim katalizira i reakciju 17α -hidroksilacije pretvarajući pregnenolon u 17-OH pregnenolon i reakciju 17,20-liaze pretvarajući 17-OH pregnenolon u DHEA. Prelazak DHEA u stabilniji sulfatni ester DHEAS katalizira enzim DHEA sulfotransferaza. DHEAS se može pretvoriti natrag u DHEA pomoću steroidne sulfataze (Slika 5.) (Baulieu i Robel 1998, Maninger i sur. 2009).

1.3.2. DHEA(S) u središnjem živčanom sustavu

Dok je DHEAS najzastupljeniji steroidni hormon u cirkulaciji u ljudskom tijelu, glodavci, kod kojih su ti neurosteroidi među prvim otkriveni (Corpechot i sur. 1981), imaju niske koncentracije DHEA(S) u perifernoj cirkulaciji. Za razliku od ljudi koji izlučuju DHEA(S) iz nadbubrežnih žlijezda i gonada, štakori i miševi mogu samo sintetizirati i izlučiti DHEA(S) iz gonada, jer njihovim nadbubrežnim žlijezdama nedostaje enzim citokrom P450c17 (Compagnone i sur. 1995, Hojo i sur. 2003, Schonemann i sur. 2012). Kao i ljudi, štakori i miševi imaju veće koncentracije DHEA u mozgu u odnosu na krvnu plazmu (Maninger i sur. 2009). Rana istraživanja pokazala su da kod *rhesus* majmuna i ljudskih prereza fetalnog mozga DHEA prelazi u DHEAS u središnjem živčanom sustavu (Knapstein i sur. 1968) pomoću enzima DHEA sulfotransferaze čija je aktivnost u mozgu također dokazana (Shimada i sur. 2001).

1.3.3. Mehanizam djelovanja DHEA(S)

DHEA ima biološku ulogu u mnogim organima, međutim, nije pronađen niti jedan nuklearni steroidni receptor s visokim afinitetom za DHEA(S). Jedan od mehanizama djelovanja je pretvorba DHEA u perifernom tkivu u aktivnije spolne hormone, kao što su testosteron ili estradiol, te njihovo vezivanje na androgeni ili estrogenski receptor. Neke stanice, poput osteoblasta, aromatazom mogu pretvoriti DHEA u testosteron ili estradiol. Drugi mehanizam djelovanja DHEA je putem vezanja hidrofobne molekule DHEA na neke makromolekule poput enzimskih proteina i djelovanje na staničnu funkciju (Nawata i sur. 2002). Osim što DHEA(S) djeluje preko estradiola i testosterona, DHEA(S) može ostvariti svoje učinke i preko neposrednijih metabolita, poput 7α -hidroksi-DHEA (Labrie 2004). DHEA također aktivira mineralokortikoidne receptore, iako nije njihov izravni ligand, te u hipotalamusu i hipokampusu

utječe na gene koji sudjeluju u regulaciji apetita, iskorištavanju energije, budnosti, preživljavanju stanica i apoptozi. Osim toga, DHEA(S) aktiviraju specifične receptore povezane s G-proteinima u plazma membrani i potiču brzu aktivaciju ekspresije miR-21 putem estrogenskog receptora G-proteina (Švob Štrac i sur. 2020).

Iako nije pronađen jedinstveni DHEA ili DHEAS nuklearni steroidni receptor, utvrđeno je da DHEA(S) utječu na receptore i pokazuju afinitet za neka mjesta vezanja. U mozgu DHEA(S) modulira djelovanje receptora γ -aminomaslačne kiseline (GABA, od eng. *γ -amino-butiric acid*), receptora NMDA i sigma-1 (σ_1) receptora (Kurata 2004). GABA je glavni inhibicijski neurotransmiter koji se veže na metabotropne GABA_B i ionotropne GABA_A receptore koji se sastoje od pet podjedinica koje čine kloridni kanal, a regulira ih ligand (Davies 2003). DHEA i DHEAS djeluju kao nekompetitivni antagonisti GABA_A receptora, pri čemu DHEAS ima snažnije antagonističke učinke od DHEA (Majewska 1992).

DHEA(S) općenito djeluje kao pozitivni alosterični modulator glutamatnih NMDA receptora, pojačava njegovu funkciju svojim djelovanjem kao agonist σ receptora (Baulieu 1998). U hipokampusu se aktivacijom NMDA receptora veže glutamat, što može utjecati na bolju plastičnost sinapsi, učenje i dugoročnu potencijaciju (Kostakis i sur 2013). Međutim, u nehipokampalnim regijama mozga DHEA(S) može inhibirati glutamatnu neurotransmisiju kroz σ receptore, budući da je pokazano da agonisti σ receptora smanjuju oslobađanje dopamina izazvano NMDA u striatumu. Neuroprotektivni učinak DHEA protiv NMDA-inducirane eksitotoksičnosti također može uključivati signalni put kalcij/dušikov oksid, budući da je dokazano da DHEA inhibira NMDA-induciranu aktivnost NO sintetaze i proizvodnju dušikovog oksida u primarnim kulturama neurona hipokampusa (Quinn i sur. 2018).

DHEAS, ali ne i DHEA, pojačava kolinergičku funkciju u nekoliko životinjskih modela. Rhodes i sur. (1996) utvrdili su da intraperitonealno davanje DHEAS-a povećava oslobađanje acetilkolina (ACh) iz hipokampalnih neurona kod štakora. Ovaj je učinak bitan za ponašanje *in vivo*, budući da DHEAS sprječava oštećenje pamćenja izazvano antagonistom ACh receptora skopolaminom kod miševa (Maninger i sur 2009). DHEA može izravno komunicirati s određenim komponentama citoskeleta ili novim membranskim receptorima (Webb i sur. 2006).

Utvrđeno je da se DHEA veže na protein povezan s mikrotubulama 2C, koji se eksprimira u tkivima u ranim fazama razvoja, stvarajući interakcije s drugim receptorima (Maninger i sur 2009).

1.4. Neuroprotektivno djelovanje i terapijski potencijal DHEA i DHEAS

Postoje dosljedni dokazi da je DHEA neuroprotektivan kod oksidativnog stresa, neuroupale i ekscitotoksičnosti, pa je stoga moguće da DHEA pomaže u obrani mozga i ima blagotvoran učinak na kogniciju u zdravom mozgu (Quinn i sur. 2018). Može regulirati živčane funkcije svojim utjecajem na ionski kanal i ekspresiju gena koji su povezani s neurotransmiterima. Kalcij-fosfolipid-ovisna protein kinaza C (PKC) uključena je u indukciju i održavanje dugotrajnog potenciranja transdukcije signala i stoga ima ključnu ulogu u učenju i pamćenju. Sa starenjem mozga dolazi do promjene (oštećenja) mehanizama koji uključuju aktivnost PKC, a primjena DHEA kod starijih mužjaka glodavaca može modulirati s godinama povezano oštećenje transdukcije PKC signala. DHEA tako može neizravno smanjiti oštećenje kognitivnih funkcija uzrokovano starenjem zbog čega je i prihvaćen kao farmakološka supstanca u borbi protiv starenja. Prema Sinha i sur. (2008.), primjena DHEA kod starijih životinja značajno smanjuje povećanu aktivnost monoaminooksidaze, peroksidaciju lipida i nakupljanje lipofuscina u mozgu. DHEA također usporava pad aktivnosti superoksid dismutaze i $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATP-aze u mozgu starih štakora (Baquer i sur 2009).

DHEA(S) može modulirati rad mozga, narušen u starijoj dobi, utječući na različite neurotransmitterske sustave, te utjecati na kognitivne funkcije moduliranjem upalnih mehanizama (Dillon 2005, Chung i sur. 2009). Dobni pad razine DHEA(S) mogao bi dovesti do povišenih razina proupalnih citokina, što rezultira neuroupalom i posljedičnom neurodegeneracijom (Haffner i sur. 1994). Pretpostavlja se da bi više β -amiloidnih plakova moglo uzrokovati povećanje koncentracije DHEA(S) u mozgu. Povećane razine DHEA u mozgu bolesnika AD-om, posebno u hipokampusu, mogu biti rezultat oksidacijskog stresa uzrokovanog stvaranjem A β (Brown i sur. 2003). Eksperimenti na uzgojenim stanicama pokazali su da DHEA(S) može utjecati na metabolizam APP-a, čija disregulacija dovodi do nakupljanja A β plakova (Gandy 2002). Također se pretpostavlja da DHEA pokazuje zaštitnu ulogu u slučaju toksičnosti

uzrokovane nakupljanjem A β inhibirajući nastanak A β putem modulacije signalizacije PI3K-Akt-mTOR-p70S6k posredovane receptorima sigma-1 (Li i sur. 2010). Nekoliko je studija pokazalo da DHEA, DHEAS i njegov prekursor, pregnenolon, utječu na povećanje kalcijevih iona induciranih peptidom A β i na taj način postižu svoje neuroprotektivne učinke (Kawahara i sur. 2009). Neurosteroidi, poput DHEA(S), mogu modulirati fosforilaciju proteina tau zbog svoje uloge u održavanju redoks homeostaze (Grimm i sur 2016). Koncentracija proteina tau negativno i značajno korelira s koncentracijom DHEAS-a u hipotalamusu, što ukazuje na potencijalnu neuroprotektivnu ulogu DHEAS-a u AD-u (Weill-Engerer i sur 2002, Wojtal i sur 2006, Manninger i sur 2009). Poveznice između proteina tau i neurosteroida primijećene su i u stanicama neuroblastoma (Schaeffer i sur 2996). Povišenje neurosteroida praćeno je hiperekspresijom divljeg tipa proteina tau i smanjenjem hiperfosforiliranog tau (Grimm i sur. 2012, Švob Štrac i sur. 2020).

Postoje dokazi da je DHEAS neuroprotektivan protiv glutamata, NMDA, AMPA, kainske kiseline i oksidativnog stresa izazvanog H₂O₂ i natrijevim nitroprusidom. Budući da i glutamatni i oksidativni stres imaju presudnu ulogu u patogenezi neuronske ishemije, sugerira se da DHEAS također može zaštititi od ishemijskog oštećenja mozga. DHEAS djeluje kao neuroprotektant u primarnoj kulturi stanica cerebelarnih zrnaca podvrgnutih OGD-u, a učinak je povezan s antiapoptotičkim i GABA_A-receptorima (Kaasik i sur. 2001). Mehanizam kojim bi DHEAS mogao promicati neurogenezu i preživljavanje neurona u SŽS-u (središnji živčani sustav) je posredovanje moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF, od eng. *brain-derived neurotrophic factor*). Neurotrofin BDNF se eksprimira u nekoliko područja SŽS-a i neophodan je za proliferaciju i diferencijaciju neurona. Uz to, BDNF ima vitalnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, pojačava dugoročno potenciranje i promiče učenje i pamćenje (Quinn i sur. 2018).

Uočena antioksidativna, antiapoptotska, antiglukokortikoidna i protuupalna svojstva DHEA mogla bi biti uključena u njegove mehanizme neuroprotekcije (Powrie i Smith, 2018). Brojne studije pokazale su antioksidativna svojstva DHEA (Tamagno i sur 1998, Jacob i sur. 2008, Li i sur. 2018), ali su primijećena i njegova prooksidacijska svojstva, ovisno o dozi, tkivu i vremenu primjene (Tamagno i sur. 1998, Gallo i sur 1999, Mastrocola i sur. 2003). Nešto veće koncentracije DHEA smanjuju peroksidaciju lipida, dok DHEA u farmakološkim dozama

pokazuje prooksidacijsko djelovanje (Gallo i sur. 1999). Jedan od glavnih signalnih putova DHEA vjerojatno uključuje fosfatidilinozitol 3-kinaza/Akt signalnu kaskadu. Akt je serin/treonin kinaza koja može biti stimulirana RKV-om i inzulinom, ali i kao odgovor na kronični tretman s DHEA (Jacob i sur. 2008, Li i sur, 2018). Li i sur. 2018 uočili su da je u *in vitro* uvjetima predtretman DHEA inhibirao proizvodnju OH iona stimulirajući aktivnost peroksidaze i smanjio gensku ekspresiju Bax, kaspaze-9 i kaspaze-3, što dovodi do niže stope apoptoze. DHEA bi svoje antioksidativne učinke mogao ostvariti i neizravno inhibicijskim učinkom na glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, što rezultira nižom razinom NADPH i smanjenom proizvodnjom slobodnih radikala ovisnom o NADPH (Schwartz i Pashko 2004), te djelujući kao kelator za metale (Tamagno i sur. 1998), sprječavajući tako aktivacija enzima koji generiraju RKV. Stoga bi se moglo zaključiti da DHEA sam po sebi nije antioksidant ili prooksidant, već ometa signalnu kaskadu uključenu u metabolizam RKV-a i drugih radikala. Uočeno je da DHEA(S) mogu stimulirati sigma receptore i smanjiti tok Ca^{2+} u mitohondrijima kao odgovor na eksitotoksičnost (Kurata i sur, 2004, Cheng i sur. 2008), koja je prisutna tijekom ishemije, i jedan je od prvih događaja u propadanju neurona (Gorlach i sur. 2015). Neuroprotektivna svojstva DHEA uočena su u različitim modelima, uključujući životinjske modele neurodegeneracije (Maurice i sur. 2000), model ishemije kod štakora (Yabuki i sur. 2015), model starijih štakora (Kumar i sur. 2008), ali i u staničnim modelima ishemije, neurotoksičnosti i neurodegeneracije (Grimm i sur. 2014, Vieira-Marques i sur 2016, Švob Štrac i sur. 2020).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

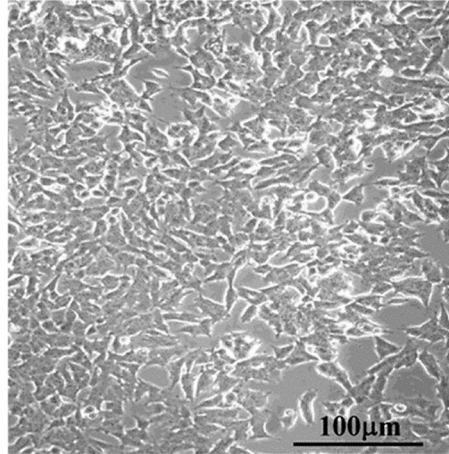
Cilj ovog rada je istražiti i razjasniti potencijalne učinke neurosteroida DHEA i njegovog sulfata (DHEAS) u prevenciji stanične smrti inducirane ishemijskom ozljedom, i promicanju preživljavanja neuralnih stanica *in vitro*, primjenom modela deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGD/R) na dva stanična modela, humanim neuroblastoma SH-SY5Y stanicama, te primarnoj kulturi mišjih neurona.

3. MATERIJALI METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y

Stanice slične neuroblastu, SH-SY5Y, subklon su roditeljske stanične linije neuroblastoma SK-N-SH (Slika 6.). Roditeljska stanična linija generirana je 1970. godine iz biopsije koštane srži koja sadrži stanice poput neuroblasta i epitela. SH-SY5Y stanice imaju stabilan kariotip koji se sastoji od 47 kromosoma i mogu se diferencirati od stanja sličnog neuroblastu u zrele ljudske neurone kroz niz različitih mehanizama, uključujući upotrebu retinoične kiseline, estera forbola i specifičnih neurotrofina kao što je BDNF. Upotrebom različitih metoda moguće je i postići diferencijaciju u specifične podtipove neurona, kao što su adrenergični, kolinergični i dopaminergični neuroni. Ovaj posljednji aspekt čini stanice SH-SY5Y korisnima za mnoštvo neurobioloških eksperimenata.



Slika 6. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y (Escargueil i sur, 2011).

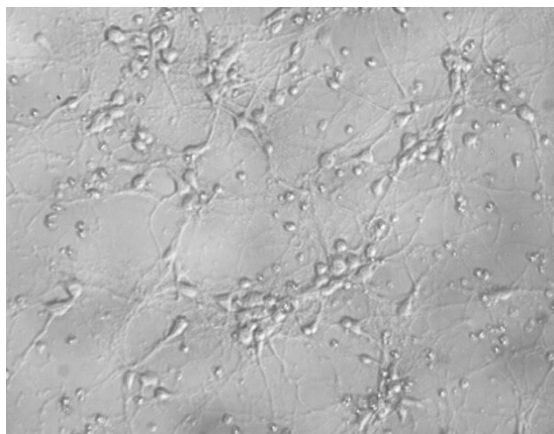
Postoje važne razlike između SH-SY5Y stanica u njihovim nediferenciranim i diferenciranim stanjima. Kad su stanice SH-SY5Y nediferencirane, brzo se razmnožavaju i čini se da nisu polarizirane. Često rastu u nakupinama i izražavaju markere koji ukazuju na nezrele neurone. Kad se diferenciraju, ove stanice imaju duge aksone/dendrite, smanjenu proliferaciju i u nekim slučajevima polariziraju. Korištenje SH-SY5Y stanica povećalo se od uspostavljanja podklona 1973. Neki primjeri njihove upotrebe, većinom u nediferenciranom obliku, uključuju istraživanja vezana za Parkinsonovu bolest i AD (Shiplej i sur. 2016).

