

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK

BARBARA VUIĆ

ULOGA DEHIDROEPIANDROSTERONA I NJEGOVOG SULFATA TE MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA U DEMENCIJI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



FACULTY OF SCIENCE DEPARTMENT OF BIOLOGY

BARBARA VUIĆ

THE ROLE OF DEHYDROEPIANDROSTERONE AND ITS SULFATE, AS WELL AS BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN DEMENTIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Dubravke Švob Štrac, znanstvene savjetnice Instituta Ruđer Bošković, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU

Dubravka Švob Štrac je 1998. godine stekla titulu dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija, magistrirala 2004. godine i doktorirala 2007. godine. Također je, 2011. godine, završila stručni specijalistički studij projektnog menadžmenta na Visokoj školi za poslovanje i upravljanje "Baltazar Adam Krečelić" u Zaprešiću, a provela je i veći broj kratkotrajnih usavršavanja u zemlji i inozemstvu.

Zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković (IRB) od 1998. godine, a od 2024. godine radi na radnom mjestu znanstvenog savjetnika. U znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor pri Sveučilištu J. J. Strossmayera u Osijeku, te Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci izabrana je 2020. godine. Od 2021. godine voditeljica je Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju, na Zavodu za molekularnu medicinu IRB-a, a od 2018. godine zamjenica je predsjednika Znanstvenog vijeća struke Biomedicina na IRB-u.

Glavni istraživački interes dr. Švob Štrac usmjeren je prema istraživanju biološke podloge neuropsihijatrijskih poremećaja. Objavila je do sada ukupno 115 radova, od čega je 100 znanstvenih radova objavljeno u časopisima indeksiranim u bazama podataka WoSCC/Scopus i 15 ostalih radova, te 23 poglavlja u knjigama (2858 citata, h-indeks 28).

Kao suradnik je sudjelovala na ukupno 24 različita istraživačka projekta i bila je voditelj dva istraživačka projekta: 2009.-2013. MZOS "Stres, GABA-A receptori i mehanizmi djelovanja neuropsihoaktivnih lijekova i 2020.-2024. HrZZ "Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji", te četiri ostala projekta: 2019.-2020. Zaklada HAZU "Uloga glazbe i zvukova u odgovoru na stres: psihofiziološki pokazatelji", 2014.-2017. CRNP-IBRO kolaborativni projekt "Neurosteroids as therapeutic opportunities in ischemic brain injury" (ostali voditelji Ž. Krsnik i J. Zlatković), 2021.-2023. bilateralni hrvatsko-mađarski MZO projekt "Testing dehydroepiandorsterone as possible treatment for Alzheimer disorder using *in vitro* and *in vivo* models" (mađarski voditelj D. Zelena) i 2020.-2025. HrZZ "Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti".

Sudjeluje u nastavi kao voditelj i suradnik kolegija na diplomskim i doktorskim studijima Sveučilišta u Zagrebu, Rijeci i Osijeku. Do sada je bila mentor 18 diplomskih i četiri doktorska rada, dok su još jedan diplomski rad i jedan doktorski rad pod njenim mentorstvom u tijeku. Član je brojnih stručnih društava u kojima ima i odgovorne funkcije: potpredsjednica je Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, tajnica Hrvatskog društva farmakologa, član Povjerenstva za znanost i društvo Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, te član Vijeća Hrvatskog društva za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju.

Dobitnica je brojnih stipendija i nagrada od kojih treba istaknuti nekoliko nagrada IRB-a za doprinos popularizaciji znanosti i ko-autorstvo na najboljem znanstvenom radu, Državnu nagradu za znanost (za popularizaciju i promidžbu znanosti u području biomedicine i zdravstva) 2019. godine, te priznanje Odjela za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci 2022. godine.

Član je uredništva nekoliko međunarodnih znanstvenih časopisa, pri čemu je urednik dva posebna broja u časopisu Genes i dva posebna broja u časopisu Biomedicines, suradni urednik u sekciji Neuropharmacology za časopise Frontiers, te urednik posebnih izdanja časopisa Journal of Neuroscience Methods (Elsevier). Recenzent je brojnih časopisa, knjiga, skupova, projekata (HrZZ, Ciparska zaklada za znanost) i nagrada (Državna nagrada za znanost), sudjelovala je u organizaciji brojnih znanstvenih i stručnih skupova, te je aktivna u popularizaciji znanosti.

ZAHVALE

Veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dubravki Švob Štrac, na prenesenom znanju, podršci, strpljenju i svim savjetima koje mi je nesebično pružala tijekom ovog putovanja. Njezina sposobnost da me usmjeri, potakne na razmišljanje iz različitih perspektiva i uvijek pronađe pravi savjet bila je ključna za moj napredak. Hvala joj što je vjerovala u moj rad i pomogla mi ostvariti zacrtane ciljeve.

Hvala mom Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, sadašnjim i bivšim kolegama, dr.
sc. Matei Nikolac Perković, dr. sc. Gordani Nedić Erjavec, dr. sc. Marceli Konjevod, dr. sc.
Luciji Tudor, dr. sc. Vladimiru Farkašu i našoj tehničarki Snježani Juler, za svaki riješeni izazov, savjet, pomoć, podršku, podijeljene životne priče, osmijehe i veselje kojima su uljepšali svaki dan na poslu. Posebno hvala Tini Miloš, mag. biol. exp., i Nikoli Baliću, mag. biol. exp., što su uvijek bili tu, motivirali me da dam najbolje od sebe i bez kojih dani na poslu ne bi bili ni upola tako zabavni.

Za eksperimentalni dio ovog rada zahvaljujem i kolegama iz Laboratorija za eksperimentalnu terapiju, Laboratorija za metabolizam i starenje, Laboratorija za membranski transport i signalizaciju, Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje, Laboratorija za kemijsku biologiju, Laboratorija za biogeokemiju mora i atmosfere i Laboratorija za procese taloženja IRB-a, Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Klinike za psihijatriju "Vrapče",

Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu te Instituta za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Pečuhu. Hvala i svim ostalim kolegama i zaposlenicima IRB-a koji su priskočili u pomoć kada je bilo potrebno i pružili utjehu kada stvari nisu išle po planu. Njihova podrška u tim trenucima bila je neprocjenjiva i na tome im od srca hvala.

Najveće hvala mojim roditeljima i braći na bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju i podršci kroz sve periode mog života. Njihova stalna prisutnost moj je najveći oslonac. Hvala im što vjeruju u mene i onda kada ja u sebe ne vjerujem.

Posebnu zahvalnost iskazujem svom Mateu i prijateljima, koji su uvijek uz mene s osmijehom i riječima ohrabrenja, kao moji najglasniji navijači. Njihova ljubav i podrška neizmjerno mi znače i beskrajno sam zahvalna što su neizostavni dio mog života.

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet Biološki odsjek

ULOGA DEHIDROEPIANDROSTERONA I NJEGOVOG SULFATA TE MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA U DEMENCIJI

BARBARA VUIĆ

Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju Institut Ruđer Bošković

Demencija predstavlja jedan od najznačajnijih medicinskih i ekonomskih izazova današnjice. Najčešći uzroci demencije su Alzheimerova bolest, obilježena nakupljanjem proteina A β i tau u mozgu, te vaskularna demencija, izazvana ograničenim dotokom krvi u mozak. Kako trenutno dostupne terapije samo ublažavaju simptome demencije, uz ograničenu učinkovitost i nuspojave, istraženi su neuroprotektivni učinci dehidroepiandrosterona i njegovog sulfata (DHEA(S)) te moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF). U istraživanju su korišteni stanični (primarna kultura neurona miševa C57BL/6 i stanična linija SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka, izložene oligomerima A β , odnosno deprivaciji kisika i glukoze) i životinjski (miševi C57BL/6 injicirani s oligomerima A β i transgenični miševi 3xTg-AD) modeli demencija, te uzorci krvi ispitanika s demencijom i normalnom kognicijom. Rezultati istraživanja ukazuju na blago neuroprotektivno djelovanje DHEA(S)-a i BDNF-a u staničnim i životinjskim modelima demencije te na smanjene razine DHEA(S)-a i povećane razine BDNF-a u plazmi ispitanika s demencijom, upućujući na preventivni i/ili terapijski potencijal ovih supstanci, koji je potrebno dalje istražiti.

(199 stranica, 83 slike, 24 tablice, 553 literaturna navoda, jezik izvorika: hrvatski)

Ključne riječi: demencija, Alzheimerova bolest, vaskularna demencija, dehidroepiandrosteron (sulfat), moždani neurotrofni čimbenik, neuroprotektivna uloga

Mentor: naslovna izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Maja Matulić

dr. sc. Julija Erhardt, viši predavač naslovna izv. prof. dr. sc. Marina Šagud, dr. med. spec. psih. Zamjena: dr. sc. Ana Čipak Gašparović, viša znanstvena suradnica University of Zagreb Faculty of Science Department of Biology

Doctoral thesis

THE ROLE OF DEHYDROEPIANDROSTERONE AND ITS SULFATE, AS WELL AS BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN DEMENTIA

BARBARA VUIĆ

Laboratory of Molecular Neuropsychiatry Ruđer Bošković Institute

Dementia represents one of the greatest medical and economic challenges today. Most common causes of dementia are Alzheimer's disease, characterized by $A\beta$ and tau accumulation in the brain, and vascular dementia, resulting from limited cerebral blood flow. Since available therapies only alleviate dementia symptoms, with limited efficacy and notable side effects, neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate (DHEA(S)) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were investigated. Research utilized cellular (primary neuronal culture from C57BL/6 mice and SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, exposed to $A\beta$ oligomers or oxygen and glucose deprivation), animal (C57BL/6 mice injected with $A\beta$ oligomers and transgenic 3xTg-AD mice) dementia models, and blood samples from dementia and control subjects. Findings revealed mild neuroprotective actions of DHEA(S) and BDNF in cellular and animal models of dementia, and reduced DHEAS and elevated BDNF plasma levels in dementia patients, suggesting their preventive and/or therapeutic potential, which should be further investigated.

(199 pages, 83 figures, 24 tables, 553 references, original in: Croatian)

Keywords: dementia, Alzheimer's disease, vascular dementia, dehydroepiandrosterone (sulfate), brain-derived neurotrophic factor, neuroprotective role

Supervisor: assoc. prof. Dubravka Švob Štrac, PhD

Reviewers: prof. Maja Matulić, PhD

Julija Erhardt, PhD, Senior Lecturer assoc. prof. Marina Šagud, MD, PhD, spec. psych.

Substitute: Ana Čipak Gašparović, PhD, Senior Research Associate

SADRŽAJ

1. UVC	1. UVOD				
2. LITI	ERATURNI PREGLED	3			
2.1. Ne	eurokognitivni poremećaji	3			
2.1.1.	Blagi NKP	4			
2.1.2.	Teški NKP	4			
2.1.3.	Etiološki podtipovi NKP-a	5			
2.2. Al	zheimerova bolest (AB)	6			
2.2.1.	Neuropatološke promjene u AB-u	6			
2.2.2.	Tijek i kliničke karakteristike AB-a	8			
2.2.3.	Čimbenici rizika i genetska osnova AB-a	8			
2.2.4.	Hipoteze nastanka AB-a	9			
2.2.5.	Terapijske mogućnosti i izazovi u AB-u	10			
2.3. Va	skularna demencija (VaD)	11			
2.3.1.	Cerebrovaskularne patologije u VaD-u	11			
2.3.2.	Oblici i kliničke karakteristike VaD-a	12			
2.3.3.	Terapijski pristup VaD-u	12			
2.4. M	odeli AB-a i VaD-a <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	14			
2.5. De	hidroepiandrosteron i njegov sulfat (DHEA(S))	18			
2.5.1.	Biosinteza DHEA(S)-a	19			
2.5.2.	Fiziološke funkcije DHEA(S)-a	21			
2.5.3.	Potencijalne uloge DHEA(S)-a u demenciji	21			
2.6. M	oždani neurotrofni čimbenik (BDNF)	25			
2.6.1.	Biosinteza BDNF-a	25			
2.6.2.	Polimorfizmi gena BDNF	26			
2.6.3.	Signalni putevi BDNF-a	26			
2.6.4.	Potencijalne uloge BDNF-a u demenciji	28			
3. MAT	FERIJAL, ISPITANICI I METODE	30			
3.1. M	odeli AB-a i VaD-a <i>in vitro</i>	30			
3.1.1.	Primarna kultura neurona miševa C57BL/6	30			
3.1.2.	Stanična linija SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka	33			
3.1.3.	Optimizacija modela AB-a	35			
3.1.3	.1. Priprema, provjera i primjena monomera, oligomera i polimera Aβ ₄₂	35			
3.1.3	.2. Određivanje vijabilnosti stanica izloženih monomerima, oligomerima i				
polin	nerima Aβ42	37			
3.1.4.	Optimizacija modela VaD-a	40			
3.1.5.	Analiza mehanizama ozljede u modelima AB-a i VaD-a in vitro	40			

3.1.0	6. Tr	etman DHEA(S)-om i BDNF-om u modelima AB-a i VaD-a in vitro	
3.	1.6.1.	Određivanje stanične vijabilnosti	46
3.	1.6.2.	Izolacija RNA i proteina	46
3.	1.6.3.	Određivanje ekspresije odabranih gena	48
3.	1.6.4.	Određivanje ekspresije odabranih proteina	51
3.2.	Model	i AB-a in vivo	54
3.2.	1. Fa	ırmakološki izazvan model AB-a	54
3.2.2	2. Ge	enetički model AB-a	55
3.2.3	3. Tr	etman DHEA(S)-om u modelima AB-a in vivo	56
3.	2.3.1.	Testovi ponašanja	57
3.	2.3.2.	Izolacija hipokampusa	61
3.	2.3.3.	Određivanje ekspresije odabranih gena u homogenatima hipokampusa.	61
3.	2.3.4.	Određivanje ekspresije odabranih proteina u homogenatima hipokampu	ısa 62
3.	2.3.5.	Određivanje koncentracije Aβ42, tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogena	tima
hi	pokamj	pusa	62
3.3.	Ispitar	nici	64
3.3.	1. Iz	olacija plazme, genomske DNA i RNA	64
3.3.2	2. Ge	enotipizacija polimorfizama gena SULT2A1 i BDNF	68
3.3.3	3. Oo	dređivanje ekspresije gena BDNF	70
3.4.	Statist	ička obrada podataka	
4. R	EZULI	ГАТІ	
4.1.	Model	i AB-a i VaD-a <i>in vitro</i>	
4.1.	1. M	ehanizmi ozljede u modelima AB-a i VaD-a in vitro	
4.1.2	2. Tr	etman DHEA(S)-om i BDNF-om u modelima AB-a i VaD-a in vitro	85
4.	1.2.1.	Stanična vijabilnost	85
4.	1.2.2.	Ekspresija odabranih gena u stanicama	88
4.	1.2.3.	Ekspresija odabranih proteina u stanicama	
4.2.	Model	i AB-a in vivo	
4.	2.1.	Ponašanje životinja	
4.	2.2.	Ekspresija odabranih gena u homogenatima hipokampusa životinja	101
4.	2.2.1.	Ekspresija odabranih proteina u homogenatima hipokampusa životinja	104
4.	2.3.	Koncentracija A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokamp	ousa
ži	votinja	107	
4.3.	Ispitar	nici	110
4.3.	1. Ko	oncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi	112
4.3.2	2. Pc	limorfizmi gena SULT2A1 i BDNF	113
4.3.3	3. Ek	cspresija gena BDNF	118
5. R	ASPRA	AVA	119
51	II.	; DHEA(S) a: DDNE an modeling AD a: VaD a in the	110
5.1.	Utjeca	J DHEA(S)-a I DDNF-a u mouennia AD-a I vad-a <i>in vitro</i>	119

.1.1.	Mehanizmi ozljede u modelima AB-a i VaD-a <i>in vitro</i>			
.1.2.	Stanična vijabilnost u modelima AB-a i VaD-a <i>in vitro</i>			
.1.3.	Ekspresija odabranih gena i proteina u modelima AB-a i VaD-a in vitro 124			
. Utje	ecaj DHEA(S)-a u modelima AB-a <i>in vivo</i>			
.2.1.	Ponašanje životinja			
.2.2.	Ekspresija odabranih gena i proteina u homogenatima hipokampusa životinja 130			
.2.3.	Koncentracija Aβ ₄₂ , tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokampusa			
ivotinja	131			
. Ispi	tanici134			
.3.1.	Koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi			
.3.2.	Polimorfizmi gena SULT2A1 i BDNF			
.3.3.	Ekspresija gena BDNF			
6. ZAKLJUČAK				
7. LITERATURA				
8. PRILOZI197				
9. ŽIVOTOPIS				
	.1.1. .1.2. .1.3. . Utje .2.1. .2.2. .2.3. ivotinja .3.1. .3.2. .3.3. ZAKI LITE PRILO ŽIVO			

POPIS KRATICA

3/17βHSD - 3/17β-hidroksisteroid dehidrogenaza 3xTg-AD - triple-transgenic Alzheimer's disease AB - Alzheimerova bolest ACD - acid citrate dextrose ADAS-Cog - kognitivna podskala ljestvice za procjenu AB-a (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale) AFM - mikroskopija atomskih sila (atomic force microscopy) ApoE - apolipoprotein E APP - amiloidni prekursorski protein $A\beta$ - amiloid β BACE1 - β-sekretaza (β-site APP cleaving enzyme 1) BACE2 - θ -sekretaza (β -site APP cleaving enzyme 2) BBB - krvno-moždana barijera (blood-brain barrier) BDNF - moždani neurotrofni čimbenik BEC - moždane endotelne stanice (brain endothelial cells) BH - Bcl-2 homologna BSA - goveđi serumski albumin (bovine serum albumin) CAA - cerebralna amiloidna angiopatija CADASIL - cerebralna autosomno dominantna arterioskleroza sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom CaMK - protein kinaze ovisne o kalciju/kalmodulinu cDNA - complementary DNA CDT - test crtanja sata (clock drawing test) CNS - središnji živčani sustav (central nervous system)

CREB - cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein

- CSF cerebrospinalna tekućina (cerebrospinal fluid)
- CTF C-terminalni fragment
- CYP11A1 cytochrome P45011A1
- DAG diacilglicerol
- DHEA(S) dehidroepiandrosteron (sulfat)
- DMEM Dulbecco's modified eagle's medium
- DMSO dimetilsulfoksid
- DMT terapije koje mijenjaju tijek bolesti (disease-modifying treatments)
- dNTP deoksinukleozidni trifosfati (deoxynucleoside triphosphates)

DSM - Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*)

- ELISA enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ent-PREGS enantiomer pregnenolon sulfata
- EOAD rani oblik AB-a (early-onset Alzheimer's disease)
- fAD obiteljski oblik AB-a (familial Alzheimer's disease)
- FBS fetalni goveđi serum (fetal bovine serum)
- GABA γ-aminomaslačna kiselina (γ-aminobutyric acid)
- GAPDH gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- GSK-3β kinaza glikogen sintaza-3β
- GWAS cjelogenomsko asocijacijsko istraživanje (genome-wide association studies)
- HBSS Hankova balansirana otopina soli (Hanks' balanced salt solution)
- hESC ljudske embrionalne matične stanice (human embryonic stem cells)
- HFIP heksafluoroizopropanol

hiPSC - ljudske inducirane pluripotentne matične stanice (human induced pluripotent stem cells)

- HIV virus ljudske imunodeficijencije (human immunodeficiency virus)
- i.c.v. intracerebroventrikularno
- i.p. intraperitonealno
- IP3 inozitol trifosfat (inositol trisphosphate)
- iPSC inducirane pluripotentne matične stanice (induced pluripotent stem cells)
- IRB Institut Ruđer Bošković
- LOAD kasni oblik AB-a (late-onset Alzheimer's disease)
- LTD dugotrajna depresija (long-term depression)
- LTP dugotrajna potencijacija (long-term potentiation)

MAPK-ERK (MEK-ERK) - kinaze MAP kinaze-kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (*mitogen-activated protein kinases-extracellular signal-regulated kinases*)

- MAPT protein tau povezan s mikrotubulima (microtubule-associated protein tau)
- mBDNF zreli BDNF (mature BDNF)
- MCI blago kognitivno oštećenje (mild cognitive impairment)
- MMSE test procjene mentalnog stanja (mini-mental state examination)
- mRNA glasnička RNA (messenger RNA)
- mTOR meta rapamicina u sisavaca (the mammalian target of rapamycin)
- MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid
- MWM Morrisov vodeni labirint (Morris water maze)
- NFT neurofibrilarni snopići (neurofibrillary tangles)
- NGF čimbenik rasta živaca (nerve growth factor)

NINCDS-ADRDA - Nacionalni institut za neurološke poremećaje i moždani udar - Udruga za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (*National institute of neurological and communicative disorders and stroke-the Alzheimer's disease and related disorders association*)

- NKP neurokognitivni poremećaj
- NMDA N-metil-D-aspartat
- NORT test prepoznavanja novog objekta (novel object recognition test)
- NT neurotrofin
- NVU neurovaskularna jedinica (neurovascular unit)
- OFT test otvorenog polja (open field test)
- OGD/R deprivacija kisika i glukoze/reperfuzija (oxygen glucose deprivation/reperfusion)
- p75NTR p75 neurotrofni receptor
- PAP 3'-fosfoadenozin-5'-fosfat (3'-phosphoadenosine-5'-phosphate)
- PAPS 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)
- PBS puferirana otopina fosfatnih soli (phosphate buffered saline)
- PDL poli-D-lizin
- PI3K-AKT fosfatidilinozitol 3-kinaza (*phosphatidylinositol 3-kinase*)-protein kinaza B (PKB/AKT)
- PKC protein kinaza C
- PLC γ fosfolipaza C γ (phospholipase C γ)
- PSEN presenilin
- PTEN homolog fosfataze i tenzina (phosphatase and tensin homolog)
- qPCR kvantitativna lančana reakcija polimerazom (quantitative polymerase chain reaction)
- Raf rapidly accelerated fibrosarcoma
- Ras rat sarcoma protein
- RCLB pufer za lizu eritrocita (red cell lysis buffer)
- ROS reaktivne kisikove vrste (reactive oxygen species)
- s.c. supkutano
- sAD sporadični oblik AB-a (sporadic Alzheimer's disease)

sAPP - sekretorni oblik APP-a

SDS - natrijev dodecil sulfat (sodium dodecil sulphate)

SDS-PAGE - denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SDT - test socijalne diskriminacije (social discrimination test)

SE – natrij-etilendiamintetraoctena kiselina (*sodium ethylenediaminetetraacetic acid, sodium EDTA*)

SHC - adaptor protein koji sadrži Src homolognu 2 domenu

SIVD - subkortikalna ishemijska vaskularna demencija

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism)

ST - test prskanja saharozom (splash test)

SULT2A1 - sulfotransferaza 2A1

SVD - bolest malih krvnih žila (small vessel disease)

 $tA\beta$ - krnji A β (truncated $A\beta$)

TBS-T - fiziološka otopina puferirana tris-om s Tween®-om 20 (tris-buffered saline with Tween20)

TE - tris-EDTA

TMB - tetrametilbenzidin

Trk - tropomiozin receptor kinaza

VaD - vaskularna demencija

1. UVOD

Demencija je jedan od najvećih svjetskih zdravstvenih i ekonomskih izazova 21. stoljeća. Naime, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2023. godine, više od 55 milijuna ljudi diljem svijeta živi s demencijom, dok se do 2050. godine predviđa utrostručenje tog broja [1]. Nadalje, u 2019. godini, troškovi skrbi za oko 14,1 milijuna oboljelih od demencije u Europi iznosili su čak 392 milijarde eura, odnosno prosječno 27815 eura po osobi [2]. Alzheimerova bolest (AB) najčešći je uzrok demencije koji se javlja u 60-70% slučajeva [3], dok se vaskularna demencija (VaD) dijagnosticira u 20% slučajeva [4].

AB je progresivna neurodegenerativna bolest povezana s kognitivnim, funkcionalnim i ponašajnim oštećenjima, a karakteriziraju je dvije glavne patološke značajke u mozgu: progresivno nakupljanje izvanstaničnih plakova peptida amiloida β (A β) i unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina tau u neurofibrilarnim snopićima [5]. Ove promjene uzrokuju postepeno propadanje neurona, što dovodi do kliničkih simptoma demencije kao što su gubitak pamćenja, poteškoće u donošenju odluka i promjene ponašanja. Prema amiloidnoj hipotezi, taloženje proteina A β , koji čini glavnu komponentu plakova, smatra se glavnim uzrokom patologije AB-a, pri čemu gubitak stanica, oštećenje krvnih žila i demencija nastaju kao izravne posljedice tog taloženja [6]. Trenutno dostupni lijekovi, inhibitori acetilkolinesteraze i antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, samo ublažavaju simptome, dok novo razvijena anti-amiloidna antitijela, iako usporavaju napredovanje bolesti u ranom stupnju, imaju ozbiljne nuspojave [7].

Drugi najčešći oblik demencije, VaD, nastaje zbog smanjenog ili blokiranog dotoka krvi u pojedine dijelove mozga, što uzrokuje nedostatak kisika i hranjivih tvari potrebnih neuronima, dovodeći do njihovog oštećenja i odumiranja. Klinički simptomi VaD-a ovise o položaju i veličini moždanog oštećenja, pri čemu specifičan neuropsihološki profil nije jasno definiran, iako su poremećaji izvršnih funkcija česti [8]. Zbog smanjenog uklanjanja proteina Aβ tijekom cerebrovaskularnog oštećenja i hipoperfuzije, AB i VaD dijele zajedničke značajke, pri čemu mnogi bolesnici s demencijom pokazuju miješanu patologiju ova dva stanja [9].

Budući da zasad ne postoji učinkovita terapija koja bi spriječila ili liječila AB i VaD, u ovom istraživanju ispitana je potencijalna neuroprotektivna uloga dehidroepiandrosterona i njegovog sulfata (DHEA(S)) te moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF). DHEA(S) je najzastupljeniji steroidni hormon u ljudskoj krvi, čije razine dostižu vrhunac u mladosti, a s godinama značajno opadaju [10]. Ovaj pad u koncentraciji DHEA(S)-a povezan je sa starenjem, ali i s

neuropsihijatrijskim poremećajima poput AB-a [11]. Istraživanja na miševima pokazala su pozitivne učinke DHEA(S)-a na pamćenje i otpornost na toksičnost nakupljanja Aβ [12], dok su u osoba s AB-om zabilježene promijenjene razine DHEA(S)-a u plazmi, serumu i cerebrospinalnoj tekućini [13].

S druge strane, BDNF, protein ključan za rast, preživljavanje i sazrijevanje neurona, kao i za sinaptičku plastičnost i kogniciju [14], ima važnu ulogu u zaštiti kortikalnih i hipokampalnih neurona od oštećenja u AB-u [15]. Osim toga, BDNF potiče i preživljavanje kolinergičnih neurona koji propadaju tijekom progresije bolesti [16]. Iako su neuroprotektivna svojstva BDNF-a potvrđena u istraživanjima *in vitro* i *in vivo* [17], u oboljelih od AB-a utvrđene su različite promjene razina BDNF-a i njegovog receptora TrkB, kao i njihove signalizacije [18,19].

Zbog proturječnih rezultata u dosadašnjoj literaturi, cilj je ovog istraživanja razjasniti ulogu DHEA(S)-a i BDNF-a u nastanku i progresiji demencije. Hipoteza je da DHEA(S) i BDNF ostvaruju neuroprotektivno djelovanje putem signalnog puta PI3K-AKT, potičući preživljavanje neurona i sprječavajući apoptozu.

Istraživanje obuhvaća primjenu različitih metoda na staničnim kulturama, laboratorijskim životinjama i uzorcima krvi ispitanika. Na primarnoj staničnoj kulturi neurona miševa C57BL/6 i staničnoj liniji SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka modelirane su AB i VaD primjenom oligomera Aβ, odnosno deprivacijom kisika i glukoze te reperfuzijom. Ispitana je neuroprotektivna uloga DHEA(S)-a i BDNF-a praćenjem signalnog puta PI3K-AKT te regulatora apoptoze na genskoj i proteinskoj razini. Na laboratorijskim životinjama, genetičkom modelu AB-a (miševi 3xTg-AD) i farmakološki izazvanom modelu AB-a (miševi 3xTg-AD) i farmakološki izazvanom modelu AB-a (miševi C57BL/6), nakon primjene DHEA(S)-a, procijenjene su kognitivne funkcije i ponašanje te je u homogenatima hipokampusa određena koncentracija proteina Aβ i tau, DHEAS-a i BDNF-a, uz analizu signalnog puta PI3K-AKT i regulatora apoptoze na genskoj i proteinskoj razini. U uzorcima krvi ispitanika određene su koncentracije DHEAS-a i BDNF-a, provedena je genotipizacija polimorfizama rs2637125 gena *SULT2A1* i rs6265 gena *BDNF* te analiza ekspresije gena *BDNF*.

Svrha ovog istraživanja je proširiti razumijevanje učinaka i mehanizama potencijalne neuroprotektivne uloge DHEA(S)-a i BDNF-a te neurobiološke osnove kompleksne stanične i molekularne patofiziologije demencija. Commented [M1]: red riječi , svugdje

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Neurokognitivni poremećaji

Kognitivne sposobnosti imaju velik utjecaj na samostalnost pojedinca u svakodnevnom životu [20] te predstavljaju jedan od ključnih čimbenika kvalitete života [21]. Kod starijih osoba određeni aspekti kognitivnog funkcioniranja, poput općeg znanja i rječnika, ostaju relativno stabilni [22], dok druge funkcije, uključujući brzinu obrade informacija, radno pamćenje, izvršne funkcije, verbalno prisjećanje i pažnju, s godinama postupno opadaju [23–25].

Starenje svjetske populacije dovodi do značajnog porasta broja osoba koje pate od neurokognitivnih poremećaja (NKP). Predviđa se da će do 2050. godine oko 22% svjetske populacije, odnosno približno 1,25 milijardi ljudi, biti starije od 60 godina, pri čemu će najveći udio činiti stanovništvo zemalja s nižim socioekonomskim statusom [26]. Procjene pokazuju da je 2010. godine u svijetu bilo 35,5 milijuna osoba s demencijom, a s obzirom na to da se njihov broj udvostručuje svakih 20 godina, očekuje se da će do 2050. narasti na 115,4 milijuna [26].

Prema četvrtom izdanju "Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje" (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, DSM-IV, [27]), kognitivni poremećaji svrstani su u četiri kategorije: delirij, demenciju, amnestičke poremećaje i ostale kognitivne poremećaje. Međutim, u petom izdanju DSM-a (DSM-V, [28]) te su kategorije zamijenjene s tri kategorije: delirij, blagi NKP i teški NKP. Dok je prema DSM-IV kognitivna disfunkcija temeljena na domenama poput afazije, agnozije, apraksije, oštećenja pamćenja i poremećaja izvršnih funkcija, DSM-V donosi precizniju kategorizaciju specifičnih kognitivnih domena, uključujući jezik, učenje i pamćenje, složenu pažnju, izvršne funkcije, perceptivnomotoričke sposobnosti te socijalnu kogniciju [29]. Osim što obuhvaća poremećaje povezane sa starenjem, klasifikacija DSM-V proširuje dijagnostički okvir i na kognitivne disfunkcije kod mlađih osoba, primjerice one uzrokovane traumatskom ozljedom mozga ili infekcijom virusa ljudske imunodeficijencije (*human immunodeficiency virus*, HIV) [30].

Prema klasifikaciji DSM-V, dijagnoza NKP-a temelji se na postojanju značajnog kognitivnog pada u odnosu na prethodnu razinu funkcioniranja u barem jednoj od šest kognitivnih domena. Taj pad mora biti potvrđen subjektivnom procjenom samog pojedinca, njegovih bliskih osoba ili kliničara te objektivnim dokazima kognitivnog oštećenja putem standardiziranih neuropsiholoških testova ili, u njihovom nedostatku, drugom kvantificiranom kliničkom procjenom. Razlikovanje između blagog i teškog NKP-a temelji se na utjecaju kognitivnih deficita na svakodnevno funkcioniranje. Kod blagog NKP-a, kognitivna oštećenja ne dovode do potpune ovisnosti o tuđoj pomoći, ali zahtijevaju veći trud, prilagodbu ili kompenzacijske strategije pri obavljanju složenih instrumentalnih aktivnosti, poput plaćanja računa ili upravljanja lijekovima. S druge strane, teški NKP značajno ometa samostalnost, pri čemu je osobi potrebna pomoć i podrška u obavljanju svakodnevnih aktivnosti. Kognitivni deficiti moraju biti prisutni neovisno o deliriju, kako bi se isključila mogućnost da su posljedica privremenog stanja akutne zbunjenosti. Također, potrebno je utvrditi da nisu uzrokovani drugim mentalnim poremećajem, poput teške depresije ili shizofrenije.

2.1.1. Blagi NKP

Blagi NKP uključuje dijagnoze blagog kognitivnog oštećenja (mild cognitive impairment, MCI) [31,32] te starije izraze, kao što su kognitivni pad povezan sa starenjem [33] i upitna demencija [34]. Međunarodno prihvaćena defincija MCI-ja vrlo je slična kategoriji blagog NKP-a iz DSM-V, s time da se MCI prvenstveno odnosi na stariju populaciju, dok blagi NKP uključuje sve dobne skupine [35]. Naime, MCI se odnosi na kognitivna oštećenja izraženija od onih uobičajenih za starosnu dob, ali nedovoljno ozbiljna da značajno utječu na svakodnevno funkcioniranje [36]. Procjenjuje se da se prevalencija MCI-ja kreće između 14-18% u osoba starijih od 70 godina [37]. Međutim, točne vrijednosti teško je odrediti zbog nepostojanja standardiziranih kriterija i različitih definicija u istraživanjima [38]. Osim dobi, kao najsnažnijeg čimbenika rizika, važnu ulogu imaju i prisutnost alela ɛ4 apolipoproteina E (ApoE) [39], muški spol [40], obiteljska anamneza kognitivnih oštećenja, te vaskularni rizici poput hipertenzije, hiperlipidemije, moždanog udara i koronarne bolesti srca [41]. Dodatno, kronična medicinska stanja poput dijabetesa, kronične opstruktivne plućne bolesti i depresije, također pridonose povećanom riziku [42-44]. Nadalje, stil života također značajno utječe na razvoj MCI-ja, pri čemu kognitivna i/ili fizička neaktivnost povećavaju vjerojatnost njegova nastanka [45,46]. Istraživanja su pokazala da se u 30-50% osoba kojima je prvotno dijagnosticiran MCI tijekom praćenja ponovno utvrđuje normalna kognicija [47,48]. Unatoč toj visokoj stopi reverzije, godišnja stopa progresije MCI-ja u teški NKP iznosi 5-10%, što je znatno više u usporedbi s incidencijom teškog NKP-a od 1-2% godišnje u općoj populaciji [49,50].

2.1.2. Teški NKP

Definicija demencije proširena je u kriterijima DSM-V, gdje je tradicionalni izraz "demencija" zamijenjen pojmom "teški NKP". Ipak, s obzirom na široku uporabu termina "demencija" u svakodnevnom govoru i medicinskoj literaturi, ovaj izraz je korišten u daljnjim poglavljima

ovog rada. Teški NKP obilježen je značajnim padom u barem jednoj od šest kognitivnih domena prema DSM-V kriterijima. Predstavlja značajnu promjenu u odnosu na prethodnu razinu kognitivnih sposobnosti oboljelog, traje duži vremenski period, te nije isključivo povezan s epizodom delirija. Uz kognitivno pogoršanje, nužna je prisutnost smanjene sposobnosti bolesnika da obavlja svakodnevne aktivnosti. Funkcionalnost se često procjenjuje prema sposobnosti bolesnika da upravlja instrumentalnim aktivnostima svakodnevnog života, poput vođenja financija ili uzimanja lijekova, ili, u težim slučajevima, osnovnim životnim aktivnostima, kao što su osobna higijena ili hranjenje [51]. Teški NKP često ima progresivan tijek, pri čemu oboljeli često nemaju uvid u vlastite poteškoće [30].

2.1.3. Etiološki podtipovi NKP-a

Različita stanja mogu uzrokovati NKP, a kriteriji DSM-V preciziraju 13 etioloških podtipova koji upućuju na mogući uzrok poremećaja. Među njima su AB, VaD, frontotemporalna lobarna degeneracija, bolest Lewyjevih tjelešaca, traumatska ozljeda mozga, uporaba supstanci ili lijekova, infekcija HIV-om, prionska bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, druga medicinska stanja, višestruki uzroci i neodređena etiologija. Uz to, stanja poput progresivne supranuklearne paralize, kortikobazalnog sindroma i, rjeđe, multiple sistemske atrofije također mogu dovesti do razvoja ovog poremećaja. Etiologija se kategorizira kao "moguća" ili "vjerojatna", čime se označava stupanj sigurnosti u vezi s uzrokom NKP-a. Patofiziologija NKP-a ovisi o podtipu, pri čemu je većina njih posljedica nakupljanja nativnih proteina u mozgu [30]. Dva najčešća podtipa NKP-a su AB i VaD.

2.2. Alzheimerova bolest (AB)

AB, nazvana po njemačkom psihijatru i neuroanatomu Aloisu Alzheimeru, najčešći je oblik demencije i progresivna je neurodegenerativna bolest. Alois Alzheimer je 1906. godine primijetio prisutnost amiloidnih plakova i značajan gubitak neurona tijekom ispitivanja mozga bolesnice Auguste Deter, koja je patila od gubitka pamćenja i promjena osobnosti. Tu je pojavu opisao kao ozbiljnu bolest moždane kore [52], dok je Emil Kraepelin prvi put ovo medicinsko stanje nazvao "Alzheimerova bolest" [53]. AB je za sada neizlječivi poremećaj, obilježen postupnim gubitkom kratkoročne memorije i kognitivnih sposobnosti, što na kraju dovodi do demencije i smrti [54].

2.2.1. Neuropatološke promjene u AB-u

Dvije vrste neuropatoloških promjena u AB-u uključuju "pozitivne" lezije, koje karakterizira nakupljanje amiloidnih plakova, neurofibrilarnih snopića (*neurofibrillary tangles*, NFT) i drugih naslaga u mozgu osoba s AB-om, i "negativne" lezije, koje su obilježene atrofijom uzrokovanom gubitkom neurona i sinapsi [55]. Drugi čimbenici poput oštećenja kolinergičnih neurona, oksidacijskog stresa i neuroupale također mogu pridonijeti neurodegeneraciji [56–58]. Dvije najizraženije patološke lezije AB-a su amiloidni plakovi i NFT-ovi [59].

Amiloidni plakovi su izvanstanične nakupine promjera oko 50-100 µm, okružene degeneriranim aksonima i dendritima, reaktivnim astrocitima i aktiviranom mikroglijom [60]. Glenner i Wong su 1984. godine otkrili da je protein Aß ključna komponenta amiloidnih plakova u AB-u [61]. Protein Aβ nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP) u amiloidogenom putu, u kojem ključnu ulogu imaju β -sekretaza (β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) i γ-sekretaza. Enzimi razgrađuju APP u fragmente aminokiselina različite duljine, koji se konačno oblikuju u peptide Aβ40 i Aβ42 [55]. U neamiloidogenom putu, koji prevladava in vivo [62], APP primarno cijepa α-sekretaza, čime se sprječava stvaranje Aβ. U fiziološkim uvjetima, BACE1 i γ -sekretaza, odnosno θ -sekretaza (β -site APP cleaving enzyme 2, BACE2) i γ-sekretaza cijepaju APP, također sprječavajući stvaranje Aβ. Detaljan prikaz amiloidogenog i neamiloidogenog puta procesiranja APP-a prikazan je na Slici 1. Nakupljanje gustih plakova u korteksu i hipokampusu uzrokuje neurotoksičnost, aktivaciju astrocita i mikroglije, oštećenje aksona, dendrita, gubitak sinapsi i kognitivne poremećaje [63-65]. Međutim, osim štetnih učinaka samih plakova, postoje indikacije da su topivi oligomeri proteina Aβ primarna toksična komponenta [66]. Ravnoteža između kontinuiranog stvaranja Aβ i njegovog učinkovitog uklanjanja važna je za homeostazu i sprječavanje njegovog toksičnog nakupljanja [67].



Slika 1. Amiloidogeni i neamiloidogeni put procesiranja APP-a. U amiloidogenom putu, BACE1 prvo cijepa APP, stvarajući sAPPβ i C99. Zatim γ-sekretaza cijepa C99 kako bi oslobodila Aβ i C57/59. U neamiloidogenom putu, APP se većinom prvo cijepa α-sekretazom, stvarajući sAPPα i C83, čime se sprječava stvaranje Aβ i nastaju P3α i C57/59. BACE1 uglavnom cijepa APP, stvarajući C89, dok γ-sekretaza cijepa C89 kako bi proizvela tAβ.
BACE2 cijepa APP, stvarajući C80 kojeg dalje cijepa γ-sekretaza stvarajući P3θ i C57/59, također sprječavajući stvaranje Aβ. BACE (β-site APP cleaving enzyme), sAPP (sekretorni oblik APP-a), CTF (C-terminalni fragment), tAβ (*truncated* Aβ, Aβ₁₁₋₄₀), P3 (Aβ_{17-40/42}). Preuzeto i prilagođeno prema radu Zhang i suradnika [68].

S druge strane, glavnu komponentu NFT-ova čine hiperfosforilirani proteini tau povezani s mikrotubulima (*microtubule-associated protein tau*, MAPT), normalno prisutni u aksonima [69]. Ova abnormalna fosforilacija uzrokuje pogrešno savijanje proteina tau i formiranje NFT-ova unutar neurona [70]. U patološkim uvjetima, te nakupine mogu formirati spiralne filamente i nakupljati se u aksonima, dendritima i citoplazmi, uzrokujući gubitak citoskeletnih mikrotubula i proteina povezanih s tubulinom [71]. Iako točni molekularni mehanizmi povezivanja gubitka citoskeletnih elemenata s razvojem NFT-ova nisu potpuno razjašnjeni, signalni transdukcijski putevi koji uključuju fosforilaciju i defosforilaciju proteina smatraju se ključnima u formiranju tih lezija [72]. U mozgu oboljelih od AB-a uočeni su različiti morfološki stupnjevi formiranja NFT-ova: stupanj prije stvaranja snopića, gdje se fosforilirani proteini tau nakupljaju u somatodendritičkom dijelu bez formiranja spiralnih filamenata, zreli NFT-ovi, karakterizirani nakupljanjem proteina tau u filamente i pomicanjem jezgre prema perifernom dijelu tijela neurona, te stupanj izvanstaničnih snopića, koji nastaje zbog gubitka neurona i velike količine filamentoznog proteina tau s djelomičnom otpornošću na proteolizu [72]. Shematski prikaz nastanka amiloidnih plakova i NFT-ova prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2. Nastanak izvanstaničnih amiloidnih plakova i unutarstaničnih NFT-ova. Preuzeto i prilagođeno prema radu Pospich i suradnika [73].