3.1.2. Primarna kultura mišjih neurona

Primarnu kulturu mišjih neurona (Slika 7.) izolirala sam iz embrija C57BL/6 miševa u gestacijskoj dobi od 15 dana prema dolje navedenom protokolu (vidi 3.2.1.). U tablici 3. su navedene kemikalije potrebne za izolaciju neurona te za oblaganje ploča za uzgoj stanica poli-D-lizinom.

Tablica 3. Kemikalije za izolaciju neurona i oblaganje ploča poli-D-lizinom.

Kemikalije za izolaciju neurona	Kemikalije za oblaganje ploča poli-D-lizinom
Hankova solna otopina (Lonza), DNAza (Sigma), Albumax (Gibco), inhibitor tripsina (Sigma), 2,5 tripsin (10x) bez fenol crvene boje (Invitrogen), B27 50x dodatan (Gibco), Ultraglutamin (Lonza), Penicilin (Sigma), Streptomycin (Sigma), neurobazalni medij (Gibco), trituracijska otopina (otopina 0,5 mg goveđeg serumskog albumina bogatog lipidima (Albumax, Gibco) i 25 mg inhibitora tripsina (Sigma T9003) u HBSS-u).	Borna kiselina, boraks, sterilna dH ₂ O, natrijev hidroksid, poli-D-lizin (Sigma), DMEM (Gibco).



Slika 7. Primarna kultura neurona izolirana iz embrija C57BL/6 miševa.

3.1.3. Uzgoj stanica

Sastav otopina koje sam koristila za uzgoj i presađivanje SH-SY5Y stanica i primarne kulture neurona prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Sastav otopina korištenih za uzgoj stanica i neurona.

Potpuni i kompletirani medij za SH-SY5Y stanice	<p>Medij DMEM (od eng. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco):</p> <ul style="list-style-type: none"> • s visokim udjelom glukoze (4500 mg/L) s 10% fetalnim goveđim serumom (Gibco) (inaktiviranim 60 minuta na 56°C), • 2 mM L-glutaminom (Sigma), • 100 U/ml penicilinom (Sigma), • 100 µg/ml streptomycinom (Sigma), • 2,5 ug/ml amfotericinom B (Sigma); • pH 7,4; steriliziran filtriranjem kroz 0,2 uM filter
Potpuni i kompletirani medij za neurone	<p>Neurobazalni medij (Gibco):</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mM L-glutaminom (Sigma), • 100 U/ml penicilinom (Sigma), • 100 µg/ml streptomycinom (Sigma), • supstancom B27 (Gibco); • pH 7,4; • steriliziran filtriranjem kroz 0,2 uM filter
Medij bez glukoze i seruma za OGD	<p>Medij DMEM bez glukoze i fetalnog goveđeg seruma:</p> <ul style="list-style-type: none"> • s 2 mM L-glutaminom, • 100 U/ml penicilinom, • 100 µg/ml streptomycinom, • 2,5 ug/ml amfotericinom B (Sigma); • pH 7,4; • steriliziran filtriranjem kroz 0,2 uM filter
Puferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBSA)	<ul style="list-style-type: none"> • 137 mM NaCl, • 2,7 mM KCl, • 8,1 mM Na₂HPO₄, • 1,4 mM KH₂PO₄; • pH 7,4
Otopina tripsina za presađivanje stanica	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05% tripsin, • 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) u PBSA
Antimikotik	<ul style="list-style-type: none"> • amfotericinom B (Sigma)
Antibiotici	<ul style="list-style-type: none"> • penicilin (Sigma), streptomycin (Sigma)
Otopina tripanskog modrila (Trypan blue)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,4% tripansko modrilo, • 0,81% NaCl, • 0,06% K₂HPO₄

3.1.4. Lijekovi

Matične otopine DHEA (Avanti) i DHEAS (Supelco) kupljene su pripremljene u metanolu, koncentracije 1 mg/ml. Radnu otopinu koncentracije 10 µM pripremila sam otapanjem u

redestiliranoj sterilnoj vodi. U slučaju DHEA, 14,5 µl matične otopine ($c = 3,48 \text{ mM}$) otopila sam u sterilnoj redestiliranoj vodi do konačnog volumena od 5 ml. Radnu otopinu DHEAS-a pripremila sam otapanjem 21,4 µl matične otopine ($c = 2,34 \text{ mM}$) u sterilnoj redestiliranoj vodi do konačnog volumena od 5 ml. Razrjeđenjem u odgovarajućem mediju (DMEM ili neurobazalni medij) do konačnih koncentracija od 10, 100, 500 i 1000 nM sam pripremila konačne koncentracije DHEA i DHEAS-a u pokusima neuroprotekcije.

3.1.5. Materijali za određivanje vijabilnosti stanica

MTT (Sigma), PBSA, dimetil-sulfoksid (Sigma), tripsin (Sigma), neurobazalni medij (Gibco), MUSE (Luminex).

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija primarnih mišjih neurona

3.2.1.1. *Oblaganje ploča za uzgoj stanica poli-D-lizinom*

Za nasađivanje mišjih neurona ploče za uzgoj stanica prethodno sam obložila poli-D-lizinom. Matične otopine poli-D-lizina pripremila sam otapanjem 10 mg poli-D-lizina (Sigma) u boratnom puferu do koncentracije od 4 mg/ml. Dan prije izolacije neurona, matičnu otopinu poli-D-lizina otopila sam dodatno u boratnom puferu kako bih dobila radnu otopinu koncentracije 0,02 mg/ml, te sam ju sterilizirala filtracijom kroz 0,2 µm filter.

U ploče s 24 jažice otpipetirala sam po 500 µl, a u ploče s 96 jažica po 125 µl radne otopine poli-D-lizina u svaku jažicu. Sve pločice sam zamotala u aluminijsku foliju i inkubirala preko noći u inkubatoru na 37 °C. Sutradan sam, prije nasađivanja neurona, aspirirala poli-D-lizin iz svih jažica, te sam sa sterilnom vodom sve jažice isprala tri puta. Do nasađivanja neurona, u sve jažice sam dodala DMEM, potom sam ploče stavila u inkubator na 37 °C.

3.2.1.2. Izolacija neurona i nasađivanje na ploče za uzgoj stanica

Neurone sam izolirala iz embrija C57BL/6 miševa u gestacijskoj dobi od 15 dana. Nakon što je ženka anestezirana, izvadila sam embrije kojima sam odvojila glave te izdvojila mozgove.

Embrionalne mozgove stavila sam u Hankovu solnu otopinu (Lonza) (HBSS, od eng. *Hanks balanced saline solution*) i pod lupom pažljivo uklonila cerebelum i meninge. Izolirane mozgove sam prebacila u plastičnu epruvetu i isprala dodatno s 10 ml HBSS-a. Nakon ispiranja, u epruvetu sam dodala 5 ml sterilnog HBSS-a i 100 μ l 2,5% tripsina, te inkubirala 20 minuta na 37 °C, uz okretanje epruvete gore-dolje svakih 5 minuta. Potom sam dodala 5 ml 10 μ g/ml DNaze (Sigma), i nakon okretanja epruvete dva puta, odsisala supernatant. Kroz staklenu pasterku s uskim otvorom sam, uz dodatak otopine za trituiranje (1 ml), trituirala 10-ak puta laganim pipetiranjem. Nakon toga sam na trituirano tkivo dodala 1 ml DMEM-a po mozgu te sam otopinu profiltrirala kroz cjedilo od 70 μ m (eng. *cell streiner*) u plastičnu epruvetu od 50 ml. Otopinu sam centrifugirala 5 minuta na 300 g, a talog resuspendirala u 1 ml DMEM-a po mozgu. Neurone sam izbrojala i nasadila na ploče za uzgoj stanica prethodno obložene poli-D-lizinom. Nakon 4 sata sam zamijenila DMEM u kojem sam nasadila neurone neurobazalnim medijem. Prije daljnjih eksperimenata neurone sam ostavila u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂ 5 do 7 dana, uz promjenu medija svaka tri dana.

3.2.2. Kultivacija SH-SY5Y stanica

3.2.2.1. Odmrzavanje SH-SY5Y stanica

Ampule sa stanicama sam izvadila iz spremnika s tekućim dušikom i otopila kratkom inkubacijom u vodenoj kupelji na 37 °C. Stanice sam zatim stavila u 5 ml hranjivog medija zagrijanog na 37°C i centrifugirala pet minuta na 300 g. Resuspendirala sam talog stanica u novih 5 ml zagrijanog medija, a navedenu staničnu suspenziju prenijela u bočicu za uzgoj staničnih kultura (75 cm², 250 ml) s dodatnih 5 ml medija te inkubirala na 37°C i 5% CO₂.

3.2.2.2. Presađivanje stanica

Rasađivala sam SH-SY5Y stanice nakon što su postizale konfluentnost na način da sam prvo odisala medij, a stanice isprala dva puta s otopinom PBSA čime sam uklonila sav medij. Potom sam inkubirala stanice 1 minutu u 0,05% tripsinu, kako bi se odvojile od podloge, a njegovu inaktivaciju sam postigla dodatkom DMEM-a sa serumom. Resuspendirala sam stanice pipetom te sam dio stanične suspenzije uz dodatak medija ostavila za daljnju inkubaciju, a dio nasadila na ploče za uzgoj stanica s 96 ili 24 jažice.

3.2.3. Nasađivanje stanica i održavanje staničnih kultura

3.2.3.1. Brojanje stanica

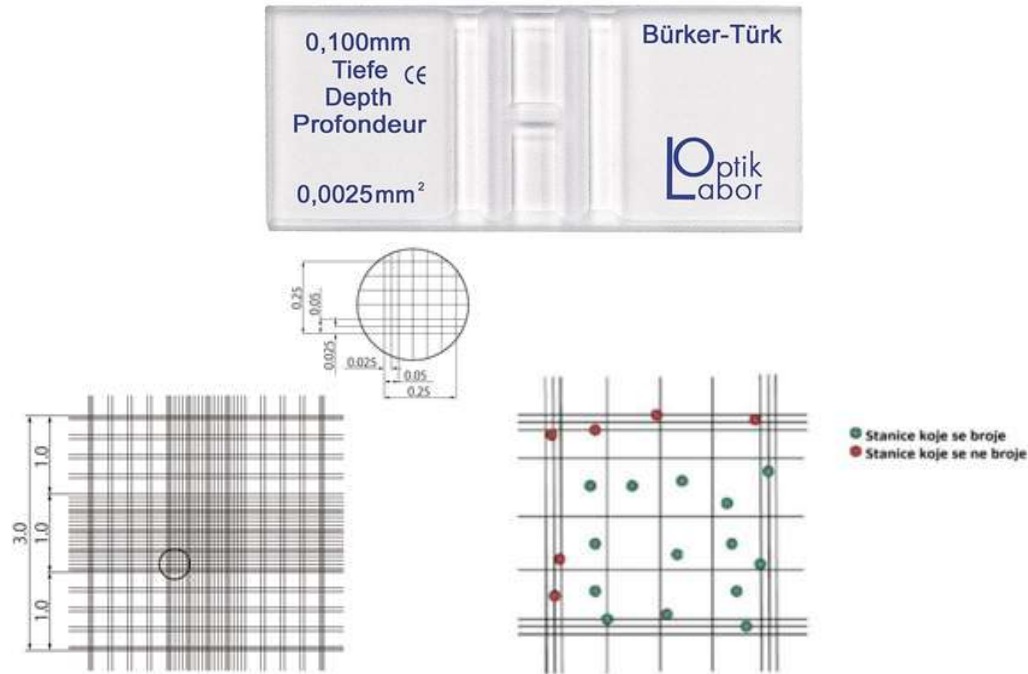
Kako bih znala u kojoj koncentraciji ću rasaditi stanične kulture, prvo sam brojala stanice. Postupak pripreme stanica za brojanje je jednak u slučaju neurona te stanica SH-SY5Y. Nakon što sam centrifugirala staničnu suspenziju 5 minuta na 300 g dobiveni talog sam resuspendirala u željenoj količini medija. Potom sam dodala 40 μ l suspenzije stanica, 60 μ l DMEM-a/neurobazalnog medija i 100 μ l tripanskog modrila pomiješala i nanijela na Bürker-Türkovu komoricu (Slika 8.).

Pod invertnim mikroskopom brojala sam samo žive stanice koje ostaju bezbojne budući da izbacuju Tripansko modrilo, dok boja prodire u mrtve stanice kod kojih je narušena cjelovitost membrane. Žive i mrtve stanice brojala sam u 4 puta po 16 polja, a broj stanica u mililitru dobila sam prema formuli:

$$\text{broj stanica u ml} = \frac{\text{izbrojen broj stanica}}{64} * 5 * 250 * 10^3$$

$$\text{Stanična vijabilnost} = \text{broj vijabilnih (nebojenih) stanica/ukupan broj stanica}$$

I neurone i stanice SH-SY5Y nasadila sam na oba tipa ploča za uzgoj stanica u koncentraciji od oko 2×10^5 stanica/ml.



Slika 8. Bürker-Türkova komorica i prikaz načina brojanja stanica.

(<https://www.wasderarztbraucht.de/Laborbedarf/Zubehoer/Zaehlkammer-nach-Buerker-Tuerk-doppelt-mit-CE-Zeichen>, https://www.researchgate.net/figure/Buerker-chamber-and-Fast-Read-102R-cell-count-method-The-Buerker-chamber-has-9-large_fig2_225084954)

3.2.3.2. Održavanje kulture stanica SH-SY5Y i primarne kulture neurona

Izolirane neurone nasadila sam na pločice za uzgoj stanica, prethodno presvučene poli-D-lizinom, u neurobazalnom mediju s dodatkom B27, L-glutamina i antibiotika. Neurone sam uzgajala u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂) tijekom 5 dana, nakon čega sam ih upotrijebila u daljnjim eksperimentima. SH-SY5Y neuroblastoma stanice sam uzgojila na pločicama u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂) u DMEM hranjivom mediju s dodatkom L-glutamina, fetalnog goveđeg seruma i antibiotika. Medij sam mijenjala sa svježim svaka dva do tri dana.

3.2.4. Deprivacija glukoze i kisika, te reperfuzija

Za OGD/R model sam koristila posebno dizajniranu zračno-izoliranu modularnu komoru ispunjenu samo s N₂ (Slika 9.).

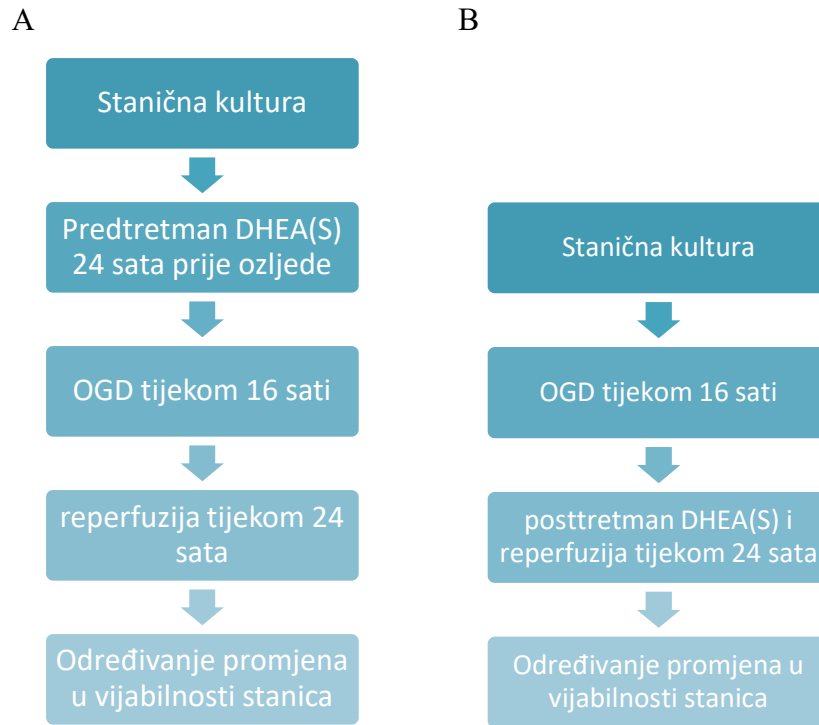


Slika 9. Posebno dizajnirana nepropusna modularna inkubacijska komora za hipoksiju (<http://alllab.net/product/hypoxia-chamber/42/>)

Odsisala sam sav hranjivi medij stanicama koje sam nasadila na ploču za uzgoj stanica s 24 jažice, te dodala 500 μ l medija bez glukoze i seruma, dok sam stanicama koje sam nasadila na ploče s 96 jažica, odsisala medij i dodala 200 μ l medija bez glukoze i seruma. Obje pločice sam stavila u komoru, koju sam ostavila u inkubatoru na 37 °C tijekom 16 sati. Nakon toga sam stanicama odsisala medij bez glukoze i seruma, te dodala DMEM/neurobazalni medij kako bi se uspostavila reperfuzija. Stanice sam ostavila u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂) 24 sata.

3.2.5. Primjena tretmana

Obje stanične kulture sam tretirala odgovarajućim koncentracijama DHEA i DHEAS-a (10, 100, 500 i 1000 nM) 24 sata prije ozljede (predtretman) ili 24 sata nakon ozljede (posttretman) (Slika 10.).



Slika 10. Tijek istraživanja neuroprotektivnog djelovanja DHEA(S) na SH-SY5Y staničnoj kulturi i neuronima; (A) predtretman i (B) posttretman.

DHEA(S) – dihidroepiandrosteron i dihidroepiandrosteron sulfat, OGD – deprivacija kisika i glukoze

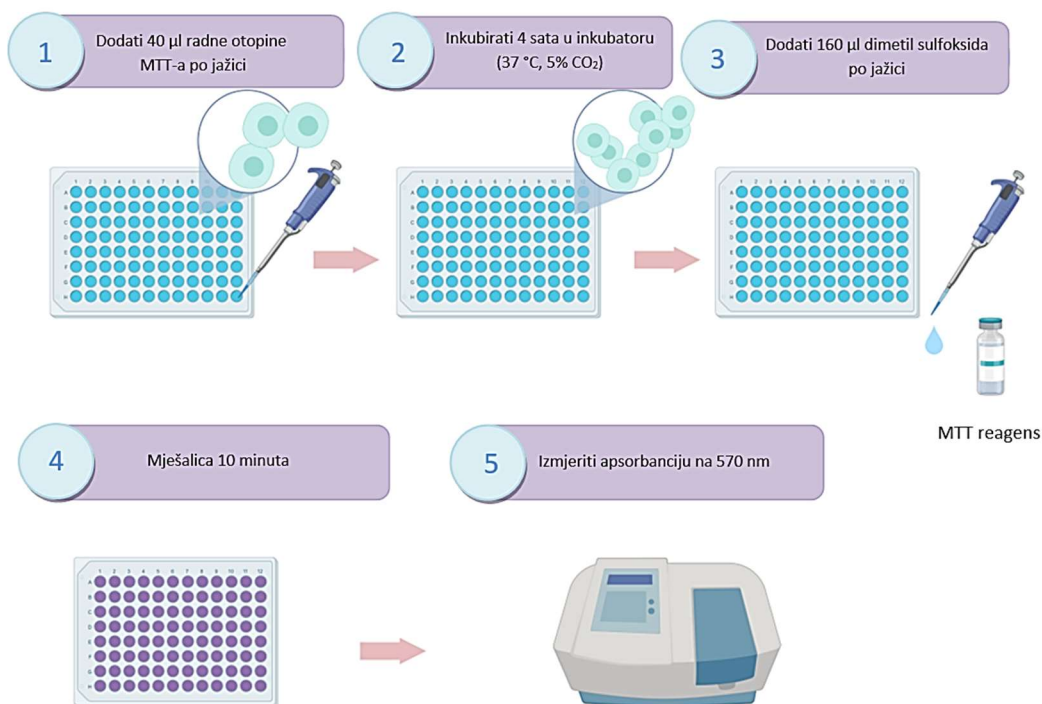
3.2.6. Mjerenje vijabilnosti stanica

3.2.6.1. MTT test

Kolorimetrijski MTT test bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Očitana apsorbancija na 570 nm proporcionalna je broju živih stanica u uzorku.

Za MTT test sam stanicama i neuronima odsisala medij. Potom sam dodala 40 μ l radne otopine MTT-a (0,5 mg/ml), koju sam pripremila otapanjem matične otopine MTT-a u odgovarajućem mediju (DMEM ili neurobazalni medij), na svaku jažicu (ploča s 96 jažica). Nakon inkubacije u inkubatoru na 4 sata (37 °C, 5% CO₂), dodala sam 160 μ l dimetil sulfoksida (Sigma) po jažici. Potom su se stanice treskale na miješalici 10 minuta, nakon čega je

apsorbancija izmjerena pri 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Slika 11.) (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader).



Slika 11. Kronološki prikaz postupka MTT testa (preuzeto i prilagođeno prema <https://theferalexplorer.wordpress.com/2019/07/05/understanding-mtt-assay/>).

3.2.6.2. Kvantitativna analiza Muse® Count & Viability testom

Muse® Count & Viability komercijalni kit omogućuje kvantitativnu analizu broja i vijabilnosti stanica na Guava® Muse® Cell Analyzer uređaju (Slika 13.) (Luminex). Pruža apsolutne podatke o broju i vijabilnosti stanica u staničnim suspenzijama iz različitih uzgajanih staničnih linija sisavaca. Žive i mrtve stanice su različito obojene na temelju njihove propusnosti za DNA-vezujuće boje u reagensu.

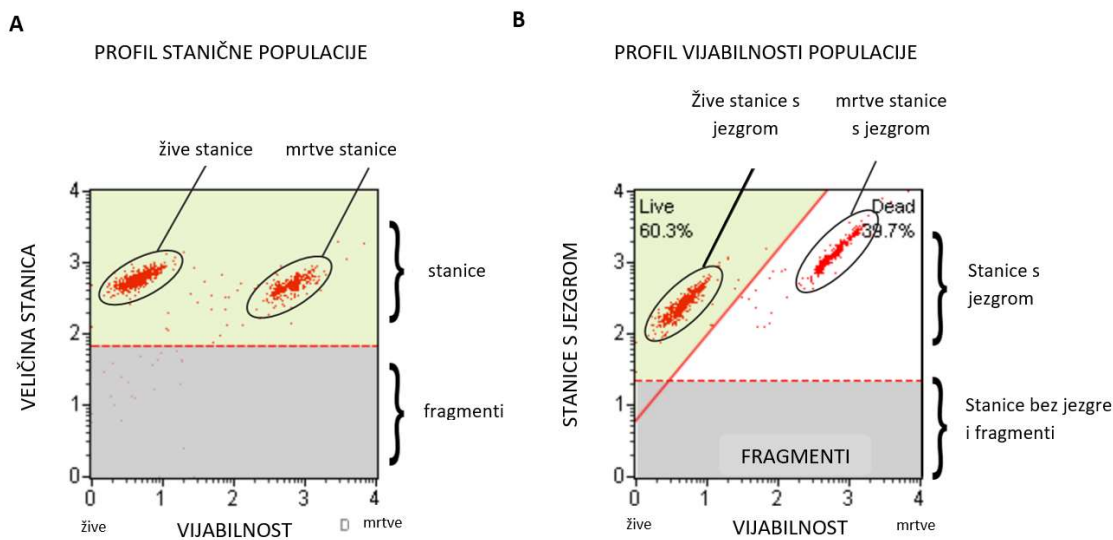
Podaci generirani pomoću Muse® Count & Viability softverskog modula pružaju:

- 1) broj živih stanica (stanica / ml)
- 2) ukupan broj stanica (stanice / ml)
- 3) % vijabilnosti uzorka

Muse® Count & Viability reagens diferencirano boji žive i mrtve stanice na temelju njihove propusnosti za dvije DNA vezujuće boje prisutne u reagensu. Uređaj automatski prikazuje podatke na dva načina (Slika 12.):

- Boja koja veže DNA u reagensu boji stanice koje su izgubile integritet membrane, omogućujući boji da oboji jezgru mrtvih i umirućih stanica. Ovaj se parametar prikazuje kao „PROFIL STANIČNE POPULACIJE” i koristi se za razlikovanje živih (žive stanice koje se bojaju) od mrtvih (mrtve ili umiruće stanice koje se bojaju).

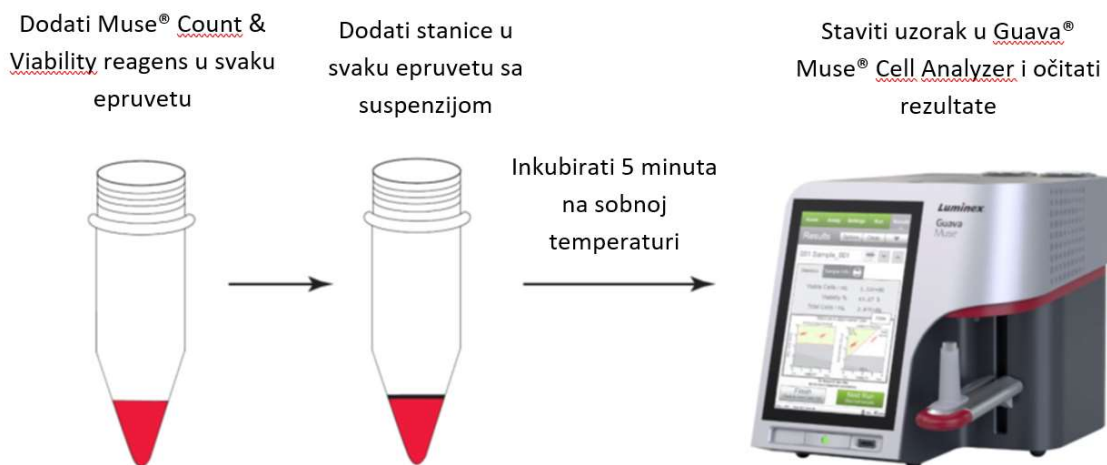
- Boja za DNA koja je membranski propusna i boja sve stanice s jezgrom. Ovaj se parametar prikazuje kao „PROFIL VIJABILNOSTI POPULACIJE” i koristi se za razlikovanje stanica s jezgrom od fragmenata i stanica bez jezgre. Muse® sustav broji obojene stanice s jezgrom, a zatim koristi svojstva stanične veličine kako bi razlikovao slobodne jezgre i stanične ostatke od stanica, kako bi odredio točan ukupan broj stanica.



Slika 12. Profil stanične populacije prikazuje se razlikovanjem živih i mrtvih stanica (A), dok se profil vijabilnosti populacije prikazuje razlikovanjem živih stanica s jezgrom od mrtvih stanica s jezgrom te staničnih fragmenata (B).

Za MUSE test sam odsisala medij stanicama SH-SY5Y i neuronima te isprala dva puta s 500 µl PBSA, zatim tripsinizirala s 200 µl 0,05% tripsina po jažici. Nakon 2 minute dodala sam 500µl DMEM-a ili neurobazalnog medija u jažicu. U odgovarajuće plastične epruvete sam

prebacila sav odsisan medij, PBSA te tripsin. Potom sam centrifugirala staničnu suspenziju 5 minuta na 300 g. Odlila sam supernatant, a talog resuspendirala u 200 μ l DMEM-a ili neurobazalnog medija. Dodala sam 50 μ l stanične suspenzije u 450 μ l MUSE otopine, prema preporukama proizvođača, s obzirom da je gustoća nasađenih stanica između 1×10^5 i 1×10^6 stanica/mL.



Slika 13. Postupak Muse® Count & Viability testa.

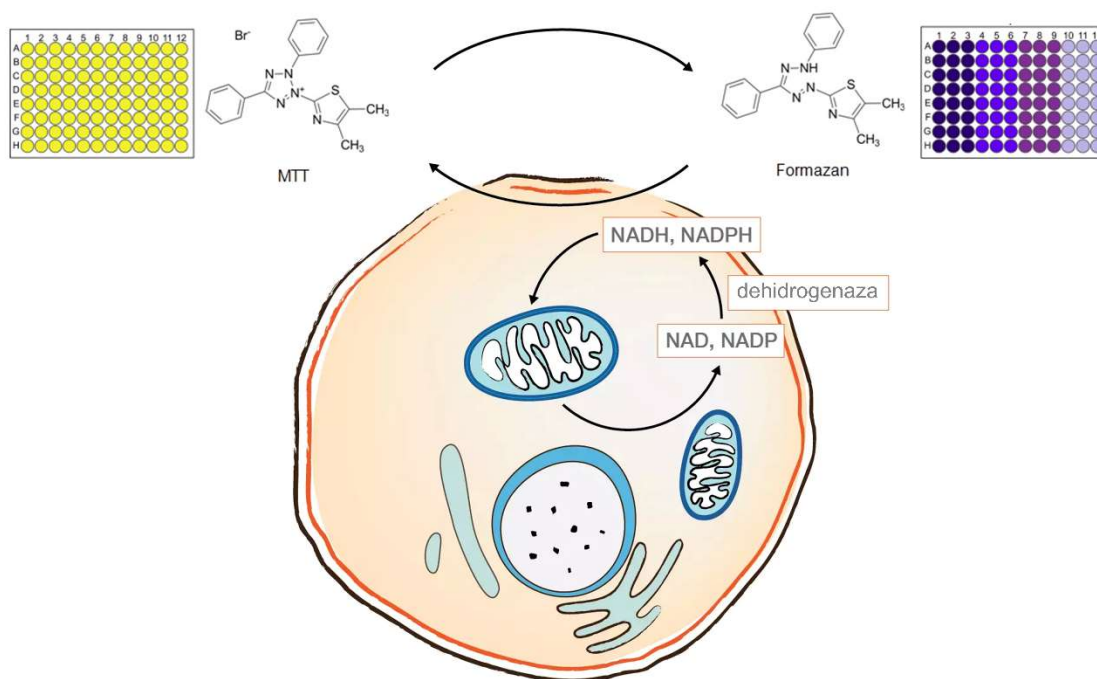
3.2.7. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu rezultata koristila sam program GraphPad Prism verzija 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD), a za grafički prikaz istih program Microsoft Excel 2019. Student t-testom sam analizirala razlike između skupina, u slučaju usporedbe dvije skupine, ili jednostrukom analizom varijance (ANOVA) i *post-hoc* Tukey testom kada sam uspoređivala više od dvije skupine. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost i standardnu devijaciju (S.D.) u obliku postotka. Razinu značajnosti α za sve analize postavila sam na 0,05, a svi korišteni testovi bili su dvosmjerni.

4. REZULTATI

4.1. Vijabilnost stanica nakon OGD-a: test MTT

Testom MTT ispitan je učinak nedostatka kisika i glukoze na neurone koji su izolirani iz embrija C57BL/6 miševa te staničnu kulturu SH-SY5Y. Također, proučavan je i potencijalni neuroprotektivni učinak DHEA i DHEAS-a u različitim koncentracijama (10 nM, 100 nM, 500 nM i 1000 nM) u slučaju kad se isti koriste kao predtretman (tretman u trajanju od 24 sata prije ozljede OGD-om) ili kao posttretman (tretman u trajanju od 24 sata nakon ozljede OGD-om). Test MTT mjeri aktivnost enzima dehidrogenaza koji se nalazi u mitohondrijima metabolički aktivnih stanica (Slika 14.). Intenzitet obojenja pojedinih jažica na ploči za uzgoj stanica proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica.



Slika 14. Princip testa MTT.