2.2.2. Tijek i kliničke karakteristike AB-a

Tijek AB-a može se podijeliti u nekoliko stupnjeva. Pretklinički ili predsimptomatski stupanj bolesti karakteriziran je blagim gubitkom pamćenja i početnim patološkim promjenama u korteksu i hipokampusu, bez funkcionalnih smetnji u svakodnevnim aktivnostima i kliničkih simptoma AB-a [74]. U sljedećem, blagom ili ranom stupnju, počinju se javljati simptomi poput poteškoća u svakodnevnom životu, gubitka koncentracije i pamćenja, te dezorijentacije u prostoru i vremenu [75]. Zatim slijedi umjereni stupanj, u kojem bolest zahvaća područja korteksa, što dovodi do povećanog gubitka pamćenja, poteškoća u prepoznavanju obitelji i prijatelja, te problema u pisanju, čitanju i govoru [70]. U posljednjem, teškom ili kasnom stupnju, bolest zahvaća cijeli korteks, uz obilno nakupljanje amiloidnih plakova i NFT-ova, rezultirajući progresivnim funkcionalnim i kognitivnim smetnjama [76]. U ovom stupnju bolesti oboljeli ne prepoznaju svoju obitelj, postaju nepokretni, imaju poteškoće u gutanju i mokrenju, što na kraju dovodi do smrti uslijed tih komplikacija [76]. Osim kognitivnih, AB često uključuje i ponašajne, te psihološke simptome, poznate kao neuropsihijatrijski simptomi. To su, između ostalih, uznemirenost, agresija, apatija, depresija, poremećaji spavanja i psihoza, a njihova se učestalost i intenzitet mijenjaju napredovanjem bolesti [77].

2.2.3. Čimbenici rizika i genetska osnova AB-a

AB se smatra kompleksnom bolesti povezanom s raznim čimbenicima rizika, koji uključuju kombinaciju promjena u mozgu povezanim sa starenjem, genetskim i okolišnim čimbenicima te stilom života, a najvažniji rizični čimbenik je dob. AB se dijeli na rani oblik AB-a (*early-onset Alzheimer's disease*, EOAD), koji čini 5-6% slučajeva AB-a i javlja se prije 65. godine života [78] i kasni (*late-onset Alzheimer's disease*, LOAD) ili sporadični oblik AB-a (*sporadic Alzheimer's disease*, sAD), koji je češći i počinje nakon 65. godine [79]. Većina slučajeva

EOAD-a smatra se obiteljskim oblikom AB (*familial Alzheimer's disease*, fAD), jer se naslijeđuje autosomno dominantnim obrascem [80] i povezana je s mutacijama u genima za APP te presenilin-1 i -2 (PSEN1 i PSEN2) [81,82]. Presenilini su ključne komponente kompleksa γ -sekretaze, koji je odgovoran za razgradnju APP-a u različite fragmente, uključujući peptide A β [83]. Varijante u *PSEN1* najčešći su uzrok AB-a, dok su varijante u *PSEN2* koje dovode do AB-a relativno rijetke [84]. S druge strane, ApoE je multifunkcionalni protein s ključnom ulogom u metabolizmu lipida, neurobiologiji i neurodegenerativnim bolestima [85]. Kod ljudi su ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4 glavni aleli gena *ApoE* koji utječu na rizik razvoja ABa [86]. Alel ϵ 4 ključni je genetski čimbenik rizika za sAD povećavajući rizik do 15 puta u homozigota [87], dok alel ϵ 2 gotovo upola smanjuje taj rizik i doprinosi dugovječnosti [88].

2.2.4. Hipoteze nastanka AB-a

Osnovni uzrok patoloških promjena u AB-u još uvijek nije poznat, no predložene su brojne hipoteze, poput kolinergičke, amiloidne, tau, neurovaskularne, upalne, mitohondrijske kaskade, homeostaze kalcija i NMDA receptora, metalnih iona i limfnog sustava [89]. Kolinergička hipoteza najstarija je hipoteza AB-a, predložena od Daviesa i Maloneya još 1976. godine [90]. Njihova istraživanja pokazala su značajno smanjenje aktivnosti enzima kolin-acetiltransferaze u amigdali, korteksu i hipokampusu osoba s AB-om, što je povezano s manjkom acetilkolina u sinapsama [91-93]. Ova saznanja doprinijela su daljnim istraživanjima i razvoju lijekova za AB [94]. Hipoteza tau predložena je 2009. godine [95] i prema njoj abnormalno fosforilirani proteini tau depolimeriziraju mikrotubule i ometaju prijenos signala unutar i između neurona [96]. Smatralo se da je patologija tau posljedica nakupljanja proteina Aβ [97], no pokazalo se da se tau može pojaviti u mozgu oboljelom od AB-a prije i neovisno o Aβ [98,99]. Osim toga, predvidljivo širenje hiperfosforiliranog proteina tau bolje korelira s kognitivnim padom od amiloidne patologije [100,101], što upućuje da bi tau mogao biti začetnik neurodegeneracije u AB-u [102]. Amiloidna hipoteza, glavna je hipoteza o patogenezi AB-a već više od 30 godina, a predložili su je Hardy i Allsop 1991. godine [103]. Protein Aβ normalno se uklanja nakon što se izreže iz APP-a pomoću β - i γ -sekretaza. Međutim, prema amiloidnoj hipotezi, u starijoj dobi ili u patološkim uvjetima, sposobnost razgradnje Aβ je smanjena i stoga dolazi do njegovog nakupljanja [104]. Peptidi A β_{40} i A β_{42} , osobito hidrofobniji A β_{42} , stvaraju amiloidne fibrile koji dalje formiraju amiloidne plakove. Ovi plakovi uzrokuju neurotoksičnost, potiču patologiju tau i dovode do smrti neurona te neurodegeneracije [104]. Neuroupala također igra ključnu ulogu u patološkom procesu AB-a [105]. U ranim stupnjevima bolesti, peptidi Aβ kolokaliziraju s čimbenicima komplementa, proteinima akutne faze i proupalnim citokinima [106]. Taloženje

Aβ pokreće proupalnu kaskadu te povećava sintezu i oslobađanje proupalnih citokina aktivacijom mikroglije [107]. Ovi procesi doprinose hiperfosforilaciji proteina tau i njihovom nakupljanju u mozgu, što dovodi do razaranja neurona, njihove smrti i oštećenja sinaptičke funkcije [105]. Iako ove hipoteze daju značajan uvid u kompleksnu patogenezu AB-a, niti jedna od njih je u potpunosti ne objašnjava [108].

2.2.5. Terapijske mogućnosti i izazovi u AB-u

U posljednjim desetljećima većina lijekova u kliničkim istraživanjima AB-a povučena je zbog nedovoljne učinkovitosti ili značajnih nuspojava [94]. Trenutno dostupni lijekovi uglavnom pružaju samo simptomatsko olakšanje, često praćeno neželjenim učincima. Inhibitori acetilkolinesteraze, kao što su donepezil, galantamin i rivastigmin, odobreni su za liječenje ABa [109], budući da povećavaju razine acetilkolina u sinapsama i usporavaju kognitivni pad [110]. Za umjerene do teške stupnjeve bolesti koristi se i memantin, antagonist glutamatnih NMDA receptora [109], koji blokira protok kalcijevih iona i smanjuje neurotoksične učinke povišenih razina glutamata [111]. Uz ove terapije, antipsihotici i antidepresivi ostaju ključni u liječenju neuropsihijatrijskih simptoma AB-a [112]. U kliničkim ispitivanjima, Aβ i tau glavni su ciljevi za terapije koje mijenjaju tijek bolesti (disease-modifying treatments, DMT) [112]. AB bi se mogla spriječiti ili učinkovito liječiti smanjenjem proizvodnje Aß i tau, sprječavanjem njihove agregacije ili pogrešnog savijanja, neutraliziranjem ili uklanjanjem toksičnih agregata ili pogrešno savijenih oblika tih proteina, ili kombinacijom tih pristupa [110]. Dva antiamiloidna monoklonska antitijela lecanemab i aducanumab odobrena su u SAD-u za liječenje AB-a, donekle postižući usporavanje bolesti [7]. Međutim, izazivaju ozbiljne nuspojave i bolesnici moraju biti pažljivo praćeni posebice zbog mogućnosti nastanka cerebralnog edema i mikrokrvarenja u mozgu [7].

2.3. Vaskularna demencija (VaD)

VaD je drugi najčešći uzrok demencije, a njena patogeneza pripisuje se vaskularnim uzrocima u odsutnosti drugih patologija [113]. Čini oko 20% ukupnih slučajeva demencije, a prevalencija joj je u korelaciji s rizikom od moždanog udara [4]. U izdanju DSM-V termin "vaskularna demencija" zamijenjen je pojmom "vaskularni NKP", koji obuhvaća kliničke dokaze o moždanom udaru ili subkliničkoj vaskularnoj ozljedi mozga, te kognitivno oštećenje koje utječe na barem jednu kognitivnu domenu [114]. Najteži oblik vaskularnog NKP-a je VaD [115]. VaD je uzrokovana smanjenim ili blokiranim protokom krvi u mozak, što neurone lišava ključnih hranjivih tvari i kisika [116], dovođeći do njihove smrti. Neki od čimbenika koji doprinose VaD-u uključuju kardiovaskularne bolesti, dijabetes, moždani udar, hipertenziju i hiperlipidemiju [117]. Simptomi VaD-a ovise o tome koji dio mozga je pogođen [118], međutim često uključuju poteškoće u razmišljanju i razumijevanju, nemogućnost stvaranja novih sjećanja, dezorijentaciju, uznemirenost te ponašajne simptome [119].

2.3.1. Cerebrovaskularne patologije u VaD-u

Najčešći vaskularni poremećaji povezani s razvojem vaskularnih lezija su ateroskleroza cerebralnih arterija, bolest malih krvnih žila (*small vessel disease*, SVD) i cerebralna amiloidna angiopatija (CAA) [120]. SVD uključuje aterosklerozu ili arteriosklerozu malih žila, arteriolosklerozu i lipohijalinozu [121], dok je CAA rezultat taloženja A β u stijenkama cerebralnih i leptomeningealnih krvnih žila [61]. Najčešće vaskularne lezije kod starijih osoba su infarkti, hemoragije (krvarenja) i lezije bijele tvari (leukoarajoze ili vaskularne leukoencefalopatije) [114]. Infarkti se osim na velike, lakunarne i mikroinfarkte, dijele i na ishemijske (bijele), koji nastaju zbog začepljenja krvnih žila, i hemoragijske (crvene), koji nastaju nakon reperfuzije ishemijskog područja ili zbog nedovoljnog kolateralnog protoka, što uzrokuje istjecanje krvi u oštećeno područje [114]. Za razliku od njih, hemoragije podrazumijevaju prodor krvi u netaknuti parenhim mozga zbog puknuća stijenke krvne žile [122]. Različite vaskularne lezije koje dovođe do VaD-a prikazane su na **Slici 3.**



Slika 3. Vaskularne lezije koje vode do VaD-a. Vaskularne promjene koje uzrokuju kognitivna oštećenja mogu biti različite, a uključuju sistemske bolesti koje utječu na ukupnu moždanu perfuziju ili promjene koje zahvaćaju same krvne žile u mozgu, najčešće male arteriole ili venule. Preuzeto i prilagođeno prema radu Iadecola [123].

2.3.2. Oblici i kliničke karakteristike VaD-a

VaD se može klasificirati u nekoliko oblika: multiinfarktna demencija, demencija uzrokovana strateškim infarktima, hemoragijska demencija, subkortikalna ishemijska vaskularna demencija (SIVD), miješana demencija, te ostali oblici VaD-a. Prva tri oblika VaD-a razvijaju se relativno naglo zbog akutnih cerebrovaskularnih bolesti, a simptomi ovise o zahvaćenim regijama mozga te mogu biti kortikalni ili subkortikalni [124]. Nasuprot tome, kognitivna oštećenja povezana sa SIVD-om često imaju podmukao početak i progresivan tijek, što može imitirati AB [125]. Miješana demencija je poremećaj koji se najčešće odnosi na istodobnu prisutnost AB-a i VaD-a [126], dok ostali oblici VaD-a uključuju demenciju uzrokovanu heterogenim etiologijama, poput CAA, vaskulitisa i nasljednih bolesti, kao što je cerebralna autosomno dominantna arterioskleroza sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL) [127–129].

2.3.3. Terapijski pristup VaD-u

VaD je kompleksno i još uvijek nedovoljno istraženo stanje koje uključuje brojne patofiziološke mehanizme te predstavlja značajan izazov za učinkovito liječenje. Budući da trenutno ne postoje odobreni lijekovi za VaD, terapijski pristup prvenstveno je usmjeren na kontrolu vaskularnih čimbenika rizika i ublažavanje povezanih simptoma [130]. S obzirom na visoku učestalost moždanog udara, ključno je povećati napore u kontroli vaskularnih i drugih rizičnih čimbenika, kao primarnoj i sekundarnoj prevenciji VaD-a [8]. U terapiji VaD-a istraživana je primjena lijekova namijenjenih za AB, uključujući inhibitore acetilkolinesteraze i antagoniste NMDA receptora. Inhibitori acetilkolinesteraze poboljšavaju kognitivne funkcije povećavanjem razine acetilkolina u sinapsama, neurotransmitora ključnog za procese učenja i pamćenja [131,132]. S druge strane, antagonist NMDA receptora, ublažava glutamatnu ekscitotoksičnost posredovanu prekomjernom stimulacijom NMDA receptora izazvanom ishemijom, čime pruža zaštitu od kognitivnog pada u VaD-u [133].

2.4. Modeli AB-a i VaD-a in vitro i in vivo

Primarne kulture neurona, osobito one dobivene iz tkiva mozga bolesnika postmortem, najtočnije oponašaju neurodegenerativni fenotip u istraživanjima in vitro [134]. Međutim, etička pitanja, poteškoće u dobivanju tkiva postmortem i visoki troškovi održavanja primarnih kultura neurona doveli su do njihove ograničene dostupnosti u istraživanjima [134]. Kulture neurona dobivene od glodavaca, iako djelomično ublažuju etičke probleme, i dalje predstavljaju značajne izazove, uključujući ograničenu proliferaciju i diferencijaciju [135]. Stoga se u istraživanjima često koriste stanične linije poput stanica SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka [136,137], koje u nediferenciranom obliku nalikuju nezrelim kateholaminskim neuronima, s pravilnom strukturom aksona i eksprimiranim nezrelim neuronskim biljezima [138]. Osim toga, stanice SH-SY5Y mogu diferencirati u fenotip specifičan za bolest. Dodavanje retinoične kiseline ili kombinacije retinoične kiseline i forbol estera u medij za kulturu stanica potiče porast dopaminergičkih biljega [139], retinoična kiselina u kombinaciji s BDNF-om dovodi do kolinergičkog fenotipa [140], a dibutirilni ciklički AMP inducira adrenergički fenotip [141]. Diferencirane stanice SH-SY5Y imaju izdužene aksone, znatno nižu stopu proliferacije te eksprimiraju zrele neuronske biljege, čime morfološki nalikuju primarnim kortikalnim neuronima u ljudskom mozgu [138]. Dodavanje oligomera Aβ stanicama SH-SY5Y diferenciranim u kolinergički fenotip uzrokuje apoptozu, što predstavlja dobro poznati model AB-a, koji omogućuje procienu potencijalnih neuroprotektivnih učinaka novih lijekova [142]. Osim navedenih, i druge stanice koje imaju svojstva neurona, poput PC12 i N2a, koriste se u istraživanjima AB-a [143].

Napredak u staničnom modeliranju neurodegenerativnih bolesti predstavlja reprogramiranje ljudskih somatskih stanica u inducirane pluripotentne matične stanice (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) [144]. Osim somatskih stanica, sve poznate vrste stanica, uključujući neurone, mogu se dobiti iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica (*human embryonic stem cells*, hESC) [145]. Modeliranje AB-a s ljudskim iPSC (*human* iPSC, hiPSC) može se postići generiranjem kolinergičkih neurona iz prednjeg mozga, koji su prvenstveno zahvaćeni u AB-u [146]. Trodimenzionalne strukture koje proizlaze iz iPSC-ova i stvaraju strukture nalik organima poznate su kao organoidi [137]. Organoidi uzgojeni iz iPSC-ova mogu se prilagoditi kako bi vjerno oponašali organizacijske značajke ljudskog mozga, poput korteksa, te se koriste za modeliranje AB-a [147]. Oligomeri Aβ pokazuju veću toksičnost u 3D modelu zbog otežane difuzije, što im omogućuje dulje vrijeme za agregaciju i bolje oponašanje uvjeta u živom

organizmu [148,149]. Iako su 3D modeli obećavajući za premošćivanje između uvjeta *in vitro* i *in vivo* [150,151], potreban je daljni razvoj kako bi se omogućila njihova šira primjena [152].

Identifikacija mutacija u genima *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* povezanih s fAD-om dovela je do razvoja brojnih transgeničnih modela glodavaca za proučavanje amiloidne patologije [153,154]. Istovremeno, mutacije ljudskog gena *MAPT*, povezane s neurodegeneracijom [155], koriste se za induciranje tau patologije. Trenutno najčešće korišteni transgenični modeli temeljeni na APP-u uključuju transgenične miševe APP23, Tg2576, TgCRND8 i J20 [156–159]. Ovi modeli pokazuju sveobuhvatnu patologiju A β , povezanu neuroupalu, gubitak neurona, sinaptičku disfunkciju te kognitivne i ponašajne poremećaje, čime podržavaju amiloidnu hipotezu [160]. Transgenični modeli koji eksprimiraju mutirani PSEN1 ili PSEN2 proizvode značajno povišene razine A β_{42} , no amiloidni plakovi i NFT-ovi ne nastaju [161]. Opažaju se nakupine proteina tau povezane s dobi, gubitak neurona i sinaptička disfunkcija [162–164], ali ne pokazuju izražene patologije slične AB-u, jer imaju niže razine A β_{42} u usporedbi s transgeničnim miševima za APP [161,165] i zbog toga je njihova primjena ograničena.

S druge strane, neki od transgeničnih mišjih modela temeljenih na tau su hTau.P310S, rTg (tauP301L) 4510, hTau i THY-Tau22. Iako ovi modeli pokazuju izraženu patologiju tau, nedostaju im amiloidni plakovi i patologija [166,167]. Zbog nedostatka amiloidne patologije u tau modelima i tau patologije u APP modelima, razvijeni su multitransgenični modeli AB-a, poput APP/PSEN, 3xTg-AD, 5xFAD i E4FAD [160]. APP/PSEN modeli privukli su veliku pažnju budući da mutacije *PSEN1* ili *PSEN2* djeluju sinergistički s *APP*-om, ubrzavajući amiloidozu [161], dok je 3xTg-AD model najčešće korišteni transgenični mišji model AB-a. miševi 3xTg-AD sadrže tri mutirana gena povezana s fAD-om (APP *Swedish*, MAPT P301L i PSEN1 M146V) te razvijaju i amiloidnu patologiju i patologiju tau [168]. Nakupljanje proteina Aβ javlja se u korteksu već sa 6 mjeseci starosti i postaje izraženije do 12 mjeseci, dok je protein tau hiperfosforiliran i agregira u hipokampusu između 12. i 15. mjeseca starosti [168,169]. Sinaptički deficiti pojavljuju se u dobi od 6 mjeseci, neuroupala od 7. mjeseca života, a kognitivno oštećenje već u dobi od 4 mjeseca [168–170]. Ovaj model reproducira brojne fenotipove povezane s AB-om i smatra se jednim od najprikladnijih za istraživanje mehanizama bolesti i razvoja lijekova.

Većina se transgeničnih modela životinja temelji na genetskim mutacijama, no više od 95% bolesnika ima dijagnosticiranu sAD, koja se rijetko povezuje s genetskim mutacijama

[171,172]. Iako etiologija sAD-a još nije u potpunosti razjašnjena, razvijeni su neki netransgenični mišji i štakorski modeli kako bi oponašali neuropatološke promjene prisutne u sAD-u, kao što su model induciran streptozotocinom, traumatskom ozljedom mozga, aluminijem i prehranom bogatom kolesterolom, model akutne ili kronične stereotaksičke injekcije proteina A β te modeli temeljeni na prirodnom i ubrzanom starenju [160]. Shematski prikaz modela *in vivo* za proučavanje AB-a prikazan je na **Slici 4.**



Slika 4. Shematski prikaz patofizioloških mehanizama AB-a i modela *in vivo* koji se koriste za proučavanje ove bolesti. Stavaranje amiloidnih plakova i NFT-ova dovodi do oštećenja ili smrti neurona, što uzrokuje gubitak kognitivnih funkcija. Za proučavanje AB-a koriste se različiti modeli *in vivo*, uključujući stereotaksičku injekciju za induciranje AB-a, transgenične životinje i kemijske modele. Ovi modeli omogućuju razumijevanje različitih patofizioloških mehanizama bolesti te služe za procjenu učinkovitosti novih terapijskih pristupa. Preuzeto i prilagođeno prema radu Chavan i suradnika [173].

Modeli VaD-a in vivo, poput bilateralne okluzije karotidnih arterija u normotenzivnim štakorima, spontano hipertenzivnih štakora sklonih moždanom udaru, mišjih i štakorskih modela bilateralne stenoze karotidnih arterija te mišjih modela globalne ishemije [174], korisni su za prikazivanje patoloških procesa cerebrovaskularnih bolesti. Međutim, ovi modeli imaju ograničenja u otkrivanju mehanizama ozljede i testiranju lijekova te nisu doveli do uspješnih kliničkih ispitivanja [175]. Ta ograničenja djelomično proizlaze iz razlika između ljudi i životinja na genomskom i molekularnom nivou [176]. Stoga je potreba za razvojem boljih modela usmjerila prema humaniziranim mišjim modelima (no interakcije među genima i proteinima često ograničavaju njihovu funkcionalnost), i modelima ljudskih stanica in vitro, kojima je glavni izazov koliko dobro oponašaju složenost krvno-moždane barijere (blood-brain barrier, BBB) [175]. Specijalizirane endotelne stanice koje tvore BBB zajedno s potpornim vrstama stanica čine neurovaskularnu jedinicu (neurovascular unit, NVU) [177], a BBB/NVU modeli mogu se podijeliti na jednoslojne moždane endotelne stanice (brain endothelial cells, BEC), 2D modele, odnosno ko-kulture u sustavima s komoricama Transwell i 3D sustave, koji preciznije repliciraju međustanične komunikacije i fiziološke uvjete, sa ili bez protoka krvi [175]. Primarne stanice zadržavaju dio svog fenotipa, no njihova izolacija i pročišćavanje su zahtjevni, a uvjeti kultivacije mogu promijeniti njihovu transkripcijsku aktivnost i ograničiti očuvanje fenotipa [178]. Često se koriste besmrtne stanične linije kao što su A735, C6, HMEC-1, HCMEC/D3, HMO6, HBPC/ci37 i TY08 [179-185] te stanice izolirane iz tumora, kao što su stanice SH-SY5Y [186] i NT2/D1 [187]. Model deprivacije kisika i glukoze/reperfuzije (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) najčešće se koristi za simulaciju ishemijskog oštećenja in vitro, imitirajući uvjete uzrokovane blokadom krvotoka [188]. Ovaj model temelji se na izlaganju stanica mediju bez glukoze i održavanju u hipoksičnoj komori, nakon čega se stanice, kako bi se simuliralo oštećenje uzrokovano reperfuzijom, vraćaju u normoksične uvjete s normaliziranom razinom glukoze. Ova metoda našla je široku primjenu u brojnim istraživanjima s 2D modelima, uključujući monokulture stanica BEC, kao i kokulture mišjih i ljudskih primarnih te besmrtnih staničnih linija [188–195].

2.5. Dehidroepiandrosteron i njegov sulfat (DHEA(S))

Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfat dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS), zajedničkim imenom DHEA(S), najzastupljeniji su steroidni hormoni u ljudskoj krvi [196]. Čak 99% DHEA-e u krvotoku prisutno je u obliku DHEAS-a [197]. Koncentracija DHEA(S)-a doseže vrhunac tijekom mladenačke dobi, nakon čega postupno opada s godinama. U dobi od 70 do 80 godina razine DHEA(S)-a opadaju na svega 20-30% vrijednosti kod mladih odraslih osoba [198] koje iznose 10 nM za DHEA-u i 10 µM za DHEAS [199]. Promjene razina cirkulirajućeg DHEA(S)-a tijekom ljudskog života prikazane su na **Slici 5.** Dobno uvjetovano smanjenje razina DHEA(S)-a povezano je s poremećajima tjelesnog sastava, kondicije, raspoloženja i kognitivnih funkcija [200,201], kao i raznim neuropsihijatrijskim i kardiovaskularnim stanjima [11,202]. Ova saznanja potaknula su ideju da bi obnavljanje razina DHEA(S)-a moglo biti potencijalni pristup u liječenju poremećaja povezanih sa starenjem, zbog čega je DHEA(S) stekao naziv "fontana mladosti" [203].



Slika 5. Razine DHEAS-a tijekom života u muškaraca i žena. Preuzeto i prilagođeno prema radu Rainey i suradnika [204].

DHEA postiže vrhunac svojih vrijednosti u ranim jutarnjim satima, dok razine DHEAS-a ostaju stabilne tijekom dana [205]. DHEA ima kratki poluživot od 15-30 min, dok je poluživot DHEAS-a znatno dulji i iznosi 7-10 h [206]. U mladih odraslih muškaraca razine DHEA(S)-a su 10-20% više nego u žena [206], a zbog činjenice da su njegove razine u mozgu 6-8 puta veće nego u perifernoj krvi [207], nazvan je neurosteroidom [208].

2.5.1. Biosinteza DHEA(S)-a

Steroidni hormoni ključni su za normalan razvoj, a kolesterol je prekursor iz kojeg se sintetiziraju svi steroidni hormoni [209]. Stvaranje pregnenolona, katalizirano enzimom CYP11A1 (*cytochrome* P45011A1), predstavlja ograničavajući korak u biosintezi steroidnih hormona [210,211]. Pregnenolon dalje služi kao prekursor za mineralokortikoide, glukokortikoide i DHEA-u te spolne hormone koji iz njega nastaju [209]. Shematski prikaz biosinteze steroidnih hormona prikazan je na **Slici 6.**



(3/17β-hidroksisteroid dehidrogenaza). Preuzeto i prilagođeno prema radu Neunzig i suradnika [212].

DHEA se sintetizira u *zoni reticularis* kore nadbubrežne žlijezde, u teka stanicama jajnika, Leydigovim stanicama testisa i u mozgu [213] te se pretvara pomoću enzima sulfotransferaze (SULT) 2A1 (SULT2A1) u svoj sulfatni ester DHEAS, a DHEAS prelazi natrag u DHEA-u uz pomoć steroid sulfataze. Reverzibilna konverzija DHEA(S)-a uz pomoć SULT2A1 prikazana je na **Slici 7.**



Slika 7. Pretvaranje DHEA-e u DHEAS uz pomoć enzima sulfotransferaze SULT2A1 koja katalizira prijenos sulfonatne (-SO₃) skupine s 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata (PAPS) na hidroksilnu (-OH) skupinu DHEAS-a uz nastajanje 3'-fosfoadenozin-5'-fosfata (PAP). U suprotnom smjeru pretvorbu katalizira steroid sulfataza.

Enzimi SULT predstavljaju važnu skupinu enzima koji sudjeluju u metabolizmu ključnih endogenih spojeva poput kateholaminskih neurotransmitora i steroida te ksenobiotika [214]. Kataliziraju prijenos sulfonatne skupine s univerzalnog donorskog spoja, 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS), na hidroksilnu ili aminsku skupinu supstratnog spoja [215], povećavajući njegovu topljivost u vodi i olakšavajući izlučivanje iz tijela [216]. U ljudi postoji 13 različitih enzima SULT koji se razlikuju po specifičnosti prema supstratima i/ili raspodjeli u tkivima [217]. Enzim SULT2A1 visoko je eksprimiran u ljudskoj jetri, gdje katalizira sulfataciju DHEA-e [218]. Varijacije u ekspresiji gena *SULT2A1* povezane su s varijacijama u koncentraciji DHEAS-a [219]. Meta-analiza usmjerena na utvrđivanje genetskih čimbenika koji utječu na koncentraciju DHEAS-a u plazmi, zabilježila je povezanost polimorfizma jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs2637125, smještenog u blizini kodirajuće regije *SULT2A1*, s varijacijama koncentracije DHEAS-a u plazmi u žena europskog podrijetla [220]. Drugi SNP u genu *SULT2A1* rs182420 također je povezan s nižom koncentracijom DHEAS-a u žena koje imaju policistične jajnike [221].
2.5.2. Fiziološke funkcije DHEA(S)-a

DHEA(S) nije samo prekursor spolnih hormona, već ostvaruje niz fizioloških funkcija izravnim djelovanjem na androgene i estrogene receptore, nuklearne receptore, različite receptore u plazmatskoj membrani te naponske kanale ovisne o kalciju, pritom aktivirajući brojne signalne puteve [222]. Specifični receptori spregnuti s G-proteinima na plazmatskoj membrani aktiviraju se pod utjecajem DHEA(S)-a [223,224]. U mozgu, DHEA(S) izravno utječe na neurotransmitorske sustave, posebno na glutamatni sustav i sustav γ-aminomaslačne kiseline (y-aminobutyric acid, GABA) [225,226]. Ekscitacijska glutamatna neurotransmisija putem receptora NMDA ključna je za sinaptičku plastičnost i preživljavanje neurona, dok prekomjerna aktivnost tih receptora uzrokuje ekscitotoksičnost, što predstavlja jedan od potencijalnih mehanizama neurodegeneracije u AB-u [227]. S druge strane, GABA je glavni inhibicijski neurotransmitor, a njezina je regulacija često poremećena u neurodegenerativnim bolestima [228]. DHEAS također djeluje kao pozitivni modulator glutamatnih NMDA receptora i pojačava glutamatergičku neurotransmisiju, vjerojatno neizravno aktivacijom središnjih receptora σ1, ponašajući se kao njihov agonist [229,230], dok je najčešći učinak DHEA(S)-a alosterička modulacija receptora GABA-A [231], gdje DHEAS djeluje kao antagonist [232]. Osim toga, DHEA se veže i na tropomiozin receptor kinazu A (TrkA) i p75 neurotrofni receptor (p75NTR) [233].

2.5.3. Potencijalne uloge DHEA(S)-a u demenciji

Istraživanja razina DHEA(S)-a u AB-u donose oprečne rezultate. Neka istraživanja pokazuju povišene razine DHEA-e u prefrontalnom korteksu, hipokampusu i hipotalamusu, s najvišom koncentracijom u hipokampusu [234]. Ovo povećanje moglo bi biti posljedica prisutnosti Aβ i povećanog oksidacijskog stresa te predstavljati kompenzacijski mehanizam [234]. Također se smatra da povišene razine DHEA-e mogu potjecati iz periferije ili alternativnog puta sinteze u središnjem živčanom sustavu (*central nervous system*, CNS) [235]. Osim navedenog, povišene razine DHEA-e zabilježene su i u cerebrospinalnoj tekućini (*cerebrospinal fluid*, CSF) osoba s AB-om [234]. Suprotno tome, druga istraživanja izvještavaju o smanjenim razinama DHEAS-a u mozgu *postmortem* i CSF-u, s negativnom korelacijom s hiperfosforiliranim proteinima tau u hipotalamusu osoba s AB-om [236]. Smanjenje razina DHEAS-a u plazmi i serumu osoba s AB-om u usporedbi sa zdravim starijim osobama [236–238] može biti rezultat patoloških procesa ili potencijalni čimbenik rizika.

DHEA(S) također sudjeluje u modulaciji plastičnosti neurona, utječući na njihovu smrt i preživljavanje [239], osobito tijekom razvoja mozga [240]. Brojna istraživanja upućuju na

njegove neuroprotektivne [241-243], antioksidacijske i antiupalne učinke [244], kao i na njegovu ulogu u regulaciji raspoloženja, emocija i ponašanja [245,246] te poboljšanju pamćenja i kognitivnih funkcija [247]. Istraživanja na staničnim kulturama pokazala su da DHEA(S) može utjecati na metabolizam APP-a [248]. Pretpostavlja se da DHEA ima zaštitnu ulogu protiv toksičnosti Aβ, inhibirajući njegov učinak putem modulacije signalnog puta fosfatidilinozitol 3-kinaza (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-protein kinaza B (PKB/AKT) posredovanog receptorom σ 1 [249]. Također, DHEA(S) bi mogao utjecati i na fosforilaciju proteina tau zbog svoje ključne uloge u održavanju redoks ravnoteže [250]. Zabilježena je značajna negativna povezanost između koncentracije proteina tau i razine DHEAS-a u hipotalamusu, što ukazuje na potencijalnu neuroprotektivnu ulogu DHEAS-a u AB-u [236]. Jedna od glavnih manifestacija oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija i nastanak proupalnog produkta 4hidroksi-2-nonenala, koji može potaknuti dodatnu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (reactive oxygen species, ROS) [251]. Istraživanja na životinjskim modelima i uzorcima ljudskog mozga postmortem pokazala su da interakcija mitohondrijske disfunkcije i prekomjerne proizvodnje ROS-ova dovodi do povećane agregacije i taloženja Aβ te formiranja NFT-ova [252]. Jedan od glavnih signalnih puteva DHEA-e vjerojatno uključuje signalni put PI3K-AKT. AKT se može aktivirati djelovanjem ROS-ova i inzulina, ali i kao odgovor na dugotrajnu primjenu DHEA-om [253,254]. Nedavna istraživanja in vitro pokazala su da prethodna primjena DHEA-e inhibira proizvodnju hidroksidnih iona te smanjuje ekspresiju mRNA (messenger RNA) za Bax, te kaspazu 3 i 9, što rezultira nižom stopom apoptoze [254]. Neuroprotektivna svojstva DHEA-e zabilježena su u različitim modelima, uključujući modele neurodegeneracije in vivo [255], model ishemije na štakorima [256] te modele neurotoksičnosti, neurodegeneracije i ishemije in vitro [257,258]. Neuroprotektivno djelovanje DHEAS-a potvrđeno je u stanicama B104 protiv toksičnosti izazvane Aβ25-35 [259], gdje je spriječio ulazak stanica u kasnu apoptozu i nekrozu. S obzirom da su u AB-u pronađene smanjene razine DHEAS-a i povišene razine proupalnih citokina, smanjene razine DHEAS-a mogle bi dovesti do disregulacije imunološkog sustava, povećanog oksidacijskog stresa i kognitivnog pada, budući da DHEAS pokazuje antioksidacijske i antiupalne učinke [260]. U štakorskom modelu AB-a, liječenje DHEA-om smanjilo je biljege oksidacijskog stresa i aktivnost acetilkolinesteraze, dok je povećalo aktivnosti antioksidacijskih enzima, razine acetilkolina i BDNF-a, što upućuje na to da antiupalni učinci DHEA-e mogu biti posredovani različitim signalnim putevima [261]. Glavni predloženi mehanizmi djelovanja DHEA(S) u AB-u prikazani su na Slici 8.

Što se tiče kliničkih ispitivanja, učinak DHEA-e na kogniciju kod žena u perimenopauzi pokazao je značajne razlike u odnosu na placebo [262]. Istraživanje o utjecaju DHEA-e na kognitivno oštećenje uzrokovano stresom pokazalo je da dvotjedna terapija dovodi do pogoršanja pamćenja, ali istovremeno poboljšava pažnju [263]. Drugo istraživanje je otkrilo da visoke večernje razine DHEA-e smanjuju anksioznost, dok su povišene jutarnje razine povezane s blagom zbunjenošću [249]. Također, viši jutarnji omjer kortizola i DHEA-e povezan je s izraženijom zbunjenošću i slabijim vizualno-prostornim pamćenjem. Unatoč tome, dodatna terapija DHEA-om nije pokazala značajan utjecaj na kognitivne funkcije [264]. Jednogodišnja primjena DHEA-e u zdravih starijih osoba nije imala vidljiv učinak [265], a slično se pokazalo i u kliničkom ispitivanju provedenom na osobama s AB-om nakon 3 i 6 mjeseci primjene [266]. Nasuprot tome, istraživanje na ženama s blagim do umjerenim kognitivnim oštećenjem zabilježilo je poboljšanje kognitivnih sposobnosti nakon šestomjesečnog tretmana DHEA-om [267]. Osim toga, dnevna intravenska primjena DHEAS-a tijekom četiri tjedna povećala je razine ovog steroida u serumu i CSF-u te poboljšala dnevne aktivnosti i emocionalno stanje osoba s multiinfarktnom demencijom [268]. Ipak, dosadašnja istraživanja ne potvrđuju značajan učinak DHEA(S)-a na kognitivne funkcije, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela njegova potencijalna terapijska uloga u demenciji.



Slika 8. Glavni predloženi mehanizmi djelovanja DHEA(S)-a u AB-u. DHEA(S) djeluje kao agonist receptora TrkA, antagonist receptora GABA-A te pozitivni modulator receptora NMDA, vjerojatno posredstvom aktivacije receptora σ1. Putem ovih receptora, DHEA(S) ostvaruje neuroprotektivne učinke, modulacijom signalnog puta PI3K-AKT, čime sprječava nakupljanje amiloidnih plakova i NFT-ova. Osim toga, DHEA(S) ima antioksidacijsko djelovanje, sprječavajući stvaranje ROS-ova te smanjujući oksidacijski stres i lipidnu peroksidaciju. Također, DHEA(S) pokazuje antiapoptotsko djelovanje, smanjujući razine mRNA Bax-a i kaspaza te posjeduje antiupalno djelovanje, smanjujući izlučivanje proupalnih citokina. Preuzeto i prilagođeno prema radu Svob Strac i suradnika [13].

2.6. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)

BDNF, član obitelji neurotrofina, ključni je protein za rast i razvoj živčanog sustava, preživljavanje neurona i poticanje neurogeneze [269]. Uz BDNF, obitelj neurotrofina uključuje i čimbenik rasta živaca (*nerve growth factor*, NGF), neurotrofin-3 (NT-3) i NT-4/5 [270]. Neurotrofini djeluju putem zajedničkog receptora p75NTR i obitelji receptora Trk, kojoj pripadaju TrkA, TrkB i TrkC. TrkA je receptor za NGF, TrkB za BDNF i NT-4/5, dok je TrkC receptor za NT-3, pri čemu se NT-3 može vezati i za TrkA i TrkB, ali s nižim afinitetom [271].

2.6.1. Biosinteza BDNF-a

BDNF sintetiziraju neuroni i glija stanice u endoplazmatskom retikulumu kao prekursorski protein proBDNF (32 kDa), koji prolazi kroz Golgijev aparat i trans-Golgijevu mrežu [272]. Uz prisutnost karboksipeptidaze E, proBDNF se pakira u vezikule i izlučuje dvjema vrstama sekrecije: reguliranom i konstitutivnom. Regulirana sekrecija uključuje proteolitičku obradu terminalne domene proBDNF-a u zreli protein mBDNF (*mature BDNF*) ili BDNF (14 kDa), unutarstaničnim cijepanjem furinom ili konvertazama, ili izvanstanično plazminom ili metaloproteinazama matriksa [273–275]. S druge strane, konstitutivna sekrecija vodi do izlučivanja proBDNF-a [276]. Sinteza BDNF-a prikazana je na Slici 9. Tijekom ranog postnatalnog razdoblja, koncentracija proBDNF-a je viša, što ga čini važnim za modulaciju funkcije mozga, dok u odrasloj dobi prevladava BDNF, ključan za procese poput neuroprotekcije i sinaptičke plastičnosti [277].



Slika 9. Sinteza BDNF-a. Preuzeto i prilagođeno prema radu Bathina i Das [278].

2.6.2. Polimorfizmi gena BDNF

Prodomena BDNF-a sadrži funkcionalni polimorfizam kod ljudi poznat kao Val66Met (G196A), također označen kao rs6265 [279]. Ova točkasta mutacija uzrokuje zamjenu aminokiseline valin s metioninom na kodonu 66 u prodomeni BDNF-a [280]. Polimorfizam rs6265 povezan je s kognitivnim procesima [281-284] te kognitivnim oštećenjima u neurodegenerativnim bolestima, poput AB-a [285,286]. Osim toga, povezuje se i s brojnim poremećajima mozga, među kojima su demencija [287] i moždani udar [288,289]. Također, prodomena BDNF-a s alelom A može izazvati povlačenje rasta hipokampalnih neurona [290]. Nekoliko istraživanja pokazalo je da alel A pogoršava patogenezu AB-a ovisnu o Aβ i negativno utječe na funkciju hipokampusa te epizodno pamćenje [281,285,291]. Budući da polimorfizam rs6265 nije povezan s promjenama kognitivnog pada u zdravih odraslih osoba s niskim Aβ, predloženo je da visoke razine A β u kombinaciji s alelom A mogu biti korištene kao prognostički biljezi u pretkliničkom stupnju AB-a [292]. Dodatnu podršku daju istraživanja koja pokazuju da polimorfizam rs6265 povećava osjetljivost na A β , smanjuje povezanost hipokampusa i medijalnog prefrontalnog korteksa te pogoršava kognitivni pad [285]. Među starijim osobama s normalnom kognicijom, nositelji ovog polimorfizma pokazuju veću atrofiju hipokampusa i brži kognitivni pad [293]. Osim polimorfizma rs6265, polimorfizam rs56164415 (C270T), smješten u nekodirajućoj regiji BDNF-a, također se povezuje s povećanim rizikom od LOAD-a [294].

2.6.3. Signalni putevi BDNF-a

BDNF ima visok afinitet prema receptoru TrkB [295], što potiče preživljavanje stanica [296] i olakšava dugotrajnu potencijaciju (*long-term potentiation*, LTP) [297]. Nasuprot tome, BDNF ima nizak afinitet prema p75NTR [298], za koji se preferencijalno veže proBDNF, olakšavajući dugotrajnu depresiju (*long-term depression*, LTD) i potičući apoptozu [299,300]. Vezanje BDNF-a za TrkB uzrokuje njegovu dimerizaciju i autofosforilaciju, što pokreće niz signalnih puteva ključnih za funkciju i preživljavanje neurona, koji uključuju fosfolipazu Cγ (*phospholipase Cγ*, PLCγ), put PI3K-AKT te kinaze MAP kinaze-kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (*mitogen-activated protein kinases-extracellular signal-regulated kinases*, MAPK-ERK) ili put Ras-Raf-MEK-ERK [301].