Vrijednost intenziteta obojenja (apsorbancija, A) za svaku pojedinu testnu ili kontrolnu jažicu korigiran je oduzimanjem prosječne pozadinske apsorbcije koja je izmjerena u jažicama s negativnom kontrolom (bez nasađenih stanica). Svi rezultati su prikazani kao % vijabilnosti

stanica u odnosu na kontrolu koja nije bila izložena ozljedi OGD. Ovaj omjer je izračunat prema formuli:

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

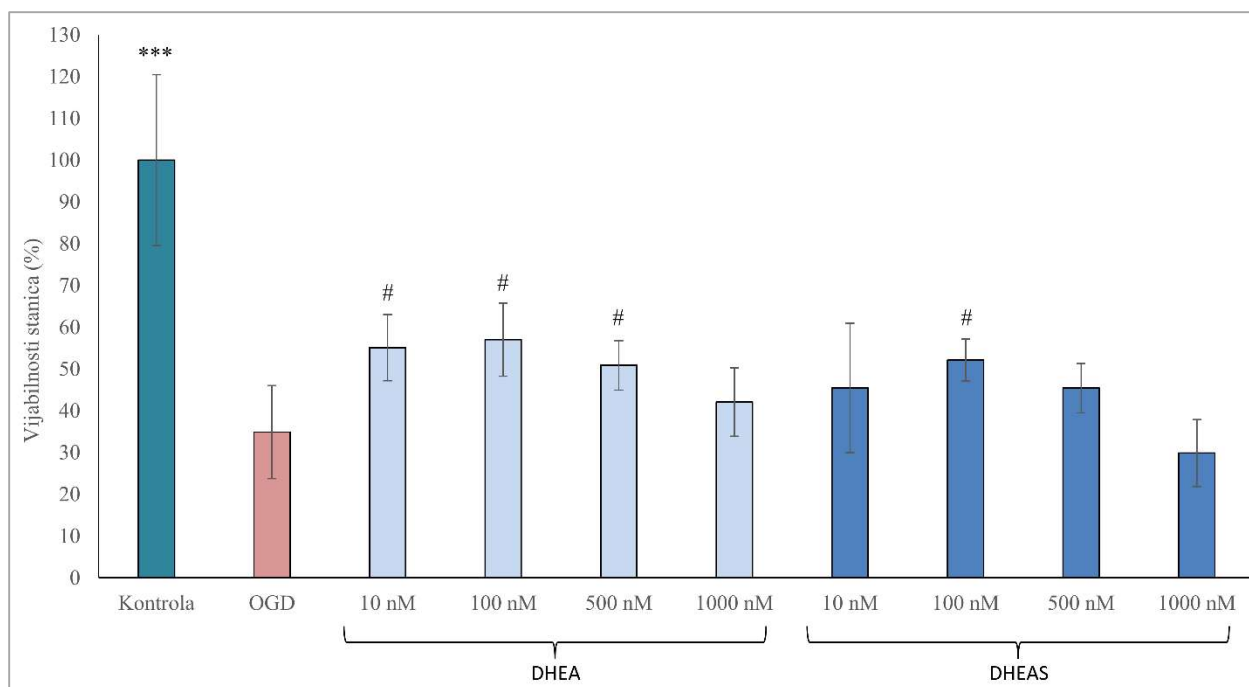
Za svaki od tretmana, prije ili poslije ozljede, kontrolu te ozljedu bez tretmana napravljeno je 8 mjerenja po jednoj ploči za uzgoj stanica tako da su rezultati grafički prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica (%) \pm standardna devijacija (S.D.).

4.1.1. Primarna kultura mišjih neurona

4.1.1.1. Vijabilnost neurona određena testom MTT nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati testa MTT nakon predtretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 15. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: $100,0 \pm 20,5$ vs. OGD: $34,9 \pm 11,1$; $F(9, 116) = 44,82$; $F(9, 116) = 41,56$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su predtretirane s DHEA ili DHEAS te zatim izložene OGD-u ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju predtretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da je metabolička aktivnost stanica značajno veća u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana, kada su korištene niže koncentracije DHEA, odnosno 10 nM DHEA ($p = 0,001$; ANOVA post-hoc test), 100 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEA ($p = 0,029$; ANOVA post-hoc test). Predtretman s DHEA povećao je vijabilnost stanica s 34,9% nakon OGD-a na preko 50% u slučaju svih testiranih koncentracija DHEA (Slika 15.), a najučinkovitiji je bio tretman sa 100 nM DHEA. U slučaju predtretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je samo u slučaju 100 nM DHEAS-a ($p = 0,013$; ANOVA post-hoc test). Kada je korištena najveća koncentracija DHEAS-a (1000 nM) uočljiv je čak i toksični učinak na stanice, odnosno pad vijabilnosti stanica na 29,9% (Slika 15.).



Slika 15. Vijabilnost, odnosno metabolička aktivnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, određena testom MTT, nakon OGD-a te predtretmana s DHEA ili DHEAS.

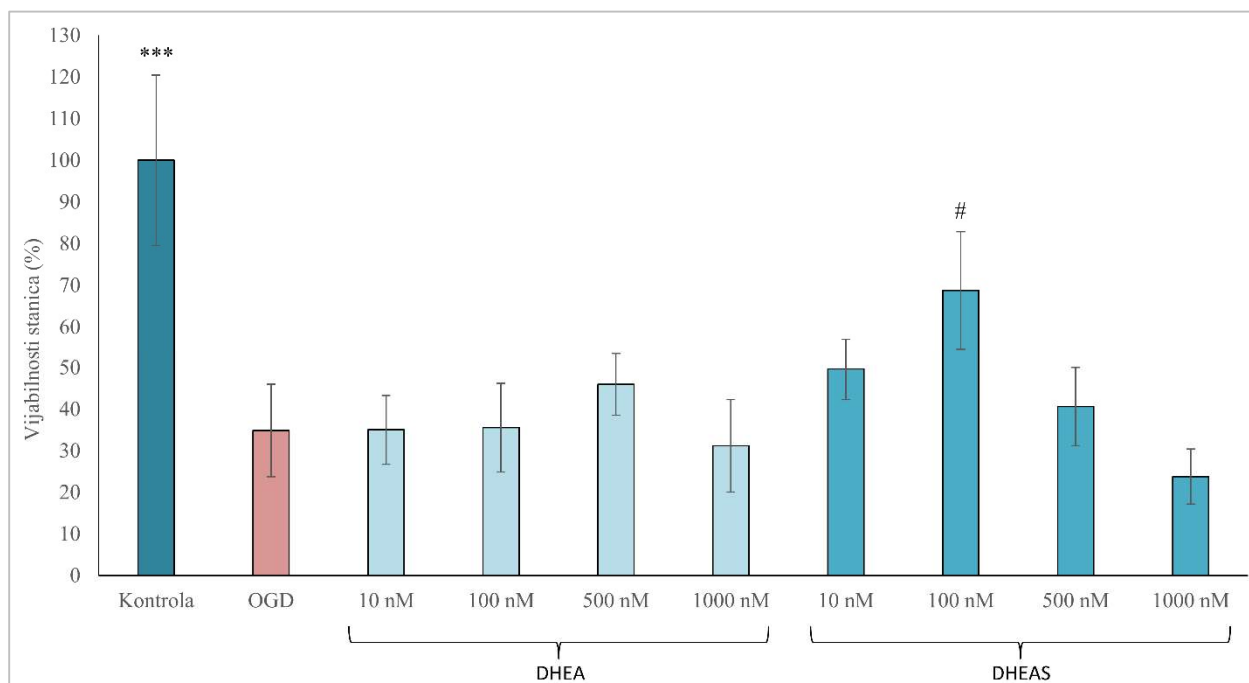
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. *** $p < 0,001$ vs. OGD, DHEA(S); # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.1.1.2. Vijabilnost neurona određena testom MTT nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati testa MTT nakon posttretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 16. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: $100,0 \pm 20,5$ vs. OGD: $34,9 \pm 11,1$; $F(9, 116) = 44,82$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod stanica koje su izložene OGD-u te zatim tretirane s DHEA ili DHEAS ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju posttretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da nije bilo značajnog poboljšanja metaboličke aktivnosti stanica u odnosu na onu nakon OGD-a bez naknadnog tretmana. Trend povećanja vijabilnosti stanica prisutan je samo u slučaju posttretmana s 500 nM DHEA, ali to povećanje nije statistički značajno ($p = 0,394$; ANOVA post-hoc test). U slučaju posttretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je samo u slučaju 100 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). Kada je korištena najveća koncentracija DHEA ili DHEAS-a (1000 nM)

uočljiv je čak i toksični učinak na stanice, odnosno pad vijabilnosti stanica na 31,2% u slučaju DHEA i na 23,8 u slučaju DHEAS (Slika 16.).



Slika 16. Vijabilnost, odnosno metabolička aktivnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, određena testom MTT, nakon OGD-a te posttretmana s DHEA ili DHEAS.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. *** $p < 0,001$ vs. OGD, DHEA(S); # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.1.1.3. Usporedba vijabilnosti neurona nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Kako bi se usporedio učinak predtretmana i posttretmana s DHEA ili DHEAS napravljena je usporedba vijabilnosti, odnosno metaboličke aktivnosti neurona između pojedinih korištenih koncentracija DHEA ili DHEAS-a Studentovim t-testom (Tablica 5.). Iz rezultata je vidljivo da je predtretman učinkovitiji od posttretmana u slučaju DHEA, a obrnuta je situacija u slučaju tretmana s DHEAS (Tablica 5.).

Predtretman s 10 nM DHEA je učinkovitiji nego posttretman s istom koncentracijom ovog neurosteroida ($t = 4,63$; $df = 12$; $p = 0,001$; Studentov t-test), a isti trend je vidljiv i kod predtretmana sa 100 nM DHEA u odnosu na posttretman ($t = 4,11$; $df = 12$; $p = 0,001$; Studentov t-test). Međutim, kod tretmana sa 100 nM DHEAS-om posttretman se pokazao kao učinkovitiji u

odnosu na predtretman ($t = -2,94$; $df = 12$; $p = 0,012$). Kod usporedbe ostalih koncentracija DHEA i DHEAS-a koje su korištene za predtretman i posttretman neurona nije bilo nikakvih statistički značajnih razlika (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba vijabilnosti, odnosno metaboličke aktivnosti neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa nakon OGD-a te posttretmana i predtretmana s DHEA ili DHEAS.

Tretman	Koncentracija	Vijabilnost stanica (%) (srednja vrijednost \pm S.D.)		Studentov t-test (df = 12)	
		Predtretman	Posttretman	t	p
DHEA	10 nM	55,1 \pm 7,9	35,0 \pm 8,3	4,63	0,001
	100 nM	57,0 \pm 8,8	35,5 \pm 10,7	4,11	0,001
	500 nM	50,9 \pm 5,9	46,0 \pm 7,4	1,37	0,197
	1000 nM	42,1 \pm 8,2	31,2 \pm 11,1	2,09	0,059
DHEAS	10 nM	45,5 \pm 15,5	49,7 \pm 7,4	-0,65	0,529
	100 nM	52,1 \pm 5,1	68,8 \pm 14,1	-2,94	0,012
	500 nM	45,4 \pm 5,9	40,6 \pm 9,4	1,41	0,276
	1000 nM	29,9 \pm 8,0	23,8 \pm 6,6	1,55	0,147

df: stupnjevi slobode (od eng. *degrees of freedom*); DHEA: dehidroepiandrosteron ; DHEAS: dehidroepiandrosteron sulfat; S.D.: standardna devijacija

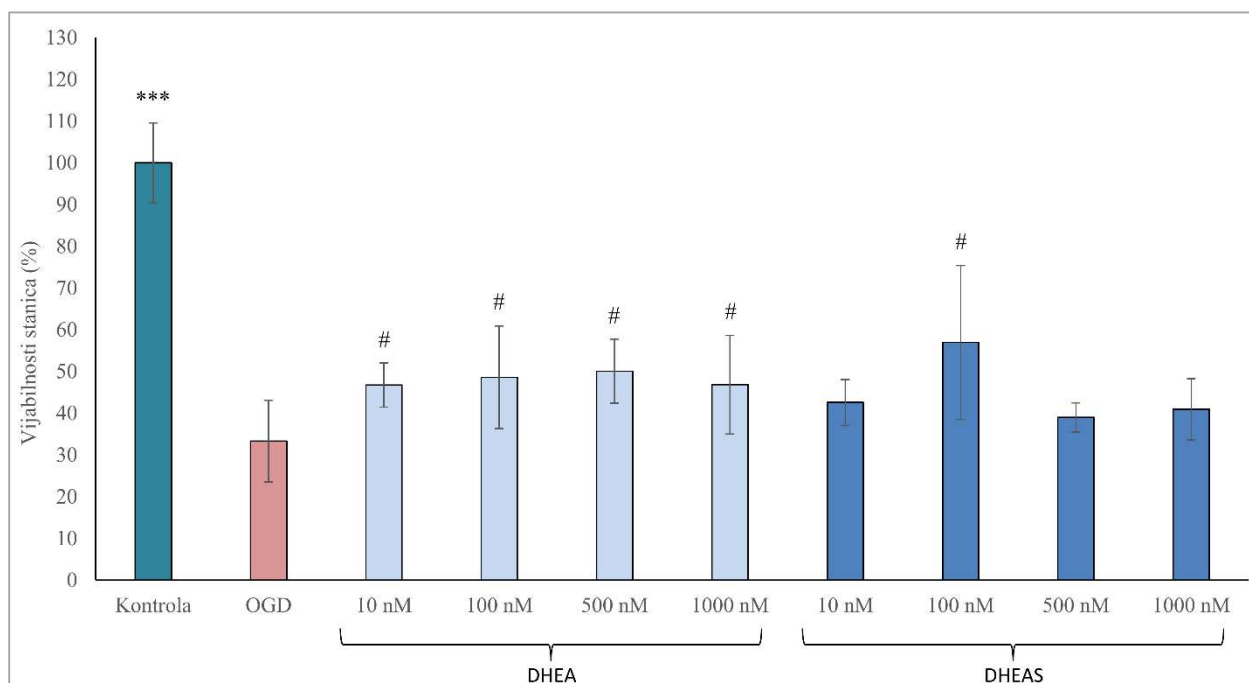
4.1.2. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y

4.1.2.1. Vijabilnost stanica određena testom MTT nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati testa MTT nakon predtretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 17. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: $100,0 \pm 20,5$ vs. OGD: $34,9 \pm 11,1$; $F(9, 132) = 101,53$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su predtretirane s DHEA ili DHEAS te zatim izložene OGD-u ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju predtretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da je metabolička aktivnost stanica značajno veća u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana za sve

koncentracije DHEA, odnosno 10 nM DHEA ($p = 0,018$; ANOVA post-hoc test), 100 nM DHEA ($p = 0,003$; ANOVA post-hoc test), 500 nM DHEA ($p = 0,001$; ANOVA post-hoc test), 1000 nM ($p = 0,017$; ANOVA post-hoc test). Predtretman s DHEA povećao je vijabilnost stanica s 33,3% nakon OGD-a na preko 46% u slučaju svih testiranih koncentracija DHEA (Slika 17), a najučinkovitiji je bio tretman s 500 nM DHEA. U slučaju predtretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je samo u slučaju 100 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).



Slika 17. Vijabilnost, odnosno metabolička aktivnost stanične linije SH-SY5Y, određena testom MTT, nakon OGD-a te predtretmana s DHEA ili DHEAS.

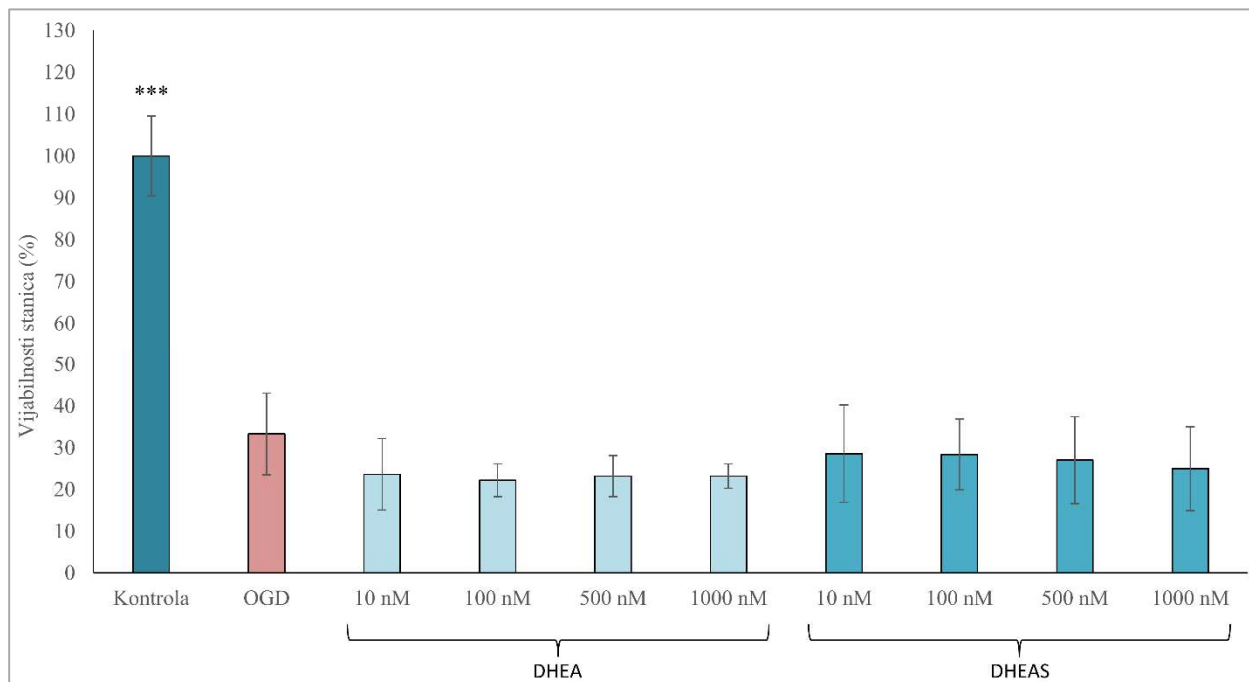
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. * $p < 0,001$ vs. OGD, DHEA(S); # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.1.2.2. Vijabilnost stanica određena testom MTT nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati testa MTT nakon posttretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 18. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu (kontrola: $100,0 \pm 20,5$ vs. OGD: $34,9 \pm 11,1$; $F(9, 132) = 163,55$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu

vidljiv je i kod stanica koje su izložene OGD-u te zatim tretirane s DHEA ili DHEAS ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju posttretmana s DHEA ili DHEAS iz rezultata je vidljivo da nije bilo značajnog poboljšanja metaboličke aktivnosti stanica u odnosu na onu nakon OGD-a bez naknadnog tretmana. U slučaju tretmana s DHEA čak je vidljiv i trend pada vijabilnosti stanica, ali isti nije statistički značajan (Slika 18).



Slika 18. Vijabilnost, odnosno metabolička aktivnost stanične linije SH-SY5Y, određena testom MTT, nakon OGD-a te posttretmana s DHEA ili DHEAS.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. *** $p < 0,001$ vs. OGD, DHEA(S).

4.1.2.3. Usporedba vijabilnosti stanica nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Kako bi se usporedio učinak predtretmana i posttretmana s DHEA ili DHEAS napravljena je usporedba vijabilnosti, odnosno metaboličke aktivnosti stanica SH-SY5Y između pojedinih korištenih koncentracija DHEA ili DHEAS-a Studentovim t-testom (Tablica 6.). Iz rezultata je vidljivo da je predtretman puno učinkovitiji od posttretmana u slučaju DHEA i DHEAS (Tablica 6.).

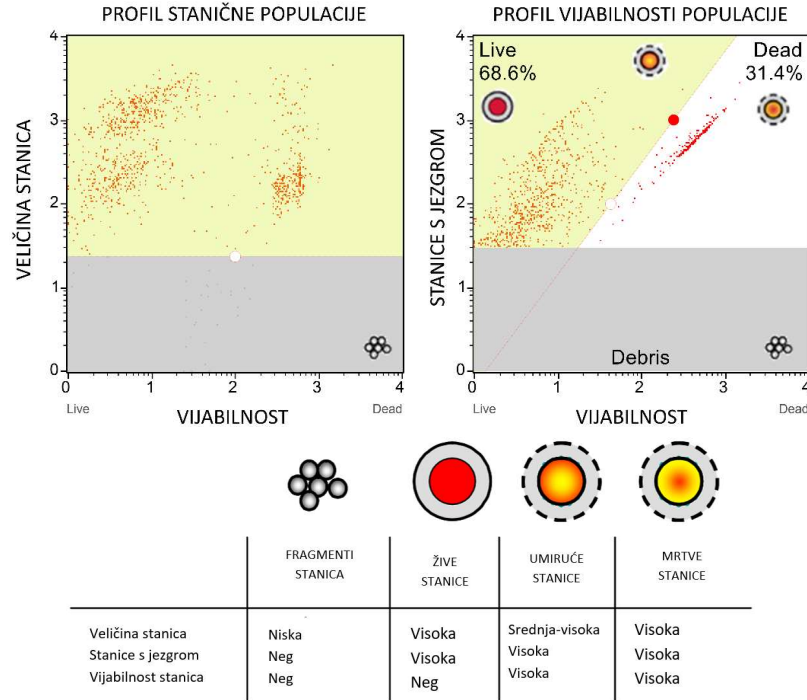
Tablica 6. Usporedba vijabilnosti, odnosno metaboličke aktivnosti stanične linije SH-SY5Y nakon OGD-a te posttretmana i predtretmana s DHEA ili DHEAS.

Tretman	Koncentracija	Vijabilnost stanica (%) (srednja vrijednost ± S.D.)		Studentov t-test (df = 12)	
		Predtretman	Posttretman	t	p
DHEA	10 nM	46,7 ± 5,3	23,6 ± 8,6	5,49	< 0,001
	100 nM	48,6 ± 12,3	22,2 ± 3,9	8,34	< 0,001
	500 nM	50,1 ± 7,7	23,2 ± 4,9	5,79	< 0,001
	1000 nM	46,8 ± 11,8	23,2 ± 2,9	6,50	< 0,001
DHEAS	10 nM	42,6 ± 5,5	28,5 ± 11,7	3,62	0,003
	100 nM	57,0 ± 18,4	28,4 ± 8,5	3,08	0,008
	500 nM	39,0 ± 3,5	27,0 ± 10,4	3,99	0,001
	1000 nM	40,9 ± 7,3	25,0 ± 10,1	3,07	0,008

df: stupnjevi slobode (od eng. *degrees of freedom*); DHEA: dehidroepiandrosteron ; DHEAS: dehidroepiandrosteron sulfat; S.D.: standardna devijacija

4.2. Vijabilnost stanica nakon OGD-a: Muse® Count & Viability test

Muse® Count & Viability test jednostavan je, brz test koji pruža informacije o koncentraciji i vijabilnosti stanica. Koristi mješavinu dviju interkalizirajućih fluorescentnih boja u jednom reagensu. Kombinacija dviju fluorescentnih boja omogućuje diskriminaciju stanica s jezgrom od stanica bez jezgre ili fragmentiranih stanica te diskriminaciju živih stanica od mrtvih ili umirućih, što rezultira preciznim određivanjem koncentracije stanica i njihove vijabilnosti (Slika 19.). Korištenje ovih dvostrukih fluorescentnih sonda omogućuje veću osjetljivost i točnost u usporedbi s drugim kolorimetrijskim metodama. Obradom uzoraka na uređaju Muse® Cell Analyzer uz pomoć odgovarajućeg programskog paketa dobivaju se rezultati koji uključuju broj živih i broj mrtvih stanica po ml te u izvornom uzorku, ukupni broj stanica po ml i postotak vijabilnih stanica.



Slika 19. Princip Muse® Count & Viability testa.

Rezultati Muse® Count & Viability testa prikazani su kao udio živih i udio mrtvih stanica, a tijekom statističke obrade podataka između pojedinih uzoraka uspoređen je udio živih stanica. Za svaki od tretmana, prije ili poslije ozljede, kontrolu te ozljedu bez tretmana napravljeno je po 3 mjerenja tako da su rezultati grafički prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica (%) ± standardna devijacija (S.D.).

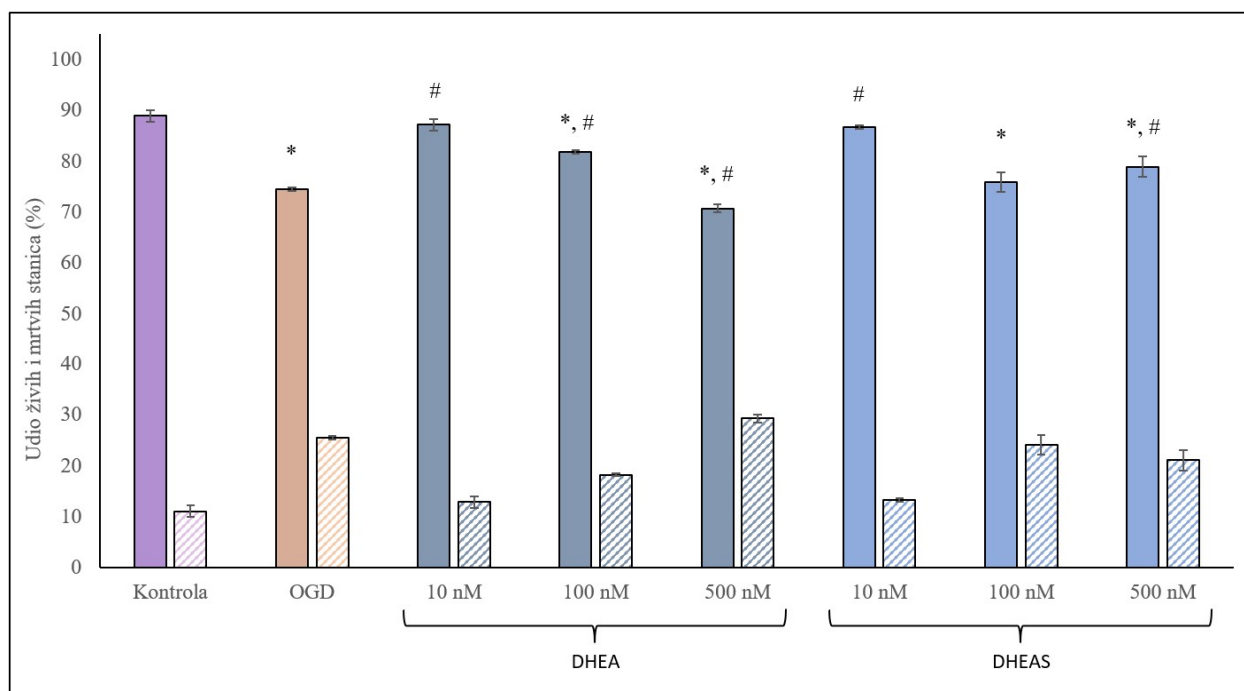
S obzirom na to da su rezultati testa MTT pokazali da najveća korištena koncentracija DHEA i DHEAS (1000 nM) nije imala neuroprotektivan učinak niti na neurone niti na stanice SH-SY5Y te je čak potencijalno i toksična za stanice, odlučili smo u slučaju Muse® Count & Viability testa izostaviti tu koncentraciju te testirati tri preostale koncentracije (500 nM, 100 nM, 10 nM).

4.2.1. Primarna kultura mišjih neurona

4.2.1.1. Vijabilnost neurona određena Muse® Count & Viability testom nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati Muse® Count & Viability testa nakon predtretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 20. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu ($F(7, 16) = 94,86$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su predtretirane s DHEA ili DHEAS te zatim izložene OGD-u ($p < 0,05$; ANOVA post-hoc test), osim u slučaju neurona tretiranih s 10 nM DHEA ($p=0,612$; ANOVA post-hoc test) ili DHEAS ($p=0,352$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju predtretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da je vijabilnost stanica značajno veća u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana, kada su korištene niže koncentracije DHEA, odnosno 10 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 100 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). U slučaju tretmana s 500 nM DHEA ($p = 0,023$; ANOVA post-hoc test) prisutno je smanjenje udjela živih stanica u odnosu na OGD što dovodi do zaključka da bi ova koncentracija DHEA mogla biti potencijalno i toksična za neurone. Predtretman s 10 nM DHEA povećao je vijabilnost stanica sa 74,5% nakon OGD-a na 87,2%, odnosno skoro na razinu koja je prisutna u kontroli (88,9%). U slučaju predtretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je u slučaju 10 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEAS-a ($p = 0,006$; ANOVA post-hoc test). U slučaju tretmana sa 100 nM DHEAS-om nije bilo nikakvog učinka na vijabilnost neurona ($p = 0,799$; ANOVA post-hoc test). Predtretman s 10 nM DHEAS-om povećao je vijabilnost stanica sa 74,5% nakon OGD-a na 86,7%, odnosno skoro na razinu koja je prisutna u kontroli (88,9%).



Slika 20. Udio živih (stupci ispunjeni bojom) i mrtvih (stupci ispunjeni teksturom) neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, određen Muse® Count & Viability testom, nakon OGD-a te predtretmana s DHEA ili DHEAS.

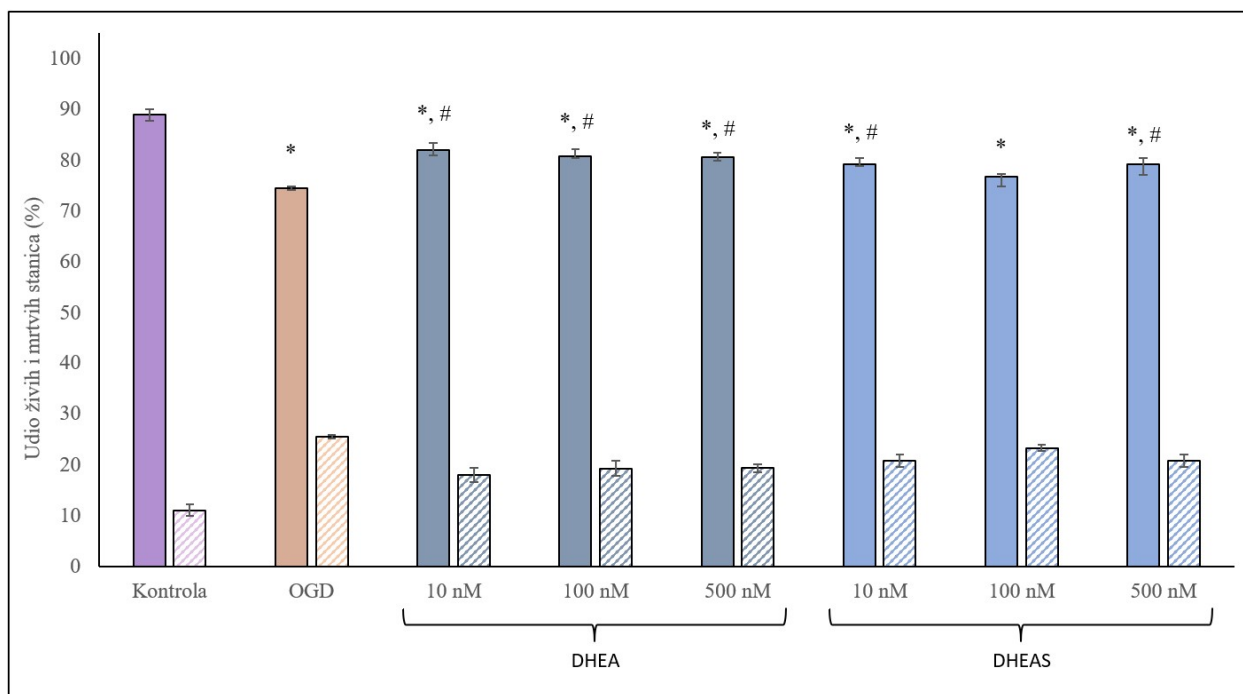
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. * $p < 0,05$ vs. kontrola; # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.2.1.2. Vijabilnost neurona određena Muse® Count & Viability testom nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati Muse® Count & Viability testa nakon posttretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 21. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede (žive stanice – $74,5 \pm 0,3$ ($2,0 \cdot 10^6 \pm 8,1 \cdot 10^4$); mrtve stanice – $25,5 \pm 0,3$ ($6,7 \cdot 10^5 \pm 1,7 \cdot 10^4$)) došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica ($F(7, 16) = 51,58$; $p < 0,001$; ANOVA) u odnosu na kontrolu (žive stanice - $88,9 \pm 1,1$ ($3,2 \cdot 10^6 \pm 3,9 \cdot 10^4$); mrtve stanice – $11,1 \pm 1,1$ ($4,0 \cdot 10^5 \pm 4,3 \cdot 10^4$)). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su izložene OGD-u te zatim tretirane s DHEA i DHEAS ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju posttretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da je vijabilnost stanica značajno veća u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana, u slučaju svih korištenih koncentracija DHEA, odnosno 10 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test), 100 nM

DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). U slučaju posttretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je u slučaju 10 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). U slučaju tretmana sa 100 nM DHEAS-om nije bilo nikakvog učinka na vijabilnost neurona ($p = 0,218$; ANOVA post-hoc test).



Slika 21. Udio živih (stupci ispunjeni bojom) i mrtvih (stupci ispunjeni teksturom) neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, određen Muse® Count & Viability testom, nakon OGD-a te posttretmana s DHEA ili DHEAS.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. * $p < 0,05$ vs. kontrola; # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.2.1.3. Usporedba vijabilnosti neurona nakon predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Kako bi se usporedio učinak predtretmana i posttretmana s DHEA ili DHEAS napravljena je usporedba vijabilnosti, odnosno udjela živih neurona između pojedinih korištenih koncentracija DHEA ili DHEAS-a Studentovim t-testom (Tablica 7.).

Tablica 7. Usporedba vijabilnosti, odnosno udjela živih neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa nakon OGD-a te posttretmana i predtretmana s DHEA ili DHEAS. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (S.D.)