PLCγ put dovodi do stvaranja inozitol trifosfata (*inositol trisphosphate*, IP3) i diacilglicerola (DAG), koji reguliraju otpuštanje kalcija te aktivaciju protein kinaza ovisnih o kalciju/kalmodulinu (CaMK) i protein kinaze C (PKC) [302]. Signalizacija PKC ključna je za sinaptičku funkciju i održavanje [303]. Signalni put PI3K-AKT ima antiapoptotski učinak i

suzbija autofagiju, čime se sprječava razgradnja triju važnih postsinaptičkih proteina ključnih za sinaptičku plastičnost ovisnu o receptoru NMDA [304]. Osim toga, put PI3K-AKT potiče rast i grananje dendrita regulacijom sinteze proteina i razvoja citoskeleta [305,306]. Put MAPK/ERK ključan je, ne samo za ekspresiju gena ranog odgovora, već i za regulaciju citoskeletnih proteina [307], a također igra važnu ulogu u rastu i grananju dendrita hipokampalnih neurona [308]. Signalni putevi BDNF-a i TrkB-a prikazani su na **Slici 10**.



Slika 10. Signalni putevi aktivirani vezanjem BDNF-a na receptor TrkB. SHC (adaptor protein koji sadrži Src homolognu 2 domenu), Ras (*rat sarcoma protein*), Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK (kinaza MAP kinaze), ERK (kinaza regulirana izvanstaničnim signalom), PLCγ (fosfolipaza Cγ), IP3 (inozitol trifosfat), DAG (diacilglicerol), CaMK (protein kinaza ovisna o kalciju/kalmodulinu), PKC (protein kinaza C), PI3K (fosfoinozitid 3-kinaza), AKT (serin treonin kinaza). Preuzeto i prilagođeno prema radu Andero i suradnika [309].

Uloga BDNF-a u regulaciji brojnih fizioloških procesa u mozgu ovisi o interakciji njegovih izoformi s različitim vrstama receptora, koji zauzvrat aktiviraju signalne puteve ključne za procese razvoja mozga, sinaptičke plastičnosti te zaštitu i/ili regeneraciju nakon oštećenja. Stoga, poremećaj sinteze BDNF-a, koji dovodi do disfunkcije njegovih signalnih puteva, može biti odgovoran za pokretanje patoloških procesa u mozgu [280].

2.6.4. Potencijalne uloge BDNF-a u demenciji

Promjena razine BDNF-a u perifernoj krvi i CNS-u, kao i neravnoteža ili nedostatak pretvorbe proBDNF-a u BDNF, povezani su s patogenezom raznih bolesti, uključujući AB i ishemijski moždani udar [310,311]. Osobe s AB-om imaju značajno niže razine BDNF-a u serumu u usporedbi s kontrolnim ispitanicima iste dobi, dok u osoba s MCI-jem taj pad nije zabilježen [312]. Smanjenje razina BDNF-a u perifernim tkivima primjetno je tek u kasnijim stupnjevima demencije [312]. U CSF-u oboljelih od AB-a otkrivena je značajno viša ekspresija proBDNF-a i omjer proBDNF-a i BDNF-a, što povećava patogenost, smanjuje trofičke učinke i dovodi do apoptoze putem aktivacije receptora p75NTR [313]. Osim toga, prekomjerni ili patološki promijenjeni protein tau inhibira proizvodnju BDNF-a i uzrokuje neurotoksičnost, čak i bez mutacija gena *tau* ili stvaranja NFT-ova [314]. S druge strane, BDNF može ometati fosforilaciju proteina tau, što ukazuje na mogući protektivni učinak BDNF-a [315].

Osim AB-a, BDNF ima ključnu ulogu u ishemijskom moždanom udaru, osobito u vezi s mobilnošću oboljelih. Istraživanje je pokazalo da se ekspresija BDNF-a i TrkB-a smanjuje u stanicama pod uvjetima OGD-a te u hipokampusu miševa nakon okluzije srednje cerebralne arterije, u što je uključena regulacija hipokampalne signalizacije BDNF-TrkB [316]. Razina BDNF-a značajno je smanjena i u akutnoj fazi ishemijskog moždanog udara i može djelovati kao čimbenik koji upućuje na lošu prognozu funkcionalnog statusa oboljelih [317]. Osim toga, kada se egzogeni BDNF daje unutar nekoliko sati nakon udara, može djelovati neuroprotektivno, a kada se daje nekoliko dana nakon, može potaknuti produženje aksona i stvaranje sinapsi [318].

Brojna istraživanja upućuju da povećanje razine BDNF-a u moždanim regijama ključnim za pamćenje i kogniciju može poboljšati kliničke ishode kod osoba s AB-om [319,320]. Međutim, dostava egzogenog BDNF-a u mozak otežana je zbog njegovog kratkog poluživota u plazmi i slabe sposobnosti prolaska kroz BBB [321,322]. Intranazalna primjena BDNF-a istaknula se kao obećavajuća strategija jer omogućuje brzu apsorpciju kroz nosnu sluznicu, zaobilazi BBB, jednostavna je za primjenu i smanjuje sistemsku izloženost [323]. Iako klinički dokazi podupiru ovu metodu, postoje izazovi poput brze difuzije i eliminacije iz dišnog sustava, ograničene količine BDNF-a koja dospijeva u CNS te mogućih imunoloških reakcija [324–326]. U svrhu

poboljšanja stabilnosti i učinkovitosti dostave BDNF-a u mozak, razvijene su polimerne nanočestice, poput PLGA, koje omogućuju produljeno oslobađanje, štite BDNF od razgradnje i povećavaju njegovu bioraspoloživost [327,328]. Prirodni biopolimeri, uključujući kolagen, hitosan i alginat, dodatno poboljšavaju ciljani transport i očuvanje biološke aktivnosti BDNF-a [329]. Kombinacija intranazalne primjene i nanotehnologije otvara nove mogućnosti u liječenju neurodegenerativnih bolesti poput AB-a [323], no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile optimalne doze, sigurnost i dugoročna učinkovitost ove terapije. S obzirom na navedena ograničenja, terapijske strategije sve više usmjeravaju pažnju na endogenu obnovu razina BDNF-a izravno, promoviranjem njegove endogene proizvodnje (npr. genskom terapijom), ili neizravno, poboljšanjem signalizacije i izlučivanja BDNF-a u mozgu (npr. tjelovježbom) [330]. Pretpostavlja se da bi genska terapija BDNF-om mogla biti učinkovitija od NGF-a, koji je ključan za preživljenje kolinergičkih neurona i potencijalna terapijska meta u AB-u [318]. BDNF je široko eksprimiran u korteksu i pokazuje veću učinkovitost u obnovi neuronskih mreža, smanjenju gubitka stanica i poboljšanju funkcije neurona u usporedbi s NGF-om [323], a ciljana dostava BDNF-a u entorinalni korteks ili hipokampus dodatno bi mogla povećati terapijsku učinkovitost [331]. Nadalje, tjelesna aktivnost, posebno aerobna tjelovježba, ima pozitivan učinak na kognitivne funkcije. Dokazano je da aerobni trening mijenja sastav metabolita crijevnog mikrobioma, a otprilike 30% tih metabolita povezano je s promjenama razine BDNF-a [332]. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnio mehanizam putem kojeg tjelesna aktivnost može igrati ulogu u prevenciji i liječenju AB-a.

3. MATERIJAL, ISPITANICI I METODE

3.1. Modeli AB-a i VaD-a in vitro

Model AB-a *in vitro* optimiziran je u primarnoj kulturi neurona miševa C57BL/6, uključujući određivanje doze i vremenskog učinka oligomera A β_{42} , kao i optimalne doze neuroprotektivnog djelovanja DHEA(S)-a i BDNF-a. Dobivene optimalne doze i vremenski period primijenjeni su u primarnim neuronima miševa C57BL/6 i staničnoj liniji SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka u modelima AB-a i VaD-a.

3.1.1. Primarna kultura neurona miševa C57BL/6

Miševi soja C57BL/6 uzgajani su u Pogonu laboratorijskih životinja na Institutu Ruđer Bošković (IRB), koji je ovlašten za uzgoj, držanje i provođenje pokusa na životinjama. U istraživanju je korišteno 20 ženki, smještenih pojedinačno u kavezima u prostoriji s ciklusom 12 h svjetla/12 h mraka (svjetlo od 07:00-19:00 h), sobne temperature 21-25°C i relativne vlažnosti od 40-70%. Mišice su hranjene standardiziranim peletima i imale su pristup vodi *ad libitum*. Primarna kultura neurona (**Slika 11.**) uspostavljena je iz embrija miševa gestacijske dobi 15,5 dana.



Slika 11. Primarna kultura neurona miševa C57BL/6.

Priprema pločica za nasađivanje primarne kulture neurona

Prije uspostave primarne kulture neurona, pločice za nasađivanje stanica obložene su otopinom poli-D-lizina (PDL). Postupak je proveden u sterilnom kabinetu (Klimaoprema, Hrvatska). Alikvot od 250 µl PDL-a koncentracije 4 mg/ml otopljen je u 50 ml 0,1 M boratnog pufera kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,02 mg/ml. Otopina je sterilizirana filtracijom kroz filter s porama od 0,2 µm i potom raspoređena u pločice s 96 jažica (125 µl), 24 jažice (500 µl) te 12 i 6 jažica (1 ml). Pločice su zamotane u aluminijsku foliju kako bi se spriječilo isparavanje i

inkubirane su preko noći u inkubatoru CO₂ Incubator HeraCell 150 (Heraeus, Njemačka) pri 37°C i 5% CO₂. Nekoliko sati prije uspostavljanja primarne kulture neurona, PDL je odsisan, a jažice su tri puta isprane ultračistom vodom. Zatim je dodan kompletirani medij DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*, Thermo Fisher Scientific, SAD; 200 μ l u pločice s 96 jažica, 500 μ l u pločice s 24 jažice i 1 ml u pločice s 12 i 6 jažica), te su pločice ponovo inkubirane pri 37°C i 5% CO₂ do nasađivanja primarnih neurona.

Uspostava primarne kulture neurona

U skladu s Direktivom Europskog parlamenta (2010/63/EU), Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 53/13, 39/17) postupci na žrtvovanim životinjama radi izolacije organa za primarne stanične kulture ne smatraju se pokusima i ne zahtijevaju odobrenje Etičkog povjerenstva.

Gravidnu mišicu soja C57BL/6 cervikalnom dislokacijom eutanazirala je ovlaštena osoba iz Pogona laboratorijskih životinja na IRB-u, a primarna kultura neurona uspostavljena je prema modificiranom protokolu Hilgenberga i Smitha [1]. Embriji gestacijske dobi 15,5 dana izolirani su iz maternice mišice (Slika 12.), dekapitirani u sterilnoj komori (Biosan, Latvija) i mozgovi su pod disekcijskim mikroskopom SteREO Discovery.V8 (Zeiss, Njemačka) očišćeni od moždanih ovojnica. Daljni postupci provođeni su u sterilnom kabinetu. Korteksi su isprani s 10 ml Hankove balansirane otopine soli (Hanks' balanced salt solution, HBSS, Lonza, SAD), resuspendirani u 5 ml HBSS-a, i tretirani s 100 µl 2,5%-tnog tripsina (Invitrogen, SAD) tijekom 20 min pri 37°C. Nakon dodavanja 5 ml 10 µg/ml DNaze (Sigma-Aldrich, SAD), smjesa je odsisana i tkivo triturirano kroz staklenu Pasteurovu pipetu. Otopina je filtrirana kroz cjedilo s porama od 70 µm i centrifugirana (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Njemačka) 5 min pri 300 x g. Stanice su potom resuspendirane u 1 ml DMEM-a po mozgu, prebrojane u alikvotu od 30 µl pomoću brojača LUNA-II Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Južna Koreja) i nasađene u gustoći od 3 x 105 stanica/ml u pločice sa 6 i 12 jažica (2 ml i 1 ml po jažici) te 2,5 x 10⁵ i 2 x 10⁵ stanica/ml u pločice s 24 i 96 jažica (500 µl i 200 µl po jažici), prethodno obložene PDL-om. Nakon 4 h, DMEM je zamijenjen neurobazalnim medijem s 2%-tnim suplementom B-27 (oboje Thermo Fischer Scientific, SAD). Kultura je održavana u inkubatoru pri 37°C i 5% CO₂, s promjenom polovice medija svaka 3 dana.



Slika 12. Izolacija embrija i primarnih neurona miševa C57BL/6.

Provjera uspostave primarne kulture neurona

U svrhu provjere uspješne uspostave primarne kulture neurona korištena je imunocitokemijska metoda. Stanice su nasađene na stakalcima u pločicama s 24 jažice. Pet do sedam dana nakon nasađivanja medij je odsisan, a stanice su isprane tri puta puferiranom otopinom fosfatnih soli (phosphate buffered saline, PBS). Zatim su fiksirane hladnim 100%-tnim metanolom (Grammol, Hrvatska) tijekom 5 min pri sobnoj temperaturi te ponovno isprane tri puta s hladnim PBSom. Potom su tretirane PBS-om s 0,1%-tnim Tween®-om 20 (Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 5 min, nakon čega su ponovno isprane tri puta s PBS-om. Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, blokirane su u 0,1%-tnoj otopini PBS-Tween® 20 s 1%-tnim goveđim serumskim albuminom (bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, SAD), 10%-tnim normalnim kozjim serumom (Sigma-Aldrich, SAD) i 0,3 M glicinom (Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 1 h pri 37°C i 5% CO2. Nakon blokiranja, stanice su preko noći inkubirane pri 4°C s primarnom antitijelom protiv tubulina ß III (Anti-ß III Tubulin, Abcam, UK) u 1%-tnom BSA (1:1000), u sterilnoj Petrijevoj posudi s vlažnim papirnatim ručnikom. Drugog dana, stanice su isprane tri puta s PBS-om te inkubirane sa sekundarnim antitijelom iz koze protiv imunoglobulina G kunića (Goat Anti-Rabbit IgG H&L, Alexa Fluor® 488, Abcam, UK) u 1%-tnom BSA (1:1000) tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi, od tada nadalje u mraku. Jezgre su obojene Hoechst-om 33342 (Sigma-Aldrich, SAD) otopljenim u redestiliranoj sterilnoj vodi (1 µg/ml) tijekom 1 min, a zatim isprane tri puta s PBS-om. Nakon uklapanja u medij Fluoromount (Sigma-Aldrich, SAD), uzorci su vizualizirani mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Japan) pri valnim duljinama od 490-580 nm za zelenu fluorescenciju i 365-465 nm za plavu fluorescenciju, nakon čega su slike preklopljene.

<u>Kemikalije:</u>

• boratni pufer (0,1 M) - 1,24 g borne kiseline (Carl Roth, Njemačka), 1,9 g borax-a (VWR, SAD), redestilirana sterilna voda do konačnog volumena 500 ml, pH 8,5, steriliziran filtriranjem kroz filter (0,2 μ m)

 otopina PDL-a (0,02 mg/ml) - 10 mg PDL-a (Sigma-Aldrich, SAD), 50 ml boratnog pufera (0,1 M), sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 μm)

DMEM (Thermo Fisher Scientific, SAD) s visokim udjelom glukoze (4500 mg/l) - za kompletirani medij dodan je 10%-tni fetalni goveđi serum (*fetal bovine serum*, FBS, Thermo Fisher Scientific, SAD) inaktiviran 60 min pri 56°C, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), 100 U/ml penicilina (Sigma-Aldrich, SAD), 100 µg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich, SAD), 2,5 µg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD), pH 7,4

 otopina DNaze (10 mg/ml) - DNaza (Sigma-Aldrich, SAD) otopljena u HBSS-u (Lonza, SAD), sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 μm)

• otopina za trituraciju - 0,5 g albumax-a (Thermo Fischer Scientific, SAD), 25 mg inhibitora tripsina (Sigma-Aldrich, SAD), 50 μl otopine DNaze (10 mg/ml), 50 ml HBSS-a (Lonza, SAD), sterilizirana filtriranjem kroz filter (0,2 μm)

 neurobazalni medij (Thermo Fischer Scientific, SAD) - za kompletirani neurobazalni medij dodano je 0,5 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml streptomicina, 2,5 μg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD), suplementa B27 (1X, Thermo Fisher Scientific, SAD), pH 7,4

• PBS (10X) - 100 g NaCl (Kemika, Hrvatska), 2,5 g KCl (Kemika, Hrvatska), 2,5 g KH₂PO₄ (Merck, Njemačka) i 36,2 g Na₂HPO₄ x 12H₂O (Kemika, Hrvatska), pH 7,4, nadopunjen destiliranom vodom do 1 l te steriliziran autoklaviranjem

3.1.2. Stanična linija SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka

Stanice neuroblastoma čovjeka SH-SY5Y (**Slika 13.**) potječu od roditeljske linije SK-N-SH, izvorno dobivene biopsijom koštane srži četverogodišnje djevojčice oboljele od neuroblastoma [333]. Nakon tri ciklusa subkloniranja (SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y) [138], zadržale su sposobnost kontinuirane proliferacije. Stanice SH-SY5Y često se koriste kao model *in vitro* u istraživanjima neurotoksičnosti, neurodegenerativnih procesa te razvoja i starenja neurona [334]. U nediferenciranom obliku, ove stanice pokazuju morfologiju sličnu neuroblastima i

eksprimiraju nezrele neuronske biljege [335] te su u tom obliku korištene u ovom istraživanju. Nediferencirane stanice SH-SY5Y obično nalikuju nezrelim kateholaminergičkim neuronima. Eksprimiraju brojne dopaminergičke neuronske biljege i izlučuju tirozin hidroksilazu, enzim ključan za pretvorbu dopamina, noradrenalina i adrenalina [141]. Stanice SH-SY5Y visoke pasaže izlučuju dopamin-β-hidroksilazu, enzim koji vrši tvorbu noradrenalina iz dopamina [138]. Također, muskarinski acetilkolinski receptori prisutni su na membranama ovih stanica [138].



Slika 13. Stanice SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka.

Uzgoj stanične linije

Prije odmrzavanja stanica SH-SY5Y, kompletirani DMEM je zagrijan pri 37°C tijekom 30 min. Ampule sa zamrznutim stanicama izvađene su iz tekućeg dušika (-196°C) i djelomično odmrznute pri 37°C. Nakon toga, stanice su prenesene u sterilnu epruvetu s 5 ml DMEM-a i centrifugirane 5 min pri 300 x g i sobnoj temperaturi. Stanični talog je resuspendiran u 5 ml svježeg DMEM-a i premješten u bočicu za uzgoj (75 cm², 250 ml) u inkubator pri 37°C i 5% CO2. Medij je mijenjan svaka tri dana. Kada su stanice postigle konfluentnost, medij je uklonjen, a stanice su isprane dva puta s 3 ml PBS-a. Dodano im je 500 µl 0,05%-tnog tripsina i inkubirane su 1-2 min uz povremeno lagano treskanje. Nakon dodavanja 2,5 ml DMEM-a radi inaktivacije tripsina, stanice su resuspendirane. Dio stanične suspenzije (1,5 ml od ukupno 3 ml) prenesen je u novu bočicu i dopunjen s DMEM-om do 5 ml. Stanice su izbrojane u alikvotu od 30 µl pomoću brojača LUNA-II Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Južna Koreja) i nasađene na pločice u gustoći od 3 x 105 stanica/ml u pločice sa 6 i 12 jažica (2 ml i 1 ml po jažici) te 2,5 x 10⁵ i 2 x 10⁵ stanica/ml u pločice s 24 i 96 jažica (500 µl i 200 µl po jažici). Neiskorištene stanice su nakon pokusa odvojene od podloge, stavljene na led 45-90 min i centrifugirane 5 min pri 300 x g i 4°C. Medij za zamrzavanje stanica pripremljen je od DMEMa i FBS-a u omjeru 1:1, s dodatkom 10%-tnog dimetilsulfoksida (DMSO, Sigma-Aldrich, SAD) i ohlađen. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u mediju za zamrzavanje. Po 1 ml stanične suspenzije stavljeno je u ohlađene ampule, koje su pohranjene u zamrzivač pri -80°C preko noći, a zatim pohranjene u tekući dušik za buduće pokuse.

3.1.3. Optimizacija modela AB-a

Model AB-a optimiziran je u primarnoj kulturi neurona miševa C57BL/6 te su dobivene optimalne koncentracije i vremenski period primijenjeni u primarnim neuronima miševa C57BL/6 i staničnoj liniji SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka u modelu AB-a i VaD-a.

3.1.3.1. Priprema, provjera i primjena monomera, oligomera i polimera Aβ₄₂

Priprema monomera, oligomera i polimera Aβ₄₂

U svrhu uspostave modela AB-a in vitro, ispitana je toksičnost monomera, oligomera i polimera peptida A β_{42} , pripremljenih prema protokolu Stinea i suradnika [336] iz liofiliziranog sintetskog ljudskog amiloida β (1-42) (Aβ, California Peptide Research, SAD). Na ledu, Hamilton iglom probušena je bočica otapala heksafluoroizopropanola (HFIP, Sigma-Aldrich, SAD) prethodno ohlađenog pri 4°C, i izvučeno je 222 µl, te izravno dodano u bočicu s 1 mg liofiliziranog peptida. Peptid je miješan dok se nije potpuno otopio, nakon čega je bočica ostavljena otvorena pri sobnoj temperaturi 1 h. U pripremljene ampule od 0,2 ml na ledu dodano je po 10 µl otopine te su ostavljene otvorene preko noći da HFIP ishlapi. Sljedećeg dana, ampule su stavljene u vakuumski koncentrator SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, SAD) 10 min na srednju brzinu sušenja i bez zagrijavanja. Ampule su spremljene pri -20°C do dana prije izlaganja stanica. Tada su u svaku ampulu dodana 2 μ l DMSO-a kako bi se dobila koncentracija A β_{42} od 5 mM, nakon čega je otopina temeljito resuspendirana i miješana 45 s, a potom kratko centrifugirana i sonificirana 10 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji (Elmasonic EASY, Elma, Njemačka). Za pripremu 100 μM polimera Aβ42, dodano je 98 μl 10 mM HCl-a (Kemika, Hrvatska), otopina je miješana 15 s i inkubirana pri 37°C tijekom 24 h. Za dobivanje 100 μ M oligomera A β_{42} , dodano je 98 µl hladnog medija DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, SAD) s 2 mM glutamina, miješano 15 s i ostavljeno pri 4°C tijekom 24 h, a za 100 µM monomere AB42, koji su svježe pripremljeni, dodano je 98 μ l ledene redestilirane vode i otopina je miješana 15 s.

Provjera monomera, oligomera i polimera Aβ₄₂

Nastanak monomera, oligomera i polimera A β_{42} provjeren je mikroskopijom atomskih sila (*atomic force microscopy*, AFM) i denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) u uzorcima koncentracije 10 μ M.

Uzorci za AFM pripremljeni su metodom depozicije kapi na tinjcu, korištenog radi njegove atomski glatke površine. Tinjac je pričvršćen na metalni disk od nehrđajućeg čelika pomoću dvostrano ljepljive trake te je na svježe izlomljeni tinjac naneseno 10 µl uzoraka Aβ₄2. Nakon 45 min sušenja u zatvorenoj Petrijevoj posudi, uzorak je ispran s 50 µl ultračiste vode dva puta kako bi se uklonile kristalizirane čestice i potom ostavljen da se osuši u pokrivenoj Petrijevoj posudi da bi se spriječila kontaminacija iz zraka. Mjerenja su provedena na uređaju Multimode Scanning Probe Microscope s kontrolnom jedinicom Nanoscope IIIa (Veeco Instruments, SAD). Korišteno je piezoelektrično pretraživalo s vertikalnom spregom AS-130V, u tapkajućem režimu rada, korištenjem pretražne probe od silicija RTESP (Bruker, SAD) s rezonantnom frekvencijom 289-335 kHz i konstantom opruge od 20-80 N/m. Amplituda je određena prema slobodnoj amplitudi (A/A0) i održavana na 0,9, a brzina skeniranja optimizirana na 1,0 do 2,0 Hz po liniji. Rezolucija je bila 512 x 512 točaka po slici, a obrada slika izvršena je korištenjem NanoScope[™] softverskog paketa verzije V6.14r1 (Digital Instruments, SAD), s primjenom opcije poravnanja prvog reda u dvije dimenzije, kako bi se uklonio prividni nagib površine. Mjerenja su izvedena na zraku, pri sobnoj temperaturi i relativnoj vlažnosti zraka od 50-60%.

Stvaranje oligomera i polimera A β_{42} iz monomera također je provjereno razdvajanjem na 4-20%-tnom poliakrilamidnom gelu Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gel uz pomoć sustava Mini-PROTEAN® 3 Cell (oboje Bio-Rad Laboratories, SAD). Uzorci su pomiješani s puferom Laemmli (Bio-Rad Laboratories, SAD) u omjeru 1:2, te je po 30 µl tako pripremljenih uzoraka i 5 µl proteinskog molekularnog biljega Novel Sharp Pre-Strained Protein Standard (3,5-260 kDa, LC5800, Invitrogen, SAD) naneseno na gel debljine 1,5 mm. Elektroforeza je provedena pri 100 V/80 mA tijekom 90 min u elektroforetskom puferu (Tris/Glycine/SDS, Invitrogen, SAD). Uzorci A β_{42} na gelu vizualizirani su bojanjem gela pri 50°C tijekom 8-10 min s 0,1%tnom bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Fisher Scientific, SAD) u 40%-tnom etanolu (Kemika, Hrvatska) i 10%-tnoj octenoj kiselini (Kemika, Hrvatska) te naknadnim odbojavanjem u otopini 10%-tnog etanola i 7,5%-tne octene kiseline.

Primjena monomera, oligomera i polimera Aβ₄₂

U svrhu utvrđivanja neurotoksičnosti, primarna kultura neurona izložena je 0,1, 1 i 10 μ M monomerima, oligomerima i polimerima A β_{42} , odnosno HFIP-u, tijekom 24 h. Nakon odsisavanja medija iz jažica, pripremljeni uzorci monomera, oligomera i polimera A β_{42} , otopljeni u neurobazalnom mediju, dodani su u jažice i inkubirani 24 h pri 37°C i 5% CO₂.

3.1.3.2. Određivanje vijabilnosti stanica izloženih monomerima, oligomerima i polimerima $A\beta_{42}$

Za određivanje vijabilnosti primarne kulture neurona izložene monomerima, oligomerima i polimerima A β_{42} korišteni su testovi MTT i RealTime-GloTM MT Cell Viability Assay (Promega, USA) te komplet MUSETM Count & Viability Kit (Luminex Corporation, USA).

Test MTT koristi se za mjerenje metaboličke aktivnosti stanica, koja služi kao pokazatelj njihove vijabilnosti, proliferacije i citotoksičnosti. Ova kolorimetrijska metoda temelji se na redukciji žute tetrazolijeve soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT, Sigma-Aldrich, SAD) u ljubičaste kristale formazana od strane metabolički aktivnih stanica. Žive stanice sadrže NAD(P)H-ovisne oksidoreduktaze koje redukcijom MTT-a stvaraju formazan (**Slika 14.**). Testirani su uzorci monomera, oligomera i polimera A β_{42} u koncentraciji od 0,1, 1 i 10 μ M tijekom 24 h. MTT je otopljen u mediju za uzgoj stanica do konačne koncentracije od 0,5 mg/ml. Pozitivnu kontrolu činile su stanice u neurobazalnom mediju, dok je negativnu kontrolu činio neurobazalni medij u jažicama bez stanica. Nakon uklanjanja medija iz pločica s 96 jažica, u svaku jažicu dodano je 40 μ l pripremljene otopine MTT-a. Pločica je zamotana u aluminijsku foliju i inkubirana pri 37°C i 5% CO₂ tijekom 4 h. Po završetku inkubacije, u svaku je jažicu dodano 160 μ l DMSO-a, nakon čega je pločica miješana 10 min na orbitalnoj miješalici Asal S.r.1. 715 CT+ (Asal S.r.1., Italija). Apsorbancija je izmjerena pri 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Thermo Scientific Multiskan® EX (Thermo Fisher Scientific, SAD).



Slika 14. Mehanizam djelovanja testa MTT. Preuzeto i prilagođeno s https://theory.labster.com/mtt-assay/.

Test RealTime-Glo[™] MT Cell Viability Assay (Promega, USA) (Slika 15.) omogućuje praćenje vijabilnosti stanica u stvarnom vremenu. Ovaj test koristi enzim luciferazu NanoLuc® za stvaranje luminescentnog signala, čiji je intenzitet proporcionalan broju živih stanica, što ga

čini pogodnim za ispitivanja citotoksičnosti. Test procjenjuje broj živih stanica mjerenjem njihovog redukcijskog potencijala, koji odražava metaboličku aktivnost stanica. Metoda se temelji na dodavanju luciferaze NanoLuc® i prosupstrata, supstrata MT za procjenu vijabilnosti stanica. Žive stanice reduciraju prosupstrat, pritom stvarajući supstrat za luciferazu NanoLuc®. Oslobođeni supstrat difundira iz stanica u okolni medij, gdje se brzo iskorištava za generiranje luminiscentnog signala. Nakon izlaganja primarnih neurona monomerima, oligomerima i polimerima Aβ₄₂ u koncentracijama 0,1, 1 i 10 µM i kontrolnoj skupini izloženoj HFIP-u, stanice su testirane prema protokolu proizvođača. Komponente kompleta, uključujući supstrat MT za procjenu vijabilnosti stanica i luciferazu NanoLuc®, te neurobazalni medij, prethodno su zagrijani pri 37°C. RealTime-GloTM reagens pripremljen je razrjeđivanjem supstrata MT i luciferaze NanoLuc® u neurobazalnom mediju. Pripremljeni reagens dodan je u jažice u volumenu jednakom onome koji je bio prisutan u bijelim pločicama s 96 jažica s nasađenim neuronima. Stanice su zatim inkubirane 10 min pri 37°C i 5% CO₂, nakon čega je izmjerena luminiscencija pomoću čitača mikropločica Infinite 200 PRO (Tecan, Švicarska).



Slika 15. Prikaz djelovanja testa RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Preuzeto i prilagođeno s https://promega.showpad.com/share/09dbG29xoCpAmEZQkhR7h.

Za određivanje broja i vijabilnosti stanica korišten je komplet MUSE[™] Count & Viability Kit (Luminex Corporation, SAD) (**Slika 16.**), koji različito boji vijabilne i nevijabilne stanice temeljem njihove propusnosti za dvije vezujuće boje za DNA, prisutne u reagensu. Jedna od boja boji stanice koje su izgubile integritet membrane, omogućujući da boja prodre u jezgru mrtvih i umirućih stanica, čime se omogućuje razlikovanje vijabilnih stanica (neobojenih, živih) od nevijabilnih (obojenih, mrtvih ili umirućih). Druga boja, koja prolazi kroz staničnu

membranu, boji sve stanice koje sadrže jezgru, što omogućuje razlikovanje stanica s jezgrom od staničnog otpada i stanica bez jezgre. Uređaj Guava® MUSE® Cell Analyzer (Luminex Corporation, SAD) broji obojene stanice s jezgrom te, koristeći svojstva veličine stanica, razlikuje slobodne jezgre i stanični otpad od cjelovitih stanica, čime osigurava precizno određivanje ukupnog broja stanica. Primarni neuroni su 24 h nakon izlaganja monomerima, oligomerima i polimerima AB42 u koncentraciji od 10 µM, odnosno HFIP-u kao kontroli, testirani ovim kompletom prema protokolu proizvođača. Za pripremu staničnih suspenzija, neurobazalni medij uklonjen je iz pločica sa 6 jažica u kojima su se nalazili neuroni, nakon čega su jažice dvaput isprane s 300 µl PBS-a. U svaku jažicu zatim je dodano 100 µl 0,05%-tnog tripsina, a nakon 2 min inkubacije tripsin je neutraliziran dodatkom 300 µl neurobazalnog medija. Jažice su na kraju još jednom isprane s 300 µl neurobazalnog medija, dok su odsisani medij, PBS i tripsin sakupljeni u plastične epruvete. Dobivena stanična suspenzija centrifugirana je 5 min pri 300 x g, supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 200 µl neurobazalnog medija. Za analizu broja i vijabilnosti stanica, 50 µl stanične suspenzije dodano je u 450 µl reagensa MUSE™ Count & Viability, prema uputama proizvođača, budući da je gustoća nasađenih stanica bila između 1 x 105 i 1 x 106 stanica/ml. Uzorci su inkubirani 5 min, a potom je provedeno očitavanje na uređaju Guava® MUSE® Cell Analyzer (Luminex Corporation, SAD).



Slika 16. Primjer prikaza rezultata dobivenih kompletom MUSE™ Count & Viability Kit na uređaju Guava® MUSE® Cell Analyzer. Preuzeto i prilagođeno s

https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Count-&-Viability-Kit-RSP.pdf.

Budući da su se oligomeri pokazali toksičnijima u odnosu na monomere i polimere, odabrani su za uspostavu modela AB-a u daljnjim pokusima. Za određivanje optimalne doze i vremenskog učinka oligomera, primarni neuroni testirani su testom MTT nakon izlaganja 0,1, 1 i 10 μM oligomerima, odnosno HFIP-u, tijekom 24, 48 i 72 h.

3.1.4. Optimizacija modela VaD-a

Za uspostavu modela VaD-a *in vitro*, uslijed ishemijske ozljede mozga, primarni neuroni i stanice SH-SY5Y podvrgnuti su OGD/R-u, korištenjem modularne inkubacijske komore (*modular incubator chamber*, Embrient, SAD, **Slika 17.**) ispunjene s N₂. Kompletirani stanični medij zamijenjen je DMEM-om bez glukoze i FBS-a, a stanice su inkubirane u komori ispunjenoj s N₂ pri 37°C tijekom 16 h. Nakon ozljede, stanicama je ponovno dodan odgovarajući kompletirani stanični medij i stanice su ostavljene u inkubatoru 24 h za oponašanje reperfuzije. Kontrolne stanice izložene su odgovarajućem mediju za rast i držane u inkubatoru pri 37°C i 5% CO₂.



Slika 17. Posebno dizajnirana modularna komora za izlaganje stanica deprivaciji kisika. Preuzeto s https://brincubator.com/modular-incubator-chamber/.

3.1.5. Analiza mehanizama ozljede u modelima AB-a i VaD-a in vitro

Za analizu mehanizama ozljede, u modelu AB-a korišteni su testovi Mitochondrial ToxGlo[™] Assay i Caspase-Glo® 3/7 Assay (oboje Promega, SAD) te kompleti MUSE® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit i MUSE® Oxidative Stress Kit (oboje Luminex Corporation, SAD), dok su u modelu AB-a i VaD-a korištene fluorescentne boje Hoechst 33342 i propidijev jodid (oboje Sigma-Aldrich, SAD).

Gubitak integriteta stanične membrane, razine ATP-a i kaspaza 3 i 7

Test Mitochondrial ToxGlo[™] Assay (**Slika 18.**) procjenjuje integritet stanične membrane i razine ATP-a. Integritet membrane mjeri se utvrđivanjem proteazne aktivnosti korištenjem fluorogenog peptidnog supstrata bis-AAF-R110, koji ne prolazi netaknutu membranu živih

stanica i stoga ne proizvodi signal. Nakon toga, dodaje se reagens za ATP koji uzrokuje lizu stanica i stvaranje luminiscentnog signala proporcionalnog količini ATP-a. U testu Caspase-Glo® 3/7 Assay (**Slika 19.**), apoptoza se utvrđuje dodavanjem luminogenog DEVD-peptida za kaspaze 3 i 7 i luciferazu Ultra-Glo[™], pri čemu cijepanje supstrata oslobađa luciferin, generirajući svjetlost proporcionalnu aktivaciji kaspaza 3 i 7.



Slika 18. Prikaz djelovanja testa Mitochondrial ToxGlo[™] Assay. Preuzeto i prilagođeno s https://promega.showpad.com/share/09dbG29xoCpAmEZQkhR7h.



Slika 19. Prikaz djelovanja testa Caspase-Glo® 3/7 Assay. Preuzeto i prilagođeno s https://promega.showpad.com/share/09dbG29xoCpAmEZQkhR7h.

Nakon izlaganja primarnih neurona oligomerima $A\beta_{42}$ u koncentracijama 0,1, 1 i 10 μ M, odnosno HFIP-u, tijekom 24 h, stanice su testirane ovim testovima i kompletima prema protokolu proizvođača.

U testu Mitochondrial ToxGlo[™] Assay, komponente citotoksičnog reagensa (pufer i supstrat bis-AAF-R110) odmrznute su pri 37°C. U svrhu pripreme citotoksičnog reagensa, 2 ml pufera

odvojeno je u epruvetu i u njega dodano 10 μl supstrata bis-AAF-R110. Smjesa je miješana dok se supstrat nije potpuno otopio. Nakon toga je pufer za utvrđivanje ATP-a odmrznut pri 37°C. Za rekonstituciju reagensa za utvrđivanje ATP-a, u tamnu bočicu s liofiliziranom enzimskom/supstratnom smjesom dodano je 10 ml pufera za utvrđivanje ATP-a, a smjesa je temeljito promiješana dok nije postala homogena. U svaku jažicu bijele pločice s 96 jažica u kojoj su se nalazili neuroni, dodano je 20 μl citotoksičnog reagensa, nakon čega je smjesa kratko miješana na orbitalnoj miješalici 1 min. Uzorci su inkubirani 30 min pri 37 °C, a zatim je fluorescencija izmjerena na čitaču mikropločica Infinite 200 PRO (Tecan, Švicarska) pri 485 nm ekscitacije i 525 nm emisije. Pločica je zatim ostavljena 5-10 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je u svaku jažicu dodano 100 μl reagensa za utvrđivanje ATP-a. Nakon orbitalnog miješanja 3 min, luminiscencija je izmjerena pomoću istog čitača mikropločica.

U drugom testu Caspase-Glo® 3/7 Assay, pufer je prenesen u tamnu bočicu sa supstratom, koji su sastavni dio kompleta. Smjesa je miješana dok se supstrat nije potpuno otopio, čime je pripremljen reagens Caspase-Glo® 3/7. Pripremljeni reagens i bijela pločica s 96 jažica s nasađenim neuronima kratko su ostavljeni pri sobnoj temperaturi, nakon čega je u svaku jažicu dodano 100 µl reagensa Caspase-Glo® 3/7. Pločica je zamotana u aluminijsku foliju, a sadržaj je promiješan na orbitalnoj miješalici 30 s. Nakon inkubacije od 1 h pri sobnoj temperaturi, luminiscencija je također izmjerena pomoću spomenutog čitača mikropločica Infinite 200 PRO.

Aktivacija Bcl-2 i izloženost oksidacijskom stresu

Komplet MUSE® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit (**Slika 20.**) koristi se za mjerenje aktivacije proteina Bcl-2, ključnog regulatora apoptoze. Bcl-2 je antiapoptotski protein koji se veže na proapoptotske proteine iz iste obitelji, poput Bax-a, i sprječava njihovu interakciju s mitohondrijskom membranom. U slučaju proapoptotskog signala, Bcl-2 prolazi kroz višestruku fosforilaciju (uključujući fosforilaciju na Ser70), što prekida interakciju između Bcl-2 i Bax-a. Bax se tada veže na mitohondrijsku membranu i uzrokuje otpuštanje citokroma C u citoplazmu, što dovodi do aktivacije kaspaza i stanične smrti. Ovaj komplet sadrži dva konjugirana antitijela: jedno specifično za fosforilirani Ser70 u proteinu Bcl-2 (konjugirano s Alexa Fluor® 555) i drugo za opći oblik proteina Bcl-2 (konjugirano s PE-Cy5) te omogućuje razlikovanje triju staničnih populacija: neaktivirane stanice (s neaktiviranim Bcl-2), aktivirane stanice (s fosforiliranim Bcl-2) i stanice koje ne eksprimiraju Bcl-2. Drugi komplet MUSE® Oxidative Stress Kit (**Slika 21.**) koristi se za određivanje broja i udjela stanica koje su izložene oksidacijskom stresu putem utvrđivanja unutarstaničnih ROS-ova, posebno superoksidnih radikala. Unutarstanični superoksidni radikali određuju se pomoću reagensa MUSE®

Oxidative Stress, koji se temelji na dihidroetidiju. Ovaj reagens može proći kroz staničnu membranu, a u prisutnosti superoksidnih aniona oksidira, stvarajući fluorofor etidijev bromid, koji interkalira u DNA i emitira crvenu fluorescenciju pod ultraljubičastim svjetlom. Test omogućuje razlikovanje dviju staničnih populacija: ROS(-) žive stanice i ROS(+) stanice izložene oksidacijskom stresu.





http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH200105.pdf.







Nakon izlaganja primarnih neurona 10 μ M oligomerima A β_{42} i HFIP-u kao kontrolnoj skupini, stanice su testirane ovim kompletima prema protokolu proizvođača. Za pripremu staničnih suspenzija, neurobazalni medij uklonjen je iz pločica sa 6 jažica s nasađenim neuronima, nakon čega su jažice dvaput isprane s 300 μ l PBS-a. Potom je u svaku jažicu dodano 100 μ l 0,05%tnog tripsina, a nakon 2 min inkubacije tripsin je neutraliziran dodatkom 300 μ l neurobazalnog medija. Slijedilo je završno ispiranje s 300 μ l istog medija, dok su odsisani medij, PBS i tripsin sakupljeni u plastične epruvete. Dobivena stanična suspenzija centrifugirana je 5 min pri 300 x g, nakon čega je supernatant odstranjen, a talog ponovno ispran s 1 ml PBS-a te podvrgnut ponovnoj centrifugi pod istim uvjetima.

Za testiranje kompletom MUSE® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit dobiveni talog resuspendiran je u 100 µl pufera te dodatno u 100 µl fiksacijskog pufera iz kompleta. Uzorci su lagano promiješani pipetiranjem, prebačeni u sterilne mikroepruvete, inkubirani 5 min na ledu i zatim centrifugirani 5 min pri 300 x g. Supernatant je pažljivo odstranjen, a talogu je dodano 200 µl permeabilizacijskog pufera iz kompleta. Nakon ponovne inkubacije od 5 min na ledu i centrifugiranja pri 300 x g, dobiveni talog resuspendiran je u 90 µl pufera iz kompleta, nakon čega je dodano 10 µl smjese dvaju antitijela (u omjeru 1:1). Uzorci su inkubirani 30 min u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u svaku mikroepruvetu dodano je 100 µl pufera, a uzorci su centrifugirani 5 min pri 300 x g. Nakon pažljivog uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u 200 µl pufera, a analiza je provedena na uređaju Guava® Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, SAD).

U drugom kompletu MUSE® Oxidative Stress Kit, reagens MUSE® Oxidative Stress pripremljen je dvostrukim razrjeđivanjem. Matična otopina reagensa, sadržana u kompletu, razrijeđena je puferom iz kompleta u omjeru 1:100, a potom je tako dobiveni reagens dodatno razrijeđen istim puferom u omjeru 1:80. Dobiveni talog stanica resuspendiran je u 100 µl pufera. Iz svake epruvete preneseno je 10 µl stanične suspenzije u sterilne mikroepruvete, nakon čega je dodano 190 µl reagensa MUSE® Oxidative Stress. Uzorci su nježno promiješani i inkubirani 30 min pri 37°C i 5% CO₂, u mikroepruvetama s otvorenim poklopcima. Nakon inkubacije, uzorci su analizirani na spomenutom uređaju Guava® Muse® Cell Analyzer.

Stanična smrt

Za istraživanje stanične smrti korištene su fluorescentne boje Hoechst 33342 i propidijev jodid otopljene u redestiliranoj sterilnoj vodi do koncentracije 1 µg/ml. Hoechst 33342, plava boja koja prolazi kroz staničnu membranu, veže se na adenin-timin regije DNA u jezgri. Zbog kompaktnijeg kromatina u apoptotskim stanicama, Hoechst 33342 daje intenzivniji signal u usporedbi s neapoptotskim stanicama. Druga boja je propidijev jodid, crvena boja koja se veže na DNA, ali ne može proći kroz netaknutu staničnu membranu, omogućujući prikazivanje nekrotičkih stanica s oštećenim membranama. Hoechst 33342 ima maksimalne valne duljine ekscitacije i emisije pri 361 i 497 nm, dok su maksimalne valne duljine ekscitacije i emisije propidijevog jodida u slobodnom obliku pri 493 i 636 nm, a u obliku vezanom za DNA pri 535 i 617 nm.

Za analizu stanica u modelu AB-a i VaD-a te kontrolnih stanica, nasađenih u pločice s 12 jažica, u svaku jažicu dodano je 1 µl Hoechsta 33342 i 1 µl propidijevog jodida, a pločice su inkubirane 3 min u tamnoj prostoriji pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, apoptotske i nekrotičke stanice vizualizirane su i snimljene pomoću fluorescentnog mikroskopa EVOS Floid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za određivanje fluorescencije korišteni su plavi filter za Hoechst 33342 (ekscitacija 357 nm, emisija 447 nm) i crveni filter za propidijev jodid (ekscitacija 531 nm, emisija 593 nm). Broj stanica na slikama brojen je ručno uz pomoć softvera ImageJ (National Institutes of Health, SAD), pri čemu je izračunat udio apoptotskih i nekrotičkih stanica u odnosu na ukupni broj stanica na slici.

3.1.6. Tretman DHEA(S)-om i BDNF-om u modelima AB-a i VaD-a in vitro

U svrhu određivanja optimalne doze neuroprotektivnog učinka u modelu AB-a, primarni neuroni kotretirani su s 10 μ M oligomerima A β_{42} i DHEA(S)-om u koncentracijama od 0,1, 1 i 10 μ M, odnosno BDNF-om u koncentracijama od 0,1, 1 i 100 ng/ml tijekom 24 h. Nakon utvrđivanja optimalne doze DHEA(S)-a od 1 μ M i BDNF-a od 100 ng/ml, primarni neuroni i stanice SH-SY5Y izložene su 10 μ M oligomerima A β_{42} i DHEA(S)-u ili BDNF-u u tim koncentracijama tijekom 24 h, odnosno predtretirane s istim koncentracijama DHEA(S)-a i BDNF-a nakon čega su izložene OGD/R-u (16+24 h). U stanicama izloženim OGD/R-u, odnosno modelu VaD-a, praćeni su učinci predtretmana DHEA(S)-om i BDNF-om, budući da se u prethodnim pokusima pokazao učinkovitijim od posttretmana [337]. DHEA(S) i BDNF razrijeđeni su u redestiliranoj sterilnoj vodi, a zatim dodani u stanični medij, u volumenu ovisnom o veličini jažica.

Kemikalije:

• DHEA (Dehydroepiandrosterone, Avanti Polar Lipids, SAD) otopljena u metanolu (1 mg/ml), zatim razrijeđena u redestiliranoj sterilnoj vodi do radne koncentracije (10 μ M) i konačnih koncentracija (1, 10 i 100 μ M) te dodana u stanični medij u omjeru 1:10, čime su dobivene koncentracije od 0,1, 1 i 10 μ M

• DHEAS (Dehydroepiandrosterone 3-sulfate sodium salt solution, Supelco, SAD) otopljen u metanolu (1 mg/ml), a zatim razrijeđen u redestiliranoj sterilnoj vodi do radne koncentracije (10 μ M) i konačnih koncentracija (1, 10 i 100 μ M) te dodan u stanični medij u omjeru 1:10, čime su dobivene koncentracije od 0,1, 1 i 10 μ M

• BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor, Sigma-Aldrich, SAD) otopljen u redestiliranoj sterilnoj vodi (5 μg/ml) i razrijeđen do konačnih koncentracija (1, 10 i 1000 ng/ml) u redestiliranoj sterilnoj vodi te dodan u stanični medij u omjeru 1:10, čime su dobivene koncentracije od 0,1,1 i 100 ng/ml

3.1.6.1. Određivanje stanične vijabilnosti

Primarnoj kulturi neurona miševa C57BL/6 i staničnoj liniji SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka je nakon kotretmana oligomerima A β_{42} i DHEA(S)-om te BDNF-om, odnosno nakon predtretmana DHEA(S)-om te BDNF-om te OGD/R-a određena vijabilnost testom MTT prema protokolu opisanom u poglavlju **3.1.3.2**.

3.1.6.2. Izolacija RNA i proteina

Ukupna RNA i proteini izolirani su iz primarnih neurona i stanica SH-SY5Y nakon tretmana lijekovima u modelima AB-a i VaD-a.

Izolacija RNA

Stanični medij s lijekovima uklonjen je iz pločica sa 6 jažica, nakon čega su stanice dvaput isprane s 300 µl PBS-a. Stanice su zatim tretirane sa 100 µl 0,05%-tnog tripsina, kojem je naknadno dodano 900 µl svježeg medija za neutralizaciju. Odvojene stanice prenesene su u sterilne epruvete, a ukupna RNA izolirana je pomoću kompleta PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača, uz nekoliko izmjena. Prema preporukama proizvođača, u epruvete je dodano 0,3 ml pufera za lizu s β -merkaptoetanolom (10 µl β -merkaptoetanola na 1 ml pufera), s obzirom na to da je broj stanica u jažici bio $\leq 1 \times 10^6$. Stanične suspenzije zatim su prenesene u epruvete bez RNaze i centrifugirane 5 min pri 2000 x g i 4°C, nakon čega je medij uklonjen. Stanicama je dodan pripremljeni pufer za lizu s

β-merkaptoetanolom, a smjesa je miješana dok nije postignuta potpuna liza. Uzorak je potom resuspendiran kako bi se dobila homogena smjesa. U sljedećem koraku, u epruvetu je dodan jednak volumen 70%-tnog etanola u odnosu na volumen stanične suspenzije te je smjesa temeljito promiješana. Dobivena otopina prenesena je u epruvetu s membranom (spin cartridge) i centrifugirana pri 12000 x g tijekom 2 min, nakon čega je supernatant odbačen. U epruvetu je zatim dodano 700 µl pufera za ispiranje I, a nakon centrifugiranja dodano je 500 µl pufera za ispiranje II s etanolom, pri čemu je postupak ispiranja ponovljen. Na kraju, epruveta je dodatno centrifugirana 1-2 min kako bi se osušila membrana. RNA je eluirana dodavanjem 60 µl vode bez RNaze, inkubacijom 1 min pri sobnoj temperaturi te centrifugiranjem 2 min pri 12000 x g. Dobivena RNA prenesena je u čistu epruvetu, a alikvoti od 5 μl uzeti su za mjerenje koncentracije, dok je ostatak RNA pohranjen pri -80 °C do daljnjih pokusa. Količina i čistoća RNA procijenjeni su spektrofotometrijski u alikvotu od 1 µl pri valnim duljinama od 260 i 280 nm, koristeći NanoPhotometer (Implen, Njemačka). Koncentracija RNA (µg/µl) izračunata je prema formuli: apsorbancija pri 260 nm x 40 x čimbenik razrjeđenja. Za procjenu čistoće RNA, odnosno stupnja zagađenosti proteinima, korišten je omjer apsorbancije 260/280 nm, pri čemu su vrijednosti veće od 1,8 upućivale na visoku čistoću izolirane RNA.

Izolacija proteina

Izolacija proteina iz stanica provedena je korištenjem pufera RIPA za lizu (MilliporeSigma, SAD), razrijeđenog u ultračistoj vodi i ohlađenog na ledu tijekom 2 h. Stanični medij je odsisan sa stanica u pločicama sa 6 jažica, nakon čega su stanice dvaput isprane s 1 ml hladnog PBS-a, a pločica je postavljena na led. Potom je u jažicu dodano 50 µl pufera RIPA s inhibitorima proteaza (Roche cOmplete Protease Inhibitor Cocktail 25X, Sigma-Aldrich, SAD) i uslijedila je inkubacija od 5 min. Stanice su potom plastičnim strugalicama ostrugane s pločica i prebačene u ohlađene epruvete, koje su ostavljene na ledu 10 min, zatim 10 s sonificirane ultrazvučnim homogenizatorom Labsonic M (B. Braun Biotech International, Njemačka) te centrifugirane pri 25000 x g i 4°C tijekom 30 min. Supernatant je prenesen u nove epruvete, uzeti su alikvoti od 10 µl, a ostatak je pohranjen pri -80°C do daljnjih pokusa. U alikvotu od 10 µl određena je koncentracija proteina korištenjem kompleta Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Standardi goveđeg albumina iz kompleta razrijeđeni su serijski, a 50 µl svakog standarda i 49,5 µl destilirane vode s 5,5 µl svakog uzorka dodano je u jažice u duplikatima. A:B smjesa iz kompleta pripremljena je u omjeru 49:1 i dodana u jažice sa standardima i uzorcima. Pločica je inkubirana pri 37°C tijekom 30 min, a apsorbancija je očitana pri 570 nm na spektrofotometru ThermoLab Systems

Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koncentracija proteina određena je pomoću standardne krivulje.

3.1.6.3. Određivanje ekspresije odabranih gena

Za analizu ekspresije gena korištena je kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR, quantitative polymerase chain reaction). Ekspresija gena PI3K, AKT, Bcl-2 i Bax određena je metodom qPCR korištenjem kompleta qPCRBIO SyGreen 1-Step Detect Hi-ROX (PCR Biosystems, UK). Ovaj komplet u jednoj reakciji omogućuje reverznu transkripciju RNA u cDNA (complementary DNA) te amplifikaciju specifičnih slijedova DNA (Slika 22.) u stvarnom vremenu pomoću boje SYBR Green koja interkalira u DNA (Slika 23.). Liofilizirane početnice od 30 nmol (Macrogen, Južna Koreja) otopljene su do koncentracije 100 µM te razrijeđene do 10 µM u redestiliranoj sterilnoj vodi. Početnice za mišje gene, korištene za analizu ekspresije u primarnim neuronima miša, kao i početnice za ljudske gene, primijenjene za stanice SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka, navedene su u Tablici 1. Uzorci RNA i komplet qPCRBIO SyGreen 1-Step Detect Hi-ROX su odmrznuti, promiješani i centrifugirani, a reakcija je izvedena na optičkoj reakcijskoj pločici s 96 jažica MicroAmpTM (Thermo Fisher Scientific, SAD). Sastav i volumen reakcijske smjese prikazani su u Tablici 2. Nakon unosa reakcijske smjese u jažice, na pločicu je pažljivo nanesen optički ljepljivi film MicroAmpTM (Thermo Fisher Scientific, SAD) i pločica je stavljena u uređaj Real-time PCR ABI PRISM 7300 SDS (Thermo Fisher Scientific, SAD) te su postavljeni uvjeti reakcije koji su navedeni u Tablici 3. Fluorescencija uzoraka praćena je računalnim programom SDS v1.4.1. (Thermo Fisher Scientific, SAD), a relativna kvantifikacija razina mRNA provedena je komparativnom Ct metodom s genom za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) kao referentnim genom, primijenjujući formulu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [338].



Slika 22. Reverzna transkripcija i qPCR u jednoj reakciji te prikaz rezultata. Preuzeto i prilagođeno s https://www.mantacc.com/differences-of-pcr-tech.



Slika 23. Metoda određivanja umnažanja DNA pomoću fluorescentne boje SYBR Green. Preuzeto i prilagođeno s https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markersadvantages-applications/.

Tablica 1. Odabrane uzvodne i nizvodne početnice za mišje i ljudske gene *PI3K, AKT, Bcl-2* i *Bax* te endogenu kontrolu *GAPDH*.

Gen	Početnice 5'-> 3' za mišje gene	Početnice 5'-> 3' za ljudske gene
PI3K	Uzvodna:	Uzvodna:
	CAGTTTGGTGTCATCCTGGAAGC	GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG
	Nizvodna:	Nizvodna:
	TCTGCTCAGCTTCACCGCATTC	GAGCATCCATGAAATCTGGTCGC
AKT	Uzvodna:	Uzvodna:
	GGACTACTTGCACTCCGAGAAG	ATGGCACCTTCATTGGCTAC
	Nizvodna:	Nizvodna:
	CATAGTGGCACCGTCCTTGATC	CCCAGCAGCTTCAGGTACTC
D 1 2	Uzvodna:	Uzvodna:
	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	ACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG
DCl-2	Nizvodna:	Nizvodna:
	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG	TGTGGCCCAGATAGGCACCCAG
Bax	Uzvodna:	Uzvodna:
	CCGGCGAATTGGAGATGAACTG	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG
	Nizvodna:	Nizvodna:
	AGCTGCCACCCGGAAGAAGACCT	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
GAPDH	Uzvodna:	Uzvodna:
	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	Nizvodna:	Nizvodna:
	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Tablica 2. Sastav i volumen reakcijske smjese za relativnu ekspresiju gena *PI3K, AKT, Bcl-2* i *Bax,* te *GAPDH.*

		T 7 V
Desgans	Volumen	Konačna
Keagens	(ukupno 20 µl)	koncentracija
Mješavina SyGreen 1-Step (2X)	10 µl	1X
Uzvodne početnice (10 µM)	0,8 µl / 0,7 µl*	400 nM
Nizvodne početnice (10 µM)	0,8 µl / 0,7 µl*	400 nM
RTaza Go (s inhibitorom RNaze, 20X)	1 µl	1X
RNA	2 μl	4 ng
Voda bez RNAze	5.4 ul	

*početnice za *Bcl-2* dodane su u manjem volumenu zbog stvaranja dimera

Korak	Ciklusi	Temperatura (°C)	Vrijeme
Zadržavanje	1	42	2 min
Reverzna transkripcija	1	45	10 min
Aktivacija polimeraze	1	1 95 2 min	
Denaturacija	cija 40		5 s
Vezanje i produljivanje	40	65	30 s
		95	15 s
Disociliocilio	1	60	1 min
Disocijacija	1	95	15 s
		60	15 s

Tablica 3. Uvjeti reakcije za relativnu ekspresiju gena PI3K, AKT, Bcl-2 i Bax te GAPDH.

3.1.6.4. Određivanje ekspresije odabranih proteina

Za analizu ekspresije proteina korištena je metoda Western blot (Slika 24.). Priprema uzoraka uključivala je miješanje 4,75 μl pufera Laemmli (Bio-Rad Laboratories, SAD), 0,25 μl βmerkaptopetanola (Sigma-Aldrich, SAD), odgovarajućeg volumena uzorka kako bi se osiguralo 20 µg proteina po jažici gela te ultračiste vode do ukupnog volumena od 10 µl. Uzorci su denaturirani pri 95°C tijekom 8 min na termomiješalici Thermomixer Model 5350 (Eppendorf, Njemačka). Zatim je elektroforeza izvedena na 4-20%-tnom gelu Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gel (Bio-Rad Laboratories, SAD), pri 50 V tijekom prvih 5 min, a potom pri 120 V oko 1 h i 15 min. Nakon elektroforeze, gelovi su isprani u vodi i inkubirani 10 min u puferu za prijenos (Tris/glicin, Bio-Rad Laboratories, SAD), zajedno s filter papirima. Za prijenos proteina korištene su nitrocelulozne membrane s porama od 0,2 µm i dimenzijama 10,7 x 8,5 cm (Bio-Rad Laboratories, SAD), koje su prethodno namočene u puferu za prijenos 3 min. Prijenos proteina proveden je pomoću sustava Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, SAD). U ladicu uređaja složeni su i poravnati redom prvi filter papir, membrana, gel i drugi filter papir, pri čemu su svi slojevi osim membrane dodatno poravnati plastičnim valjkom i proveden je prijenos u trajanju 3 min. Nakon prijenosa, membrane su isprane u vodi, obojene 0,1%-tnom otopinom Ponceau S (Sigma-Aldrich, SAD) u 5%-tnoj octenoj kiselini tijekom 1 min te ponovno isprane. Potom su izrezane na trakice ovisno o molekularnoj masi proteina, isprane u PBS-u 10 min i blokirane u 5%-tnoj otopini BSA u puferu TBS-T (fiziološka otopina puferirana tris-om s Tween®-om 20, tris-buffered saline with Tween®20) ili u otopini I-block (Invitrogen, SAD) tijekom 45 min. Inkubacija s primarnim antitijelima provedena je preko noći pri 4°C uz lagano miješanje. Sljedećeg dana, membrane su triput isprane u TBS-Tu po 10 min, inkubirane sa sekundarnim antitijelom 2 h pri sobnoj temperaturi uz lagano miješanje te dodatno isprane šest puta po 5 min u TBS-T-u. Vrsta pufera za blokiranje te razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela prikazani su u Tablici 4. Za utvrđivanje proteina,

na membrane je nanesen kemiluminiscentni supstrat SuperSignal[™] West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, SAD), nakon čega su inkubirane 5 min u mraku pri sobnoj temperaturi. Proteinske vrpce vizualizirane su u uvjetima automatske ekspozicije i njihova je kvantifikacija provedena pomoću uređaja UVItec Alliance 4.7 (Uvitec, UK).





Tablica 4. Vrsta pufera za blokiranje te razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela korištenih u metodi Western blot.

Proteini Blokiran		Razrjeđenje primarnih antitijela	Razrjeđenje sekundarnih antitijela	
	BSA	Antitijelo PI3 Kinase p110α (C73F8) Rabbit mAb (Cell	Antitijelo Anti-rabbit IgG, HRP-povezano (Cell	
PI3K (110 kDa)		Signaling Technology, SAD)	Signaling Technology,	
		otopljeno u 5%-tnom BSA	SAD) otopljeno u 5%-	
AKT (62 kDa)		Antitijelo Akt1/2/3 (5C10): sc- 81434 (Santa Cruz Biotechnology, SAD) otopljeno u I-blocku-u (1:500)	thom BSA (1:2000)	
Bcl-2 (26 kDa)	I block	Antitijelo Bcl-2 (C-2): sc-7382 (Santa Cruz Biotechnology, SAD) otopljeno u I-blocku-u (1:500)	Antitijelo Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	
Bax (23 kDa)	1-010CK	Antitijelo Bax (B-9): sc-7480 (Santa Cruz Biotechnology, SAD) otopljeno u I-blocku-u (1:500)	peroksidazom hrena (Bio- Rad Laboratories, SAD) otopljeno u I-block-u	
β-aktin (43 kDa)		Antitijelo β-Actin (C4): sc- 47778 (Santa Cruz Biotechnology, SAD) otopljeno u I-blocku-u (1:500)	(1.5000)	

<u>Kemikalije:</u>

• TBS-T - 2,43 g tris (Trizma® base, Sigma-Aldrich, SAD), 8,77 g NaCl (Kemika, Hrvatska), 2 ml Tween® 20 (Sigma-Aldrich, SAD), otopljen u 900 ml destilirane vode, pH 7,6, nadopunjen destiliranom vodom do 1 l

• I-block (Invitrogen, SAD) - 0,6 g I-block-a otopljeniu 300 ml PBS-a, miješan uz zagrijavanje do 50°C, nakon hlađenja dodano 300 µl Tween®-a 20 (Sigma-Aldrich, SAD)

3.2. Modeli AB-a in vivo

Miševi C57BL/6 i 3xTg-AD uzgojeni su na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Pečuhu, koji posjeduje licencu za uzgoj, držanje i provođenje pokusa na životinjama. Miševi su bili smješteni po četiri u kavezima, u prostoriji s ciklusom 12 h svjetla/12 h mraka (svjetlo od 07:00-19:00 h), sobne temperature $22 \pm 2^{\circ}$ C i relativne vlažnosti od $55 \pm 10\%$ te hranjeni standardiziranim peletima i pristupom vodi *ad libitum*. Uzgoj i svi postupci na miševima odobreni su od strane Povjerenstva za dobrobit životinja Sveučilišta u Pečuhu (BA02/2000-84/2022) i provedeni su u skladu s Direktivom Europskog parlamenta (2010/63/EU).

3.2.1. Farmakološki izazvan model AB-a

U ovom istraživanju korišten je 21 mužjak miševa C57BL/6, starosti 9 do 10 mjeseci (Slika 25.). Miševi C57BL/6 često se koriste u biomedicinskim istraživanjima [339], osobito kao podloga za genetski modificirane miševe i divlji tip kontrolnih miševa [340]. Osim što su korišteni za farmakološki izazvan model AB-a, u ovom su istraživanju služili i za izolaciju primarnih neurona te kao podloga za razvoj miševa 3xTg-AD, genetičkog modela AB-a.



Slika 25. Miš C57BL/6. Preuzeto s https://brainstuff.org/blog/why-do-scientists-study-thec57bl6-mouse.

Mužjacima miševa C57BL/6, u općoj anesteziji (kombinacija 80 mg/kg ketamina (Narkamon, otopina za injiciranje, Bioveta, Češka) i 8 mg/kg ksilazina (Xylazine 2%-tna otopina za injiciranje, Alfasan International B.V., Nizozemska), primijenjenih intraperitonealno (i.p.)), napravljen je rez kože i potkožnog tkiva u medijalnoj liniji ošišane glave (1 cm) te su električnom bušilicom napravljeni otvori s lijeve i desne strane. Analgetik buprenorfin (Buprenorphine SR-LAB, ZooPharm, SAD) u dozi od 0,1 mg/kg primijenjen je supkutano (s.c.) 30 min prije operacije. Oligomeri A β_{42} u koncentraciji od 100 μ M pripremljeni su prema protokolu opisanom u poglavlju **3.1.3.1.**, samo je umjesto medija za stanice dodan PBS. Za intracerebroventrikularnu (i.c.v.) primjenu 100 μ M oligomera A β_{42} (skupina AB) ili otapala

(DMSO i PBS, kontrolna skupina), napravljen je otvor na stereotaksičkim koordinatama -0,9 mm posteriorno od bregme, 1,7 mm lateralno od sagitalnog šava i 2,2 mm u dubinu. Otopina (4 μ l po otvoru) primijenjena je injekcijskom iglom brzinom od 1 μ l/min, uz zadržavanje igle 1-2 min kako bi se smanjio povrat otopine. Nakon injekcije, koža je zatvorena kirurškim šavom. Postupak je prikazan na **Slici 26.** Tijekom operacije sudjelovala su dva veterinara, a postoperativna skrb uključivala je utopljavanje, izolaciju u zasebne kaveze i višesatni nadzor nakon buđenja iz anestezije. Stanje životinje pomno je nadzirano više puta dnevno tijekom prvih 24 h, dva puta dnevno prvog tjedna te jednom dnevno do kraja pokusa.



Slika 26. Primjer stereotaksičke operacije miša C57BL/6. Preuzeto iz rada Taylor i suradnika [341].

3.2.2. Genetički model AB-a

Miševi 3xTg-AD (*triple-transgenic Alzheimer's disease*) (Slika 27.) transgenični su miševi razvijeni na hibridnoj podlozi miševa C57BL/6 i 129SvJ [342] te homozigoti za tri ljudske genske mutacije povezane s AB-om: APP *Swedish*, MAPT P301L i PSEN1 M146V [168,342,343]. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Pečuhu uzgajani su miševi 3xTg-AD i kontrolni transgenični miševi bez navedenih mutacija (3xTg(+/+)). U ovom istraživanju korišteno je 25 mužjaka starosti 9 do 10 mjeseci, 13 3xTg (+/+) i 12 3xTg-AD.



Slika 27. Miš 3xTg-AD. Preuzeto s https://www.jax.org/strain/004807#.

3.2.3. Tretman DHEA(S)-om u modelima AB-a in vivo

Tretman DHEA-om u farmakološki izazvanom modelu AB-a

Nakon 24 h od stereotaksičke primjene oligomera A β_{42} ili otapala i.c.v., mužjaci miševa C57BL/6 tijekom 30 dana svakodnevno su primali 10 mg/kg DHEA-e otopljene u kukuruznom ulju i.p., dok je kontrolna skupina dobivala jednaku količinu kukuruznog ulja (0,5 ml/100 g tjelesne mase).

Tretman DHEAS-om u genetičkom modelu AB-a

Mužjacima miševa 3xTg-AD DHEAS, otopljen u 50%-tnom DMSO-u, kontinuirano je primjenjivan putem Alzet® mikro-osmotske pumpice volumena 200 µl (Charles River Laboratories, Njemačka) implantirane s.c. (Slika 28.). Dnevna doza DHEAS-a iznosila je 1 mg/kg, dok su kontrolne skupine primale otapalo (mješavinu DMSO-a i sterilne vode) tijekom 18 tjedana, počevši od 9. do 10. mjeseca života. Pumpice su punjene prema uputama proizvođača s brzinom protoka od 0,15 µl/h i trajanjem od 6 tjedana. Implantirane su u interskapularno područje (Slika 29.) i mijenjane dvaput tijekom pokusa (svakih 6 tjedana). Tijekom implantacije miševi su bili anestezirani izofluranom (3-4% za indukciju i 1-3% za održavanje) u indukcijskoj komori RWD Induction Chamber V101 uz pomoć uređaja R500 Small Animal Anesthesia Machine (oboje RWD Life Science, Kina), a 30 min prije zahvata im je primijenjen analgetik 0,1 mg/kg buprenorfin s.c. Postupke implantacije provodila su dva veterinara, uz osiguranu postoperativnu skrb koja je uključivala utopljavanje, smještaj u odvojene kaveze te višesatni nadzor nakon buđenja iz anestezije. Stanje miševa pomno je praćeno, uz više pregleda dnevno u prvih 24 h nakon implantacije, dva puta dnevno tijekom prvog tjedna te jednom dnevno do kraja pokusa.



Slika 28. Princip rada mikro-osmotske pumpice. Preuzeto i prilagođeno s https://agnthos.se/alzet-osmotic-pumps/1483-alzet-pumps-overview.html.


Slika 29. Supkutana implantacija mikro-osmotske pumpice u interskapularno područje miša 3xTg-AD.

3.2.3.1. Testovi ponašanja

Kognitivne funkcije miševa C57BL/6 i 3xTg-AD, kao farmakološki izazvanog i genetičkog modela AB-a, istražene su Morrisovim vodenim labirintom (MWM, *Morris water maze*), testom prepoznavanja novog objekta (NORT, *novel object recognition test*) i testom socijalne diskriminacije (SDT, social discrimination test). Lokomotorna aktivnost i ponašanje miševa ispitani su testom otvorenog polja (OFT, open field test), testom prisilnog plivanja (FST, forced swim test) i testom prskanja saharozom (ST, splash test). Testiranja su provedena tijekom posljednjih 7-10 dana tretmana DHEA(S)-om, a ponašanje životinja praćeno je i analizirano pomoću softvera Noldus EthoVision XT (Noldus, Nizozemska). Na miševima 3xTg-AD provedeni su MWM, SDT, OFT i ST, a na miševima C57BL/6 MWM, NORT, OFT i FST.

MWM (Slika 30.) se koristi za procjenu učenja i prostornog pamćenja. Pokus je proveden u okruglom bazenu promjera 110 cm i visine 60 cm, ispunjenom vodom temperature 23-25°C, s platformom smještenom 1 cm ispod površine vode u jednom od kvadranata. Miševi su priviknuti na uvjete plivanja prije početka testiranja. Tijekom šest uzastopnih dana, životinje su prolazile postupke učenja s ciljem pronalaska skrivene platforme. Ako bi pronašle platformu, ostavljane su na njoj 10 s prije nego što su vraćene u kavez. U slučaju da nisu uspjele pronaći platformu unutar 1 min, stavljene su na platformu kako bi zapamtile njezino mjesto i zadržane na njoj 10 s prije vraćanja u kavez. Svaka životinja je testirana četiri puta dnevno, s odmorom od 30 min između pokušaja. Tijekom faze učenja mjereno je vrijeme potrebno da životinja pronađe platformu svaki dan. Sedmog dana, platforma je uklonjena, a mjereno je vrijeme koje je životinja provela tražeći platformu u kvadrantu gdje se prethodnih dana nalazila, kao i broj ulazaka u pogrešne kvadrante. Miševi s neoštećenim funkcijama učenja i pamćenja brže usvajaju put do platforme, bolje pamte njezino mjesto i rjeđe griješe. Cijeli postupak proveden je uz minimalnu nelagodu za životinje, uključujući sušenje i grijanje nakon izlaska iz bazena.



Slika 30. Morrisov vodeni labirint (MWM). Preuzeto i prilagođeno s https://www.ataxia.org/scasourceposts/snapshot-morris-water-maze-test/.

NORT (Slika 31.) se koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti životinja, s naglaskom na sposobnost prepoznavanja i pamćenja. Pokus je proveden u kutiji dimenzija 34 cm x 29 cm x 40 cm i trajao je tri dana. Prvi dan testiranja, životinja je stavljena u praznu kutiju 5 min kako bi se priviknula na novo okruženje. Drugi dan, u kutiju su postavljena dva identična objekta u suprotne kutove, a životinja je imala 10 min za istraživanje tih objekata. Trećeg dana, životinja je ponovno stavljena u kutiju, ali ovaj put s jednim poznatim objektom iz prethodnog dana i jednim potpuno nepoznatim objektom. Životinja je imala 10 min za istraživanje objekata. Vrijeme koje je provela istražujući svaki objekt bilježeno je kako bi se procijenile kognitivne sposobnosti, posebno sposobnost prepoznavanja nepoznatog objekta. Kognitivna sposobnost životinje procjenjena je na temelju vremena provedenog u istraživanju nepoznatog objekta u usporedbi s poznatim. Veća posvećenost istraživanju nepoznatog objekta upućuje na sposobnost prepoznavanja i pamćenja prethodno viđenog objekta, dok podjednako istraživanje oba objekta može ukazivati na poteškoće s prisjećanjem ili gubitak pamćenja povezan s poznatim objektom, kao znakom narušenih kognitivnih funkcija.



Slika 31. Test prepoznavanja novog objekta (NORT). Preuzeto i prilagođeno prema radu Wendelmuth i suradnika [344].

SDT (**Slika 32.**) se koristi za procjenu sposobnosti prepoznavanja i pamćenja u životinja na temelju njihovog prirodnog socijalnog ponašanja. U ovom testu, životinje pokazuju normalnu sposobnost pamćenja tako što provode manje vremena istražujući već poznate u usporedbi s nepoznatim životinjama, omogućujući procjenu funkcije pamćenja. Postupak testiranja počinje stavljanjem životinje u praznu kutiju dimenzija 34 cm x 29 cm x 40 cm, gdje ima 10 min za istraživanje prostora. Zatim se u suprotne kutove kutije postavljaju dva kaveza, a životinja ima 5 min za njihovo istraživanje. U jedan od kaveza stavlja se druga životinja, omogućujući testnoj životinji 5 min socijalne interakcije. Nakon tog razdoblja, u drugi kavez stavlja se nova, nepoznata životinja i mjeri se vrijeme koje testna životinja provodi istražujući obje životinje tijekom sljedećih 5 min. Uobičajen socijalni odgovor testne životinje podrazumijeva više vremena posvećenog istraživanju nepoznate životinje u usporedbi s već poznatom životinjom. Takvo ponašanje ukazuje na sposobnost prepoznavanja i pamćenja prethodnog susreta, što ukazuje na funkcionalno pamćenje i prepoznavanje.





Slika 32. Test socijalne diskriminacije (SDT). Preuzeto i prilagođeno prema radu Cysneiros i Ribeiro [345].

OFT (**Slika 33.**) se koristi za procjenu pokretljivosti i anksioznog ponašanja životinja unutar kontroliranog okruženja. Ovaj test temelji se na suprotstavljenim nagonima životinja: potrebi za istraživanjem novog prostora i strahu od svijetlih, otvorenih područja. Pokus je proveden u kutiji dimenzija 34 cm x 29 cm x 40 cm i trajao je 15 min, s posebnim fokusom na posljednjih 10 min, tijekom kojih su praćeni različiti parametri, uključujući vrijeme provedeno na periferiji (uz rubove kutije) i u središnjem dijelu (svjetlijem i otvorenijem prostoru), brzinu kretanja te ukupnu prijeđenu udaljenost. Životinje sa smanjenom razinom anksioznosti pokazuju povećanu sklonost istraživanju, provodeći više vremena u središnjem dijelu kutije. S druge strane, životinje s povećanom razinom anksioznosti imaju smanjenu lokomotornu aktivnost te

preferiraju zadržavanje uz rubove, gdje se osjećaju sigurnije. Ovaj test pruža uvid u ravnotežu između istraživačkog ponašanja i straha, omogućujući procjenu emocionalnog stanja životinja.



Slika 33. Test otvorenog polja (OFT). Preuzeto iz rada Kraeuter i suradnika [346].

FST (**Slika 34.**) se koristi za procjenu depresivnog ponašanja i učinkovitosti antidepresivnih tretmana u životinja. U ovom testu, životinja je stavljena u cilindrični spremnik promjera 20 cm i visine 30 cm, ispunjen vodom temperature 23-25°C do visine od 15 cm. Razina vode je bila takva da životinja nije mogla dosegnuti dno niti izaći iz spremnika, što ju je prisiljavalo na neprekidno plivanje ili plutanje kako bi ostala iznad površine vode i izbjegla utapanje. Na početku testa, životinja aktivno pokušava pobjeći plivanjem, no nakon određenog vremena postaje pasivna i prelazi u fazu plutanja, gdje provodi minimalne pokrete samo kako bi se održala na površini vode. Ova pasivnost i smanjena aktivnost tumače se kao pokazatelji depresivnog ponašanja. Životinje su plivale 6 min, pri čemu je u posljednje 4 min bilježeno vrijeme koje je životinja provela u stanju imobilnosti, odnosno kada se nije pokušavala aktivno kretati, već je samo održavala minimalne pokrete potrebne za plutanje. Duže trajanje imobilnosti upućuje na simptome depresivnog ponašanja, dok kraće trajanje imobilnosti može upućivati na potencijalni učinak antidepresivnih tretmana. Cijeli postupak proveden je uz minimalnu nelagodu za životinje, uključujući sušenje i grijanje nakon izlaska životinje iz vode.



Slika 34. Test prisilnog plivanja (FST). Preuzeto i prilagođeno prema radu Gorman-Sandler i suradnika [347].

ST (**Slika 35.**) se koristi za procjenu anhedonije, odnosno gubitka interesa ili zadovoljstva u ugodnim aktivnostima u životinja. Test je započeo privikavanjem životinja na novi kavez dimenzija 15 cm x 33 cm x 13 cm, bez stelje, tijekom 10 min. Nakon privikavanja, testna životinja je poprskana 10%-tnom otopinom saharoze (Thermo Fisher Scientific, SAD) po leđnoj dlaci. Tijekom sljedećih 5 min, bilježeni su različiti parametri: latencija (vrijeme od prskanja otopine do početka čišćenja dlake), učestalost i trajanje čišćenja dlake te ukupna udaljenost koju životinja prijeđe. Ovi parametri služe kao pokazatelji motivacijskog ponašanja životinje. Dulja latencija, smanjena učestalost ili trajanje čišćenja dlake te smanjena lokomotorna aktivnost mogu ukazivati na anhedoniju i smanjenu motivaciju kod životinja. Analizom ovih podataka procjenjuje se prisutnost anhedonije, što može biti znak depresivnih stanja ili smanjenog interesa za ugodne aktivnosti.



Slika 35. Test prskanja saharozom (ST). Preuzeto i prilagođeno prema radu Várkonyi i suradnika [348].

3.2.3.2. Izolacija hipokampusa

Nakon završetka tretmana DHEA(S)-om i provedbe testova ponašanja, životinje su anestezirane (primjenom ketamina 80 mg/kg i ksilazina 8 mg/kg i.p.) i žrtvovane dekapitacijom od strane stručnog osoblja. Na ledu su zatim izolirani mozgovi i odvojeni hipokampusi koji su pohranjeni u sterilne plastične epruvete, kratko uronjeni u tekući dušik i zatim spremljeni u zamrzivač pri -80°C, do određivanja koncentracija DHEAS-a i BDNF-a te analize genske i proteinske ekspresije.

3.2.3.3. Određivanje ekspresije odabranih gena u homogenatima hipokampusa

Za određivanje genske ekspresije metodom qPCR, ukupna RNA iz odmrznutih hipokampusa životinja izolirana je korištenjem kompleta PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača za izolaciju RNA iz tkiva. Odmrznuta tkiva hipokampusa su izvagana i prenesena u epruvete bez RNaze na ledu. U skladu s preporukama proizvođača, dodano je 0,3 ml pufera za lizu s β -merkaptoetanolom (10 µl β -merkaptoetanola na 1 ml pufera), budući da je masa tkiva bila ≤ 10 mg. Tkivo je zatim usitnjeno plastičnim tučkom bez RNaze do potpune lize, a daljnji postupak slijedio je upute opisane u poglavlju **3.1.6.2.**, dok je provedena metoda qPCR opisana u poglavlju **3.1.6.3**.

3.2.3.4. Određivanje ekspresije odabranih proteina u homogenatima hipokampusa

Za određivanje proteinske ekspresije korištena je metoda Western blot, a hipokampusi životinja su odmrznuti, izvagani i dodano im je 10 μ l prethodno ohlađenog pufera RIPA s inhibitorima proteaza po 1 mg tkiva. Tkiva su potom ručno homogenizirana plastičnim tučcima i inkubirana na termomiješalici Thermomixer Model 5350 (Eppendorf, Njemačka) 1 h pri 10 x g i 4°C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 20 min pri 12000 x g i 4°C. Određivanje koncentracije proteina, kao i cijela metoda Western blot provedeni su u skladu s postupcima opisanim u poglavljima **3.1.6.2.** i **3.1.6.4.**

3.2.3.5. Određivanje koncentracije Aβ₄₂, tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokampusa

Koncentracije proteina određene su korištenjem specifičnih kompleta enzimski povezane imunoapsorpcijske analize (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Mišji proteini A β_{42} , tau i BDNF analizirani su "sendvič" kompletima A β 1-42 ELISA Kit (AntibodiesOnline, Njemačka), tau ELISA Kit (AntibodiesOnline, Njemačka) i Mouse BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ELISA Kit (ELK Biotechnology, SAD), dok je DHEAS analiziran kompetitivnim kompletom DHEA-S (Dehydroepiandrosterone sulfate) ELISA Kit (ELK Biotechnology, SAD), prema uputama proizvođača. Princip "sendvič" i kompetitivne metode ELISA prikazan je na **Slici 36.**



Slika 36. Princip "sendvič" (lijevo) i kompetitivne metode ELISA (desno). Preuzeto i prilagođeno s https://www.leadgenebio.com/services/index/elisa-kit-development.

Pohranjeni hipokampusi su nakon odmrzavanja isprani u prethodno ohlađenom PBS-u te izvagani i homogenizirani u svježem PBS-u u omjeru 1:9 (npr. 900 µl PBS-a na 100 mg tkiva). Homogenati su zatim sonicirani ultrazvučnim homogenizatorom Labsonic M (B. Braun Biotech International, Njemačka) dok nisu postali bistri te centrifugirani 5 min pri 10000 x g i sobnoj temperaturi. Dobiveni supernatant prebačen je u nove epruvete i pohranjen u zamrzivaču pri - 20°C do daljnje analize.

Nakon inkubacije homogenata hipokampusa i kompleta za ELISA-u pri sobnoj temperaturi, u svaku jažicu pločice s 96 jažica dodano je 100 µl serijski razrijeđenih standarda ili 100 µl homogenata (za DHEAS 50 µl standarda i 50 µl homogenata te 50 µl biotiniliranog antitijela), nakon čega je uslijedila inkubacija pri 37°C. Vrijeme inkubacije iznosilo je 60 min za tau i DHEAS, 80 min za BDNF i 90 min za A β_{42} . Nakon inkubacije, sadržaj jažica je uklonjen te je svaka jažica isprana dva puta za Aβ₄₂ i tri puta za tau s 350 µl pufera te tri puta za BDNF i pet puta za DHEAS s 200 µl pufera. Nakon ispiranja, dodano je 100 µl biotiniliranog antitijela u "sendvič" kompletima, uz inkubaciju pri 37°C: 50 min za BDNF te 60 min za Aβ42 i tau. Potom je sadržaj jažica uklonjen, a jažice su ponovno isprane puferom tri puta. U sljedećem koraku u svaku jažicu dodano je 100 µl streptavidina konjugiranog s peroksidazom hrena, uz inkubaciju pri 37°C: 30 min za A β_{42} i tau, 50 min za BDNF i 60 min za DHEAS. Pločice su zatim isprane puferom pet puta. U svaku jažicu dodano je 90 µl supstrata TMB (tetrametilbenzidin), pri čemu je otopina poprimila plavu boju, te su pločice inkubirane u mraku pri 37°C: 10-20 min za Aβ42 i tau te 20 min za DHEAS i BDNF. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µl otopine za zaustavljanje reakcije, nakon čega je boja promijenjena iz plave u žutu. Apsorbancija je očitana pri 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Thermo Scientific Multiskan® EX (Thermo Fisher Scientific, SAD), a koncentracije proteina određene su prema standardnoj krivulji.