Tretman	Koncentracija	Udio živih i mrtvih stanica (%)				Studentov t-test (df = 4)	
		Broj živih i mrtvih stanica (br. stanica/ml)				t	p
		Predtretman		Posttretman			
Žive stanice	Mrtve stanice	Žive stanice	Mrtve stanice				
DHEA	10 nM	87,2 \pm 1,1 1,9*10 ⁶ \pm 6,3*10 ⁴	12,8 \pm 1,1 2,9*10 ⁵ \pm 1,9*10 ⁴	82,0 \pm 1,4 1,4*10 ⁶ \pm 1,6*10 ⁴	18,0 \pm 1,4 3,0*10 ⁵ \pm 3,1*10 ⁴	5,09	0,007
	100 nM	81,8 \pm 0,3 1,4*10 ⁶ \pm 5,0*10 ⁴	18,2 \pm 0,3 3,1*10 ⁵ \pm 9,6*10 ³	80,7 \pm 1,5 2,8*10 ⁶ \pm 2,5*10 ⁴	19,3 \pm 1,5 6,6*10 ⁵ \pm 3,1*10 ⁴	1,24	0,283
	500 nM	70,8 \pm 0,7 1,8*10 ⁶ \pm 1,7*10 ⁴	29,3 \pm 0,7 7,6*10 ⁵ \pm 5,0*10 ⁴	80,7 \pm 0,8 2,4*10 ⁶ \pm 9,2*10 ⁴	19,3 \pm 0,8 5,9*10 ⁵ \pm 4,1*10 ⁴	-15,80	< 0,001
DHEAS	10 nM	86,7 \pm 0,4 1,8*10 ⁶ \pm 6,1*10 ⁴	13,3 \pm 0,4 2,7*10 ⁶ \pm 1,6*10 ⁴	79,2 \pm 1,2 1,6*10 ⁶ \pm 1,0*10 ⁵	20,8 \pm 1,2 4,1*10 ⁵ \pm 5,5*10 ⁴	10,64	< 0,001
	100 nM	75,9 \pm 1,9 1,6*10 ⁶ \pm 7,2*10 ⁴	24,1 \pm 1,9 5,0*10 ⁵ \pm 7,3*10 ⁴	76,7 \pm 0,6 3,0*10 ⁶ \pm 1,3*10 ⁵	23,3 \pm 0,6 9,2*10 ⁵ \pm 6,7*10 ³	-0,66	0,547
	500 nM	78,9 \pm 2,0 1,8*10 ⁶ \pm 7,6*10 ⁴	21,1 \pm 2,0 4,7*10 ⁵ \pm 6,0*10 ⁴	82,7 \pm 0,8 3,5*10 ⁶ \pm 1,9*10 ⁵	17,3 \pm 0,8 7,4*10 ⁵ \pm 4,1*10 ⁴	-3,01	0,040

df: stupnjevi slobode (od eng. *degrees of freedom*); DHEA: dehidroepiandrosteron ; DHEAS: dehidroepiandrosteron sulfat

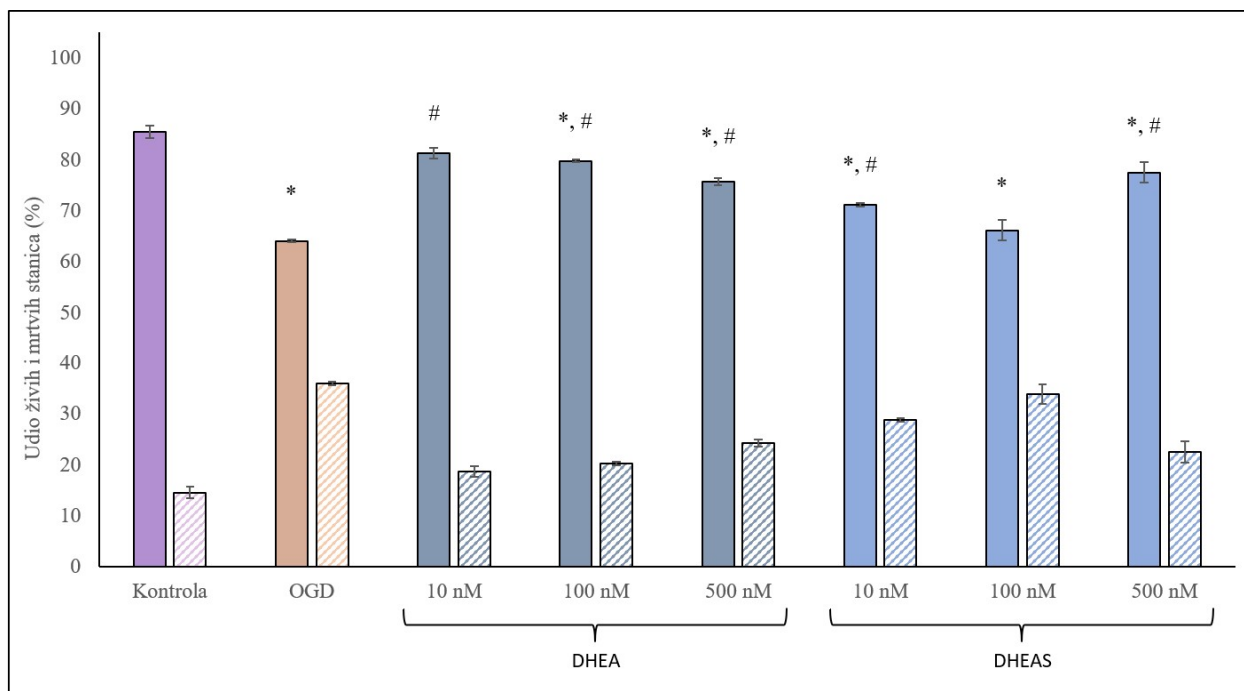
Iz rezultata je vidljivo da je predtretman učinkovitiji u slučaju DHEA i DHEAS kada su korištene najmanje koncentracije ovih neurosteroida (10 nM), a obrnuta je situacija u slučaju tretmana s najvećom koncentracijom neurosteroida (500 nM). Predtretman i posttretman sa 100 nM DHEA i DHEAS-om bio je podjednako učinkovit u slučaju tretmana s DHEA, odnosno neučinkovit u slučaju tretmana s DHEAS-om (Tablica 7.).

4.2.2. Kultura humanih neuroblastoma SH-SY5Y

4.2.2.1. Vijabilnost stanica određena Muse® Count & Viability testom nakon predtretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati Muse® Count & Viability testa nakon predtretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 1 h prikazani su na Slici 22. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu ($F(7, 16) = 53,31$; $p < 0,001$; ANOVA). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su predtretirane s DHEA ili DHEAS-om te zatim izložene OGD-u ($p < 0,05$; ANOVA post-hoc test), osim u slučaju neurona tretiranih s 10 nM DHEA ($p=0,146$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju predtretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da je vijabilnost stanica značajno veća u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana, u slučaju tretmana s 10 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test), 100 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEA ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). Predtretman s 10 nM DHEA povećao je vijabilnost stanica sa 64,1% nakon OGD-a na 81,4%, odnosno skoro na razinu koja je prisutna u kontroli (85,5%). U slučaju predtretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je u slučaju 10 nM DHEAS-a ($p = 0,003$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test). U slučaju tretmana sa 100 nM DHEAS nije bilo nikakvog učinka na vijabilnost neurona ($p = 0,819$; ANOVA post-hoc test).



Slika 22. Udio živih (stupci ispunjeni bojom) i mrtvih (stupci ispunjeni teksturom) stanica SH-SY5Y, određen Muse® Count & Viability testom, nakon OGD-a te predtretmana s DHEA ili DHEAS.

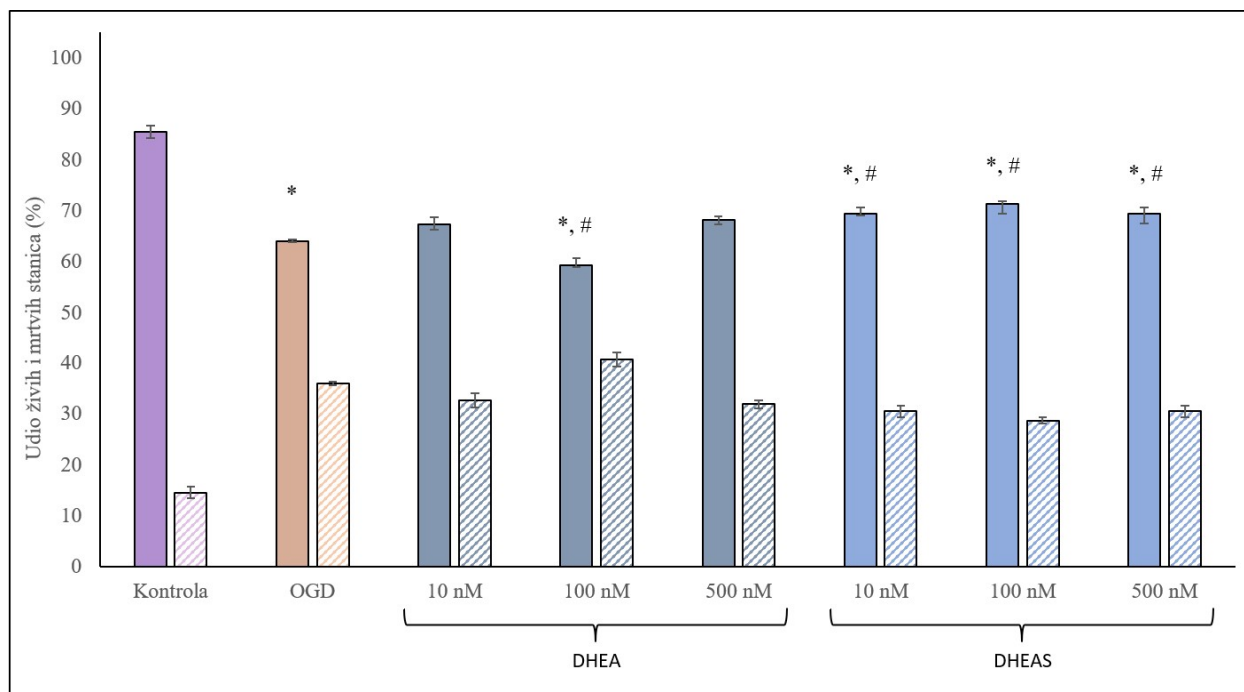
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. *p < 0,05 vs. kontrola; #p < 0,05 vs. OGD.

4.2.2.2. Vijabilnost stanica određena Muse® Count & Viability testom nakon posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Rezultati Muse® Count & Viability testa nakon posttretmana s DHEA, odnosno DHEAS, te ozljede (OGD) u trajanju od 16h prikazani su na Slici 23. Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju ozljede (žive stanice – $64,1 \pm 1,0$ ($3,0 \cdot 10^5 \pm 1,4 \cdot 10^4$); mrtve stanice – $35,9 \pm 1,0$ ($1,7 \cdot 10^5 \pm 1,5 \cdot 10^3$)) došlo do značajnog pada vijabilnosti stanica $F(7, 16) = 80,52$; $p < 0,001$; ANOVA) u odnosu na kontrolu (žive stanice – $85,5 \pm 2,6$ ($3,0 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^5$); mrtve stanice – $14,5 \pm 2,6$ ($5,1 \cdot 10^5 \pm 9,8 \cdot 10^4$)). Statistički značajan pad u odnosu na kontrolu vidljiv je i kod svih stanica koje su izložene OGD-u te zatim tretirane s DHEA i DHEAS-om ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test).

U slučaju posttretmana s DHEA iz rezultata je vidljivo da se vijabilnost stanica nije promijenila u odnosu na onu nakon OGD-a bez prethodnog tretmana, u slučaju kad je korištena 10 nM DHEA ($p = 0,199$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEA ($p = 0,071$; ANOVA post-hoc test). U slučaju tretmana sa 100 nM DHEA ($p = 0,024$; ANOVA post-hoc test) vidljiv je čak

i pad broja živih stanica (Slika 23.). U slučaju posttretmana s DHEAS, statistički značajan učinak prisutan je pri tretmanu s 10 nM DHEAS-a ($p < 0,001$; ANOVA post-hoc test), 100 nM DHEAS-a ($p = 0,001$; ANOVA post-hoc test) i 500 nM DHEAS-a ($p = 0,009$; ANOVA post-hoc test).



Slika 23. Udio živih (stupci ispunjeni bojom) i mrtvih (stupci ispunjeni teksturom) stanica SH-SY5Y, određena Muse® Count & Viability testom, nakon OGD-a te posttretmana s DHEA ili DHEAS.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. * $p < 0,05$ vs. kontrola; # $p < 0,05$ vs. OGD.

4.2.2.3. Usporedba vijabilnosti stanica predtretmana i posttretmana neurosteroidima DHEA i DHEAS

Kako bi se usporedio učinak predtretmana i posttretmana s DHEA ili DHEAS napravljena je usporedba vijabilnosti, odnosno udjela živih neurona između pojedinih korištenih koncentracija DHEA ili DHEAS-a Studentovim t-testom (Tablica 8.). Iz rezultata je vidljivo da je predtretman učinkovitiji u slučaju DHEA u slučaju svih ispitivanih koncentracija te u slučaju tretmana s 500 nM DHEAS (Tablica 8.). Kada je korištena najmanje koncentracije DHEAS (10 nM), posttretman se pokazao učinkovitijim od predtretmana (Tablica 8.). Predtretman i posttretman sa 100 nM DHEAS bili su podjednako neučinkoviti (Tablica 8.).

Tablica 8. Usporedba vijabilnosti, odnosno udjela živih stanica SH-SY5Y nakon OGD-a te posttretmana i predtretmana s DHEA ili DHEAS. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (S.D.)

Tretman	Koncentracija	Udio živih i mrtvih stanica (%)				Studentov t-test (df = 4)	
		Broj živih i mrtvih stanica (br. stanica/ml)				t	p
		Predtretman		Posttretman			
Žive stanice	Mrtve stanice	Žive stanice	Mrtve stanice				
DHEA	10 nM	81,4 \pm 2,0 1,6*10 ⁵ \pm 2,0*10 ⁴	18,6 \pm 2,0 3,7*10 ⁴ \pm 9,7*10 ²	67,4 \pm 0,8 1,4*10 ⁵ \pm 1,1*10 ⁴	32,6 \pm 0,8 6,9*10 ⁴ \pm 4,6*10 ³	11,21	< 0,001
	100 nM	79,8 \pm 0,5 2,2*10 ⁵ \pm 9,5*10 ³	20,2 \pm 0,5 5,6*10 ⁴ \pm 1,9*10 ³	59,3 \pm 1,0 2,8*10 ⁵ \pm 1,0*10 ⁴	40,7 \pm 1,0 1,9*10 ⁵ \pm 2,9*10 ³	31,10	< 0,001
	500 nM	75,7 \pm 1,4 2,6*10 ⁵ \pm 1,6*10 ⁴	24,3 \pm 1,4 8,3*10 ⁴ \pm 5,1*10 ³	68,2 \pm 0,9 3,9*10 ⁵ \pm 2,3*10 ⁴	31,8 \pm 0,9 1,8*10 ⁵ \pm 7,5*10 ³	7,67	0,002
DHEAS	10 nM	71,2 \pm 1,1 1,6*10 ⁵ \pm 1,8*10 ⁴	28,8 \pm 1,1 6,3*10 ⁴ \pm 4,0*10 ³	75,8 \pm 0,2 1,5*10 ⁵ \pm 3,2*10 ³	24,2 \pm 0,2 4,7*10 ⁴ \pm 1,3*10 ³	-7,00	0,002
	100 nM	66,2 \pm 2,6 3,0*10 ⁵ \pm 4,0*10 ⁴	24,1 \pm 1,9 1,5*10 ⁵ \pm 1,1*10 ⁴	71,3 \pm 2,1 4,6*10 ⁵ \pm 2,6*10 ⁴	28,7 \pm 2,1 1,8*10 ⁵ \pm 9,9*10 ³	-2,64	0,058
	500 nM	77,5 \pm 1,7 2,2*10 ⁵ \pm 9,5*10 ³	22,5 \pm 1,7 6,4*10 ⁴ \pm 3,8*10 ³	69,5 \pm 2,0 3,6*10 ⁵ \pm 1,8*10 ⁴	30,5 \pm 2,0 1,6*10 ⁵ \pm 1,4*10 ⁴	5,29	0,006

df: stupnjevi slobode (od eng. *degrees of freedom*); DHEA: dehidroepiandrosteron ; DHEAS: dehidroepiandrosteron sulfat

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti i razjasniti potencijalne učinke neurosteroida DHEA i njegovog sulfata (DHEAS) u prevenciji stanične smrti inducirane ishemijskom ozljedom, i promicanju preživljavanja neuralnih stanica *in vitro*, primjenom modela deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGD/R) na dva stanična modela, humanim neuroblastoma stanicama SH-SY5Y, te primarnoj kulturi mišjih neurona.

U slučaju oba stanična modela rezultati su pokazali da predtretman ima značajniji učinak na metaboličku aktivnost stanica (test MTT) od posttretmana s oba neurosteroida. Posttretman je jedino bio uspješan u slučaju tretmana mišjih neurona sa 100 nM DHEAS. Kod predtretmana s DHEA, u oba stanična modela tretman je povećao metaboličku aktivnost stanica kada su korištene koncentracije od 10 nM, 100 nM i 500 nM DHEA. Predtretman s DHEAS je imao pozitivan učinak na metaboličku aktivnost stanica kada su tretirane sa 100 nM DHEAS. Sve navedeno upućuje na to da predtretman s DHEA (10 nM; 100 nM i 500 nM) te 100 nM DHEAS poboljšava metaboličku aktivnost stanica te ima potencijalan protektivni učinak. Također, iz rezultata je vidljivo da visoke koncentracije neurosteroida mogu imati čak i negativan utjecaj na metaboličku aktivnost stanica, odnosno, mogu biti i potencijalno toksične za stanice. U slučaju vijabilnosti, odnosno preživljenja stanica (Muse® Count & Viability testa), u pravilu je potvrđen pozitivan utjecaj predtretmana s DHEA i DHEAS koji je vidljiv na testu MTT. Identično kao i kod testa MTT, rezultati upućuju na to da je predtretman s DHEA (10 nM i 100 nM) uspješniji od predtretmana s DHEAS (10 nM i 500 nM) kod oba stanična modela. Međutim, u slučaju posttretmana Muse® Count & Viability test je pokazao da je tretman s DHEA uspješno zaštitio mišje neurone od djelovanja ozljede dok je u slučaju stanica SH-SY5Y taj učinak izostao te je vidljiv čak i negativan trend kada je korišten posttretman s 100 nM DHEA. Posttretman s DHEAS je također pokazao potencijalan protektivni učinak na mišje neurone (10 nM i 500 nM DHEAS), ali i na stanice SH-SY5Y (10 nM, 100 nM i 500 nM DHEAS). Međutim, kada se rezultati testa MTT i Muse® Count & Viability testa usporede, vidljivo je da najznačajniji protektivni učinak ima predtretman s DHEA (10 nM; 100 nM i 500 nM) te 100 nM DHEAS, dok je posttretman slabije učinkovit.

Navedeni rezultati podudaraju se s rezultatima Kaasik i sur. (2001) koji pokazuju neuroprotektivni učinak DHEAS-a u *in vitro* modelima ishemije mozga, budući da DHEAS

pokazuje snažan neuroprotektivni učinak protiv oštećenja neurona izazvanog OGD-om u staničnim kulturama cerebelarnih granula. Taj je učinak bio najznačajniji kod blagog i srednjeg OGD-a koji nalikuje situaciji u penumbralnoj regiji, dok je DHEAS bio relativno neučinkovit protiv značajnog OGD-a koji oponaša situaciju bliže ishemijskom centru. Rezultati se također slažu s nalazima drugih (Mao i Barger 1988) koji pokazuju neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a na toksičnost izazvanu glutatomom i oksidativnim stresom koja može imati presudnu ulogu u patofiziologiji ishemije.

Dokazan je neuroprotektivni učinak DHEAS-a protiv djelovanja glutamata (Mao i Barger 1998), agonista podtipa glutamatnog receptora, kao što su NMDA, AMPA i kainska kiselina (Kimonides i sur. 1998), te protiv oksidativnog stresa izazvanog s H_2O_2 i natrijevim nitroprusidom (Bastianetto i sur. 1999). DHEAS je također djelomično protektivan u slučaju toksičnosti izazvane kolhicinom. Kurata i sur. (2004) pokazali su da DHEA (1–60 μM) ima značajne neuroprotektivne učinke protiv NMDA-inducirane neurotoksičnosti, dok 1 do 30 μM DHEA nije inhibirao NMDA-inducirani porast unutarstaničnog Ca^{2+} . Također su pokazali da 10 μM DHEA inhibira NMDA-induciranu NOS aktivnost i proizvodnju NO. Nadalje, dokazano je da je DHEAS neuroprotektivan u koncentracijama ($0,1 \pm 10$ mM) sličnima onim uočenim u ljudskoj plazmi (Kaasik i sur. 2001), u rasponu mM u mladih odraslih i $10 \pm 20\%$ od toga nakon osamdesetih godina (Birkenhager-Gillesse i sur. 1994). Ta otkrića stoga podupiru hipotezu da bi stanja (npr. starenje i Alzheimerova bolest) sa smanjenom razinom DHEAS-a mogla biti povezana s većim rizikom smrti neurona nakon ozljeda poput ishemije. Navedeni podaci sugeriraju da DHEAS može imati terapijski potencijal u prevenciji i liječenju ishemičnog / hipoksičnog oštećenja neurona.

Na staničnim kulturama kod oba neurosteroida se predtretman pokazao značajno učinkovitijim od posttretmana. U slučaju OGD-a te predtretmana i posttretmana stanica SH-SY5Y i neurona uočen je značajan pad metaboličke aktivnosti i vijabilnosti, odnosno preživljenja stanica, u odnosu na kontrolu. Međutim, navedena metabolička aktivnost i vijabilnost su i dalje bile veće u odnosu na ozljedu. U slučaju mjerenja metaboličke aktivnosti stanica, predtretmani s 10 nM, 100 nM i 500 nM DHEA te 100 nM DHEAS pokazali su se kao protektivni u oba stanična modela dok posttretman nije bio toliko uspješan. Predtretman i posttretman neurona i stanica SH-SY5Y učinkoviti su zaštititi vijabilnosti stanica u slučaju kada su korištene najmanje koncentracije DHEA i DHEAS (10 nM). Predtretman s 100 nM

DHEA također je bio podjednako učinkovit u slučaju oba stanična modela. Predtretman i posttretman oba stanična modela s 500 nM DHEAS-om pokazao se učinkovitim, odnosno zaštitio je stanice od ozljede te povećao njihovo preživljenje.

Rezultati mjerenja vijabilnosti stanica podudaraju se s rezultatima Kaasik i sur. (2001), koji su pokazali da nakon blagog OGD-a znatan broj stanica umire staničnom smrću sličnom apoptozi, što ukazuje da DHEAS smanjuje broj neurona s apoptotskim značajkama. S obzirom da na agaroznome gelu nakon elektroforeze nisu uočeni fragmenti DNA, rezultati sugeriraju da DHEAS pokazuje svoj neuroprotektivni učinak suzbijajući apoptotsku staničnu smrt. To neizravno podupire neuroprotektivni učinak DHEAS-a na kolhicin, toksin koji uglavnom uzrokuje apoptotsku smrt stanica (Kaasik i sur. 1999).

Dobiveni rezultati pokazuju da neurosteroidi nisu samo učinkoviti u zaštiti stanica i neurona od smrti prije ozljede OGD-om, nego i nakon, što sugerira da DHEA(S) povećava njihovu otpornost na stres. Ti se rezultati slažu s istraživanjem kojeg su proveli Mao i Barger (1998) i koje pokazuje da je učinak DHEAS-a bio popraćen i ovisan o povećanoj aktivnosti NF- κ B-nalik transkripcijskog faktora, što bi moglo povećati otpornost neurona na ozljedu. Štoviše, sugerira se da DHEAS djeluje kao trofični čimbenik jer potiče rast neurona (Compagnone i Mellon 1998).

Nedavne studije također upućuju na to da bi DHEA i, možda, DHEAS mogli djelovati kao pozitivni modulatori NMDA receptora (Compagnone i Mellon 1998). Ključna uloga aktivacije ekscitacijskih aminokiselinskih receptora praćena preopterećenjem kalcijem u patogenezi ozljede neurona izazvane OGD-om dobro je dokumentirana (Goldberg i Choi 1993). Istraživanja Kimonides i sur. (1998) pokazala su da DHEAS ima snažno neuroprotektivno djelovanje protiv toksičnosti izazvane putem NMDA. Sugerira se da pozitivno modulatorsko djelovanje DHEAS-a na receptor NMDA nema ulogu u promatranoj neuroprotekciji.

Neurosteroidi su primjenjivani u vremenu od 24 sata prije ili nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, no ne i u trenutku samog OGD/R-a. Iako neurosteroidi pokazuju neuroprotektivno djelovanje u slučaju predtretmana ili posttretmana, tijekom same ozljede bi mogli biti neurotoksični što proizlazi iz istraživanja koje su proveli Li i sur. (2009). Navedeno istraživanje pokazalo je proturječne učinke DHEA na cerebralna oštećenja uzrokovana

ishemijom, koja proizlaze iz razlike u vremenu primjene DHEA, na modelu štakora s prolaznom globalnom cerebralnom ishemijom. U slučaju posttretmana u trajanju od 3 do 48 sati DHEA pokazuje neuroprotektivno djelovanje, iako pokazuje neurotoksičnost kada se daje tijekom ishemije ili rane reperfuzije, što implicira važnost vremena primjene DHEA u liječenju ishemijskih oštećenja mozga, uključujući one koja nastaje kao posljedica moždanog udara. Unatoč činjenici da temeljni mehanizmi još nisu u potpunosti razjašnjeni, ova studija jasno pokazuje neuroprotektivno djelovanje DHEA s dugom terapijskom mogućnošću (najmanje 48 sati nakon ishemije) protiv ishemijskih oštećenja mozga. S druge strane, rezultati pružaju dokaze da DHEA negativno utječe na neurone hipokampusa tijekom ili nedugo nakon ishemijske ozljede.

Slično tome, Gil-ad i sur. (2001) uočili su veću vijabilnost stanica u primarnim mišjim kulturama neurona i stanicama humanog neuroblastoma (SK-N-SH) nakon izloženosti (24-72 h) velikom rasponu doza DHEA. No sličan rezultat nije uočen u miješanim neuronskim ili glijalnim kulturama. Nadalje, neurotoksični učinci DHEA poništeni su istodobnim liječenjem s DHEAS-om.

U slučaju posttretmana neurona s oba neurosteroida pri koncentraciji od 1000 nM, uočen je potencijalni neurotoksični učinak. Podudarne rezultate zabilježio je Burkitt (2001) u istraživanju tijekom kojeg je dokazano da visoke doze antioksidansa kao što je DHEA mogu imati štetne učinke.

Tijekom istraživanja u kojemu su sudjelovale starije žene, rezultati sugeriraju da postoji obrnuta povezanost DHEAS-a i rizika od ishemijskog moždanog udara, gdje su niže razine DHEAS-a povezane s povećanim rizikom od ishemijskog moždanog udara. Postoje i dokazi da povišeni rizik od ishemijskog moždanog udara, povezan s niskom razinom DHEAS-a, može biti najznačajniji kod dijabetičara, mlađih žena (<65 godina) i cjeloživotnih nepušača (Jiménez i sur. 2013).

Oralna primjena DHEA, u mišjem modelu privremenog začepljenja zajedničke karotidne arterije, sprječava staničnu smrt neurona i deficit pamćenja stimulacijom sigma-1 receptora, na način da proizvodi energiju i aktivira Akt signalni put staničnog preživljavanja (Yabuki i sur. 2015). Prema tome, aktivacija sigma-1 receptora neurosteroidima pokazuje njihov

potencijal u neuroprotekciji i poboljšanju neuronske aktivnosti u procesima pamćenja, što se podudara s pozitivnim djelovanjem posttretmana nakon OGD/R-a.

Potencijal DHEAS-a da modulira aktivnost NMDA receptora kroz niz mehanizama objašnjava njihovu sposobnost zaštite neurona od ekscitotoksičnosti u prisutnosti visokih razina izvanstaničnog glutamata. Ekscitotoksičnost glutamata implicirana je u AD-u, gdje smanjenje proizvodnje neurosteroida može ugroziti unutarnje obrambene mehanizme SŽS-a. Drugi mogući mehanizam pomoću kojeg bi DHEAS mogao promovirati neurogenezu i neuronsko preživljavanje u SŽS-u je posredovanje neurotrofina BDNF (Sakr i sur. 2014). Sakr i sur. (2014) istraživali su učinak DHEA na kogniciju i učenje u modelu vaskularne demencije štakora, te su zaključili da je tretman s DHEA značajno očuvao pamćenje, što je popraćeno značajnim povećanjem razine acetilkolina, noradrenalina i dopamina u mozgu. Nuovo i sur. (2018) izvijestili su da su razine DHEAS-a u mozgu značajno niže u AD-u, i u obrnutoj korelaciji s prisutnošću fosforiliranog tau proteina i β -amiloida. Prema tome, prethodna zapažanja uglavnom podržavaju stajalište da su razine DHEAS-a u serumu smanjene kod AD-a u usporedbi s onima kod zdravih dobnih kontrolnih grupa.

S obzirom na to da DHEAS smanjuje oksidativni stres i neuroupalu, štiti od ekscitotoksičnosti glutamata i umanjuje negativne učinke kortizola na mozak, smanjena razina DHEAS-a u serumu vjerojatno će povećati ranjivost mozga na ove čimbenike. Budući da DHEA(S) imaju značajno neuroprotektivno djelovanje u *in vitro* modelu OGD/R, pokazuju veliki potencijal za daljnja istraživanja njihova utjecaja kod vaskularne demencije i AD-a.

6. ZAKLJUČAK

Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfat (DHEAS) pokazuju neuroprotektivno djelovanje u *in vitro* modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede mozga.

Na obje stanične kulture (mišji neuroni i stanice SH-SY5Y) je pokazano da je predtretman u slučaju DHEA i DHEAS značajno učinkovitijim od posttretmana.

U slučaju OGD-a, metabolička aktivnost (test MTT) i vijabilnost (Muse® Count & Viability test) nakon predtretmana i posttretmana stanica SH-SY5Y i neurona, bile su veće u odnosu na ozljedu. Međutim, nisu dosegle razine navedene metaboličke aktivnosti i vijabilnosti kao kod kontrolnih, tj. ne ozljeđenih.

U slučaju mjerenja metaboličke aktivnosti stanica (test MTT), predtretmani s 10 nM, 100 nM i 500 nM DHEA te 100 nM DHEAS pokazali su se kao protektivni u oba stanična modela dok posttretman nije bio toliko uspješan.

Predtretman i posttretman neurona i stanica SH-SY5Y s DHEA i DHEAS učinkoviti su u zaštiti vijabilnosti stanica (Muse® Count & Viability test) kada se koriste najmanje koncentracije ovih neurosteroida (10 nM), te kada se koristi 500 nM DHEAS. Predtretman sa 100 nM DHEA podjednako je protektivan i učinkovit u slučaju oba stanična modela.

Oba neurosteroida pokazuju potencijal u liječenju ozljeda izazvanih ishemijom, kao i onih uzrokovanih neurodegeneracijom, te imaju veliki potencijal u njihovoj prevenciji.

7. LITERATURA

Antonic A, Sena E, Donnan G, Howells D. (2012). Human in vitro models of ischaemic stroke: A test bed for translation. *Transl. Stroke Res*, 3:306–309.

Auchus, R. (2004). Overview of Dehydroepiandrosterone Biosynthesis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(4), 281-288.

Baquer, N. Z., Taha, A., Kumar, P., McLean, P., Cowsik, S. M., Kale, R. K., Sharma, D. (2009). A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. *Biogerontology*, 10(4), 377–413.

Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J. and Quirion R. (1999) Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Brain Res. Molec. Brain Res.* 66, 35-41.

Baulieu, E.-E., & Robel, P. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4089–4091.

Birkenhager-Gillesse E. G., Derksen J. and Lagaay A. M. (1994) Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in the oldest old, aged 85 and over. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719, 543-552.

Boot BP, Orr CF, Ahlskog JE, et al.(2013). Risk factors for dementia with Lewy bodies: a case-control study. *Neurology*, 81:833–840

Brott, T., & Bogousslavsky, J. (2000). Treatment of Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 710–722.

Brown RC, Han Z, Cascio C, Papadopoulos V. (2003). Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 24: 57–65.

Burkitt, M. (2001). Too much of a good thing? *Nature Biotechnology*, 19(9), 811–811.

Canas, P. T., Velly, L. J., Labrande, C. N., Guillet, B. A., Sautou-Miranda, V., Masmajan, F. M., Nieoullon, A. L., Gouin, F. M., Bruder, N. J., Pisano, P. S. (2006). Sevoflurane Protects

Rat Mixed Cerebrocortical Neuronal-Glial Cell Cultures against Transient Oxygen-Glucose Deprivation. *Anesthesiology*, 105(5), 990-998.