3.3. Ispitanici

U sklopu ovog istraživanja prikupljeni su i analizirani podaci te uzorci krvi 369 ispitanika hrvatskog podrijetla, liječenih u Klinici za psihijatriju "Vrapče" u Zagrebu. Krvni parametri, uključujući glukozu u krvi, ukupni kolesterol, HDL i LDL kolesterol, trigliceride, aspartat aminotransferazu, alanin aminotransferazu i gama glutamiltransferazu, određeni su standardiziranim metodama u kliničkom laboratoriju. Ispitanicima je dijagnosticirana demencija, uglavnom povezana s AB-om i VaD-om, ili su imali očuvanu kogniciju te su činili kontrolnu skupinu. Dijagnozu su postavili iskusni psihijatri iz Klinike za psihijatriju "Vrapče" prema kriterijima DSM-V i Nacionalnog instituta za neurološke poremećaje i moždani udar -Udruga za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (NINCDS-ADRDA) [349]. Ispitanici nisu prethodno uzimali antidementive niti su bili u srodstvu i kod svih je provedena detaljna anamneza te procjena općeg i neurokognitivnog stanja. Kognitivni simptomi ispitanika evaluirani su testom procjene mentalnog stanja (mini-mental state examination, MMSE) [350,351], pri čemu su rezultati od 27 do 30 bodova ukazivali na očuvanu kognitivnu funkciju, dok su rezultati ≤26 bodova upućivali na demenciju (blagi i teški NKP) [352,353]. Uz MMSE, korišteni su i test crtanja sata (clock drawing test, CDT) [354] te kognitivna podskala ljestvice za procjenu AB-a (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale, ADAS-Cog) [355]. U CDT-u, gdje je maksimalni broj bodova 10, rezultat od ≤5 bodova ukazuje na kognitivno oštećenje [356], dok se kod ljestvice ADAS-Cog ukupni broj bodova kreće se od 0 do 70, pri čemu, za razliku od MMSE-a, viši rezultat (≥18 bodova) ukazuje na kognitivno oštećenje [357]. Ispitanicima i njihovim skrbnicima detaljno je objašnjena svrha i postupak istraživanja te su potpisali informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Klinike za psihijatriju "Vrapče" i IRB-a, a provedeno je u skladu s Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine. Uzorci krvi od 8 ml prikupljeni su natašte ujutro u Klinici za psihijatriju "Vrapče", pohranjeni u plastične epruvete s 2 ml antikoagulansa ACD (acid citrate dextrose) te dostavljeni u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju na IRB, gdje su odmah obrađeni.

3.3.1. Izolacija plazme, genomske DNA i RNA

Izolacija plazme

Uzorci krvi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom obrađeni su unutar 24 h od uzimanja. Nakon centrifugiranja pune krvi 3 min pri 1100 x g kako bi se izdvojila plazma, ista je podvrgnuta daljnjem centrifugiranju 15 min pri 5087 x g radi uklanjanja trombocita i dobivanja plazme siromašne trombocitima. Plazma i preostali dio krvi, namijenjen za izolaciju



genomske DNA i RNA, pohranjeni su pri -20°C do daljnje analize. Cijeli postupak prikazan je na **Slici 37.**

Slika 37. Postupak obrade krvi ispitanika.

Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz leukocita metodom isoljavanja (Slika 38.), opisanoj u protokolu Millera i suradnika [358]. Nakon odmrzavanja, uzorci krvi stavljeni su na valjkastu miješalicu Roller Mixer RS-TR05 (Phoenix Instrument, Njemačka) i miješani 15-20 min. U sterilnu epruvetu dodano je 300 µl uzorka krvi i 900 µl hladnog pufera za lizu eritrocita (red cell lysis buffer, RCLB). Sadržaj epruvete miješan je 20 s i zatim pohranjen na led 10 min. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 2 min pri 13400 x g i 4°C kako bi se talog, koji sadrži leukocite, odvojio od supernatanta s liziranim eritrocitima. Talog je sačuvan i pročišćen trostrukim resuspendiranjem u RCLB-u i centrifugiranjem. Za lizu stanica, talogu je dodano 300 µl pufera natrij-etilendiamintetraoctene kiseline (sodium ethylenediaminetetraacetic acid, sodium-EDTA, SE) zatim 30 µl 10%-tnog natrijevog dodecil sulfata (sodium dodecil sulphate, SDS, Sigma-Aldrich, SAD) i 1,5 µl 20 mg/ml proteinaze K (TaKaRa Bio, Japan). SDS otapa lipidne membrane stanica, dok proteinaza K razgrađuje proteine i enzime poput nukleaza, omogućujući neoštećenoj DNA da izađe iz stanica. Nakon laganog miješanja, uzorci su inkubirani pri 56°C tijekom 2 h na miješalici. Nakon inkubacije, uzorcima je dodano 120 µl 5 M NaCl-a, zatim su promiješani i centrifugirani 5 min pri 13400 x g i 20°C. Supernatant, koji sadrži otopljenu DNA, prebačen je u novu mikroepruvetu te je dodano 800 µl hladnog izopropanola (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem izazvana je precipitacija DNA koja je postala vidljiva. Uzorci su ponovno centrifugirani 2 min pri 12000 x g i 20°C, supernatant je uklonjen, a talogu je dodano 250 µl 75%-tnog etanola kako bi se uklonili ostaci NaCl-a i dodatno pročistio talog. Nakon još jednog centrifugiranja od 2 min pri 12000 x g i 20°C, supernatant je odliven, a talog

je ostavljen da se suši na zraku 15 min kako bi sav alkohol ishlapio. Talogu je dodano 100 µl pufera tris-EDTA (TE) i uzorci su ostavljeni pri 37°C 1 h kako bi se izolirana DNA otopila. Uzorci su pohranjeni pri -20°C do daljnje analize.



Slika 38. Postupak izolacije genomske DNA. Preuzeto i prilagođeno s https://www.bioted.es/1-1-extraction-and-purification-of-nucleics-acids/.

<u>Kemikalije:</u>

 pufer RCLB - 10 mM tris (Trizma® base, Sigma-Aldrich, SAD), 5 mM MgCl₂ (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska), pH 7,6

- pufer SE 75 mM NaCl, 25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, SAD), pH 8,0
- pufer TE 10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 7,6

Izolacija RNA

Ukupna RNA izolirana je iz uzoraka krvi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom korištenjem kompleta PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača za izolaciju iz pune krvi. Cijeli postupak proveden je pri sobnoj temperaturi. Uzorak svježe krvi od 0,2 ml prebačen je u epruvetu bez RNaze, dodano je 0,2 ml pufera za lizu s 2 μ l β -merkaptoetanola i miješano dok nije nastao lizat. Uzorak je zatim centrifugiran pri 12000 x g 2 min. Supernatant je prebačen u novu epruvetu, dodano je 200 μ l 100%-tnog etanola i uzorak je resuspendiran pipetom. Nakon toga, uzorak je premješten u epruvetu s membranom (*spin cartridge*) i centrifugiran pri 12000 x g 15 s. Dodano je 700 μ l pufera za ispiranje I i centrifugirano pri 12000 x g 15 s. Slijedilo je dodavanje 500 μ l pufera za ispiranje I i ponovno centrifugiranje u istim uvjetima. Epruveta s membranom zatim je centrifugirana pri 12000 x g 1 min kako bi se osušila membrana. Membrana je potom prebačena u novu epruvetu, dodano je 30 μ l vode bez RNaze u sredinu membrane i inkubirano 1 min. Nakon toga, uzorak je centrifugiran pri 12000 x g 2 min i odvojeni su alikvoti od 5 μ l za

mjerenje koncentracije i čistoće RNA. Ostatak RNA pohranjen je pri -80°C do daljnje analize. Količina i čistoća RNA procijenjeni su spektrofotometrijski u alikvotu od 1 μl pri pri valnim duljinama od 260 i 280 nm na uređaju NanoPhotometer (Implen, Njemačka) i izračunata je koncentracija RNA (μg/μl) prema formuli (apsorbancija pri 260 nm x 40 x čimbenik razrjeđenja).

3.3.2. Određivanje koncentracije DHEAS-a i BDNF-a u plazmi

Koncentracije DHEAS-a i BDNF-a određene su u odmrznutoj plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom. Za određivanje DHEAS-a korišten je kompetitivni komplet za ELISA-u DHEA-S (Dehydroepiandrosterone sulfate) ELISA Kit (ELK Biotechnology, SAD), dok je koncentracija BDNF-a određena korištenjem kompleta Total BDNF ELISA Kit - Quantikine (R&D Systems, SAD) u skladu s uputama proizvođača.

Prije određivanja koncentracije BDNF-a, uzorci plazme centrifugirani su 10 min pri 4°C i 10000 x g pri kako bi se uklonili ostaci trombocita, a zatim razrijeđeni četiri puta kalibracijskom otopinom. U jažice pločice s 96 jažica dodano je 100 µl razrjeđivača, nakon čega je dodano 50 µl uzoraka plazme ili serijski razrijeđenih standarda u duplikatima, dok je u dvije jažice dodana kalibracijska otopina kao negativna kontrola. Pločica je inkubirana 2 h pri sobnoj temperaturi, zatim je dodano 100 µl sekundarnog antitijela s vezanom peroksidazom hrena, uz daljnju inkubaciju od 1 h. Nakon tri ispiranja s 400 µl pufera, dodano je 200 µl supstratne otopine, a pločica je inkubirana 30 min u mraku. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µl otopine za zaustavljanje reakcije, a apsorbancija uzoraka izmjerena je pri 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Thermo Scientific Multiskan® EX (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koncentracije BDNF-a određene su prema standardnoj krivulji.

Za određivanje koncentracije DHEAS-a, u svaku jažicu dodano je 50 µl serijski razrijeđenih standarda ili 50 µl plazme, zajedno s 50 µl biotiniliranog antitijela. Nakon inkubacije pri 37°C tijekom 60 min, pločica je isprana tri puta puferom, a potom je dodano 100 µl streptavidina konjugiranog s peroksidazom hrena, uz ponovnu inkubaciju pri 37°C tijekom 60 min. Nakon pet ispiranja, u svaku jažicu dodano je 90 µl supstrata TMB, pri čemu je otopina poprimila plavu boju. Inkubacija je trajala 20 min u mraku, nakon čega je dodano 50 µl otopine za zaustavljanje reakcije, što je rezultiralo promjenom boje u žutu. Apsorbancija je očitana pri 450 nm pomoću spomenutog čitača, a koncentracije DHEAS-a izračunate su prema standardnoj krivulji.

3.3.2. Genotipizacija polimorfizama gena SULT2A1 i BDNF

Genotipizacija je provedena na izoliranoj DNA kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, obzirom na odabrane SNP-ove: rs2637125 u genu SULT2A1 i rs6265 (Val66Met) u genu BDNF. Analizirana je raspodjela genotipova, alela i nositelja genotipova za ove polimorfizme. Polimorfizmi su genotipizirani metodom qPCR, korištenjem kompleta TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, SAD) i mješavine početnica i sondi TaqMan za rs2637125 u genu SULT2A1 (C_26078613_10, Thermo Fisher Scientific, SAD) i rs6265 (Val66Met) u genu BDNF (C_11592758_10, Thermo Fisher Scientific, SAD). Ova metoda temelji se na 5' nukleaznoj aktivnosti DNA polimeraze Taq, pri čemu se koriste oligonukleotidne sonde obilježene fluorescentnim bojama (VIC ili FAM) na 5' kraju i utišivačem na 3' kraju. Prilikom vezanja sonde na komplementarnu sekvencu DNA, polimeraza Taq cijepa sondu, oslobađajući fluorescentnu boju, što omogućuje utvrđivanje signala (Slika 39.). Intenzitet fluorescentnog signala proporcionalan je količini nastalog produkta qPCR-a. Uzorci izolirane DNA razrijeđeni su destiliranom vodom do konačne koncentracije od 1,8 ng/µl. Kao negativna kontrola, umjesto uzorka DNA, dodana je destilirana voda. Sastav i volumen reakcijske smjese dodane u pločice za qPCR s 96 jažica prikazani su u Tablici 5. Umnažanje je provedeno na uređaju Real-time PCR ABI PRISM 7300 SDS (Thermo Fisher Scientific, SAD) u uvjetima reakcije prikazanim u Tablici 6. Razina fluorescencije VIC i/ili FAM, praćena je računalnim programom SDS v1.4.1. (Thermo Fisher Scientific, SAD), pri čemu je prisutnost jedne boje ukazivala na homozigotnost za određeni alel, dok je fluorescencija obje boje označavala heterozigotnost (Slika 40.).



Slika 39. Prikaz qPCR-a uz korištenje sonde označene fluorescentnom bojom. Preuzeto i prilagođeno s https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/.



Slika 40. Prikaz rezultata genotipizacije. Preuzeto i prilagođeno prema radu Beltz i suradnika [359].

Tablica 5. Sastav i volumen rekacijske smjese za genotipizaciju polimorfizama rs6265 gena *BDNF* i rs2637125 gena *SULT2A1*.

Reagens	Volumen u jažici (µl)
Genomska DNA razrijeđena u destiliranoj vodi	4,5
Mješavina za genotipizaciju TaqMan (2X)	5
Mješavina početnica i sondi TaqMan obilježenih fluorescentnim bojama VIC i FAM (40X)	0,5
Ukupni volumen	10

Tablica 6. Uvjeti reakcije za genotipizaciju polimorfizama rs6265 gena *BDNF* i rs2637125 gena *SULT2A1*.

Korak	Ciklusi	Temperatura (°C)	Vrijeme
Početna denaturacija	1	95	10 min
Denaturacija	50	92	15 s
Vezanje i produljivanje	50	60	1 min

3.3.3. Određivanje ekspresije gena BDNF

Za određivanje ekspresije gena BDNF, izolirana RNA kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom prvo je reverznom transkripcijom prevedena u cDNA kompletom Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Zbog niske koncentracije RNA, u reakcijsku smjesu stavljen je maksimalni preporučeni volumen početne RNA (5 μl). Sastav i volumen reakcijske smjese prikazani su u Tablici 7., a uvjeti reakcije u Tablici 8. Koncentracije su prilagođene tako da se doda približno 5 ng RNA u reakciju (5 µl RNA u 20 µl reakcijskog volumena). Ekspresija gena BDNF i kontrolnog gena GAPDH analizirana je kompletom TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, SAD) te komercijalno dostupnim početnicama i sondama TaqMan za BDNF (Hs02718934 s1, Thermo Fisher Scientific, SAD) i GAPDH (Hs00266705_g1, Thermo Fisher Scientific, SAD) na uređaju Real-time PCR ABI PRISM 7300 SDS (Thermo Fisher Scientific, SAD), a fluorescencija uzoraka praćena je računalnim programom SDS v1.4.1. (Thermo Fisher Scientific, SAD). U reakciju je dodano po 3 µl cDNA u duplikatu za BDNF i GAPDH, u ukupnom volumenu reakcije od 20 µl. Sastav i volumen reakcijske smjese za relativnu ekspresiju gena prikazani su u Tablici 9., a uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 10. Relativna ekspresija gena *BDNF* izračunata je pomoću formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tablica 7. Sastav i volumen rekacijske smjese za konverziju RNA u cDNA.

Reagens	Volumen u jažici (µl)
Pufer za sintezu cDNA (5X)	4
Mješavina enzima Verso	1
Nasumični heksameri (400 ng/µl)	1
Mješavina deoksinukleozidnih trifosfata	2
(dNTP, 5 mM svaki)	2
Pojačivač reverzne transkripcije	1
Voda bez nukleaze	6
Kalup RNA (1 ng/µl)	5
Ukupni volumen	20

Tablica 8. Uvjeti reakcije za konverziju RNA.

Korak	Ciklusi	Temperatura (°C)	Vrijeme
Početna denaturacija	1	98	45 s
Denaturacija		95	15 s
Vezanje	10	55	30 s
Produljivanje		72	30 s
Završno produljivanje	1	72	1 min
Zadržavanje	1	4	neodređeno

Tablica 9. Sastav i volumen rekacijske smjese za relativnu ekspresiju gena BDNF.

Reagens	Volumen u jažici (µl)
Mješavina za gensku ekspresiju TaqMan	10
Sonda TaqMan (BDNF/GAPDH)	1
Voda bez RNAze	7
cDNA	3
Ukupni volumen	20

Tablica 10. Uvjeti reakcije za relativnu ekspresiju gena BDNF.

Korak	Ciklusi	Temperatura (°C)	Vrijeme
Početna denaturacija	1	95	10 min
Denaturacija	43	95	15 s
Vezanje	15	60	1 min
Zadržavanje	1	4	neodređeno

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza, kao i grafički prikazi dobivenih rezultata, provedeni su programom GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, SAD). Ovisno o normalnosti raspodjele podataka testirane D'Agostino-Pearsonovim testom, korišteni su parametrijski (Studentov t-test, ANOVA + Tukeyjev test, Pearsonov test korelacije) ili neparametrijski testovi (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis + Dunnov test, Spearmanov test korelacije). Frekvencije genotipova, alela i nositelja, kao i Hardy-Weinbergova ravnoteža, evaluirani su χ^2 ili Fisherovim testom. Statistička značajnost prihvaćena je pri p<0,05 (p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška u grafičkim prikazima, odnosno srednja vrijednost ± standardna greška u tabličnim prikazima.

4. REZULTATI

4.1. Modeli AB-a i VaD-a in vitro

Istraživanje potencijalne neuroprotektivne uloge DHEA(S)-a i BDNF-a provedeno je u primarnoj kulturi neurona miša C57BL/6 i staničnoj liniji SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka u modelima AB-a i VaD-a. Model AB-a najprije je uspostavljen i optimiziran u primarnim neuronima, a zatim je primijenjen i u stanicama SH-SY5Y. Model VaD-a, odnosno postupak OGD/R, optimiziran u stanicama SH-SY5Y u prethodnim pokusima, primijenjen je također i u primarnim neuronima. Kontrolne skupine stanica nisu bile izložene oligomerima A β_{42} (već samo otapalu HFIP) u modelu AB-a, odnosno nisu bile izložene uvjetima OGD/R-a (već uvjetima s kisikom i kompletiranim medijem) u modelu VaD-a.

Model AB-a u primarnim neuronima

Uspostavljena je primarna kultura neurona miša C57BL/6, a prisutnost neurona pokazana je imunocitokemijskom metodom, primjenom primarnog antitijela protiv tubulina β III i sekundarnog antitijela iz koze protiv imunoglobulina G kunića obilježenog Alexa Fluor® 488, te boje Hoechst 33342 koja se veže na DNA u jezgri. Protein tubulin β III specifično je eksprimiran u neuronima, gdje ima važnu ulogu u izgradnji mreže mikrotubula. Također sudjeluje u neurogenezi, usmjeravanju i održavanju aksona, zbog čega se koristi kao specifičan biljeg neurona. Fluorescentnim mikroskopom vizualizirani su dendriti obojani zeleno (tubulin β III) i jezgre obojene plavo (Hoechst 33342), potvrđujući da se radi o primarnim neuronima (**Prilog 1.**).

Napravljene su otopine monomera, oligomera i polimera $A\beta_{42}$ u koncentraciji od 10 μ M i provjerene AFM-om. Uzorci monomera, oligomera i polimera $A\beta_{42}$ mogu se jasno razlikovati na temelju morfoloških obilježja i veličine čestica (**Prilog 2.**). Dodatno, stvaranje oligomera i polimera iz monomera $A\beta_{42}$ u koncentraciji od 10 μ M potvrđeno je SDS-PAGE elektroforezom i vizualizacijom uz pomoć boje Coomasie Brilliant Blue. Kao što je prikazano (**Prilog 3.**), u svježem oligomernom uzorku utvrđeni su oligomeri $A\beta_{42}$ manje (dimeri, trimeri ili tetrameri) i veće (veći oligomeri) molekulske mase. No kako s vremenom dolazi do daljnje agregacije, u starijem oligomernom uzorku mogu se uočiti i polimeri $A\beta_{42}$, odnosno fibrili veće molekulske mase, slični uzorku pripremljenih polimera $A\beta_{42}$ (**Prilog 3.**).

Za procjenu neurotoksičnosti A β_{42} , primarni neuroni izloženi su monomerima, oligomerima i polimerima A β_{42} u koncentracijama od 0,1, 1 i 10 μ M tijekom 24 h. Stanična vijabilnost utvrđena je testovima MTT i RealTime-GloTM MT Cell Viability Assay. Rezultati testa MTT pokazali su značajno smanjenje postotka vijabilnih stanica pri izlaganju oligomerima A β_{42} u koncentracijama od 1 i 10 μ M, te polimerima A β_{42} u koncentraciji od 10 μ M (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 41. A**). Iako je test RealTime-GloTM MT Cell Viability Assay utvrdio značajno smanjenje stanične vijabilnosti nakon 24-satnog tretmana 10 μ M monomerima, oligomerima i polimerima u usporedbi s kontrolnom skupinom (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 41. B**), u skladu s rezultatima testa MTT najveći pad vijabilnosti primarnih neurona utvrđen je nakon primjene 10 μ M oligomera A β_{42} .



Slika 41. Postotak vijabilnosti primarnih neurona, nakon izlaganja 0,1, 1 i 10 μM monomerima, oligomerima i polimerima Aβ₄₂ tijekom 24 h, određen testovima A) MTT i B) RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti **p<0,01 i ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.

Za dodatnu procjenu vijabilnosti stanica izloženih uzorcima monomera, oligomera i polimera Aβ₄2 u koncentraciji 10 μM korišten je komplet MUSE™ Count & Viability Kit. Rezultati su



pokazali značajno smanjenje postotka vijabilnih stanica u svim ispitivanim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 42.**).

Slika 42. Postotak živih i mrtvih stanica nakon izlaganja primarnih neurona A) otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT) i 10 µM B) monomerima, C) oligomerima i D) polimerima Aβ₄₂, određen kompletom MUSE™ Count & Viability Kit na uređaju Guava® MUSE® Cell Analyzer te E) grafički prikaz rezultata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.

U sva tri provedena testa, oligomeri A β_{42} primjenjeni u najvišoj koncentraciji pokazali su veći toksični učinak na primarne neurone, u usporedbi s monomerima i polimerima, i zbog toga su odabrani za uspostavu modela AB-a. Kako bi se dalje odredila ne samo optimalna doza, već i optimalna duljina tretmana oligomerima A β_{42} , vijabilnost primarnih neurona utvrđena je testom MTT nakon izlaganja oligomerima A β_{42} u koncentracijama od 0,1, 1 i 10 μ M, tijekom 24, 48 i 72 h. Rezultati su pokazali značajan pad vijabilnosti stanica u svim vremenskim intervalima pri koncentracijama od 1 i 10 μ M (p<0,0001 nakon 24 i 48 h, p=0,0018 nakon 72 h, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 43.**). S obzirom da se pad vijabilnosti stanica nije dalje povećavao u vremenskim periodima izloženosti oligomerima A β_{42} duljim od 24 h, ovaj vremenski interval odabran je za uspostavu modela AB-a u staničnoj kulturi.



Slika 43. Postotak stanične vijabilnosti određen testom MTT nakon izlaganja primarnih neurona 0,1, 1 i 10 μM oligomerima Aβ₄₂ tijekom A) 24, B) 48 i C) 72 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti *p<0,05, **p<0,01 i ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.

Na temelju dobivenih rezultata, izloženost stanica 10 μ M oligomerima A β_{42} kroz 24 h odabrana je kao optimalni model AB-a, koji je korišten u daljnjim pokusima te primijenjen i u stanicama SH-SY5Y.

4.1.1. Mehanizmi ozljede u modelima AB-a i VaD-a in vitro

Gubitak integriteta stanične membrane, razine ATP-a i kaspaza 3 i 7

S ciljem boljeg razumijevanja mehanizama nastanka ozljede u modelu AB-a *in vitro*, provedene su analize staničnog metabolizma, integriteta stanične membrane te apoptoze u primarnim neuronima izloženim toksičnim oligomerima $A\beta_{42}$. Testom Mitochondrial ToxGloTM Assay utvrđene su razine ATP-a i gubitak integriteta stanične membrane, dok je test Caspase-Glo® 3/7 Assay korišten za mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7. Rezultati su pokazali da su stanice izložene 10 µM oligomerima $A\beta_{42}$ imale značajno manje razine ATP-a i veći gubitak integriteta stanične membrane (p=0,0358 razine ATP-a i p=0,0017 gubitak integriteta membrane, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 44.**), kao i povećanu aktivnost kaspaza 3 i 7 (p=0,0131, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 45.**) u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 44. Postotak A) razina ATP-a i B) gubitka integriteta stanične membrane primarnih neurona nakon izlaganja 0,1, 1 i 10 µM oligomerima Aβ₄2 tijekom 24 h, određenih testom Mitochondrial ToxGlo™ Assay. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti *p<0,05 i **p<0,01 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.



Slika 45. Postotak aktivnosti kaspaza 3 i 7 u primarnim neuronima nakon izlaganja 0,1, 1 i 10 μM oligomerima Aβ42 tijekom 24 h, određen testom Caspase-Glo® 3/7 Assay. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti *p<0,05 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.</p>

Aktivacija Bcl-2 i izloženost oksidacijskom stresu

Dodatno je u primarnim neuronima u modelu AB-a istražena aktivacija ključnih staničnih mehanizama pomoću kompleta MUSE® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit i MUSE® Oxidative Stress Kit na uređaju Guava® MUSE® Cell Analyzer. Nakon tretmana primarnih neurona oligomerima A β_{42} tijekom 24 h određen je postotak stanica s aktiviranim Bcl-2 koji može upućivati na apoptozu, te postotak stanica izloženih oksidacijskom stresu, odnosno stvaranju ROS-ova. Rezultati su utvrdili značajno veći postotak stanica s aktiviranim Bcl-2 u primarnim neuronima izloženim oligomerima A β_{42} u usporedbi s kontrolnom skupinom (p=0,0006, Studentov t-test, **Slika 46.**). Međutim, broj stanica izloženih oksidacijskom stresu nije bio značajno različit između skupine izložene oligomerima A β_{42} i kontrolne skupine (**Slika 47.**). Na temelju ovih rezultata, fokus daljnjih istraživanja usmjeren je na potencijalni apoptotski učinak oligomera A β_{42} , koji je dalje istražen i u stanicama SH-SY5Y.



Slika 46. Postotak primarnih neurona s aktiviranim Bcl-2 nakon 24 h izlaganja A) otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), B) 10 µM oligomerima Aβ₄₂, određen kompletom MUSE® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit na uređaju Guava® MUSE® Cell Analyzer te C) grafički prikaz rezultata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), Studentov ttest.





Stanična smrt

S ciljem daljnjeg istraživanja stanične smrti nakon ozljede, primarni neuroni i stanice SH-SY5Y izloženi su 10 μM oligomerima Aβ42 tijekom 24 h (model AB-a) ili deprivaciji kisika i glukoze tijekom 16 h te reperfuziji kroz 24 h (OGD/R, model VaD-a). Nakon toga, stanice su obojene fluorescentnim bojama Hoechst 33342 (plava fluorescencija), koja boji kompaktni kromatin apoptotskih staničnih jezgri, i propidijevim jodidom (crvena fluorescencija), koji ulazi samo u nekrotičke stanice s narušenim integritetom stanične membrane. Vizualizacija i snimanje stanica provedeno je fluorescentnim mikroskopom EVOS Floid Cell Imaging Station. Broj apoptotskih i nekrotičkih stanica ručno je izbrojan pomoću softvera ImageJ, a rezultati su izraženi kao udio apoptotskih ili nekrotičnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. U oba modela ozljede zabilježen je porast broja apoptotskih i nekrotičkih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom, međutim značajan porast broja apoptotskih i nekrotičkih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježen je samo u modelu VaD-a u primarnim neuronima (model AB-a u primarnim neuronima (p=0,4536 apoptoza i p=0,6297 nekroza) i u stanicama SH-SY5Y (p=0,8187 apoptoza i p=0,7557 nekroza); model VaD-a u primarnim neuronima (p=0,0135 apoptoza i p=0,0177 nekroza) i u stanicama SH-SY5Y (p=0,1305 apoptoza i p=0,8780 nekroza), Studentov t-test, Slike 48.-51.).

Model AB-a



Slika 48. Prikaz primarnih neurona u apoptozi i nekrozi nakon izlaganja otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT) i 10 μM oligomerima Aβ₄₂ tijekom 24 h (AB) A) snimljenih fluorescentnim mikroskopom EVOS Floid Cell Imaging Station te B) grafički prikaz rezultata. Plavom bojom (Hoechst 33342) označene su apoptotske, a crvenom bojom (propidijev jodid) nekrotičke stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Mjerna skala: 100 μm.



Slika 49. Prikaz stanica SH-SY5Y u apoptozi i nekrozi nakon izlaganja otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT) i 10 μM oligomerima Aβ₄₂ tijekom 24 h (AB) A) snimljenih fluorescentnim mikroskopom EVOS Floid Cell Imaging Station te B) grafički prikaz rezultata. Plavom bojom (Hoechst 33342) označene su apoptotske, a crvenom bojom (propidijev jodid) nekrotičke stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Mjerna skala: 100 μm.

Model VaD-a



Slika 50. Prikaz primarnih neurona u apoptozi i nekrozi u kontrolnoj skupini (u uvjetima s kisikom i kompletiranim medijem, KONT) i nakon deprivacije kisika i glukoze te reperfuzije (OGD/R) (16+24 h) A) snimljenih fluorescentnim mikroskopom EVOS Floid Cell Imaging

Station te B) grafički prikaz rezultata. Plavom bojom (Hoechst 33342) označene su apoptotske, a crvenom bojom (propidijev jodid) nekrotičke stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti *p<0,05 u odnosu na kontrolnu skupinu, Studentov t-test. Mjerna skala: 100 μm.



Slika 51. Prikaz stanica SH-SY5Y u apoptozi i nekrozi u u kontrolnoj skupini (u uvjetima s kisikom i kompletiranim medijem, KONT) i nakon i nakon deprivacije kisika i glukoze te reperfuzije (OGD/R) (16+24 h) A) snimljenih fluorescentnim mikroskopom EVOS Floid Cell Imaging Station te B) grafički prikaz rezultata. Plavom bojom (Hoechst 33342) označene su apoptotske, a crvenom bojom (propidijev jodid) nekrotičke stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Mjerna skala: 100 μm.

4.1.2. Tretman DHEA(S)-om i BDNF-om u modelima AB-a i VaD-a in vitro

4.1.2.1. Stanična vijabilnost

Neuroprotektivni učinak različitih koncentracija DHEA(S)-a i BDNF-a najprije je istražen u modelu AB-a na primarnim neuronima mjerenjem stanične vijabilnosti testom MTT. Rezultati su pokazali da koncentracija DHEA(S)-a od 1 μ M i BDNF-a od 100 ng/ml ima najveće protektivno djelovanje na vijabilnost primarnih neurona izloženih toksičnim oligomerima A β_{42} tijekom 24 h (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 52.**). Na temelju ovih rezultata, navedene koncentracije DHEA(S)-a i BDNF-a korištene su u daljnjim pokusima.



Slika 52. Postotak vijabilnosti primarnih neurona izloženih tijekom 24 h, 10 μM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s različitim koncentracijama A) DHEA-e i B) DHEAS-a (0,1, 1 i 10 μM) te C) BDNF-a (0,1, 1 i 100 ng/ml), određen testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), [#]p<0,05 u odnosu na skupinu AB, ANOVA + Tukeyjev test.</p>

Naime, u oba modela demencije (AB i VaD), i u primarnim neuronima i u stanicama SH-SY5Y, istražen je učinak optimalnih koncentracija DHEA(S)-a i BDNF-a na staničnu vijabilnost.

Model AB-a

U modelu AB-a, na primarnim neuronima, 1 μ M DHEAS i 100 ng/ml BDNF pokazali su značajan neuroprotektivan učinak na vijabilnost stanica izloženih oligomerima A β_{42} tijekom 24 h, dok je 1 μ M DHEA pokazala samo trend u povećanju stanične vijabilnosti (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 53.**). S druge strane, u istom modelu AB-a, ali u stanicama SH-SY5Y nije zabilježena značajna razlika između ispitivanih skupina (p=0,7936, ANOVA, **Slika 54.**).



Slika 53. Postotak vijabilnosti primarnih neurona izloženih tijekom 24 h, 10 μ M oligomerima A β_{42} (AB) te kombinaciji s 1 μ M DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om, određen testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu otapalu A β_{42} (HFIP, KONT), #p<0,05 u odnosu na skupinu AB, ANOVA + Tukeyjev test.



Slika 54. Postotak vijabilnosti stanica SH-SY5Y izloženih tijekom 24 h, otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), 10 μM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om, određen testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa.

Model VaD-a

U modelu VaD-a, u primarnim neuronima, samo je 24-satni predtretman sa 100 ng/ml BDNFa značajno povećao vijabilnost stanica izloženih OGD/R-u (16+24 h), dok prethodno izlaganje primarnih neurona 1 μ M DHEA(S)-u nije imalo značajan neuroprotektivni učinak u ozljedi izazvanoj OGD/R-om (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 55**.).



Slika 55. Postotak vijabilnosti primarnih neurona nakon izlaganja predtretmanu s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h te naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R) (16+24 h), određen testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik i kompletirani medij, KONT), ^{###}p<0,001 u odnosu na OGD/R, ANOVA + Tukeyjev test.

U modelu VaD-a, u stanicama SH-SY5Y nije zabilježen neuroprotektivan učinak predtretmana s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om na vijabilnost stanica izloženih OGD/R-u (16+24 h) (p<0,0001, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 56.**).



Slika 56. Postotak vijabilnosti stanica SH-SY5Y nakon izlaganja predtretmanu s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h te naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R) (16+24 h), određen testom MTT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001, u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik + kompletirani medij, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.

4.1.2.2. Ekspresija odabranih gena u stanicama

U oba modela demencije (AB i VaD), i u primarnim neuronima i u stanicama SH-SY5Y, istražen je učinak optimalnih koncentracija DHEA(S)-a i BDNF-a na ekspresiju gena *Pl3K, AKT, Bcl-2 i Bax* te omjer *Bax/Bcl-2* metodom qPCR.

Model AB-a

U modelu AB-a, u primarnim neuronima izloženim oligomerima $A\beta_{42}$ i lijekovima DHEA(S) i BDNF tijekom 24 h, zabilježeno je povećanje ekspresije gena *Pl3K, AKT, Bcl-2 i Bax*, kao i omjera gena *Bax/Bcl-2*, dok su 1 µM DHEA(S) ili 100 ng/ml BDNF pokazali trend vraćanja ekspresije svih analiziranih gena prema kontrolnim vrijednostima (p=0,1660 *Pl3K*, p=0,1788 *AKT*, p=0,4739 *Bcl-2*, p=0,2915 *Bax* i p=0,5036 *Bax/Bcl-2*, ANOVA, **Slika 57.**).



Slika 57. Relativna ekspresija gena A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax, te E) omjer genske ekspresije Bax/Bcl-2, u odnosu na referentni gen GAPDH u primarnim neuronima nakon izlaganja otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), 10 µM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s 1 µM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h, određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa.

U modelu AB-a, u stanicama SH-SY5Y izloženim oligomerima A β_{42} i lijekovima DHEA(S) i BDNF tijekom 24 h, zabilježeno je smanjenje ekspresije gena *PI3K*, *AKT* te *Bcl-2*, ali ne i *Bax*, niti omjera gena *Bax/Bcl-2*, dok su 1 μ M DHEA(S) ili 100 ng/ml BDNF također uglavnom pokazali trend vraćanja ekspresije gena prema kontrolnim razinama (p<0,0001 *PI3K*, p=0,0030 AKT, p=0,0002 Bcl-2, p=0,5489 Bax i p=0,0019 Bax/Bcl-2, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 58.**).



Slika 58. Relativna ekspresija gena A) Pl3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer genske ekspresije Bax/Bcl-2, u odnosu na referentni gen GAPDH u stanicama SH-SY5Y nakon izlaganja otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), 10 µM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s 1 µM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h, određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (HFIP, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.</p>

Model VaD-a

U modelu VaD-a, u primarnim neuronima izloženim OGD/R-u, zabilježeno je značajno smanjenje ekspresije gena *PI3K*, *AKT*, *Bcl-2* i *Bax*, ali i blagi trend povišenog omjera genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, dok predtretman s 1 µM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om nije uspio povećati ekspresiju analiziranih gena, ali su DHEAS i BDNF pokazali tendenciju snižavanja omjera genske ekspresije *Bax/Bcl-2* (p<0,0001 *PI3K*, *Bcl-2* i *Bax*, p=0,0022 *AKT* i p=0,0009 *Bax/Bcl-2*, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 59.**).



Slika 59. Relativna ekspresija gena A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer genske ekspresije Bax/Bcl-2 u odnosu na referentni gen GAPDH u primarnim neuronima, te predtretmanu s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h, a naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R) (16+24 h), određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti **p<0,01 i ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik + kompletirani medij, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.</p>

U modelu VaD-a, u stanicama SH-SY5Y, izlaganje OGD/R-u uzrokovalo je smanjenu ekspresiju gena *AKT* i *Bax* te omjera *Bax/Bcl-2*, dok su ekspresije gena *PI3K* i *Bcl-2* bile povišene, a predtretman s 1 μ M DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om pokazao je trend vraćanja ekspresije svih analiziranih gena prema kontrolnim vrijednostima (p=0,1808 *PI3K*, p=0,0102 *AKT*, p=0,1546 *Bcl-2*, p=0,4294 *Bax* i p=0,0516 *Bax/Bcl-2*, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 60.**).



Slika 60. Relativna ekspresija gena A) Pl3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer genske ekspresije Bax/Bcl-2, u odnosu na referentni gen GAPDH u stanicama SH-SY5Y nakon izlaganja predtretmanu s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h te naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R) (16+24 h), u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik + kompletirani medij, KONT), određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa.

4.1.2.3. Ekspresija odabranih proteina u stanicama

Ekspresija proteina PI3K, AKT, Bcl-2, Bax te omjer Bax/Bcl-2 analizirana je metodom Western blot samo u stanicama SH-SY5Y (**Slika 61.**), budući da količina proteina dobivena iz primarnih neurona nije bila dostatna za analizu.



Slika 61. Prikaz proteinskih vrpci PI3K, AKT, Bax, Bcl-2 i β-aktin iz stanica SH-SY5Y
nakon izlaganja A) otapalu Aβ₄₂ (HFIP, K), 10 µM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s 1 µM DHEA-om (DH), DHEAS-om (DS) ili 100 ng/ml BDNF-om (B) tijekom 24 h te B)
predtretmanu s 1 µM DHEA-om (DH), DHEAS-om (DS) ili 100 ng/ml BDNF-om (B)
tijekom 24 h te naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R) u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik + kompletirani medij, K), dobivenih metodom Western blot.

Model AB-a

U modelu AB-a, u stanicama SH-SY5Y izloženim oligomerima A β_{42} , zabilježeno je smanjenje ekspresije proteina PI3K, AKT i Bax i omjera proteinske ekspresije Bax/Bcl-2, osim proteina Bcl-2, čija je ekspresija bila povišena, a tretman 1 μ M DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om pokazao je trend vraćanja ekspresije svih analiziranih proteina prema kontrolnim vrijednostima, pri čemu su DHEAS i BDNF pokazali snažniji učinak u usporedbi s DHEA-om (p=0,5667 PI3K, p=0,3231 AKT, p=0,2363 Bcl-2, p=0,2368 Bax i p=0,1972 Bax/Bcl-2, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 62.**).


Slika 62. Relativna ekspresija proteina A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer proteinske ekspresije Bax/Bcl-2 u odnosu na referentni protein β-aktin u stanicama SH-SY5Y nakon izlaganja otapalu Aβ₄₂ (HFIP, KONT), 10 µM oligomerima Aβ₄₂ (AB) te kombinaciji s 1 µM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h, određena metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa.

U modelu VaD-a, u stanicama SH-SY5Y izloženim OGD/R-u primijećeno je smanjenje ekspresije proteina PI3K, AKT, Bcl-2 i Bax te omjera proteinske ekspresije Bax/Bcl-2, a predtretman s 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om pokazao je trend vraćanja ekspresije svih analiziranih proteina prema kontrolnim vrijednostima (p=0,0012 PI3K, p=0,1079 AKT, p=0,0543 Bcl-2, p=0,0029 Bax i p=0,1749 Bax/Bcl-2, ANOVA + Tukeyjev test, **Slika 63.**).



Slika 63. Relativna ekspresija proteina A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te omjer E) proteinske ekspresije Bax/Bcl-2 u odnosu na referentni protein β-aktin u stanicama SH-SY5Y nakon izlaganja predtretmanu s 1 µM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om tijekom 24 h te naknadno deprivaciji kisika i glukoze te reperfuziji (OGD/R, 16+24 h), određena metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška iz 3 pokusa. Razina značajnosti **p<0,01 u odnosu na kontrolnu skupinu (kisik + kompletirani medij, KONT), ANOVA + Tukeyjev test.</p>

4.2. Modeli AB-a in vivo

Neuroprotektivni učinak DHEA(S)-a ispitan je u modelima AB-a *in vivo*. Dugotrajni učinci DHEA-e istraženi su u farmakološki izazvanom modelu AB-a, dok je dugotrajno djelovanje DHEAS-a istraženo u genetičkom modelu AB-a. U oba modela istraženo je ponašanje životinja kognitivnim i bihevioralnim testovima, te je u homogenatima hipokampusa određena ekspresija gena *PI3K*, *AKT*, *Bcl-2*, *Bax* i pripadajućih proteina, kao i koncentracije Aβ₄₂, tau, DHEAS-a i BDNF-a.

4.2.1. Ponašanje životinja

Učinci DHEA(S)-a u modelima AB-a *in vivo* ispitani su testovima ponašanja. Kognitivne sposobnosti miševa procijenjene su testovima MWM, NOR i SDT, dok su mobilnost i ponašanja nalik anksioznom i depresivnom istraženi testovima OFT, FST i ST. U farmakološki izazvanom modelu AB-a na miševima C57BL/6, provedeni su testovi MWM, NOR, OFT i FST, dok su u genetičkom modelu AB-a na miševima 3xTg-AD provedeni testovi MWM, SDT, OFT i ST.

Farmakološki izazvan model AB-a

U farmakološki izazvanom modelu AB-a korišteni su miševi C57BL/6, kojima su injicirani 100 μ M oligomeri A β_{42} i.c.v. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEA-e, otopljene u kukuruznom ulju i primijenjene i.p. u dozi od 10 mg/kg tijekom 30 dana, na ponašanje životinja. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEA-om te kontrolnu skupinu, koju su činili miševi C57BL/6 s injiciranim PBS-om i.c.v. i tretirani kukuruznim uljem i.p. tijekom 30 dana. Miševi iz skupine AB, također su primali kukuruzno ulje i.p., kao kontrola tretmanu DHEA-om.

Primjenom MWM-a nije zabilježena značajna razlika među analiziranim skupinama miševa u vremenu provedenom u odgovarajućem kvadrantu, upućujući na očuvano prostorno pamćenje (p=0,7545, Kruskal-Wallis test, **Slika 64.**). Međutim, primjenom NORT-a, skupina AB pokazala je smanjeno prepoznavanje novog (nepoznatog) objekta u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je dugotrajni tretman DHEA-om u skupini AB poboljšao razinu prepoznavanja, odnosno kratkoročno vizualno pamćenje (p=0,2384, Kruskal-Wallis test, **Slika 65.**).



Slika 64. Vrijeme miševa C57BL/6 provedeno u odgovarajućem kvadrantu (Morrisov vodeni labirint, MWM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo A β_{42} , PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 μ M oligomera A β_{42} i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.



Slika 65. Postotak vremena miševa C57BL/6 provedenog u istraživanju nepoznatog objekta u odnosu na poznati (test prepoznavanja novog objekta, NORT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo Aβ₄₂, PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 µM oligomera Aβ₄₂ i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.

Nadalje, primjenom OFT-a, skupina AB pokazala je veću brzinu kretanja i veću prijeđenu udaljenost, što ukazuje na povećanu lokomotornu aktivnost, ali i smanjeno vrijeme provedeno u sredini polja, što upućuje na povišenu razinu ponašanja nalik anksioznom, dok je dugotrajna primjena DHEA-e u pokazala blagi suprotni učinak, upućujući na potencijalno anksiolitičko djelovanje (p=0,2612 brzina, p=0,2955 prijeđena udaljenost i p=0,8297 vrijeme provedeno u

sredini, Kruskal-Wallis test, **Slika 66.**). U FST-u, skupina AB imala je kraću latenciju plutanja, ali i kraće vremena provedenog plutajući, mjere ponašanja nalik depresivnom, dok je DHEA imala suprotan učinak (p=0,2400 latencija plutanja i p=0,1391 plutanje, Kruskal-Wallis test, **Slika 67.**).



Slika 66. A) Brzina, B) prijeđena udaljenost i C) vrijeme provedeno u sredini polja miševa C57BL/6 (test otvorenog polja, OFT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo Aβ₄₂, PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 µM oligomera Aβ₄₂ i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.



Slika 67. A) Latencija plutanja i B) vrijeme provedeno u plutanju miševa C57BL/6 (test prisilnog plivanja, FST). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo A β_{42} , PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 μ M oligomera A β_{42} i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.

Genetički model AB-a

U genetičkom modelu AB-a korišteni su transgenični miševi 3xTg-AD, koji starenjem razvijaju sve ključne neuropatološke karakteristike AB-a. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEAS-a u koncentraciji 1 mg/kg, otopljenog u DMSO-u i primijenjenog putem mikro-osmotske pumpice implantirane s.c. tijekom 18 tjedana, na ponašanje životinja. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEAS-om te kontrolnu skupinu, koju su činili transgenični miševi bez mutacija (3xTg(+/+)) s implantiranom mikro-osmotskom pumpicom ispunjenom DMSO-om. Miševi iz skupine AB, također su imali implantiranu mikro-osmotsku pumpicu ispunjenu DMSO-om, kao kontrola tretmanu DHEAS-om.

Primjenom MWM-a, pokazano je da je skupina AB provela značajno kraće vrijeme u odgovarajućem kvadrantu u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok je tretman DHEAS-om povećao to vrijeme (p=0,0103, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 68**.).



Slika 68. Vrijeme miševa 3xTg-AD provedeno u odgovarajućem kvadrantu (Morrisov vodeni labirint, MWM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana. Razina značajnosti *p<0,05, u odnosu na kontrolnu skupinu, Kruskal-Wallis + Dunnov test.</p>

Primjenom SDT-a, skupina AB pokazala je smanjen interes za nepoznatu životinju i lošije socijalno ponašanje, dok je DHEAS poboljšao oba parametra SDT-a (p=0,0103 nepoznata životinja i p=0,0110 asocijalno ponašanje, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 69.**).



Slika 69. Postotak vremena provedenog u A) istraživanju nepoznate životinje u odnosu na poznatu i B) asocijalnom ponašanju miševa 3xTg-AD (test socijalne diskriminacije, SDT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana. Razina značajnosti *p<0,05 u odnosu na kontrolnu skupinu, Kruskal-Wallis + Dunnov test.</p>

Nadalje, u OFT-u, skupina AB pokazala je smanjenu brzinu i prijeđenu udaljenost, što upućuje na njihovu manju lokomotornu aktivnost, uz značajno kraće vrijeme provedeno u sredini polja, što upućuje na izraženu anksioznost ovih miševa, dok je dugotrajni tretman s DHEAS-om imao pozitivan učinak na brzinu i prijeđenu udaljenost u skupini AB te je značajno produžio vrijeme provedeno u sredini polja (p=0,0728 brzina, p=0,0865 prijeđena udaljenost i p=0,0020 vrijeme provedeno u sredini, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 70**.), upućujući na anksiolitički učinak DHEAS-a. Primjena ST-a utvrdila je da je skupina AB imala kraću latenciju čišćenja od saharoze, ali i kraće vrijeme provedeno u čišćenju, dok je DHEAS povećao latenciju, ali i ukupno vrijeme čišćenja skupine AB (p=0,0006 latencija čišćenja i p=0,0550 čišćenje, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 71**.), što upućuje na antidepresivni učinak DHEAS-a.



Slika 70. A) Brzina, B) prijeđena udaljenost i C) vrijeme provedeno u sredini polja miševa 3xTg-AD (test otvorenog polja, OFT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18

tjedana. Razina značajnosti **p<0,01 u odnosu na kontrolnu skupinu i [#]p<0,05 u odnosu na skupinu AB, Kruskal-Wallis + Dunnov test.



Slika 71. A) Latencija čišćenja i B) vrijeme provedeno u čišćenju miševa 3xTg-AD (test prskanja saharozom, ST). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana. Razina značajnosti ***p<0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu i [#]p<0,05 u odnosu na skupinu AB, Kruskal-Wallis + Dunnov test.</p>

4.2.2. Ekspresija odabranih gena u homogenatima hipokampusa životinja

Ekspresija gena *PI3K*, *AKT*, *Bcl-2* i *Bax* te omjer ekspresije *Bax/Bcl-2* analizirani su metodom qPCR u homogenatima hipokampusa životinja u oba modela AB-a.

Farmakološki izazvan model AB-a

U farmakološki izazvanom modelu AB-a korišteni su miševi C57BL/6, kojima su injicirani 100 μ M oligomeri A β_{42} i.c.v. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEA-e, otopljene u kukuruznom ulju i primijenjene i.p. u dozi od 10 mg/kg tijekom 30 dana, na ekspresiju odabranih gena. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEA-om te kontrolnu skupinu, koju su činili miševi C57BL/6 s injiciranim PBS-om i.c.v. i tretirani kukuruznim uljem i.p. tijekom 30 dana. Miševi iz skupine AB, također su primali kukuruzno ulje i.p., kao kontrola tretmanu DHEA-om.

Ekspresija svih analiziranih gena u hipokampusu, kao i omjer *Bax/Bcl-2*, bili su sniženi u skupini AB u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je dugotrajna primjena DHEA-e vratila vrijednosti ekspresije gena prema kontrolnim razinama (p=0,6065 *PI3K*, p=0,4868 *AKT*, p=0,2128 *Bcl-2*, p=0,0498 *Bax* i p=0,3041 *Bax/Bcl-2*, Kruskal-Wallis test, **Slika 72.**).



Slika 72. Relativna ekspresija gena A) *PI3K*, B) *AKT*, C) *Bcl-2* i D) *Bax* te E) omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, u odnosu na referentni gen *GAPDH* u homogenatima hipokampusa miševa C57BL/6 određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo A β_{42} , PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 µM oligomera A β_{42} i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.

Genetički model AB-a

U genetičkom modelu AB-a korišteni su transgenični miševi 3xTg-AD, koji starenjem razvijaju sve ključne neuropatološke karakteristike AB-a. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEAS-a u koncentraciji 1 mg/kg, otopljenog u DMSO-u i primijenjenog putem mikro-osmotske pumpice implantirane s.c. tijekom 18 tjedana, na ekspresiju odabranih gena. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEAS-om te kontrolnu skupinu, koju su činili transgenični miševi bez mutacija (3xTg(+/+)) s implantiranom mikro-osmotskom pumpicom ispunjenom DMSO-om. Miševi iz

skupine AB, također su imali implantiranu mikro-osmotsku pumpicu ispunjenu DMSO-om, kao kontrola tretmanu DHEAS-om.

Ekspresija gena *PI3K*, *Bax* i *Bax/Bcl-2* u hipokampusu skupine AB bila je snižena, dok su geni *AKT* i *Bcl-2* pokazali povišene razine ekspresije. Međutim, dugotrajni tretman DHEAS-om u AB miševa također je djelovao u smjeru normalizacije ekspresije analiziranih gena prema kontrolnim vrijednostima (p=0,1561 *PI3K*, p=0,1931 *AKT*, p=0,3679 *Bcl-2*, p=0,1073 *Bax* i p=0,1017 *Bax/Bcl-2*, Kruskal-Wallis test, **Slika 73.**).



Slika 73. Relativna ekspresija gena A) *PI3K*, B) *AKT*, C) *Bcl-2* i D) *Bax* te E) omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, u odnosu na referentni gen *GAPDH* u homogenatima hipokampusa miševa 3xTg-AD određena metodom qPCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana.

4.2.2.1. Ekspresija odabranih proteina u homogenatima hipokampusa životinja

Ekspresija proteina PI3K, AKT, Bcl-2 i Bax te omjer ekspresije Bax/Bcl-2 analizirani su metodom Western blot u homogenatima hipokampusa životinja u oba modela AB-a. Dobivene proteinske vrpce prikazane su na **Slici 74**.

A	K2 K3 K1 K2 K3 AB1AB2 AB3 DH1DH2 DH3	В		К1	K2	КЗ	AB1	AB2	AB3	DS1	DS2	DS3
p-aktin			β-aktin	-	-	-	-	-	-	-		
Bax			Bcl-2	-	-	-		****		-		
PI3K			РІЗК	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-aktin	The state in the local base in the state in	I	β-aktin	-	-	-		-	-		-	-
Bcl-2			Bax	=	-	-	-		-	-	=	
AKT			AKT	1000	1000	1282	8294L	89754	17593	0.075	Sec.	11120

Slika 74. Prikaz proteinskih vrpci PI3K, AKT, Bcl-2, Bax i β-aktin iz homogenata hipokampusa miševa A) C57BL/6 i B) 3xTg-AD, dobivenih metodom Western blot. K1-K3 = miševi C57BL/6 kojima je injicirano otapalo Aβ42 (PBS) i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p. (A), odnosno miševi 3xTg(+/+) kojima je primijenjeno otapalo DHEASa (DMSO, B) s.c., AB1-AB3 = miševi C57BL/6 kojima je injicirano 100 µM oligomera Aβ42 i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje, A) i.p., odnosno miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DH1-DH3 = miševi C57BL/6 kojima je

injicirano 100 μ M oligomera A β_{42} i.c.v. i primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana, DS1-DS3 = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tijedana.

Farmakološki izazvan model AB-a

U farmakološki izazvanom modelu AB-a, ekspresija svih analiziranih proteina i omjer proteinske ekspresije Bax/Bcl-2 bili su povišeni u skupini AB u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je dugotrajna primjena DHEA-e pokazala tendenciju vraćanja vrijednosti ekspresije analiziranih proteina prema kontrolnim razinama (p=0,0454 PI3K, p=0,0034 AKT, p=0,4233 Bcl-2, p=0,0400 Bax i p=0,1077 Bax/Bcl-2, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 75.**).



Slika 75. Relativna ekspresija proteina A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer proteinske ekspresije Bax/Bcl-2, u odnosu na referentni protein β -aktin u homogenatima hipokampusa miševa C57BL/6 određena metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo A β_{42} , PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 μ M oligomera A β_{42} i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana. Razina značajnosti *p<0,05 u odnosu na kontrolnu skupinu, Kruskal Wallis + Dunnov test.

Genetički model AB-a

U genetičkom modelu AB-a, ekspresija proteina PI3K, AKT, Bcl-2 i Bax bila je snižena u skupini AB, dok je omjer Bax/Bcl-2 bio povišen, a dugotrajni tretman DHEAS-om djelovao je u smjeru normalizacije ekspresije svih analiziranih proteina prema kontrolnim vrijednostima (p=0,1561 PI3K, p=0,0273 AKT, p=0,0390 Bcl-2, p=0,0665 Bax i p=0,8752 Bax/Bcl-2, Kruskal-Wallis + Dunnov test, **Slika 76.**).



Slika 76. Relativna ekspresija proteina A) PI3K, B) AKT, C) Bcl-2 i D) Bax te E) omjer proteinske ekspresije Bax/Bcl-2, u odnosu na referentni protein β-aktin u homogenatima hipokampusa miševa 3xTg-AD određena metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana. Razina značajnosti *p<0,05 u odnosu na kontrolnu skupinu, Kruskal-Wallis + Dunnov test.</p>

4.2.3. Koncentracija Aβ₄₂, tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokampusa životinja

Koncentracija Aβ42, tau, DHEAS-a i BDNF-a određena je metodom ELISA u homogenatima hipokampusa životinja u oba modela AB-a.

U farmakološki izazvanom modelu AB-a korišteni su miševi C57BL/6, kojima su injicirani 100 μ M oligomeri A β_{42} i.c.v. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEA-e, otopljene u kukuruznom ulju i primijenjene i.p. u dozi od 10 mg/kg tijekom 30 dana, na koncentraciju A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEA-om te kontrolnu skupinu, koju su činili miševi C57BL/6 s injiciranim PBS-om i.c.v. i tretirani kukuruznim uljem i.p. tijekom 30 dana. Miševi iz skupine AB, također su primali kukuruzno ulje i.p., kao kontrola tretmanu DHEA-om.

U genetičkom modelu AB-a korišteni su transgenični miševi 3xTg-AD, koji starenjem razvijaju sve ključne neuropatološke karakteristike AB-a. Istraživano je dugotrajno djelovanje DHEAS-a u koncentraciji 1 mg/kg, otopljenog u DMSO-u i primijenjenog putem mikro-osmotske pumpice implantirane s.c. tijekom 18 tjedana, na koncentraciju A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a. Istraživanje je obuhvatilo tri skupine od 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEAS-om te kontrolnu skupinu, koju su činili transgenični miševi bez mutacija (3xTg(+/+)) s implantiranom mikro-osmotskom pumpicom ispunjenom DMSO-om. Miševi iz skupine AB, također su imali implantiranu mikro-osmotsku pumpicu ispunjenu DMSO-om, kao kontrola tretmanu DHEAS-om.

Rezultati su pokazali da u farmakološki izazvanom modelu AB-a nema značajne razlike između analiziranih skupina u koncentracijama A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a (p=0,9360 A β_{42} , p=0,8688 tau, p=0,6168 DHEAS i p=0,5333 BDNF, Kruskal-Wallis test), dok je sličan obrazac uočen i u genetičkom modelu AB-a (p=0,9035 A β_{42} , p=0,8731 tau, p=0,4110 DHEAS i p=0,9788 BDNF, Kruskal-Wallis test), gdje također nisu zabilježene značajne razlike u njihovim koncentracijama (**Slike 77.** i **78.**).



Farmakološki izazvan model AB-a

Slika 77. Koncentracija A) Aβ₄₂, B) tau, C) DHEAS-a i D) BDNF-a u homogenatima hipokampusa miševa C57BL/6 određena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (otapalo Aβ₄₂, PBS) i AB = miševi kojima je injicirano 100 µM oligomera Aβ₄₂ i.c.v. uz primjenu otapala DHEA-e (kukuruzno ulje) i.p., DHEA = miševi skupine AB kojima je primijenjeno 10 mg/kg DHEA-e i.p. tijekom 30 dana.



Slika 78. Koncentracija A) Aβ₄₂, B) tau, C) DHEAS-a i D) BDNF-a u homogenatima hipokampusa miševa 3xTg-AD određena metodom ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška od 5 do 7 miševa po skupini. KONT = kontrolna skupina (miševi 3xTg(+/+)) i AB = miševi 3xTg-AD kojima je primijenjeno otapalo DHEAS-a (DMSO) s.c., DHEAS = miševi skupine AB kojima je primijenjen 1 mg/kg DHEAS-a s.c. tijekom 18 tjedana.

109

4.3. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 369 ispitanika (202 muškarca i 167 žena), od čega 137 osoba s normalnom kognicijom (kontrola) te 232 osobe s dijagnozom demencije. Ispitanicima su prikupljeni demografski i klinički podaci, utvrđena je koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi, napravljena genotipizacija polimorfizama gena *SULT2A1* i *BDNF* te određena ekspresija gena *BDNF*.

Dob ispitanika s demencijom bila je značajno je viša od dobi kontrolnih ispitanika (p<0,0001, Mann-Whitney U test, **Slika 79.**).



Slika 79. Dob kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. Razina značajnosti ***p<0,001, u odnosu na kontrolnu skupinu, Mann-Whitney U test.

Nadalje, u skupini ispitanika s demencijom utvrđen je značajno veći udio žena u odnosu na skupinu kontrolnih ispitanika (p<0,0001, Fisherov test, **Slika 83.**).





U 137 kontrolnih ispitanika i 168 ispitanika s demencijom izmjereni su parametri iz krvi, prikazani u **Tablici 11.** Osobe s demencijom imale su značajno višu vrijednost glukoze (p=0,0039, Mann-Whitney U test) i nižu vrijednost ukupnog kolesterola u krvi (p=0,0007, Mann-Whitney U test) u odnosu na kontrolne ispitanike, dok razine ostalih parametara krvi nisu bile značajno različite između ove dvije skupine ispitanika (**Tablica 11.**).

Skupina N (%)	Kontrola 137 (44,92%)	Demencija 168 (55,08%)	Statistika				
GUK (mmol/l)	$4{,}94\pm0{,}09$	$5{,}37 \pm 0{,}10$	p=0,0039, Mann-Whitney U test				
KOL UK (mmol/l)	$5,56 \pm 0,10$	$5{,}11\pm0{,}09$	p=0,0007, Mann-Whitney U test				
HDL (mmol/l)	$1,\!20 \pm 0,\!03$	$1,\!12\pm0,\!02$	p=0,6285, Mann-Whitney U test				
LDL (mmol/l)	$3,\!17 \pm 0,\!10$	$2{,}94 \pm 0{,}08$	p=0,1301, Mann-Whitney U test				
TRG (mmol/l)	$2,\!24 \pm 0,\!08$	$2,\!05\pm0,\!07$	p=0,0709, Mann-Whitney U test				
AST (U/l)	$19,82 \pm 0,51$	$18,73 \pm 0,46$	p=0,0621, Mann-Whitney U test				
ALT (U/l)	$20,74 \pm 0,53$	$20,\!66 \pm 0,\!58$	p=0,7721, Mann-Whitney U test				
GGT (U/l)	$22,\!36\pm0,\!39$	$21,85 \pm 0,51$	p=0,3998, Mann-Whitney U test				
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška rezultata 137 kontrolnih							

Tablica 11. Koncentracije parametara iz krvi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 168 ispitanika s demencijom. GUK = glukoza u krvi, KOL UK = ukupni kolesterol, HDL = HDL kolesterol, LDL = LDL kolesterol, TRG = trigliceridi, AST = aspartat aminotransferaza, ALT = alanin aminotransferaza, GGT = gama glutamiltransferaza.

Kontrolni ispitanici imali su značajno veći broj bodova na ljestvicama MMSE (p<0,0001, Mann-Whitney U test) i CDT (p<0,0001, Mann-Whitney U test) u odnosu na ispitanike s demencijom, dok kod ljestvice ADAS-Cog nije bilo značajne razlike u bodovima između ovih dviju skupina (**Tablica 12.**).

Tablica 12. Bodovi na ljestvicama MMSE, CDT i ADAS-Cog u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

Skupina N (%)	Kontrola 137 37,13%)	Demencija 232 (62,87%)	Statistika			
Bodovi na MMSE	$28{,}10\pm0{,}10$	$21,\!99 \pm 0,\!23$	p<0,0001, Mann-Whitney U test			
Bodovi na CDT	$4{,}59\pm0{,}04$	$3,86 \pm 0,12$	p<0,0001, Mann-Whitney U test			
Bodovi na ADAS-Cog	$38{,}18\pm0{,}49$	$37,22 \pm 0,66$	p=0,2796, Mann-Whitney U test			
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna greška rezultata 137 kontrolnih						

ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. MMSE = mini mental state examination, CDT = clock drawing test, ADAS-Cog = Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale.

4.3.1. Koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi

Kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s demencijom utvrđena je koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi metodom ELISA. Naime, u ispitanika s demencijom utvrđena je značajno manja koncentracija DHEAS-a u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike (p=0,0227, Mann-Whitney U test, **Slika 81.**), dok je koncentracija BDNF-a u plazmi bila značajno viša u ispitanika s demencijom u odnosu na kontrolne ispitanike (p=0,0046, Mann-Whitney U test, **Slika 82.**).



Slika 81. Koncentracija DHEAS-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. Razina značajnosti *p<0,05, Mann-Whitney U test.</p>



Slika 82. Koncentracija BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost + standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. Razina značajnosti **p<0,01, Mann-Whitney U test.

Multiplom regresijskom analizom utvrđeno je da nema značajnog utjecaja dobi i spola na koncentraciju DHEAS-a (β =-0,0003, p=0,9082 dob; β =-0,0001, p=0,5493 spol) i BDNF-a (β =0,1513, p=0,1830 dob; β =-0,0029, p=0,7532 spol) u plazmi ispitanika. Analiza Spearmanove korelacije nije pokazala značajnu povezanost između dobi te bodova na ljestvicama CDT i ADAS-Cog s koncentracijama DHEAS-a (r_s =0,0198, p=0,7127 dob; r_s =-0,0848, p=0,1093 CDT; r_s =-0,0350, p=0,5084 ADAS-Cog) i BDNF-a (r_s =-0,0673, p=0,2047 dob; r_s =-0,0150, p=0,7749 CDT; r_s =0,0532, p=0,3077 ADAS-Cog) u plazmi. Međutim, utvrđena je značajna negativna povezanost između koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi te bodova na ljestvici MMSE (r_s =-0,1202, p<0,0001 DHEAS; r_s =-0,1478, p<0,0001 BDNF).

4.3.2. Polimorfizmi gena SULT2A1 i BDNF

Kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s demencijom napravljena je genotipizacija polimorfizama gena *SULT2A1* i *BDNF* metodom qPCR. Raspodjela genotipova obzirom na polimorfizme rs2637125 gena *SULT2A1* i rs6265 gena *BDNF* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom bila je u skladu je s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (**Tablice 13.** i **14.**).

Tablica 13. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s demencijom.

rs263	37125	AA (N, %)	AG (N, %)	GG (N, %)	Statistika
Kontrola	Dobiveno	7 (5,88)	33 (27,73)	79 (66,39)	p=0,7023,
	Očekivano	5 (4,20)	38 (31,93)	77 (64,71)	χ ² -test
Demencija	Dobiveno	4 (2,70)	43 (29,05)	101 (68,24)	p=0,6834,
	Očekivano	6 (4,05)	47 (31,76)	95 (64,19)	χ^2 -test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. Ukoliko je p>0,05, rezultat je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Tablica 14. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs6265 gena *BDNF* u kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s demencijom.

rs	6265	AA (N, %)	AG (N, %)	GG (N, %)	Statistika
Kontrola	Dobiveno	4 (2,96)	45 (33,33)	86 (63,70)	p=0,9220,
	Očekivano	5 (3,70)	43 (31,85)	87 (64,44)	χ ² -test
Demencija	Dobiveno	10 (4,35)	70 (30,43)	150 (65,22)	p=0,9433,
	Očekivano	9 (3,91)	73 (31,74)	149 (64,78)	χ^2 -test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom. Ukoliko je p>0,05, rezultat je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Daljna analiza nije utvrdila značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*, kao ni polimorfizma rs6265 gena *BDNF*, između kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom (**Tablice 15.** i **16.**). Također, kad su ispitanici obzirom na polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* i polimorfizam rs6265 gena *BDNF* podijeljeni na nositelje genotipa AA naspram alela G, odnosno genotipa GG naspram alela A, nije utvrđena značajna razlika u učestalosti ovih genotipova i alela između ove dvije skupine ispitanika (**Tablice 17.** i **18.**).

Tablica 15. Raspodjela genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

rs2637125 genotip/alel	Kontrola N (%)	Demencija N (%)	Statistika
AA	7 (5,88)	4 (2,70)	-0.4280
AG	33 (27,73)	43 (29,05)	p=0,4289,
GG	79 (66,39)	101 (68,24)	χ-test
А	47 (19,75)	51 (17,23)	p=0,5002,
G	191 (80,25)	245 (82,77)	Fisherov test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 16. Raspodjela genotipova i alela polimorfizma rs6265 gena *BDNF* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

rs6265 genotip/alel	Kontrola N (%)	Demencija N (%)	Statistika
AA	4 (2,96)	10 (4,35)	m=0.7100
AG	45 (33,33)	70 (30,43)	p=0,7109,
GG	86 (63,70)	150 (65,22)	χ-test
А	53 (19,63)	90 (19,57)	p=1,0000,
G	217 (80,37)	370 (80,43)	Fisherov test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 17. Raspodjela nositelja genotipa AA naspram alela G te nositelja GG naspram A polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

rs2637125 nositelji	Kontrola N (%)	Demencija N (%)	Statistika
AA	7 (5,88)	4 (2,70)	p=0,2262,
G	191 (80,25)	245 (82,77)	Fisherov test
GG	79 (66,39)	101 (68,24)	p=0,7933,
А	47 (19,75)	51 (17,23)	Fisherov test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 18. Raspodjela nositelja genotipa AA naspram alela G te nositelja GG naspram A polimorfizma rs6265 gena *BDNF* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom.

rs6265 nositelji	Kontrola N (%)	Demencija N (%)	Statistika
AA	4 (2,96)	10 (4,35)	p=0,5844,
G	217 (80,37)	370 (80,43)	Fisherov test
GG	86 (63,70)	150 (65,22)	p=0,8208,
А	53 (19,63)	90 (19,57)	Fisherov test

Rezultati su prikazani kao broj i postotak rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Nadalje, nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji DHEAS-a u plazmi između nositelja različitih genotipova, alela, kao i nositelja homozigotnih genotipova naspram alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1* u kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom (**Tablice 19.-21.**).

Tablica 19. Koncentracija DHEAS-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, nositelja različitih genotipova polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*.

rs2637125	Genotipovi	AA	AG	GG	Statistika
Koncentracija DHEAS-a u	Kontrola	$245,00\pm\\60,80$	$\begin{array}{r} 232,\!60\pm\\ 19,\!84\end{array}$	215,80± 13,23	p=0,6226, Kruskal- Wallis test
plazmi (ng/ml)	Demencija	246,60 ± 97,22	219,30 ± 20,69	233,40 ± 13,32	p=0,8232, Kruskal- Wallis test
	Statistika	p=0,9273, Mann- Whitney U test	p=0,5468, Mann- Whitney U test	p=0,4277, Mann- Whitney U test	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 20. Koncentracija DHEAS-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, nositelja različitih alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*.

rs2637125	Aleli	Α	G	Statistika
				p=0,4640,
Koncentracija DHEAS-a u	Kontrola	$234,80 \pm 19,15$	$220,70 \pm 10,99$	Mann-Whitney
				U test
	Demencija			p=0,7183,
plazmi (ng/mi)		221.60 ± 20.28	$229,20 \pm 11,18$	Mann-Whitney
				U test
		p=0,5511,	p=0,7562,	
	Statistika	Mann-Whitney	Mann-Whitney	
		U test	U test	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 21. Koncentracija DHEAS-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom,

nositelja homozigotnih genotipova u odnosu na nositelje alela polimorfizma rs2637125 gena SULT2A1.

rs2637125	Nositelji	AA	G	Statistika
	Vantuala	245.00 + 60.00	220.70 ± 10.00	p=0,6637,
	Kontrola	$243,00 \pm 00,80$	$220,70 \pm 10,99$	Mann-Whitney U test
	Demencija	246 60 + 07 22	220.20 ± 11.19	p=0,8536,
Koncentracija		$240,00 \pm 97,22$	$229,20 \pm 11,18$	Mann-Whitney U test
DHEAS-a u		GG	Α	
plazmi (ng/ml)	IZ a ména la	215.90 + 12.22	224.90 ± 10.15	p=0,3347,
	Kontrola	$215,80 \pm 13,23$	$234,80 \pm 19,15$	Mann-Whitney U test
	Domonoilio	222 40 + 12 22	221.60 ± 20.29	p=0,5979,
	Demencija	$233,40 \pm 13,32$	$221,00 \pm 20,28$	Mann-Whitney U test

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Vezano za polimorfizam rs6265 gena *BDNF* utvrđene su značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi između kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom u nositelja genotipa AG (p=0,0009, Mann-Whitney U test), alela A (p=0,0003, Mann-Whitney U test) i alela G (p=0,029, Mann-Whitney U test) (**Tablice 22.** i **23.**).

Tablica 22. Koncentracija BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, nositelja različitih genotipova polimorfizma rs6265 gena *BDNF*.

rs6265	Genotipovi	AA	AG	GG	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi (ng/ml)	Kontrola	$0,\!48 \pm 0,\!15$	$0{,}50\pm0{,}07$	$0,39 \pm 0,06$	p=0,0627,
					Kruskal-
					Wallis test
	Demencija	0,41 ± 0,16	$1,\!03\pm0,\!70$	0,50 ± 0,15	p=0,6374,
					Kruskal-
					Wallis test
	Statistika	p=0,1810,	p=0,0009,	p=0,4617,	
		Mann-	Mann-	Mann-	
		Whitney U	Whitney U	Whitney U	
		test	test	test	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Tablica 23. Koncentracija BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, nositelja različitih alela polimorfizma rs6265 gena *BDNF*.

rs6265	Aleli	Α	G	Statistika		
V	Kontrola	$0{,}50\pm0{,}06$	$0,\!43\pm0,\!04$	p=0,0949,		
BDNF-a u plazmi (ng/ml)				Mann-Whitney U test		
	Demencija	$0,\!96\pm0,\!62$	$0,\!70\pm0,\!27$	p=0,8617,		
				Mann-Whitney U test		
		p=0,0003,	p=0,0286,			
	Statistika	Mann-	Mann-			
		Whitney U	Whitney U			
		test	test			

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Nadalje, vezano za polimorfizam rs6265 gena *BDNF* utvrđene su i značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi između kontrolnih ispitanika koji su nositelji genotipa GG u odnosu na nositelje alela A (p=0,023, Mann-Whitney U test) (Tablica 24.).

Tablica 24. Koncentracija BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, nositelja homozigotnih genotipova u odnosu na nositelje alela polimorfizma rs6265 gena *BDNF*.

rs6265	Nositelji	AA	G	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi (ng/ml)	Kontrola	$0,\!48\pm0,\!15$	$0,\!43\pm0,\!04$	p=0,2409,
				Mann-Whitney U test
	Demencija	$0,\!41 \pm 0,\!16$	$0,\!46\pm0,\!13$	p=0,7016,
				Mann-Whitney U test
		GG	Α	
	Kontrola	$0,\!39\pm0,\!06$	$0{,}50\pm0{,}06$	p=0,0225 ,
				Mann-Whitney U test
	Domonoiio	0.50 ± 0.15	0.06 ± 0.62	p=0,5405,
				_

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna greška rezultata 137 kontrolnih ispitanika i 232 ispitanika s demencijom.

Ovi rezultati pokazuju da su ispitanici s demencijom nositelji genotipa AG, ili pojedinačnih alela A i G, polimorfizma rs6265 gena *BDNF* imali značajno više koncentracije BDNF-a u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike.

4.3.3. Ekspresija gena BDNF

U uzorcima izolirane RNA iz krvi kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom dodatno je utvrđena i relativna ekspresija gena *BDNF* metodom qPCR. Rezultati su pokazali da nije bilo značajne razlike u relativnoj ekspresiji *BDNF*-a između kontrolnih ispitanika i ispitanika s demencijom, iako je vidljiv blagi pad ekspresije ovog gena u skupini ispitanika s demencijom u odnosu na kontrolne ispitanike (**Slika 83.**).





5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj DHEA(S)-a i BDNF-a u modelima AB-a i VaD-a *in vitro*

Neuroprotektivno djelovanje DHEA(S)-a i BDNF-a istraženo je u primarnim neuronima miševa C57BL/6 i stanicama SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka. Najprije je u kulturi primarnih neurona testirana toksičnost monomera, oligomera i polimera A β_{42} , a zatim je u tako optimiziranom modelu AB-a *in vitro* utvrđena optimalna neuroprotektivna doza DHEA(S)-a i BDNF-a. Obje vrste stanica potom su izložene 10 μ M oligomerima A β_{42} (24 h, model AB-a) ili OGD/R-u (16+24 h, model VaD-a) uz tretman DHEA(S)-om (1 μ M) i BDNF-om (100 ng/ml). Analizirani su mehanizmi ozljede u modelu AB-a i VaD-a te učinci tretmana DHEA(S)-om i BDNF-om na vijabilnost stanica te ekspresiju gena i proteina PI3K, AKT, Bcl-2, Bax i omjera ekspresije Bax/Bcl-2. Kontrolnu skupinu činile su stanice izložene otapalu HFIP (model AB-a) ili uvjetima s kisikom i kompletiranim medijem za rast stanica (model VaD-a).

Toksičnost 0,1, 1 i 10 μ M monomera, oligomera i polimera A β_{42} tijekom 24 h ispitana je mjerenjem stanične vijabilnosti u primarnim neuronima. Svi oblici A β_{42} bili su toksični za primarne neurone u koncentraciji od 10 μ M, pri čemu su oligomeri A β_{42} izazvali najveći pad stanične vijabilnosti. Neuroni su potom izloženi 0,1, 1 i 10 μ M oligomerima A β_{42} tijekom 24, 48 i 72 h. Stanična vijabilnost bila je značajno smanjena pri 1 i 10 μ M u svim vremenskim intervalima, bez dodatnog pogoršanja tijekom vremena, stoga je period izloženosti oligomerima A β_{42} od 24 h odabran za uspostavu modela AB-a u staničnoj kulturi.

Među brojnim hipotezama nastanka AB-a, amiloidna hipoteza i dalje predstavlja najprihvaćeniji model patogeneze AB-a [6], prema kojoj su oligomeri A β , posebno A β_{42} , ključni čimbenici tog procesa [97]. U patološkim uvjetima, monomeri A β prvo formiraju oligomere, koji zatim prolaze strukturne promjene iz α -helikalnog u β -pločasti oblik, što potiče njihov toksični učinak [360]. Sljedeća faza uključuje prelazak oligomera A β u topive protofibrile, koji se udružuju u netopive fibrile, čineći osnovne komponente amiloidnih plakova [361]. Prvotno se smatralo da su netopivi fibrili glavni uzrok oštećenja neurona [68], no novija istraživanja upućuju da su intermedijarni topivi oligomeri A β toksičniji od monomera i zrelih fibrila [362,363]. Topivi oligomeri A β stupaju u interakciju s mikroglijom, astrocitima, krvnim žilama i neuronima, potičući različite štetne stanične odgovore koji dovode do disfunkcije i smrti neurona [364]. Štoviše, oligomeri A β mogu aktivirati različite apoptotske puteve [365]. Budući da amiloidna hipoteza pruža objašnjenje za formiranje amiloidnih plakova, često se koristi u istraživanjima novih dijagnostičkih metoda i terapijskih pristupa u AB-u [364].

5.1.1. Mehanizmi ozljede u modelima AB-a i VaD-a in vitro

U svrhu određivanja mehanizama ozljede u modelu AB-a, u primarnim neuronima izloženima 0,1, 1 i 10 μ M oligomerima A β_{42} tijekom 24 h provedene su analize staničnog metabolizma, integriteta stanične membrane i apoptotske aktivnosti. Rezultati su pokazali značajno smanjenje razina ATP-a, gubitak integriteta stanične membrane te povećanu aktivnost kaspaza 3 i 7, nakon tretmana neurona s 10 μ M oligomerima A β_{42} . Stoga je ova koncentracija oligomera A β_{42} , zajedno s prethodno odabranim vremenskim intervalom od 24 h, korištena kao model AB-a *in vitro* u daljnjim pokusima.

Pokazano je da oligomeri Aβ narušavaju funkciju mitohondrija [366-368], što rezultira neuravnoteženom mitohondrijskom dinamikom, fragmentacijom mitohondrija, smanjenom proizvodnjom ATP-a i povećanom propusnošću membrane [369]. Nekroza stanica proizlazi iz akutnog poremećaja staničnog metabolizma, što dovodi do smanjenja razina ATP-a, bubrenja organela, oštećenja membrane i lize stanica [370]. Iako su mitohondrijska disfunkcija i smanjenje ATP-a usko povezani s procesom nekroze [371], promjene u funkciji mitohondrija također mogu potaknuti ključne čimbenike apoptoze, poput oštećenja mitohondrijske DNA, povećanog stvaranja ROS-ova i oslobađenja citokroma C iz mitohondrija u citosol [369]. U toj signalnoj kaskadi, ključnu ulogu imaju kaspaze koje su uključene u apoptozu neurona nakon akutnog oštećenja [372]. Kaspaze se dijele na inicijatorske kaspaze 8 i 9 te efektorske kaspaze 3, 6 i 7 [373]. U mozgovima oboljelih od AB-a zabilježene su povišene razine kaspaze 3 [374], dok je fragmentacija aktina, potencijalnog supstrata kaspaze 3, utvrđena u neuronima i mikrogliji u blizini amiloidnih plakova [375]. U prethodnim istraživanjima, aktivacija kaspaze 3 povezana je s apoptozom kortikalnih neurona izazvanom Aβ25-35 [376], dok je Aβ42 izazvao aktivaciju kaspaza 3 i 7 u hipokampalnim neuronima štakora [377]. Nadalje, izlaganje oligomerima AB42 potaknulo je aktivaciju kaspaza 3 i 7 i u diferenciranim stanicama SH-SY5Y [142] i LAN-5 neuroblastoma u kulturi [365].

Kaspaze su ključni medijatori apoptoze, dok su njezini glavni regulatori pro- i antiapoptotski proteini iz obitelji Bcl-2 koji kontroliraju propusnost vanjske membrane mitohondrija [378]. Proteini obitelji Bcl-2 sadrže Bcl-2 homologne (BH) domene BH1, BH2, BH3 i BH4, koje su ključne za njihovu funkciju [379]. Antiapoptotski proteini, poput Bcl-2 i Bcl-xl, sprječavaju apoptozu, dok se proapoptotski proteini dijele na one koji imaju samo BH3 domenu (npr. Bim, Bid) i one s više BH domena (npr. Bax, Bak, Bok) [380]. Proapoptotski proteini Bax, Bak i Bok u aktivnom stanju stvaraju makropore na vanjskoj membrani mitohondrija, omogućujući oslobađanje proteina iz intermembranskog prostora u citosol [381]. Među oslobođenim

proteinima, citokrom C ima ključnu ulogu u formiranju apoptosoma, kompleksa koji aktivira kaskadu apoptoze, od inicijatorske kaspaze 9 do efektorske kaspaze 3, ključne za provedbu apoptoze [382].

U modelu AB-a u primarnim neuronima analizirana je aktivacija Bcl-2 i djelovanje oksidacijskog stresa, odnosno izloženost stanica ROS-ovima. Rezultati su pokazali značajno povećanje aktivacije Bcl-2, dok porast stanica izloženih oksidacijskom stresu nije utvrđen. Stanje oksidacijskog stresa nastaje kada proizvodnja ROS-ova, uključujući slobodne radikale poput superoksida i hidroksida te vodikov peroksid [383], premaši sposobnost antioksidacijske obrane organizma. ROS-ovi u neuronima mogu izazvati oštećenja DNA, proteina i lipida, što dovodi do neurotoksičnosti i smrti stanica. Kod oboljelih od AB-a uočene su povišene razine biljega oksidacijskog stresa, poput 8-hidroksi-2'deoksigvanozina [384] te produkata lipidne peroksidacije poput 4-hidroksi-2-nonenala [385]. Osjetljivost mozga na oksidacijskog kapaciteta [386–388], a povišene razine oksidacijskih biljega u bolesnika s AB-om dodatno potvrđuju povezanost oksidacijskog stresa s razvojem i progresijom bolesti [389–391].

Povećana aktivacija antiapoptotskog proteina Bcl-2 u modelu AB-a može upućivati na kompenzacijski protektivni učinak protiv apoptoze izazvane ozljedom primarnih neurona, dok izostanak povećane izloženosti stanica ROS-ovima sugerira da izazivanje značajnog oksidacijskog stresa nije primarni mehanizam neurotoksičnog učinka oligomera A β_{42} u ovim uvjetima. Iako je moguće da su ova dva procesa povezana, s obzirom na ulogu Bcl-2 u neutralizaciji slobodnih radikala i stabilizaciji stanica [392], izloženost oligomerima A β_{42} tijekom 24 h možda nije dovoljna za značajno podizanje razine oksidacijskog stresa. S druge strane, dobiveni rezulati upućuju da bi apoptoza mogla biti glavni mehanizam akutnog toksičnog djelovanja oligomera A β_{42} u primarnim neuronima.

Primjena oligomera Aβ₄₂ u primarnim neuronima izazvala je smanjenje razina ATP-a, gubitak integriteta stanične membrane te aktivaciju proteina Bcl-2, kao i kaspaza 3 i 7, upućujući na apoptozu i nekrozu stanica. Mehanizmi stanične smrti dalje su istraženi u modelima AB-a i VaD-a bojanjem stanica bojom Hoechst 33342 koja boji kompaktni kromatin apoptotskih staničnih jezgri i propidijevim jodidom, bojom koji ulazi samo u nekrotičke stanice s narušenim integritetom stanične membrane. Rezultati su pokazali blagi porast broja i apoptotskih i nekrotičkih stanica u oba modela demencija *in vitro*, s posebice izraženim značajnim promjenama u primarnim neuronima u modelu VaD-a. Povećana osjetljivost stanica SH-SY5Y

u modelu VaD-a potvrđuje općenito jači toksični učinak OGD/R-a, u usporedbi s akutnom primjenom oligomera Aβ₄₂.

Različiti agregati Aβ pokazuju različito ponašanje koje također ovisi o vrsti stanica [365,393]. Tumorske stanice SH-SY5Y vjerojatno su otpornije na Aβ u odnosu na primarne neurone. S druge strane, diferencirane stanice SH-SY5Y osjetljivije su na Aβ od nediferenciranih stanica zbog prisutnosti izduženih aksona [142]. Stanice SH-SY5Y često se koriste za proučavanje ABa zbog sposobnosti diferencijacije u zrele neurone [394], no u ovom su istraživanju korištene u nediferenciranom obliku jer se diferencijacija u kolinergičke neurone, kao modela AB-a, provodi dodavanjem BDNF-a, čiji je učinak bio predmet ovog istraživanja.