Cheng ZX, Lan DM, Wu PY, Zhu YH, Dong Y, Ma L, et al. (2008). Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate inhibits persistent sodium currents in rat medial prefrontal cortex via activation of sigma-1 receptors. *Exp Neurol* 210: 128-36.

Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8: 18–30.

Compagnone, N., Bulfone, A., Rubenstein, J. L., Mellon, S. H. (1995). Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136(11), 5212-5223.

Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., Baulieu, E. E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), 4704–4707.

Crane PK, Gibbons LE, Dams-O'Connor K, et al. (2016). Association of traumatic brain injury with late-life neurodegenerative conditions and neuropathologic findings. *JAMA Neurology*, 73:1062–1069 .

Davies, M. (2003). The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(4), 263–274.

Deutsch MB, Mendez MF, Teng E. (2015). Interactions between traumatic brain injury and frontotemporal degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 39:143–153.

Dillon JS. (2005). Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 377–85.

Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310–318.

- Durukan, A., and Tatlisumak, T. (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia, *Pharmacol Biochem Behav* 87, 179–197.
- Eltzschig, H. K., Collard, C. D. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin*, 70(1), 71-86.
- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 17(11), 1391–1401.
- Endres, M., & Dirnagl, U. (2003). Ischemia and Stroke. *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, 455–473. doi:10.1007/978-1-4615-0123-7_17
- Escargueil, C. R., Machado, C. B., Blanc, R. P., Fleck, R. A., & Sesardic, D. (2011). Enhanced sensitivity to Botulinum type A neurotoxin of human neuroblastoma SH-SY5Y cells after differentiation into mature neuronal cells. *The Botulinum J.*, 2(1), 30.
- Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Schrijvers, D., Moens, L., Dewilde, S. (2007). Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: A step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions. *Gene*, 398(1-2), 114-122.
- Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. (1999). Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 141: 35-9.
- Gandy S. (2002). Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23: 1009–16.
- Gil-ad I, Shtauf B, Eshet R, Maayan R, Rehavi M, Weizman A. (2001). Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture. *Isr Med Assoc J.* 3:639–43.
- Goldberg, M. P., Choi. D. W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of Neuroscience*, 13(8), 3510-3524.

Gorlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Red Biol* 6: 260-71.

Grimm A, Biliouris EE, Lang UE, Gotz J, Mensah-Nyagan AG, Ecker A. (2016). Sex hormone-related neurosteroids differentially rescue bioenergetic deficits induced by amyloid- β or hyperphosphorylated tau protein. *Cell Mol Life Sci* 73: 201-15.

Grimm A, Lim Y-A, Mensah-Nyagan AG, Götz J, Eckert A. (2012). Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Mol Neurobiol* 46: 151–60.

Grimm A, Schmitt K, Lang UE, Mensah-Nyagan AG, Eckert A. (2014). Improvement of neuronal bioenergetics by neurosteroids: Implications for age-related neurodegenerative disorders. *BBA – Mol Bas Dis* 1842: 2427-38.

Guazzo, E., Kirkpatrick, P. J., Goodyer I. M., Shier 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. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(11), 3951- 3960.

Gupta M, Dasgupta A. (2014). Behavioural and psychological symptoms in poststroke vascular cognitive impairment. *Behav Neurol*. 2014: 430128.

Haffner SM, Valdez RA, Mykkanen L, Stern MP, Katz MS. (1994). Decreased testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations are associated with increased insulin and glucose concentrations in nondiabetic men. *Metabolism* 43: 599–603.

Hojo, Y., Hattori, T., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H., Mukai, H., Morrison, J. H., Janssen, W. G., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., Kawato, S. (2003). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 865-870.

Holloway, P. M., & Gavins, F. N. E. (2016). Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke*, 47(2), 561–569.

- Jacob MH, Janner Dda R, Bello-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MF. (2008). Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Ster Bioch Mol Biol* 112: 138-44.
- Jiménez MC, Sun Q, Schürks M, Chiuve S, Hu FB, Manson JE, Rexrode KM. (2013). Low dehydroepiandrosterone sulfate is associated with increased risk of ischemic stroke among women. *Stroke*. 44: 1784-9.
- 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.
- Kaasik A., Vassiljev V., Poldoja E., Kalda A. and Zharkovsky A. (1999) Do nuclear condensation and DNA fragmentation reflect the mode of neuronal death? *NeuroReport* 10, 1937-1942.
- Kalaria, R. N., & Ballard, C. (2001). Stroke and cognition. *Current Atherosclerosis Reports*, 3(4), 334–339.
- Kawahara M, Negishi-Kato M, Sadakane Y.(2009). Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid protein. *Expert Rev Neurother* 9: 681-693.
- Kimonides V. G., Khatibi N. H., Svendsen C. N., Sofroniew M. V. and Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 95, 1852-1857.
- Knapstein, P., David, A., Wu, C., Archer, D., Flickinger, G., Touchstone, J. (1968). Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids*, 11(6), 885-896.
- Kostakis, E., Smith, C., Jang, M., Martin, S. C., Richards, K. G., Russek, S. J., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (2013). The Neuroactive Steroid Pregnenolone Sulfate Stimulates Trafficking of Functional NMethyl D-Aspartate Receptors to the Cell Surface via a Noncanonical, G Protein, and Ca²⁺ - Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology*, 84(2), 261-274.

- Kumar P, Taha A, Sharma D, Kale RK, Baquer NZ. (2008). Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on monoamine oxidase activity, lipid peroxidation and lipofuscin accumulation in aging rat brain regions. *Biogerontology* 9: 235-46.
- Kurata, K., Takebayashi, M., Morinobu, S. Yamawaki, S. (2004). Beta-Estradiol, Dehydroepiandrosterone, and Dehydroepiandrosterone Sulfate Protect against N-Methyl-Daspartate-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 237-245.
- Labrie, F. (2004). Adrenal Androgens and Intracrinology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(4), 299-309.
- Lanthier, A., Patwardhan, V. (1986). Sex steroids and 5-en-3 β -hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *Journal of Steroid Biochemistry*, 25(3), 445-449.
- Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjövall, J., Baulieu E. E. (2004). Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *The Journal of Lipid Research*, 45(12), 2287- 2302.
- 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: 323-33.
- Li L, Zhao J, Ge C, Yu L, Ma H. (2018). Dehydroepiandrosterone rehabilitate BRL-3A cells oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide. *J Cell Physiol* 233: 6262-72.
- Li, W., Risacher, S. L., McAllister, T. W., & Saykin, A. J. (2016). Traumatic brain injury and age at onset of cognitive impairment in older adults. *Journal of Neurology*, 263(7), 1280–1285.
- Li Z, Cui S, Zhang Z, Zhou R, Ge Y, Sokabe M, Chen L. (2009). DHEA-neuroprotection and -neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29: 287–96.

LoBue, C., Cullum, C. M., Didehbani, N., Yeatman, K., Jones, B., Kraut, M. A., & Hart, J. (2018). Neurodegenerative Dementias After Traumatic Brain Injury. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 30(1), 7–13.

Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, DeKosky S. (2002). Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA*. 288: 1475–83.

Majewska, M. D. (1992). Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology*, 38(4), 379-394.

Malagelada, C., Xifro, X., Minano, A., Sabria, J., Rodriguezalvarez, J. (2005). Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen – glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of Disease*, 20(1), 27-37.

Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol* 30: 65-91 (2009).

Mao X. and Barger W. B. (1998) Neuroprotection by dehydroepiandrosteronesulphate: role of an NFkB-like factor. *NeuroReport* 9, 759-763.

Martin, R., Lloyd, H., Cowan, A. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *Trends in Neurosciences*, 17(6), 251-257.

Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O, et al. (2003). Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life Sci* 73: 289-99.

Mattson, M. P., Zhu, H., Yu, J., Kindy, M. S. (2000). Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1358-1364.

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. *Eur J Pharmacol* 390: 145-55.

Mcbean, D. E., Kelly, P. A. (1998). Rodent Models of Global Cerebral Ischemia: A Comparison of Two-Vessel Occlusion and Four-Vessel Occlusion. *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(4), 431-434.

Mckeith, I. (2007). Dementia with Lewy bodies. *Handbook of Clinical Neurology*, 531–548.

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. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(8), 1101–1106.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 139(2), 271-279.

Nieschlag, E., Loriaux, D., Ruder, H., Zucker, I., Kirschner, M., Lipsett, M. (1973). The Secretion Of Dehydroepiandrosterone And Dehydroepiandrosterone Sulphate In Man. *Journal of Endocrinology*, 57(1), 123-134.

Nour, M., Scalzo, F., Liebeskind, D. S. (2012). Ischemia - Reperfusion Injury in Stroke. *Interventional Neurology*, 1(3-4), 185-199.

Nuovo G, Paniccia B, Mezache L, Quiñónez M, Williams J, Vandiver P, Fadda P, Amann V. (2017). Diagnostic pathology of Alzheimer's disease from routine microscopy to immunohistochemistry and experimental correlations. *Annals of Diagnostic Pathology*. 28:24-29.

O'Brien J. T, Erkinjuntti T, Reisberg B, et al. (2003). Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol*. 2: 89–98.

O'Brien, J. T., & Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *The Lancet*, 386(10004), 1698–1706.

- Parker, L., Odell, W. (1980). Control of Adrenal Androgen Secretion. *Endocrine Reviews*, 1(4), 392-410.
- Powrie YSL, Smith C. (2018). Central intracrine DHEA synthesis in ageing-related neuroinflammation and neurodegeneration: therapeutic potential? *J Neuroinflam* 15: 289.
- Quinn, T. A., Robinson, S. R., & Walker, D. (2018). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA Sulfate: Roles in Brain Function and Disease. *Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases*.
- Rainey, W. E., & Nakamura, Y. (2008). Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3-5), 281–286.
- Rhodes, M.E., Li, P. K., Flood, J. F., Johnson, D. A. (1996). Enhancement of hippocampal acetylcholine release by the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate: an in vivo microdialysis study, *Brain Res.* 733 284–286.
- Ridder, D., Schwaninger, M. (2009). NF- κ B signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3), 995-1006.
- Rogers, J. M., & Read, C. A. (2007). Psychiatric comorbidity following traumatic brain injury. *Brain Injury*, 21(13-14), 1321–1333.
- Román, G. C. (2002). Vascular dementia revisited: Diagnosis, pathogenesis, treatment, and prevention. *Medical Clinics of North America*, 86(3), 477–499.
- Roman, G. C., Tatemichi, T. K., Erkinjuntti, T., Cummings, J. L., Masdeu, J. C., Garcia, J. H., Scheinberg, P. (1993). Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies: Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology*, 43(2), 250–250.
- Sakr H, Khalil K, Hussein A, Zaki M, Eid R, Alkhateeb M. (2014). Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 65:41-53.

- Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG. (2006). Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J Neurol Neurobiol* 66: 868-881.
- Schonemann, M., Muench, M., Tee, M., Miller, W., Mellon, S. (2012). Expression of P450c17 in the Human Fetal Nervous System. *Endocrinology*, 153(5), 2494-2505.
- Schwartz AG, Pashko LL. (2004). Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Age Res Rev* 3: 171-87.
- Shen, J., Qiu, X., Jiang, B., Zhang, D., Xin W., Fung, P. C., Zhao, B. (2003). Nitric oxide and oxygen radicals induced apoptosis via bcl-2 and p53 pathway in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Science in China Series C*, 46(1), 28-39.
- Shi, H., Liu, K. J. (2006). Effects of glucose concentration on redox status in rat primary cortical neurons under hypoxia. *Neuroscience Letters*, 410(1), 57-61.
- Shimada, M., Yoshinari, K., Tanabe, E., Shimakawa, E., Kobashi, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2001). Identification of ST2A1 as a rat brain neurosteroid sulfotransferase mRNA. *Brain Research*, 920(1-2), 222-225.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, (108)
- Sinha N, Taha A, Baquar NZ, Sharma D (2008). Exogenous administration of dehydroepiandrosterone attenuates loss of superoxide dismutase activity in the brain of old rats. *Indian J Biophys Biochem* 45:57-60.
- Stebbins GT, Nyenhuis DL, Wang C, et al. (2008). Gray matter atrophy in patients with ischemic stroke with cognitive impairment. *Stroke*. 39: 785-93.
- Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology Mammalian Cell Viability*, 740, 1-6.
- Stoppini, L., Buchs, P., Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173-182.

Suh, S. W., Shin, B. S., Ma, H., Hoecke, M. V., Brennan, A. M., Yenari, M. A., Swanson, R. A. (2008). Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Annals of Neurology*, 64(6), 654-663.

Švob Štrac, D. Š., Konjevod, M., Perković, M. N., Tudor, L., Erjavec, G. N., Pivac, N (2020). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its Sulphate (DHEAS) in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2020, 17, 1-15.

Tamagno E, Aragno M, Bocuzzi G, Gallo M, Parola S, Fubini B, et al. (1998). Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem Funct* 16: 57-63.

Tannenbaum, C., Barrett-Connor, E., Laughlin, G., Platt, R. (2004). A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) change in older men and women: The Rancho Bernardo Study. *European Journal of Endocrinology*, 151(6), 717-725.

Traystman, R. J. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85-95.

Vieira-Marques C, Arbo BD, Ruiz-Palmero I, Ortiz-Rodriguez A, Ghorbanpoor S, Kucharski LC, et al. (2016). Dehydroepiandrosterone protects male and female hippocampal neurons and neuroblastoma cells from glucose deprivation. *Brain Res* 1644: 176-82.

Wang, J., Zhang, P. & Tang, Z. (2020). Animal models of transient ischemic attack: a review. *Acta Neurol Belg* 120, 267–275.

Webb, S. J., Geoghegan, T. E., Prough, R. A., Miller, K. K. (2006). The Biological Actions of Dehydroepiandrosterone Involves Multiple Receptors. *Drug Metabolism Reviews*, 38(1-2), 89-116.

Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, et al. (2002). Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5138-43.

Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. (2006). Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep* 58: 335-40.

Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S.-C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., & Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 11.

Yabuki Y, Shinoda Y, Izumi H, Ikuno T, Shioda N, Fukunaga K. (2015). Dehydroepiandrosterone administration improves memory deficits following transient brain ischemia through sigma-1 receptor stimulation. *Brain Res* 1622: 102-13.

Yang, L., Shah, K. K., & Abbruscato, T. J. (2011). An In Vitro Model of Ischemic Stroke. *Astrocytes*, 451–466.

Yang, S.-T., Hsiao, I.-T., Hsieh, C.-J., Chiang, Y.-H., Yen, T.-C., Chiu, W.-T., Hu, C.-J. (2015). Accumulation of amyloid in cognitive impairment after mild traumatic brain injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 349(1-2), 99–104.

Yilmaz, G., Granger, D. N. (2010). Leukocyte Recruitment and Ischemic Brain Injury. *Neuromolecular Medicine*, 12(2), 193–204.

Yu, A. C., Wong, H. K., Yung, H. W., Lau, L. T. (2001). Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia*, 35(2), 121-130.

<http://mozdanival.hr/mozdani-udar/>

<http://alllab.net/product/hypoxia-chamber/42/>

<https://www.world-stroke.org/>

<https://www.wasderarztbraucht.de/Laborbedarf/Zubehoer/Zaehlkammer-nach-Buerker-Tuerk-doppelt-mit-CE-Zeichen>

https://www.researchgate.net/figure/Buerker-chamber-and-Fast-Read-102R-cell-count-method-The-Buerker-chamber-has-9-large_fig2_225084954

<https://theferalexplorer.wordpress.com/2019/07/05/understanding-mtt-assay/>

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. rujna 1996. u Osijeku. Osnovnu školu pohađala sam u Tenji, nakon čega sam završila II. Gimnaziju Osijek. 2015. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a diplomski studij Eksperimentalna biologija (Fiziologija i imunobiologija) upisala sam u Zagrebu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Tijekom studiranja volontirala sam kao demonstrator na kolegijima Biokemija 1 i Biokemija 2. Također sam sudjelovala u projektima popularizacije znanosti, kao što su „Biolog-i-ja“ te „Tjedan mozga“. Diplomski rad sam započela 2021. na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Matee Nikolac Perković.

Vrlo dobro se služim engleskim jezikom u govoru i pisanju, a talijanski poznajem na osnovnoj razini. Tijekom studiranja sam kontinuirano radila studentske poslove promotora, što mi je uvelike pomoglo u stjecanju komunikacijskih vještina, te dobrom snalaženju u timskom radu.