I druga su istraživanja pokazala da oligomeri A β_{42} u koncentraciji od 10 μM značajno potiču apoptozu u primarnim kortikalnim neuronima miševa C57BL/6 [395] te većina dosadašnjih istraživanja podupire apoptozu kao glavni mehanizam stanične smrti uzrokovane A β [396– 398], iako neki podaci upućuju i na primarnu ulogu nekroze [399]. U stanicama SH-SY5Y apoptoza započinje već nakon 6 h izlaganja 10 μM A β_{42} , pri čemu je nakon 12 h stanična vijabilnost smanjena na 60%, a nakon 24 h na 50% kontrolnih vrijednosti [400], dok je apoptoza potaknuta A β posebno izražena u diferenciranim stanicama SH-SY5Y [401,402].

Za uspostavu modela VaD-a korišten je postupak OGD/R, koji uzrokuje oštećenje neurona slično onom izazvanom ishemijom mozga. Tijekom ishemijskog moždanog udara dolazi do prekida krvotoka, što uzrokuje stvaranje ishemijskog središta u zahvaćenom području i okolnog dijela s kolateralnim krvotokom, koji djelomično ublažava oštećenja [403]. Ishod ishemije ovisi o mjestu, trajanju i intenzitetu oštećenja, pri čemu je nekrotička smrt neurona najizraženija u ishemijskom središtu [404]. Ova smrt posljedica je produljenog prekida krvotoka, što dovodi do smanjenja razina kisika i ATP-a, vala depolarizacije te nakupljanja kalcijevih iona u citosolu, što u konačnici rezultira nekrozom [404-406]. Smrt neurona kod moždanog udara kompleksan je proces koji osim nekroze uključuje i apoptozu uzrokovanu upalnim odgovorom, proizvodnju ROS-ova te oštećenja uzrokovana reperfuzijom [405]. Prethodna istraživanja na kortikalnim neuronima fetusa miša pokazala su da OGD izaziva potpunu smrt neurona već nakon 70 min [407]. Međutim, prisutnost glukoze u koncentracijama od 2 mM i 5,5 mM produžila je preživljavanje neurona na 8 i 14 h, dok je pri 20 mM glukoze vijabilnost stanica povećana na 40% i nakon 24 h [407]. Slično, istraživanja na stanicama SH-SY5Y pokazala su da tijekom anoksije, uz prisutnost glukoze, stanice ostaju vijabilne do 32 h, dok reoksigenacija tijekom 24 h blago smanjuje njihovu vijabilnost i povećava razinu ROS-ova [408]. S druge strane, stanice

SH-SY5Y izložene OGD-u pokazale su smrtnost od približno 50% nakon 16 h [408]. Osim navedenih, i druga su istraživanja potvrdila da OGD/R izaziva apoptozu i u primarnim mišjim neuronima i u diferenciranim stranicama SH-SY5Y [409].

5.1.2. Stanična vijabilnost u modelima AB-a i VaD-a in vitro

Koncentracija DHEA(S)-a i BDNF-a koja izaziva optimalan neuroprotektivni učinak određena je mjerenjem vijabilnosti primarnih neurona u modelu AB-a. Najveća stanična vijabilnost zabilježena je primjenom 1 µM DHEA(S)-a i 100 ng/ml BDNF-a, zbog čega su te doze odabrane za daljnje pokuse u modelima AB-a i VaD-a, i u primarnim neuronima i u stanicama SH-SY5Y.

U modelu AB-a, 1 μ M DHEAS i 100 ng/ml BDNF značajno su poboljšali vijabilnost primarnih neurona izloženim toksičnim oligomerima A β_{42} , dok je DHEA imala samo blagi učinak. S druge strane, u istom modelu AB-a, stanice SH-SY5Y nisu pokazale značajne promjene u vijabilnosti nakon izlaganja ovim lijekovima. U modelu VaD-a, 100 ng/ml BDNF značajno je poboljšao vijabilnost primarnih neurona, dok u stanicama SH-SY5Y nije imao značajan učinak. Ovi rezultati upućuju na varijabilne odgovore različitih vrsta stanica u različitim modelima demencije i ističu jače neuroprotektivno djelovanje BDNF-a u usporedbi s DHEA(S)-om.

Prethodna istraživanja pokazala su protektivne učinke DHEA(S)-a u pokusima deprivacije seruma [410], kisika i glukoze *in vitro* [241,257,411,412]. Također, utvrđena su neuroprotektivna svojstva BDNF-a protiv apoptoze izazvane deprivacijom seruma [413], a pokazano je i da inhibicija signalizacije BDNF-a može dovesti do prekomjernog nakupljanja A β [414]. U primarnim kortikalnim neuronima štakora i stanicama SH-SY5Y, BDNF je imao zaštitni učinak protiv toksičnosti izazvane oligomerima A β_{42} [17,415], a slični neuroprotektivni učinci DHEA(S)-a zabilježeni su u fetalnim hipokampalnim neuronima štakora i hipokampalnim stanicama HT-22 miša [416,417]. DHEA(S) je također smanjio toksičnost A β u stanicama B104 neuroblastoma i mišjim hipokampalnim neuronima [249,259], sprječavajući progresiju u kasnu apoptozu i nekrozu putem aktivacije signalnog puta PI3K-AKT [249]. Budući da signalni put PI3K-AKT sudjeluje u regulaciji ključnih bioloških procesa, uključujući proliferaciju, rast, preživljavanje stanica i metaboličke funkcije, njegova aktivacija bi mogla imati važnu ulogu u prevenciji neurotoksičnih posljedica [418]. Stoga je u nastavku ovog istraživanja ispitana uključenost signalnog puta PI3K-AKT u neuroprotektivne učinke DHEA(S)-a i BDNF-a.

5.1.3. Ekspresija odabranih gena i proteina u modelima AB-a i VaD-a *in vitro* U modelima AB-a i VaD-a, analiza ekspresije gena uključenih u signalni put PI3K-AKT (*PI3K*, *AKT*), ključnih regulatora apoptoze (*Bcl-2*, *Bax*) i njihovog omjera (*Bax/Bcl-2*), te odgovarajućih proteina, ukazala je na različite promjene u primarnim neuronima i stanicama SH-SY5Y u odgovoru na ozljedu toksičnim oligomerima A β_{42} i tretman 1 µM DHEA(S)-om i 100 ng/ml BDNF-om.

U modelu AB-a, u primarnim neuronima ekspresija svih analiziranih gena (*PI3K*, *AKT*, *Bcl-2*, *Bax*) i omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2* bili su povišeni nakon izlaganja oligomerima A β_{42} u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u stanica SH-SY5Y izloženim oligomerima A β_{42} , genska ekspresija uglavnom bila snižena, osim u slučaju gena *Bax* i omjera *Bax/Bcl-2*. Zbog nedovoljne količine proteina, ekspresija odgovarajućih proteina nije mogla biti određena u primarnim neuronima, zbog njihove manje gustoće u kulturi i nemogućnosti dijeljenja. S druge strane, u tumorskih stanica SH-SY5Y, koje se intenzivno dijele, nakon izlaganja oligomerima A β_{42} utvrđena je snižena ekspresija proteina PI3K, AKT i Bax te omjera proteinske ekspresije Bax/Bcl-2, osim proteina Bcl-2, čija je ekspresija bila povišena, što je uglavnom u skladu s dobivenim rezultatima genske ekspresije.

U modelu VaD-a, primarni neuroni izloženi OGD/R-u u odnosu na kontrolnu skupinu pokazali su sniženu ekspresiju svih ispitivanih gena, dok je omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2* bio povišen. Slično neuronima, stanice SH-SY5Y izložene OGD/R-u također su imale sniženu ekspresiju gena *AKT* i *Bax* te omjera gena *Bax/Bcl-2*, ali je ekspresija gena *PI3K* i *Bcl-2* bila povišena. Slični rezultati pokazani su i na proteinskoj razini gdje je ekspresija proteina PI3K, AKT, Bcl-2, Bax i omjera proteinske ekspresije Bax/Bcl-2 u stanicama SH-SY5Y izloženim OGD/R-u bila snižena u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tretman 1 μM DHEA(S)-om ili 100 ng/ml BDNF-om, u oba modela demencije i u obje vrste stanica uglavnom je djelovao na način da je vraćao razine ekspresije istraživanih gena i proteina promijenjene u ozljedi prema kontrolnim vrijednostima. Ovi rezultati upućuju da, u modelima AB-a i VaD-a *in vitro*, ozljeda stanica izaziva promjene u ekspresiji gena i proteina uključenih u signalne puteve povezane sa staničnim preživljavanjem i apoptozom, dok DHEA(S) i BDNF pokazuju potencijal za obnavljanje poremećene genske i proteinske ravnoteže i ponovno uspostavljanje homeostaze u stanici.

Prekomjerna aktivacija puta PI3K-AKT povezuje se s bolestima poput tumora i dijabetesa, a disfunkcija ovog signalnog puta važna je i u kontekstu kardiovaskularnih te

neurodegenerativnih bolesti [419]. Brojna istraživanja poduprla su višestruke uloge puta PI3K-AKT u regulaciji rasta i diferencijacije stanica, staničnog ciklusa, upalnih reakcija, oksidacijskog stresa i autofagije [420-425]. Također, mnoga istraživanja uputila su na značajnu ulogu ključnih komponenti signalnog puta PI3K-AKT u patogenezi AB-a [426]. Naime, s obzirom da razni unutarstanični čimbenici, uključujući put PI3K-AKT, sudjeluju u regulaciji apoptoze putem kontrole aktivnosti kaspaze 3 [427], modifikacija ovog puta predložena je kao moguća terapija za modulaciju aktivnosti kaspaze 3 i usporavanje napredovanja AB-a [419,428]. Međutim, u osoba s AB-om zabilježena je prekomjerna inhibicija ovog puta, kao i promjene aktivnosti kaspaze 3 [419,429]. Unatoč tome što put PI3K-AKT obično regulira aktivnost kaspaze 3 i štiti stanice od smrti, istraživanja su pokazala da aktivirana kaspaza 3 može uzrokovati cijepanje AKT-a [430], pritom smanjujući njegovu zaštitnu funkciju. Promjene u opskrbi mozga krvlju, poput smanjenog protoka i hipoksije, smatraju se ranim događajima u razvoju AB-a [431,432], a poznato je da hipoksija aktivira kaspazu 3 kako bi zaštitila neurone od ishemijskog oštećenja [433]. Međutim, dok nizak protok krvi obično potiče aktivaciju puta PI3K-AKT [434], u AB-u to nije slučaj. Umjesto toga, nizak protok krvi može uzrokovati prekomjernu aktivaciju kaspaze 3, što dovodi do cijepanja AKT-a i njegovog smanjenog djelovanja.

Razlike u promjenama u genskoj ekspresiji između primarnih neurona i stanica SH-SY5Y u ovom istraživanju ističu složenost staničnog odgovora na stresore te važnost primjene različitih modela za dublje razumijevanje neuroprotektivnih mehanizama. Iako su u ovom istraživanju analizirane promjene u ekspresiji gena i proteina AKT, treba uzeti u obzir da prisutnost proteina ne znači nužno i njegovu funkcionalnu aktivnost. Aktivacija AKT-a ovisi o fosforilaciji na ključnim aminokiselinama (Thr308 i Ser473) [435], čime se regulira njegovo signaliziranje unutar puta PI3K-AKT. Stoga bi buduće istraživanje trebalo uključiti analizu fosforiliranog AKT-a kako bi se stekao bolji uvid u njegovu aktivnost u modelima AB-a i VaD-a.

5.2. Utjecaj DHEA(S)-a u modelima AB-a in vivo

Neuroprotektivni učinak dugotrajne primjene DHEA(S)-a istražen je u modelima AB-a *in vivo*, i to u farmakološki izazvanom modelu AB-a, uspostavljenom na miševima C57BL/6 injekcijom 100 μ M oligomera A β_{42} i.c.v., te u genetičkom modelu AB-a, korištenjem transgeničnih miševa 3xTg-AD. U genetičkom modelu AB-a, DHEAS otopljen u DMSO-u primijenjen je pomoću mikro-osmotskih pumpica implantiranih s.c. u interskapularno područje miševa 3xTg-AD tijekom 18 tjedana, dok je DHEA, zbog svoje lipofilne prirođe, otopljena u kukuruznom ulju i u farmakološkom modelu AB-a primijenjena i.p. tijekom 30 dana miševima C57BL/6 kojima su injicirani oligomeri A β_{42} i.c.v. Oba modela uključivala su tri skupine od po 5 do 7 mužjaka starih 9-10 mjeseci: skupinu s AB-om, skupinu s AB-om tretiranu DHEA(S)-om te kontrolnu skupinu koju su predstavljali transgenični miševi bez mutacija (3xTg(+/+)) s ugrađenom mikroosmotskom pumpicom ispunjenom DMSO-om tijekom 18 tjedana (genetički model AB-a), odnosno miševi C57BL/6 koji su stereotaksičkom injekcijom primili PBS i.c.v. i kroz 30 dana tretirani kukuruznim uljem i.p. (farmakološki izazvan model AB-a).

Neuroprotektivna uloga DHEA(S)-a ispitana je testovima kognitivnih sposobnosti, mobilnosti te ponašanja nalik anksioznom i depresivnom, analizom ekspresije gena *PI3K*, *AKT*, *Bcl-2*, *Bax* i omjera genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, te odgovarajućih proteina, kao i utvrđivanjem razina $A\beta_{42}$, tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokampusa životinja. Učinak primjene BDNF-a nije ispitan u modelima AB-a *in vivo*, budući da neka istraživanja upućuju da BDNF ne može prijeći BBB [436], međutim praćen je učinak tretmana DHEA(S)-om na koncentraciju BDNF-a u hipokampusu. Osim toga, neuroprotektivno djelovanje DHEA(S)-a u ovom istraživanju ispitano je samo u modelima AB-a *in vivo*, budući da je testiranje DHEA(S)-a u ishemijskoj ozljedi mozga na štakorima, kao modelu VaD-a *in vivo*, provedeno u ranijim istraživanjima koja upućuju na njegov antiapoptotski učinak [437,438].

5.2.1. Ponašanje životinja

U farmakološki izazvanom modelu AB-a, primjenom MWM-a nisu zabilježene značajne razlike između ispitivanih skupina miševa C57BL/6, što upućuje na očuvano prostorno pamćenje ovih životinja. Međutim, primjenom NORT-a, primjećeno je da je skupina AB imala oslabljeno kratkoročno vizualno pamćenje, dok je produljeno izlaganje DHEA-i pokazalo blagotvoran učinak na pamćenje. Primjenom OFT-a nije uočena promijenjena lokomotorna aktivnost u skupini AB, ali je u većoj mjeri primijećeno ponašanje nalik anksioznom, dok je tretman DHEA-om imao blagi anksiolitički učinak. Primjenom FST-a zabilježeni su blagi

znakovi ponašanja nalik depresivnom u skupini AB, pri čemu je tretman DHEA-om imao antidepresivno djelovanje.

S druge strane, u genetičkom modelu AB-a, miševi 3xTg-AD pokazali su izraženije kognitivne i ponašajne deficite u odnosu na kontrolnu skupinu. Oštećenje prostornog pamćenja miševa 3xTg-AD zabilježeno je primjenom MWM-a, dok su smanjeno kratkoročno vizualno i socijalno pamćenje primijećeni u SDT-u. Nadalje, primjenom OFT-a utvrđeno je da su miševi 3xTg-AD imali smanjenu lokomotornu aktivnost i izraženo anksiozno ponašanje u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su u ST-u opaženi znakovi depresivnog ponašanja. Dugotrajna primjena DHEAS-a značajno je poboljšala prostorno i kratkoročno vizualno pamćenje, potaknula socijalno ponašanje, smanjila anksioznost te ublažila depresivne simptome miševa 3xTg-AD. Ovi rezultati upućuju da genetički model vjernije oponaša karakteristična obilježja AB-a u usporedbi s farmakološki izazvanim modelom. Nadalje, dugotrajna primjena DHEAS-a pokazala se učinkovitijom od tretmana DHEA-om u ublažavanju kognitivnih, motoričkih i ponašajnih deficita u mišjim modelima AB-a.

U prethodnom istraživanju primjenom MWM-a utvrđeno je da su miševi 3xTg-AD imali oslabljeno prostorno pamćenje kao i kratkoročno vizualno pamćenje testirano SDT-om [348]. Nadalje, u usporedbi s kontrolnim miševima, miševi 3xTg-AD pokazali su smanjenu lokomotornu aktivnost primjenom OFT-a, te ponašanje nalik depresivnom u ST-u [348]. MWM se smatra "zlatnim standardom" u istraživanju AB-a [439], dok su testovi kratkoročnog vizualnog pamćenja i socijalnog ponašanja, poput SDT-a, također važni za razumijevanje patofiziologije bolesti. Oštećenje kratkoročnog pamćenja jedan je od ranih znakova AB-a, a nedavno istraživanje pokazalo je da se oštećenja kratkoročnog vizualnog pamćenja mogu javiti godinama prije kliničke dijagnoze fAD-a [440]. Smanjeno socijalno ponašanje može se tumačiti i kao manifestacija anksioznosti ili depresije, budući da može biti posljedica smanjenog istraživačkog nagona, ranije primjećenog u miševa 3xTg-AD [441,442]. Primjenom OFT-a također je zabilježena smanjena lokomotorna aktivnost miševa 3xTg-AD, vjerojatno kao rezultat smanjene motivacije. Ova pretpostavka proizlazi iz činjenice da su u MWM-u miševi 3xTg-AD pokazali usporedive razine plivanja s kontrolnom skupinom miševa. U MWM-u, glavna je motivacija bijeg životinja iz neugodne situacije pronalaskom suhog područja, što potiče njihovu pokretljivost. Nasuprot tome, u OFT-u se znatiželja životinje za istraživanjem okoline suprotstavlja prirodnoj potrebi životinja za sigurnošću, odnosno kretanjem uz rubove polja ili pak ukočenošću kao posljedicom anksioznosti. Manja brzina kretanja i prijeđena udaljenost u ovom testu mogu biti pokazatelji anksioznosti, što je u skladu s prethodno

primijećenom anksioznošću miševa 3xTg-AD, unatoč odsustvu promjena u lokomotornoj aktivnosti [443]. U ST-u, smanjena motivacija životinja za čišćenjem dlake poprskane saharozom interpretirana je kao manifestacija depresivnog ponašanja. Iako su se miševi 3xTg-AD nakon prskanja saharozom brzo počeli čistiti, nisu nastavili istim intenzitetom čišćenja kao kontrolni miševi, što je u skladu s rezultatima ranijih procjena depresivnog ponašanja miševa 3xTg-AD bodovanjem stanja njihovog krzna [444]. Ovi podaci u skladu su s činjenicom da neurodegeneracija regija mozga povezanih s emocijama može doprinijeti razvoju anksioznosti i depresije u osoba s AB-om. U ranim fazama bolesti, anksioznost i depresija mogu se pojaviti kao psihološka reakcija na dijagnozu i kao posljedica poteškoća u suočavanju s progresijom bolesti. Međutim, u kasnijim stupnjevima AB-a kognitivno propadanje dovodi do smanjenih emocionalnih odgovora [445].

Injekcija oligomera A β_{42} u mozak, koja simulira toksičnost A β u procesu formiranja amiloidnih plakova, predložena je također kao vrijedan model za proučavanje AB-a na životinjama [446,447]. AB je prevenstveno sporadični poremećaj, zbog čega je ključno identificirati toksine prisutne u mozgu oboljelih, kao i disfunkcionalne signalne puteve, kako bi se otvorio put razvoju novih i učinkovitijih terapijskih pristupa. Injekcija oligomera A β_{42} i.c.v. kod miševa može izazvati značajnu neurodegeneraciju, upalni odgovor i kognitivna oštećenja, uključujući deficite u učenju i pamćenju [446,448]. Glavna prednost primjene i.c.v. je izravna dostava u mozak, pri čemu se učinkovito zaobilazi BBB, dok se injicirani spojevi rasprostranjuju putem CSF-a [449]. Prethodna istraživanja pokazala su da su miševi koji su primili injekciju oligomera Aβ₄₂ i.c.v. dulje tražili platformu i kraće vrijeme provodili u odgovarajućem kvadrantu prilikom primjene MWM-a, uz izražene deficite kratkoročnog vizualnog pamćenja u NORT-u [450]. Također su zabilježeni znakovi depresivnog ponašanja tijekom provođenja FST-a već 24 h nakon infuzije 100 µM Aβ₄₂ i.c.v. [451]. Međutim, u našem istraživanju nisu opažene značajne razlike u ponašanju miševa C57BL/6 između ispitivanih skupina. Moguće je da jednokratno primijenjena doza oligomera A β_{42} u koncentraciji od 100 μ M nije bila dostatna za izazivanje izraženih kognitivnih i ponašajnih deficita ili da je potrebno više vremena kako bi se oštećenja manifestirala. Također, nije isključena mogućnost da su kompenzacijski mehanizmi prikrili očekivane toksične učinke oligomera Aβ42. Dodatno, u OFT-u nisu zabilježene značajne promjene u mobilnosti životinja, što može biti posljedica činjenice da se motorički deficiti u AB-u obično pojavljuju u kasnijim stupnjevima bolesti [452].

Genetički model AB-a omogućuje postupno nakupljanje toksičnih peptida i razvoj neuropatoloških promjena tijekom duljeg vremenskog razdoblja, što bolje oponaša prirodni
tijek bolesti i dovodi do izraženijih kognitivnih i ponašajnih promjena. Nasuprot tome, moguće je da farmakološki izazvani model AB-a ne izaziva jednako snažne ili dugotrajne neurodegenerativne promjene. Primijećeni blaži učinci primjene DHEA-e u usporedbi s DHEAS-om mogli bi se objasniti kraćim trajanjem tretmana (30 dana naspram 18 tjedana), koje je bilo nužno zbog primjene i.p. i smanjenja stresa u životinja, pogotovo ako se uzme u obzir da je DHEAS primijenjivan u nižoj koncentraciji (1 mg/kg) u odnosu na DHEA-u (10 mg/kg), zbog ograničenja volumena mikro-osmotske pumpice. Naime, dobiveni rezultati upućuju da dugotrajniji tretman (18 tjedana) nižom koncentracijom DHEAS-a pruža učinkovitije neuroprotektivne učinke u usporedbi s kraćom primjenom (30 dana) više doze DHEA-e. Također postoji mogućnost da je DHEA, primijenjena 24 h nakon injekcije oligomera Aβ42, djelovala protektivno i spriječila nastanak značajnih oštećenja u mozgu u ranoj fazi bolesti, što bi moglo upućivati na terapijski potencijal DHEA-e u ranim stupnjevima AB-a ili na njezin preventivni učinak prije početka stvaranja amiloidnih plakova u mozgu. Jedno od ograničenja ovog istraživanja je da su korišteni isključivo mužjaci miševa C57BL/6 i 3xTg-AD, a poznato je da su obilježja AB-a izraženija u ženki ovih miševa [453]. Dodatno, u istraživanju je korišten najmanji potreban broj životinja u skladu s etičkim smjernicama principa 3R (replacement, reduction, refinement) te opsegom provedenih metoda.

Iako su u osoba s demencijom uočeni pozitivni učinci DHEA(S)-a [263], za sada nema dovoljno dokaza da ovaj neurosteroid poboljšava mentalne sposobnosti i pamćenje u zdravih pojedinaca [454–456]. Pokazano je da DHEA(S) može imati pozitivan učinak na učenje i pamćenje u osoba s niskim endogenim razinama ovog steroida, iako su neka istraživanja ove rezultate dovela u pitanje [266,457]. Dodatno, zbog svoje uloge u regulaciji neurotransmitora, posebno serotonina i dopamina, DHEA(S) može utjecati na smanjenje simptoma depresije [458], koji su česti u oboljelih od AB-a i povezani s nižim razinama ovog steroida u mozgu [459]. Prethodna istraživanja pokazala su da tretman DHEAS-om u miševa s AB-om poboljšava kognitivne funkcije i smanjuje nakupljanje Aβ [460]. Također, brojna istraživanja potvrdila su neuroprotektivne učinke DHEA(S)-a protiv toksičnosti Aβ u miševa [461–463] te njegovo pozitivno djelovanje na pamćenje u miševa i štakora [464,465]. U skladu s time, sintetski enantiomeri ent-PREGS (pregnenolon sulfat) i ent-DHEAS pokazali su se učinkovitima u sprječavanju poremećaja pamćenja izazvanih primjenom Aβ₂₅₋₃₅ u mužjaka miševa [259].

5.2.2. Ekspresija odabranih gena i proteina u homogenatima hipokampusa životinja

U homogenatima hipokampusa miševa analizirana je ekspresija gena *PI3K*, *AKT*, *Bcl-2*, *Bax* i omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2* te ekspresija pripadajućih proteina. Za analizu ekspresije odabran je hipokampus budući da je uz korteks ova regija mozga najviše pogođena u AB-u [466]. Također je utvrđeno da se amiloidni plakovi najprije formiraju u hipokampusu miševa 3xTg-AD u dobi od 9-12 mjeseci, dok su rijetko uočeni u korteksu [467].

U farmakološki izazvanom modelu AB-a, u miševa C57BL/6 zabilježena je snižena ekspresija svih analiziranih gena (*PI3K*, *AKT*, *Bcl-2*, *Bax*) i omjera genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, nakon primjene oligomera Aβ₄₂ i.c.v., što je u skladu s rezultatima dobivenim u modelu AB-a *in vitro* u primarnim neuronima ovih miševa. Nasuprot tome, ekspresija pripadajućih proteina PI3K, AKT, Bcl-2, Bax i omjer proteinske ekspresije Bax/Bcl-2 bila je povišena u skupini miševa s AB-om u odnosu na kontrolnu skupinu. U genetičkom modelu AB-a, ekspresija gena *PI3K* i *Bax*, kao i omjer genske ekspresije *Bax/Bcl-2*, bili su sniženi u miševa 3xTg-AD, dok je ekspresija gena *AKT* i *Bcl-2* bila povišena. Ekspresija svih analiziranih proteina u miševa 3xTg-AD bila je također snižena u odnosu na kontrolnu skupinu, osim omjera proteinske ekspresije Bax/Bcl-2.

Neurodegeneraciju u farmakološki izazvanom modelu AB-a potiče primjena egzogenog toksičnog A β , što uzrokuje akutni stres i upalne reakcije. Ove promjene dalje dovode do promjena u ekspresiji gena uključenih u apoptozu i preživljavanje, dok razlike između genske i proteinske ekspresije upućuju na posttranskripcijsku regulaciju i promjene u stabilnosti i transportu proteina. S druge strane, u genetičkom modelu AB-a genske mutacije predstavljaju temelj kronične i progresivne patologije, što dovodi do drugačije regulacije molekularnih puteva. Povišena ekspresija gena *AKT* i *Bcl-2* upućuje na pokušaj stanica da spriječe apoptozu i promoviraju preživljavanje, dok je snižena ekspresija drugih gena i proteina znak narušene homeostaze i smanjenog kapaciteta za prilagodbu. DHEA(S) pokazuje protektivno djelovanje u oba modela AB-a *in vivo*, smanjujući promjene u ekspresiji gena i proteina, što ukazuje na njegovu ulogu u regulaciji homeostaze. Ovi rezultati ukazuju na potencijal DHEA(S)-a za terapijsku primjenu, osobito u obliku aditivne terapije u kombinaciji s drugim intervencijama.

Signalni put PI3K-AKT igra ključnu ulogu u formiranju amiloidnih plakova i NFT-ova u ABu [468], pa bi njegova aktivacija mogla odgoditi progresiju bolesti. Različite nizvodne mete ovog puta povezane su s razvojem AB-a, uključujući kinazu glikogen sintazu-3β (GSK-3β), koja je izravno uključena u stvaranje amiloidnih plakova i NFT-ova. Fosforilacija AKT-a inaktivira GSK-3β, čime se smanjuje fosforilacija proteina tau i inhibira formiranje NFT-ova [469]. Smrt neurona u AB-u također je povezana s promjenama u ekspresiji antiapoptotskih proteina poput Bcl-2 i Bcl-xl, koji stabiliziraju mitohondrijsku membranu i sprječavaju oslobađanje citokroma C, a put PI3K-AKT regulira ekspresiju proteina uključenih u apoptozu, poput Bcl-2 i Bax [470]. Prekomjerna ekspresija homologa fosfataze i tenzina (phosphatase and tensin homolog, PTEN), koja je povezana s apoptozom, utječe na preživljavanje neurona, dok smanjenje razina PTEN-a može aktivirati AKT i imati neuroprotektivne učinke [471]. Osim toga, put PI3K-AKT igra značajnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti. U transgeničnom modelu AB-a in vivo, inhibicija PTEN-a pokazala se korisnom za očuvanje sinaptičke funkcije i poboljšanje kognicije [472]. Nadalje, istraživanja su pokazala da aktivacija puta PI3K-AKT usporava napredovanje AB-a u mišjem modelu, pokazujući neuroprotektivne učinke poput zaštite dopaminergičkih, kortikalnih i hipokampalnih neurona te inaktivacije mikroglije [419,473]. Dodatno, istraživanja na štakorima pokazala su da PI3K i meta rapamicina u sisavaca (the mammalian target of rapamycin, mTOR), glavnog nizvodnog supstrata AKT-a, igraju ključnu ulogu u jačanju dugoročnog pamćenja u hipokampusu [474]. Budući da je degeneracija hipokampusa prisutna u poremećajima pamćenja poput AB-a, ova istraživanja dodatno podupiru važnost puta PI3K-AKT u neurodegenerativnim procesima [475].

5.2.3. Koncentracija Aβ₄₂, tau, DHEAS-a i BDNF-a u homogenatima hipokampusa životinja

U homogenatima hipokampusa životinja izmjerene su koncentracije A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a. Rezultati su pokazali da u oba modela AB-a *in vivo* nije bilo značajne razlike u njihovoj koncentraciji između tri ispitivane skupine životinja.

U farmakološki izazvanom modelu AB-a, moguće objašnjenje rezultata leži u činjenici da je jednokratno primijenjena koncentracija oligomera A β_{42} (100 μ M) i.c.v. možda bila preniska te nije uspjela potaknuti značajne promjene u koncentracijama ovih analita u hipokampusu. U genetičkom modelu AB-a, moguće je da životinje nisu bile dovoljno stare, pa je formiranje amiloidnih plakova tek započelo, što ih čini teško mjerljivima. Iz istog razloga nisu zabilježene ni značajne promjene u razinama proteina tau. Nakupljanje proteina tau ključna je značajka AB-a, ali njegove razine variraju u različitim stupnjevima AB-a [476]. Osobe s AB-om koje imaju povišene razine proteina tau također pokazuju povećane koncentracije proteina povezanih s plastičnošću neurona. Nasuprot tome, osobe s AB-om koje imaju normalne razine proteina tau često imaju smanjene razine proteina povezanih s plastičnošću neurona, ali povećane razine proteina koji ukazuju na oštećenje BBB-a i barijere između BBB-a i CSF-a. Ove promjene

zabilježene su već u pretkliničkom stupnju AB-a i održavaju se kroz razvoj demencije, što upućuje da su povezane s temeljnim karakteristikama bolesti [476]. Istraživanja pokazuju da $A\beta_{42}$ može ubrzati patologiju tau *in vivo* [477]. Međutim, moguće je da koncentracija oligomera $A\beta_{42}$ primijenjena u farmakološki izazvanom modelu AB-a nije bila dovoljna za pokretanje ovog procesa. Dodatno, protein tau u miševima 3xTg-AD pokazuje manje izražene abnormalnosti u odnosu na protein tau u ljudima, koji ima veću sposobnost agregacije, što može otežati utvrđivanje povišenih razina tau u mišjem modelu AB-a [478]. Također, ovi rezultati mogu ukazivati na postojanje kompenzacijskih mehanizama koji, unatoč narušenoj homeostazi i promjenama u signalnim putevima, održavaju razine $A\beta_{42}$, tau, DHEAS-a i BDNF-a relativno stabilnima.

U hipokampusu miševa mjerena je koncentracija DHEAS-a, s obzirom na njegov dulji poluživot u odnosu na DHEA-u te činjenicu da je većina DHEA-e u krvotoku prisutna u stabilnijem obliku DHEAS-a [197,206]. Razine DHEAS-a nisu bile povišene u hipokampusu miševa tretiranih DHEA(S)-om, što može biti rezultat preniske primijenjene doze, prekratkog trajanja tretmana ili njegove raspodjele u organizmu, što je moglo uzrokovati da promjene koncentracija DHEAS-a u hipokampusu ostanu ispod praga utvrđivanja. Međutim, koncentracija DHEAS-a nije bila niti smanjena u skupini s AB-om, što može ukazivati na postojanje kompenzacijskih mehanizama koji održavaju njegove razine unatoč neurodegenerativnim promjenama. Naime, moguće je da organizam pokušava nadoknaditi smanjenje DHEAS-a tijekom neurodegenerativnih promjena u mozgu povećanom sintezom ili smanjenom razgradnjom ovog steroida.

Jedan od glavnih mehanizama neurodegenerativnog djelovanja $A\beta_{42}$ je smanjenje razine BDNF-a i narušavanje funkcije CREB-a (*cyclic adenosine monophosphate response elementbinding protein*), ključnog transkripcijskog regulatora i medijatora BDNF-a [479]. BDNF ima presudnu ulogu u poticanju neurogeneze, preživljavanju neurona, održavanju i rastu dendrita te u sinaptičkoj transmisiji, podražljivosti i plastičnosti [270,480,481]. Stoga je BDNF ključan čimbenik u procesu formiranja pamćenja u hipokampusu. Osim toga, BDNF sudjeluje u inicijaciji i održavanju rane i kasne faze LTP-a u hipokampusu, što odgovara kratkoročnom i dugoročnom pamćenju [482]. U putu PI3K-AKT, AKT fosforilira GSK3 β , čime inhibira njegovu aktivnost, a taj je proces ključan za odgovor neurona na stres i regulaciju aktivnosti transkripcijskih čimbenika poput CREB-a [483]. Jedan od potencijalnih mehanizama putem kojeg DHEA(S) potiče neurogenezu i preživljavanje neurona [484–486] mogao bi biti upravo promjena koncentracije BDNF-a u različitim regijama mozga [487–489]. Budući da DHEA aktivira receptore Trk, čime se pokreće put PI3K-AKT, u ovom istraživanju analizirane su koncentracije BDNF-a u hipokampusu miševa.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su odsutnost razlika u hipokampalnim razinama BDNF-a između analiziranih skupina životinja u oba modela AB-a in vivo, što bi moglo biti rezultat nekoliko čimbenika. Moguće da su primijenjena koncentracija DHEA(S)-a ili trajanje tretmana miševa nedovoljni za značajnu aktivaciju puta PI3K-AKT. Povećana aktivnost GSK3β, koja nije bila dovoljno inhibirana zbog slabog djelovanja puta PI3K-AKT, mogla je dodatno smanjiti aktivnost CREB-a, čime je utjecala na razinu BDNF-a. Također, moguće je da DHEA, unatoč vezanju na receptore Trk, nije uspjela učinkovito pokrenuti signalni odgovor zbog čimbenika poput kompetitivne inhibicije ili smanjene dostupnosti receptora. Dodatno, kompenzacijski mehanizmi ili alternativni signalni putevi mogli su imati ulogu u dodatnoj regulaciji BDNF-a, neutralizirajući očekivane razlike u koncentraciji BDNF-a u hipokampusu između analiziranih skupina miševa u oba modela AB-a in vivo. Ovi rezultati upućuju na složenost signalnih puteva uključenih u regulaciju BDNF-a u mozgu i važnost dodatnih istraživanja za razumijevanje ovih kompleksnih procesa. Također, moguće je da bi se promjene u razinama ovih čimbenika mogle zabilježiti u drugim regijama mozga, poput korteksa, s obzirom na njegovu ključnu ulogu u kognitivnim procesima te osjetljivosti na neuropatološke promjene u AB-u. Naime, korteks je jedna od prvih regija zahvaćenih amiloidnom i tau patologijom, što može rezultirati izraženijim promjenama u razinama BDNF-a i povezanih signalnih puteva u usporedbi s hipokampusom. Osim toga, različite regije mozga mogu imati specifične obrasce ekspresije BDNF-a i njegovih receptora, što može doprinijeti regionalnim razlikama u odgovoru na tretman DHEA(S)-om.

5.3. Ispitanici

Istraživanje je uključilo 369 ispitanika (202 muškarca i 167 žena), od kojih je 137 osoba s normalnom kognicijom služilo kao kontrolna skupina i 232 osobe s dijagnozom demencije (osobe s blagim i teškim NKP-om). Osobe s demencijom bile su značajno starije od ispitanika u kontrolnoj skupini, a u toj skupini zabilježen je i veći udio žena. Ova spolna razlika u skladu je s epidemiološkim podacima koji pokazuju da žene čine oko dvije trećine osoba s klinički dijagnosticiranom demencijom [490]. Primarni razlog tome je njihov dulji životni vijek [491], budući da je dob jedan od ključnih čimbenika rizika za razvoj demencije.

Analiza parametara iz krvi pokazala je da ispitanici s demencijom imaju značajno višu razinu glukoze i nižu razinu ukupnog kolesterola u krvi u usporedbi s osobama u kontrolnoj skupini, dok u ostalim krvnim parametrima nije utvrđena značajna razlika između analiziranih skupina. Ovi rezultati upućuju na moguću povezanost metaboličkih promjena s progresijom kognitivnog oštećenja. Povišena razina glukoze u krvi može biti posljedica inzulinske rezistencije i smanjenog metabolizma glukoze u mozgu, koji su prepoznati kao važni čimbenici rizika za razvoj demencije [492]. AB je toliko usko povezana s dijabetesom da se često naziva "dijabetesom tipa 3", a pad metabolizma glukoze u mozgu može se primijetiti čak i 10 godina prije pojave simptoma AB-a [493]. S druge strane, kolesterol je ključan za fiziologiju neurona tijekom razvoja i u odrasloj dobi, predstavlja glavnu komponentu staničnih membrana i prekursor je steroidnih hormona, stoga bi smanjenje razina kolesterola moglo biti povezano sa smanjenom koncentracijom DHEA(S)-a u osoba s demencijom [494]. Osim toga, smanjenje razina kolesterola u skladu je s prethodnim istraživanjima [495], dok neka istraživanja upućuju da visoke razine kolesterola u kasnijoj životnoj dobi mogu smanjiti ili, pak, povećati rizik od razvoja AB-a i VaD-a [496-501]. Razlike između vrijednosti razina glukoze i ukupnog kolesterola u krvi nisu bile velike između kontrolne skupine i demencije u ovom istraživanju, što je u skladu s činjenicom da je većina ispitanika s demencijom imala blagi stupanj demencije (173 osobe s blagim i 59 osoba s teškim NKP-om).

U skladu s dijagnozom, ispitanici s demencijom imali su značajno niži broj bodova na ljestvicama MMSE i CDT u usporedbi s ispitanicima u kontrolnoj skupini. Međutim, u broju bodova na ljestvici ADAS-Cog nije utvrđena značajna razlika između ispitanika s demencijom i kontrolnih ispitanika. Ovi rezultati upućuju da su ljestvice MMSE i CDT bolje u razlikovanju normalne kognicije od demencije od ljestvice ADAS-Cog, koja je razvijena za procjenu učinkovitosti lijekova u kliničkim ispitivanjima AB-a [502]. Unatoč uspješnoj primjeni u kliničkim ispitivanjima simptomatskog liječenja osoba s blagim do teškim stupnjem AB-a

[355], njezina primjena je ograničena u istraživanjima ranijih stupnjeva AB-a zbog nedovoljne osjetljivosti [503]. Osobe s blagim ili umjerenim stupnjem AB-a u brojnim parametrima ljestvice ADAS-Cog postižu maksimalne rezultate [504,505], što upućuje na ograničenu informativnost ove ljestvice u istraživanjima ranijih faza bolesti, što bi mogao biti slučaj i u ovom istraživanju.

5.3.1. Koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi

Multiplom regresijom utvrđeno je da dob i spol ispitanika nemaju značajan utjecaj na koncentraciju DHEAS-a i BDNF-a u plazmi, zbog čega ove varijable nisu uključene u daljnje analize. Također, Spearmanovom korelacijom nije utvrđena značajnu povezanost dobi i rezultata na ljestvicama CDT i ADAS-Cog s koncentracijama DHEAS-a i BDNF-a. Istraživanje je obuhvatilo osobe relativno starije životne dobi (69±6 godina), a prethodna istraživanja potvrdila su negativnu povezanost koncentracija DHEA(S)-a i BDNF-a s dobi [506,507]. Međutim, utvrđena je značajna negativna povezanost koncentracija DHEAS-a i BDNF-a u plazmi s brojem bodova na ljestvici MMSE te je dalje utvrđeno da su ispitanici s demencijom imali značajno niže razine DHEAS-a i više razine BDNF-a u plazmi u odnosu na ispitanike u kontrolnoj skupini.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da su razine DHEA(S)-a u plazmi i serumu osoba s AB-om niže u usporedbi sa zdravim pojedincima starije dobi [234,236–238,494,508–510]. Ova promjena može biti posljedica patološkog procesa ili potencijalni čimbenik rizika za razvoj bolesti. Međutim postoje i istraživanja koja su zabilježila povišene razine DHEA(S)-a u serumu i CSF-u osoba s AB-om [511–514]. Nadalje, meta-analiza koja je obuhvatila 31 istraživanje usporedila je koncentracije DHEA(S)-a u osoba s AB-om i zdravih ispitanika, analizirajući uzorke plazme, seruma i CSF-a [260]. Rezultati nisu uputili na jasnu povezanost između koncentracije DHEA-e i AB-a, osim u istraživanjima koja su uključila osobe starije od 80 godina. Ipak, niže razine DHEAS-a zabilježene su u oboljelih od AB-a u odnosu na zdrave ispitanike [260]. Osim toga, smanjene koncentracije DHEAS-a primjećene su u uzorcima mozga *postmortem* i CSF-a osoba s AB-om [236] te u plazmi osoba s MCI-jem i AB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima [515]. Ovi rezultati također upućuju na potencijalni neuroprotektivni učinak DHEAS-a i naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se razjasnila njegova povezanost s patogenezom i progresijom demencije te potencijal DHEAS-a kao nove terapijske mete.

Prethodna istraživanja razina BDNF-a u plazmi u osoba s AB-om također donose proturječne rezultate. Dok su neka istraživanja utvrdila smanjenje razina BDNF-a u plazmi osoba s AB-om [516-519], druga nisu pronašla razlike ili su čak zabilježila povišene koncentracije BDNF-a [520-524], kao što je slučaj u ovom istraživanju. U osoba u ranoj fazi AB-a zabilježene su više razine BDNF-a u plazmi i serumu u usporedbi s kasnijim stupnjevima bolesti [520,524-526], što je u skladu s ovim istraživanjem koje je uključilo 173 ispitanika s blagim NKP-om i 59 s teškim NKP-om. Također, u uzorcima mozga postmortem oboljelih od AB-a pronađene su povećane razine BDNF-a i njegovog receptora TrkB [18,527]. Istraživanja koja su pokazala da BDNF može prijeći BBB [528], te da postoje slične i povezane promjene koncentracija BDNFa u perifernoj krvi i mozgu [529], upućuju da bi BDNF mogao poslužiti kao periferni biljeg demencije. Brojne meta-analize proučavale su promjene perifernog BDNF-a tijekom nastanka i progresije AB-a. Pokazano je da oboljeli od AB-a imaju značajno niže razine BDNF-a u perifernoj krvi u odnosu na zdrave osobe [530] te da su više razine BDNF-a u serumu povezane s nižim rizikom od demencije [531]. U usporedbi sa zdravim ispitanicima, razine BDNF-a u krvi prvo rastu u ranim stupnjevima AB-a, a zatim padaju u bolesnika s umjerenim ili teškim stupnjem bolesti [532]. Početni porast razina BDNF-a u krvi mogao bi biti rezultat kompenzacijskih mehanizama koji se aktiviraju u ranim stadijima bolesti, a kako bolest napreduje kompenzacijski mehanizmi počinju slabiti, dovodeći do smanjenja razina BDNF-a u perifernoj krvi [323]. Nadalje, pojedina istraživanja zabilježila su smanjene razine BDNF-a u serumu ispitanika s AB-om u odnosu na ispitanike s VaD-om i zdrave ispitanike [526].

U ovom istraživanju za određivanje periferne koncentracije BDNF-a korištena je plazma ispitanika koja se smatra pouzdanijim pokazateljem stanja organizma u usporedbi s njegovom koncentracijom u serumu [533]. Naime, koncentracija BDNF-a u serumu više je od 100 puta veća od njegove koncentracije u plazmi zbog otpuštanja BDNF-a iz trombocita tijekom njihove degranulacije u procesu zgrušavanja krvi [533,534]. Također je poznato da razine BDNF-a u perifernoj krvi mogu biti regulirane i od strane drugih vrsta stanica, poput mononuklearnih i epitelnih stanica [535], što bi moglo utjecati na rezultate istraživanja, zbog čega plazma predstavlja bolji izvor za utvrđivanje periferne koncentracije BDNF-a.

ProBDNF je pronađen u uzorcima ljudske krvi s omjerom proBDNF-a prema BDNF-u od 1:5 u trombocitima i 10:1 u plazmi [323], a snižene razine proBDNF-a i BDNF-a javljaju se u ranim fazama progresije AB-a [19]. Međutim, iako su niže razine BDNF-a u mozgu povezane s napredovanjem bolesti, postoje proturječni rezultati u pogledu smanjenja BDNF-a kod osoba s AB-om. Većina kliničkih istraživanja analizirala je ukupne koncentracije BDNF-a pomoću metode ELISA, kao što je slučaj u ovom istraživanju, koja ne može pouzdano razlikovati proBDNF od BDNF-a [323]. Osim toga, razine BDNF-a smanjuju se tijekom prirodnog starenja, što upućuje da bi BDNF mogao biti koristan kao prognostički pokazatelj u mlađih osoba s povećanim rizikom od razvoja AB-a [536].

5.3.2. Polimorfizmi gena SULT2A1 i BDNF

Ovo istraživanje ispitalo je razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*, koji kodira za enzim odgovoran za pretvorbu DHEA-e u DHEAS, i polimorfizma rs6265 (Val66Met) gena *BDNF*, između osoba s demencijom i kontrolnih ispitanika. Također, istraženo je utječe li polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* na koncentraciju DHEAS-a, odnosno polimorfizam rs6265 gena *BDNF* na koncentraciju BDNF-a u plazmi ispitanika.

Raspodjela genotipova za polimorfizme rs2637125 gena *SULT2A1* i rs6265 gena *BDNF* u ispitanika demencijom i kontrolnih ispitanika bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom, što bi značilo da je učestalost genotipova i alela stabilna i da je križanje u populaciji nasumično, bez ometajućih vanjskih čimbenika. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u učestalosti genotipova i alela ovih polimorfizama između dviju skupina ispitanika. Također, koncentracije DHEAS-a u plazmi nisu se značajno razlikovale između nositelja različitih genotipova i alela polimorfizma rs2637125 gena *SULT2A1*. S druge strane, vezano za polimorfizam rs6265 gena *BDNF* utvrđena je značajno veća koncentracija BDNF-a u plazmi u ispitanika s demencijom nositelja genotipa AG, alela A i G u odnosu na kontrolne ispitanike. Na temelju ovih rezultata, može se pretpostaviti da bi varijacije u polimorfizmu rs6265 gena *BDNF* nogle biti povezane s razinama BDNF-a u različitim stupnjevima demencije, dok polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* nije imao značajan utjecaj na koncentraciju DHEAS-a te nije povezan s razvojem demencije u ovom istraživanju.

Polimorfizam rs6265 u genu *BDNF* predstavlja česti funkcionalni SNP koji uzrokuje zamjenu valina sa metioninom na kodonu 66 (Val66Met, G196A) [537]. Ova varijanta utječe na unutarstanični transport proBDNF-a i izlučivanje BDNF-a [281]. Polimorfizam rs6265 također se nalazi u neravnoteži vezivanja (*linkage disequilibrium*) s drugim polimorfizmima gena *BDNF*, poput rs2030324 (C270T) i G712A, upućujući da se ovi polimorfizmi nasljeđuju zajedno u bloku što može utjecati na njihove međusobne interakcije i njihovu povezanost s nastankom i razvojem AB-a [538,539]. Meta-analiza koja je proučavala polimorfizme rs6265 i rs2030324 u genu *BDNF* pokazala je da alel A polimorfizma rs6265 može povećati rizik od AB-a u žena bijele rase i žena s LOAD-om, dok polimorfizam rs2030324 nije bio povezan s

AB-om [540]. Druga istraživanja također su povezala alel A polimorfizma rs6265 u genu *BDNF* s povećanim rizikom od AB-a u žena [541,542], što upućuje na spolno specifičnu ulogu BDNF-a u razvoju bolesti. Nadalje, u žena je pokazano da je polimorfizma rs6265 povezan s povećanim rizikom i brzinom prelaska iz subjektivnog kognitivnog pada u MCI, te iz MCI-ja u AB [543]. Druga istraživanja pokazale su da nositelji genotipa GG polimorfizma rs6265 imaju bolje kognitivne sposobnosti među starijim kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s AB-om [544]. S druge strane, istraživanja ovog polimorfizma gena *BDNF* u osoba s VaD-om su ograničena, iako je utvrđeno da genotip AA može ubrzati kognitivno oštećenje u osoba sa SIVD-om [545].

Vezano za polimorfizam gena *SULT2A1*, meta-analiza podataka iz cjelogenomskog asocijacijskog istraživanja (*genome-wide association studies*, GWAS) utvrdila je 8 neovisnih čestih SNP-ova povezanih s koncentracijama DHEAS-a u serumu, među kojima je i polimorfizam rs2637125 [220]. Međutim, kasnija istraživanja su pokazala da polimorfizam rs2637125 nema značajan utjecaj na individualne koncentracije DHEA-e i DHEAS-a, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, kao niti na omjer DHEA/DHEAS kao pokazatelja sposobnosti sulfatacije DHEA-e [546]. U skladu s time, istraživanje koje je proučavalo utjecaj 7 polimorfizama gena *SULT2A1* na razinu DHEAS-a u žena pokazalo je da su samo nositelji manje učestalog alela G jednog drugog polimorfizma rs182420 imali niže razine DHEAS-a u usporedbi s nositeljima genotipa A [221].

Iako je enzim SULT2A1 ključan za pretvorbu DHEA-e u DHEAS, moguće je da postoje i drugi mehanizmi, enzimi te geni koji reguliraju njegovu koncentraciju [220]. S druge strane, polimorfizam rs6265 gena *BDNF* mogao bi biti povezan s različitim stupnjevima demencije, stoga su potrebna daljna istraživanja. Nadalje, uz genetske čimbenike na razvoj kompleksnih poremećaja poput demencije, utječu i brojni drugi čimbenici poput okoliša, životnih navika, stresa, kao i njihova interakcija s brojnim genskim varijantama.

5.3.3. Ekspresija gena BDNF

Osim koncentracije BDNF-a u plazmi, u ovom istraživanju također je određena ekspresija gena *BDNF*. Iako rezultati nisu bili statistički značajni, zabilježeno je smanjenje ekspresije *BDNF*-a u ispitanika s demencijom u odnosu na kontrolne ispitanike, dok je povišena koncentracija BDNF-a prethodno primijećena u plazmi ispitanika s demencijom.

Ovi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su utvrdila smanjenu ekspresiju BDNF-a u uzorcima hipokampusa postmortem osoba s AB-om, upućujući da bi BDNF mogao igrati ulogu u progresivnoj atrofiji neurona u AB-u [547]. Također, smanjena ekspresija gena i proteina BDNF potvrđena je u parijetalnom i entorinalnom korteksu te hipokampusu oboljelih od AB-a [16,527,548–551]. U AB-u je uočena i smanjena signalizacija putem njegovog receptora TrkB [16,550,552], a u frontalnom i temporalnom korteksu te hipokampusu osoba s AB-om manje neurona eksprimira njegov dulji, funkcionalni oblik, dok je ekspresija skraćenog oblika povezana s nastankom amiloidnih plakova [549,553].

Iako je ekspresija *BDNF*-a bila smanjena, ta razlika nije bila statistički značajna, dok je koncentracija BDNF-a u plazmi bila značajno povišena. Ovaj naizgled proturječan rezultat mogao bi se objasniti kompenzacijskim mehanizmima pojačanog otpuštanja BDNF-a kao odgovora na smanjenu razinu. Također, povećana propusnost BBB-a mogla bi doprinijeti prelasku BDNF-a iz mozga u cirkulaciju, dok neuroupalni procesi i oksidacijski stres mogu negativno utjecati na njegovu gensku ekspresiju. Nadalje, epigenetske modifikacije na posttranskripcijskoj razini, poput regulacije putem *micro*RNA, mogle bi smanjiti sintezu proteina u mozgu, dok bi istovremeno njegova razgradnja u plazmi mogla biti usporena ili nepromijenjena.

6. ZAKLJUČAK

1. U istraživanjima *in vitro* na primarnim neuronima miševa C57BL/6 i stanicama SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka izloženim oligomerima A β_{42} , kao modelu AB-a, te OGD/R-u, kao modelu VaD-u, tretman DHEA(S)-om i BDNF-om pokazao je blage neuroprotektivne učinke na preživljenje stanica, vjerojatno djelujući na inhibiciju aktivnosti kaspaza 3 i 7, kao i na signalne puteve staničnog preživljenja i apoptoze PI3K-AKT i Bcl-2.

2. U istraživanjima na miševima C57BL/6 izloženim oligomerima A β_{42} , kao farmakološki izazvanom modelu AB-a, te transgeničnim miševima 3xTg-AD, kao genetičkom modelu AB-a, dugotrajna primjena DHEA(S)-a imala je blago homeostatsko djelovanje na kognitivne, motoričke i ponašajne deficite, te hipokampalne promjene u ekpresiji gena i proteina uključenih u signalne puteve PI3K-AKT i Bcl-2, ali nije utjecala na koncentraciju A β_{42} , tau, DHEAS-a i BDNF-a u hipokampusu.

3. Istraživanja na uzorcima krvi ispitanika pokazala su da osobe s demencijom imaju značajno smanjenu koncentraciju DHEAS-a i povećanu koncentraciju BDNF-a u plazmi, uz istovremeno sniženu ekspresiju gena *BDNF* u odnosu na kontrolnu skupinu. Ispitanici s demencijom nositelji genotipa AG, alela A i G polimorfizma rs6265 gena *BDNF* imali su značajno veću koncentraciju BDNF-a u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike, stoga bi varijacije u polimorfizmu rs6265 mogle biti povezane s razinama BDNF-a u različitim stupnjevima demencije, dok polimorfizam rs2637125 gena *SULT2A1* nije imao značajan utjecaj na koncentraciju DHEAS-a te nije povezan s razvojem demencije u ovom istraživanju.

4. Rezultati istraživanja koji su ukazali na blagu neuroprotektivnu ulogu DHEA(S)-a i BDNFa u staničnim i životinjskim modelima demencije, kao i na smanjenje razina DHEAS-a i potencijalno kompenzacijsko povećanje razina BDNF-a u plazmi, upućuju na njihov potencijal kao novih preventivnih i/ili aditivnih terapijskih pristupa, koji zahtijeva daljnja istraživanja.

7. LITERATURA

- Nichols, E.; Steinmetz, J.D.; Vollset, S.E.; Fukutaki, K.; Chalek, J.; Abd-Allah, F.; Abdoli, A.; Abualhasan, A.; Abu-Gharbieh, E.; Akram, T.T.; et al. Estimation of the Global Prevalence of Dementia in 2019 and Forecasted Prevalence in 2050: An Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet Public Heal. 2022, 7, e105–e125.
- Jönsson, L. The Personal Economic Burden of Dementia in Europe. Lancet Reg. Heal. -Eur. 2022, 20, 100472.
- 3. Alzheimer's Disease Puzzle: Delving into Pathogenesis Hypotheses. Aging Dis. **2024**, 15(1), 43-73.
- Bir, S.C.; Khan, M.W.; Javalkar, V.; Toledo, E.G.; Kelley, R.E. Emerging Concepts in Vascular Dementia: A Review. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2021, 30, 105864.
- 5. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimer's Dement. 2020, 16, 391–460.
- Hardy, J.A.; Higgins, G.A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. Science 1992, 256, 184–185.
- Cummings, J. Anti-Amyloid Monoclonal Antibodies Are Transformative Treatments That Redefine Alzheimer's Disease Therapeutics. Drugs 2023, 83, 569–576.
- 8. Lee, A.Y. Vascular Dementia. Chonnam Med. J. 2011, 47, 66.
- Wang, X.-X.; Zhang, B.; Xia, R.; Jia, Q.-Y. Inflammation, Apoptosis and Autophagy as Critical Players in Vascular Dementia. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2020, 24, 9601– 9614.
- Tannenbaum, C.; Barrett-Connor, E.; Laughlin, G.; Platt, R. A Longitudinal Study of Dehydroepiandrosterone Sulphate (DHEAS) Change in Older Men and Women: The Rancho Bernardo Study. Eur. J. Endocrinol. 2004, 717–725.
- Schumacher, M.; Weill-Engerer, S.; Liere, P.; Robert, F.; Franklin, R.J.M.; Garcia-Segura, L.M.; Lambert, J.J.; Mayo, W.; Melcangi, R.C.; Parducz, A.; et al. Steroid Hormones and Neurosteroids in Normal and Pathological Aging of the Nervous System. Prog. Neurobiol. 2003, 71, 3–29.
- Rahmani, A.; Shoae-Hassani, A.; Keyhanvar, P.; Kheradmand, D.; Darbandi-Azar, A. Dehydroepiandrosterone Stimulates Nerve Growth Factor and Brain Derived

Neurotrophic Factor in Cortical Neurons. Adv. Pharmacol. Sci. 2013, 2013, 1-7.

- Strac, D.S.; Konjevod, M.; Perkovic, M.N.; Tudor, L.; Erjavec, G.N.; Pivac, N. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulphate (DHEAS) in Alzheimer's Disease. Curr. Alzheimer Res. 2020, 17, 141–157.
- Bartkowska*, K.; Turlejski, K.; Djavadian, R. Neurotrophins and Their Receptors in Early Development of the Mammalian Nervous System. Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 2010, 70, 454–467.
- Ghosh, A.; Carnahan, J.; Greenberg, M.E. Requirement for BDNF in Activity-Dependent Survival of Cortical Neurons. Science (80-.). 1994, 263, 1618–1623.
- Garzon, D.; Yu, G.; Fahnestock, M. A New Brain-derived Neurotrophic Factor Transcript and Decrease Inbrain-derived Neurotrophic Factor Transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's Disease Parietal Cortex. J. Neurochem. 2002, 82, 1058–1064.
- Arancibia, S.; Silhol, M.; Moulière, F.; Meffre, J.; Höllinger, I.; Maurice, T.; Tapia-Arancibia, L. Protective Effect of BDNF against Beta-Amyloid Induced Neurotoxicity in Vitro and in Vivo in Rats. Neurobiol. Dis. 2008, 31, 316–326.
- Durany, N.; Michel, T.; Kurt, J.; Cruz-Sánchez, F.F.; Cervás-Navarro, J.; Riederer, P. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 Levels in Alzheimer's Disease Brains. Int. J. Dev. Neurosci. 2000, 18, 807–813.
- Peng, S.; Wuu, J.; Mufson, E.J.; Fahnestock, M. Precursor Form of Brain-derived Neurotrophic Factor and Mature Brain-derived Neurotrophic Factor Are Decreased in the Pre-clinical Stages of Alzheimer's Disease. J. Neurochem. 2005, 93, 1412–1421.
- Sousa, R.M.; Ferri, C.P.; Acosta, D.; Albanese, E.; Guerra, M.; Huang, Y.; Jacob, K.; Jotheeswaran, A.; Rodriguez, J.J.L.; Pichardo, G.R.; et al. Contribution of Chronic Diseases to Disability in Elderly People in Countries with Low and Middle Incomes: A 10/66 Dementia Research Group Population-Based Survey. Lancet 2009, 374, 1821– 1830.
- Reichstadt, J.; Depp, C.A.; Palinkas, L.A.; Jeste, D. V. Building Blocks of Successful Aging: A Focus Group Study of Older Adults' Perceived Contributors to Successful Aging. Am. J. Geriatr. Psychiatry 2007, 15, 194–201.
- 22. Baltes, P.B. The Aging Mind: Potential and Limits. Gerontologist 1993, 33, 580–594.

- Park, D.C.; Lautenschlager, G.; Hedden, T.; Davidson, N.S.; Smith, A.D.; Smith, P.K. Models of Visuospatial and Verbal Memory across the Adult Life Span. Psychol. Aging 2002, 17, 299–320.
- Cheng, S.-T. Cognitive Reserve and the Prevention of Dementia: The Role of Physical and Cognitive Activities. Curr. Psychiatry Rep. 2016, 18, 85.
- Salthouse, T.A. The Processing-Speed Theory of Adult Age Differences in Cognition. Psychol. Rev. 1996, 103, 403–428.
- Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C.P. The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. Alzheimer's Dement. 2013, 9, 63.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR); American Psychiatric Association: Arlington, VA. 2000, 1, ISBN 0-89042-334-2.
- American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; American Psychiatric Association. 2013, ISBN 0-89042-555-8.
- McDonald, W.M. Overview of Neurocognitive Disorders. Focus (Madison). 2017, 15, 4–12.
- Emmady, P.D.; Schoo, C.; Tadi, P. Major Neurocognitive Disorder (Dementia). [Updated 2022 Nov 19]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2024.
- Winblad, B.; Palmer, K.; Kivipelto, M.; Jelic, V.; Fratiglioni, L.; Wahlund, L. -O.; Nordberg, A.; Bäckman, L.; Albert, M.; Almkvist, O.; et al. Mild Cognitive Impairment – beyond Controversies, towards a Consensus: Report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. J. Intern. Med. 2004, 256, 240–246.
- Petersen, R.C. Mild Cognitive Impairment as a Diagnostic Entity. J. Intern. Med. 2004, 256, 183–194.
- Levy, R. Aging-Associated Cognitive Decline. Working Party of the International Psychogeriatric Association in Collaboration with the World Health Organization. Int. psychogeriatrics 1994, 6, 63–68.

- Hughes, C.P.; Berg, L.; Danziger, W.; Coben, L.A.; Martin, R.L. A New Clinical Scale for the Staging of Dementia. Br. J. Psychiatry 1982, 140, 566–572.
- Stokin, G.B.; Krell-Roesch, J.; Petersen, R.C.; Geda, Y.E. Mild Neurocognitive Disorder. Harv. Rev. Psychiatry 2015, 23, 368–376.
- Petersen, R.C.; Smith, G.E.; Waring, S.C.; Ivnik, R.J.; Kokmen, E.; Tangelos, E.G. Aging, Memory, and Mild Cognitive Impairment. Int. Psychogeriatrics 1997, 9, 65–69.
- Petersen, R.C.; Roberts, R.O.; Knopman, D.S.; Boeve, B.F.; Geda, Y.E.; Ivnik, R.J.; Smith, G.E.; Jack, C.R. Mild Cognitive Impairment. Arch. Neurol. 2009, 66.
- Pandya, S.Y.; Clem, M.A.; Silva, L.M.; Woon, F.L. Does Mild Cognitive Impairment Always Lead to Dementia? A Review. J. Neurol. Sci. 2016, 369, 57–62.
- Caselli, R.J.; Dueck, A.C.; Osborne, D.; Sabbagh, M.N.; Connor, D.J.; Ahern, G.L.; Baxter, L.C.; Rapcsak, S.Z.; Shi, J.; Woodruff, B.K.; et al. Longitudinal Modeling of Age-Related Memory Decline and the APOE E4 Effect. N. Engl. J. Med. 2009, 361, 255–263.
- Roberts, R.O.; Geda, Y.E.; Knopman, D.S.; Cha, R.H.; Pankratz, V.S.; Boeve, B.F.; Tangalos, E.G.; Ivnik, R.J.; Rocca, W.A.; Petersen, R.C. The Incidence of MCI Differs by Subtype and Is Higher in Men. Neurology 2012, 78, 342–351.
- Ng, T.P.; Feng, L.; Nyunt, M.S.Z.; Feng, L.; Gao, Q.; Lim, M.L.; Collinson, S.L.; Chong, M.S.; Lim, W.S.; Lee, T.S.; et al. Metabolic Syndrome and the Risk of Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia. JAMA Neurol. 2016, 73, 456.
- Roberts, R.O.; Knopman, D.S.; Geda, Y.E.; Cha, R.H.; Pankratz, V.S.; Baertlein, L.; Boeve, B.F.; Tangalos, E.G.; Ivnik, R.J.; Mielke, M.M.; et al. Association of Diabetes with Amnestic and Nonamnestic Mild Cognitive Impairment. Alzheimer's Dement. 2014, 10, 18–26.
- Singh, B.; Mielke, M.M.; Parsaik, A.K.; Cha, R.H.; Roberts, R.O.; Scanlon, P.D.; Geda, Y.E.; Christianson, T.J.; Pankratz, V.S.; Petersen, R.C. A Prospective Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and the Risk for Mild Cognitive Impairment. JAMA Neurol. 2014, 71, 581.
- 44. Geda, Y.E.; Roberts, R.O.; Mielke, M.M.; Knopman, D.S.; Christianson, T.J.H.; Pankratz, V.S.; Boeve, B.F.; Sochor, O.; Tangalos, E.G.; Petersen, R.C.; et al. Baseline

Neuropsychiatric Symptoms and the Risk of Incident Mild Cognitive Impairment: A Population-Based Study. Am. J. Psychiatry **2014**, 171, 572–581.

- Geda, Y.E.; Roberts, R.O.; Knopman, D.S.; Christianson, T.J.H.; Pankratz, V.S.; Ivnik, R.J.; Boeve, B.F.; Tangalos, E.G.; Petersen, R.C.; Rocca, W.A. Physical Exercise, Aging, and Mild Cognitive Impairment. Arch. Neurol. 2010, 67.
- Verghese, J.; LeValley, A.; Derby, C.; Kuslansky, G.; Katz, M.; Hall, C.; Buschke, H.; Lipton, R.B. Leisure Activities and the Risk of Amnestic Mild Cognitive Impairment in the Elderly. Neurology **2006**, 66, 821–827.
- Han, J.W.; Kim, T.H.; Lee, S.B.; Park, J.H.; Lee, J.J.; Huh, Y.; Park, J.E.; Jhoo, J.H.; Lee, D.Y.; Kim, K.W. Predictive Validity and Diagnostic Stability of Mild Cognitive Impairment Subtypes. Alzheimer's Dement. 2012, 8, 553–559.
- Manly, J.J.; Tang, M.; Schupf, N.; Stern, Y.; Vonsattel, J.G.; Mayeux, R. Frequency and Course of Mild Cognitive Impairment in a Multiethnic Community. Ann. Neurol. 2008, 63, 494–506.
- Roberts, R.O.; Knopman, D.S.; Mielke, M.M.; Cha, R.H.; Pankratz, V.S.; Christianson, T.J.H.; Geda, Y.E.; Boeve, B.F.; Ivnik, R.J.; Tangalos, E.G.; et al. Higher Risk of Progression to Dementia in Mild Cognitive Impairment Cases Who Revert to Normal. Neurology 2014, 82, 317–325.
- Mitchell, A.J.; Shiri-Feshki, M. Rate of Progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia – Meta-analysis of 41 Robust Inception Cohort Studies. Acta Psychiatr. Scand. 2009, 119, 252–265.
- Sachdev, P.S.; Blacker, D.; Blazer, D.G.; Ganguli, M.; Jeste, D. V.; Paulsen, J.S.; Petersen, R.C. Classifying Neurocognitive Disorders: The DSM-5 Approach. Nat. Rev. Neurol. 2014, 10, 634–642.
- Hippius, H.; Neundörfer, G. The Discovery of Alzheimer's Disease. Dialogues Clin. Neurosci. 2003, 5, 101–108.
- Cipriani, G.; Dolciotti, C.; Picchi, L.; Bonuccelli, U. Alzheimer and His Disease: A Brief History. Neurol. Sci. 2011, 32, 275–279.
- 54. Squitti, R.; Rongioletti, M.C.A.; Liguri, G. Copper, Oxidative Stress, Alzheimer's Disease, and Dementia. In Vitamins and Minerals in Neurological Disorders; Elsevier.

2023, 65-85.

- Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules 2020, 25, 5789.
- Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2011, 1, a006189– a006189.
- Spires-Jones, T.L.; Hyman, B.T. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. Neuron 2014, 82, 756–771.
- 58. Singh, S.K.; Srivastav, S.; Yadav, A.K.; Srikrishna, S.; Perry, G. Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting A β by Using Several Synthetic and Herbal Compounds. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016, 2016.
- Perl, D.P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. Mt. Sinai J. Med. A J. Transl. Pers. Med. 2010, 77, 32–42.
- Villemagne, V.L.; Rowe, C.C.; Macfarlane, S.; Novakovic, K.E.; Masters, C.L. Imaginem Oblivionis: The Prospects of Neuroimaging for Early Detection of Alzheimer's Disease. J. Clin. Neurosci. 2005, 12, 221–230.
- Glenner, G.G.; Wong, C.W. Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984, 120, 885–890.
- 62. Deng, Y.; Wang, Z.; Wang, R.; Zhang, X.; Zhang, S.; Wu, Y.; Staufenbiel, M.; Cai, F.; Song, W. Amyloid-β Protein (Aβ) Glu11 Is the Major B-secretase Site of B-site Amyloid-β Precursor Protein-cleaving Enzyme 1(BACE1), and Shifting the Cleavage Site to Aβ Asp1 Contributes to Alzheimer Pathogenesis. Eur. J. Neurosci. 2013, 37, 1962–1969.
- Armstrong, R.A. The Molecular Biology of Senile Plaques and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. Folia Neuropathol. 2009, 47, 289–299.
- Chen, G.; Xu, T.; Yan, Y.; Zhou, Y.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H.E. Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development. Acta Pharmacol. Sin. 2017, 38, 1205–1235.

- Tabaton, M.; Piccini, A. Role of Water-soluble Amyloid-β in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Int. J. Exp. Pathol. 2005, 86, 139–145.
- Reiss, A.B.; Arain, H.A.; Stecker, M.M.; Siegart, N.M.; Kasselman, L.J. Amyloid Toxicity in Alzheimer's Disease. Rev. Neurosci. 2018, 29, 613–627.
- Bateman, R.J.; Munsell, L.Y.; Morris, J.C.; Swarm, R.; Yarasheski, K.E.; Holtzman, D.M. Human Amyloid-β Synthesis and Clearance Rates as Measured in Cerebrospinal Fluid in Vivo. Nat. Med. 2006, 12, 856–861.
- Zhang, Y.; Chen, H.; Li, R.; Sterling, K.; Song, W. Amyloid β-Based Therapy for Alzheimer's Disease: Challenges, Successes and Future. Signal Transduct. Target. Ther. 2023, 8, 248.
- 69. Johns, P. Dementia. In Clinical Neuroscience; Elsevier. 2014, 145–162.
- Kumar, A.; Sidhu, J.; Lui, F.; Tsao, J.W. Alzheimer Disease. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2025.
- Rathmann, K.L.; Conner, C.S. Alzheimer's Disease: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment. Drug Intell. Clin. Pharm. 1984, 18, 684–691.
- Metaxas, A.; Kempf, S. Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease: Elucidation of the Molecular Mechanism by Immunohistochemistry and Tau Protein Phospho-Proteomics. Neural Regen. Res. 2016, 11, 1579.
- Pospich, S.; Raunser, S. The Molecular Basis of Alzheimer's Plaques. Science (80-.).
 2017, 358, 45–46.
- Dubois, B.; Hampel, H.; Feldman, H.H.; Scheltens, P.; Aisen, P.; Andrieu, S.; Bakardjian, H.; Benali, H.; Bertram, L.; Blennow, K.; et al. Preclinical Alzheimer's Disease: Definition, Natural History, and Diagnostic Criteria. Alzheimer's Dement. 2016, 12, 292–323.
- Wattmo, C.; Minthon, L.; Wallin, Å.K. Mild versus Moderate Stages of Alzheimer's Disease: Three-Year Outcomes in a Routine Clinical Setting of Cholinesterase Inhibitor Therapy. Alzheimers. Res. Ther. 2016, 8, 7.
- Apostolova, L.G. Alzheimer Disease. Contin. Lifelong Learn. Neurol. 2016, 22, 419– 434.

- Vuic, B.; Konjevod, M.; Tudor, L.; Milos, T.; Nikolac Perkovic, M.; Nedic Erjavec, G.; Pivac, N.; Uzun, S.; Mimica, N.; Svob Strac, D. Tailoring the Therapeutic Interventions for Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. Expert Rev. Neurother. 2022, 22, 707–720.
- Mendez, M.F. Early-Onset Alzheimer Disease and Its Variants. Contin. Lifelong Learn. Neurol. 2019, 25, 34–51.
- Rabinovici, G.D. Late-Onset Alzheimer Disease. Contin. Lifelong Learn. Neurol. 2019, 25, 14–33.
- Van Cauwenberghe, C.; Van Broeckhoven, C.; Sleegers, K. The Genetic Landscape of Alzheimer Disease: Clinical Implications and Perspectives. Genet. Med. 2016, 18, 421– 430.
- Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's Disease: Clinical Trials and Drug Development. Lancet Neurol. 2010, 9, 702–716.
- Zhang, L.; Chen, C.; Mak, M.S.; Lu, J.; Wu, Z.; Chen, Q.; Han, Y.; Li, Y.; Pi, R. Advance of Sporadic Alzheimer's Disease Animal Models. Med. Res. Rev. 2020, 40, 431–458.
- Gholami, A. Alzheimer's Disease: The Role of Proteins in Formation, Mechanisms, and New Therapeutic Approaches. Neurosci. Lett. 2023, 817, 137532.
- Xiao, X.; Liu, H.; Liu, X.; Zhang, W.; Zhang, S.; Jiao, B. APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-Evaluation According to ACMG Guidelines. Front. Aging Neurosci. 2021, 13.
- Huang, Y.; Mahley, R.W. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. Neurobiol. Dis. 2014, 72, 3–12.
- Raulin, A.-C.; Doss, S. V.; Trottier, Z.A.; Ikezu, T.C.; Bu, G.; Liu, C.-C. ApoE in Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Therapeutic Strategies. Mol. Neurodegener. 2022, 17, 72.
- Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to Beta-Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, 90, 1977–1981.

- Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Risch, N.J.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Rimmler, J.B.; Locke, P.A.; Conneally, P.M.; Schmader, K.E.; et al. Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease. Nat. Genet. 1994, 7, 180–184.
- Liu, P.-P.; Xie, Y.; Meng, X.-Y.; Kang, J.-S. History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease. Signal Transduct. Target. Ther. 2019, 4, 29.
- DAVIES, P. SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. Lancet 1976, 308, 1403.
- Francis, P.T.; Palmer, A.M.; Snape, M.; Wilcock, G.K. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1999, 66, 137–147.
- Fotiou, D.; Kaltsatou, A.; Tsiptsios, D.; Nakou, M. Evaluation of the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease with Neuropsychological Methods. Aging Clin. Exp. Res. 2015, 27, 727–733.
- H. Ferreira-Vieira, T.; M. Guimaraes, I.; R. Silva, F.; M. Ribeiro, F. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. Curr. Neuropharmacol. 2016, 14, 101–115.
- Zhang, J.; Zhang, Y.; Wang, J.; Xia, Y.; Zhang, J.; Chen, L. Recent Advances in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Clinical Trials and New Drug Development Strategies. Signal Transduct. Target. Ther. 2024, 9, 211.
- Frost, B.; Jacks, R.L.; Diamond, M.I. Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. J. Biol. Chem. 2009, 284, 12845–12852.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y.C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H.M.; Binder, L.I. Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. **1986**, 83, 4913–4917.
- Selkoe, D.J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. EMBO Mol. Med. 2016, 8, 595–608.
- 98. Uematsu, M.; Nakamura, A.; Ebashi, M.; Hirokawa, K.; Takahashi, R.; Uchihara, T. Brainstem Tau Pathology in Alzheimer's Disease Is Characterized by Increase of Three Repeat Tau and Independent of Amyloid β. Acta Neuropathol. Commun. 2018, 6, 1.

- Braak, H.; Thal, D.R.; Ghebremedhin, E.; Del Tredici, K. Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2011, 70, 960–969.
- Berg, L.; McKeel, D.W.; Miller, J.P.; Storandt, M.; Rubin, E.H.; Morris, J.C.; Baty, J.; Coats, M.; Norton, J.; Goate, A.M.; et al. Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer Disease. Arch. Neurol. **1998**, 55, 326.
- 101. Giannakopoulos, P.; Herrmann, F.R.; Bussière, T.; Bouras, C.; Kövari, E.; Perl, D.P.; Morrison, J.H.; Gold, G.; Hof, P.R. Tangle and Neuron Numbers, but Not Amyloid Load, Predict Cognitive Status in Alzheimer's Disease. Neurology **2003**, 60, 1495–1500.
- Arnsten, A.F.T.; Datta, D.; Del Tredici, K.; Braak, H. Hypothesis: Tau Pathology Is an Initiating Factor in Sporadic Alzheimer's Disease. Alzheimer's Dement. 2021, 17, 115– 124.
- Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease. Trends Pharmacol. Sci. 1991, 12, 383–388.
- Kametani, F.; Hasegawa, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. Front. Neurosci. 2018, 12.
- 105. Wang, W.-Y.; Tan, M.-S.; Yu, J.-T.; Tan, L. Role of Pro-Inflammatory Cytokines Released from Microglia in Alzheimer's Disease. Ann. Transl. Med. 2015, 3, 136.
- 106. Lai, K.S.P.; Liu, C.S.; Rau, A.; Lanctôt, K.L.; Köhler, C.A.; Pakosh, M.; Carvalho, A.F.; Herrmann, N. Peripheral Inflammatory Markers in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of 175 Studies. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2017, 88, 876–882.
- 107. Takahashi, R.H.; Capetillo-Zarate, E.; Lin, M.T.; Milner, T.A.; Gouras, G.K. Co-Occurrence of Alzheimer's Disease β-Amyloid and Tau Pathologies at Synapses. Neurobiol. Aging 2010, 31, 1145–1152.
- A. Armstrong, R. Risk Factors for Alzheimer's Disease. Folia Neuropathol. 2019, 57, 87–105.
- Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2019. Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv. 2019, 5, 272–293.

- Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A.C.; Farlow, M.R.; Giacobini, E.; Grossberg, G.T.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P.J.; et al. The Cholinergic System in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease. Brain 2018, 141, 1917–1933.
- Matsunaga, S.; Kishi, T.; Iwata, N. Memantine Monotherapy for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One 2015, 10, e0123289.
- Yiannopoulou, K.G.; Papageorgiou, S.G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. J. Cent. Nerv. Syst. Dis. 2020, 12, 117957352090739.
- KORCZYN, A.D. Mixed Dementia—the Most Common Cause of Dementia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002, 977, 129–134.
- 114. Thal, D.R.; Grinberg, L.T.; Attems, J. Vascular Dementia: Different Forms of Vessel Disorders Contribute to the Development of Dementia in the Elderly Brain. Exp. Gerontol. 2012, 47, 816–824.
- 115. Gorelick, P.B.; Scuteri, A.; Black, S.E.; DeCarli, C.; Greenberg, S.M.; Iadecola, C.; Launer, L.J.; Laurent, S.; Lopez, O.L.; Nyenhuis, D.; et al. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. Stroke 2011, 42, 2672–2713.
- Vijayan, M.; Reddy, P.H. Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease: Molecular Links. J. Alzheimer's Dis. 2016, 54, 427–443.
- 117. Song, J.; Lee, W.T.; Park, K.A.; Lee, J.E. Association between Risk Factors for Vascular Dementia and Adiponectin. Biomed Res. Int. 2014, 2014, 1–13.
- Venkat, P.; Chopp, M.; Chen, J. Models and Mechanisms of Vascular Dementia. Exp. Neurol. 2015, 272, 97–108.
- Kalaria, R.N. Neuropathological Diagnosis of Vascular Cognitive Impairment and Vascular Dementia with Implications for Alzheimer's Disease. Acta Neuropathol. 2016, 131, 659–685.
- Ferrer, I. Cognitive Impairment of Vascular Origin: Neuropathology of Cognitive Impairment of Vascular Origin. J. Neurol. Sci. 2010, 299, 139–149.
- Grinberg, L.T.; Thal, D.R. Vascular Pathology in the Aged Human Brain. Acta Neuropathol. 2010, 119, 277–290.

- 122. Magid-Bernstein, J.; Girard, R.; Polster, S.; Srinath, A.; Romanos, S.; Awad, I.A.; Sansing, L.H. Cerebral Hemorrhage: Pathophysiology, Treatment, and Future Directions. Circ. Res. 2022, 130, 1204–1229.
- 123. Iadecola, C. The Pathobiology of Vascular Dementia. Neuron 2013, 80, 844-866.
- Roh, J.H.; Lee, J.-H. Recent Updates on Subcortical Ischemic Vascular Dementia. J. Stroke 2014, 16, 18.
- 125. Chui, H.C. Subcortical Ischemic Vascular Dementia. Neurol. Clin. 2007, 25, 717–740.
- Fierini, F. Mixed Dementia: Neglected Clinical Entity or Nosographic Artifice? J. Neurol. Sci. 2020, 410, 116662.
- 127. Won Seo, S.; Hwa Lee, B.; Kim, E.-J.; Chin, J.; Sun Cho, Y.; Yoon, U.; Na, D.L. Clinical Significance of Microbleeds in Subcortical Vascular Dementia. Stroke 2007, 38, 1949– 1951.
- 128. Park, J.; Seo, S.W.; Kim, C.; Kim, G.H.; Noh, H.J.; Kim, S.T.; Kwak, K.; Yoon, U.; Lee, J.M.; Lee, J.W.; et al. Pathogenesis of Cerebral Microbleeds: In Vivo Imaging of Amyloid and Subcortical Ischemic Small Vessel Disease in 226 Individuals with Cognitive Impairment. Ann. Neurol. 2013, 73, 584–593.
- 129. Patel, B.; Lawrence, A.J.; Chung, A.W.; Rich, P.; MacKinnon, A.D.; Morris, R.G.; Barrick, T.R.; Markus, H.S. Cerebral Microbleeds and Cognition in Patients With Symptomatic Small Vessel Disease. Stroke 2013, 44, 356–361.
- 130. Lyu, D.; Gong, M.; Zhang, Y.; Lyu, X. Effects of Different Kinds of Anti-Alzheimer's Disease Drugs on Cognitive Improvement: Protocol for a Systematic Review and Network Meta-Analysis of Phase III Clinical Trials. Syst. Rev. 2022, 11, 84.
- Román, G.C.; Kalaria, R.N. Vascular Determinants of Cholinergic Deficits in Alzheimer Disease and Vascular Dementia. Neurobiol. Aging 2006, 27, 1769–1785.
- Chen, Y.; Zhang, J.; Wang, Y.; Yuan, J.; Hu, W. Efficacy of Cholinesterase Inhibitors in Vascular Dementia: An Updated Meta-Analysis. Eur. Neurol. 2016, 75, 132–141.
- Koch, H.; Uyanik, G.; Fischer-Barnicol, D. Memantine: A Therapeutic Approach in Treating Alzheimers and Vascular Dementia. Curr. Drug Target -CNS Neurol. Disord. 2005, 4, 499–506.

- 134. Cetin, S.; Knez, D.; Gobec, S.; Kos, J.; Pišlar, A. Cell Models for Alzheimer's and Parkinson's Disease: At the Interface of Biology and Drug Discovery. Biomed. Pharmacother. 2022, 149, 112924.
- Brown, D.G.; Wobst, H.J. Opportunities and Challenges in Phenotypic Screening for Neurodegenerative Disease Research. J. Med. Chem. 2020, 63, 1823–1840.
- 136. de Medeiros, L.M.; De Bastiani, M.A.; Rico, E.P.; Schonhofen, P.; Pfaffenseller, B.; Wollenhaupt-Aguiar, B.; Grun, L.; Barbé-Tuana, F.; Zimmer, E.R.; Castro, M.A.A.; et al. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In Vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. Mol. Neurobiol. 2019, 56, 7355–7367.
- 137. Dubey, S.K.; Ram, M.S.; Krishna, K.V.; Saha, R.N.; Singhvi, G.; Agrawal, M.; Ajazuddin; Saraf, S.; Saraf, S.; Alexander, A. Recent Expansions on Cellular Models to Uncover the Scientific Barriers Towards Drug Development for Alzheimer's Disease. Cell. Mol. Neurobiol. 2019, 39, 181–209.
- Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. Methods Mol Biol. 2013, 1078, 9-21.
- 139. Avola, R.; Graziano, A.C.E.; Pannuzzo, G.; Albouchi, F.; Cardile, V. New Insights on Parkinson's Disease from Differentiation of SH-SY5Y into Dopaminergic Neurons: An Involvement of Aquaporin4 and 9. Mol. Cell. Neurosci. 2018, 88, 212–221.
- Xie, H.; Hu, L.; Li, G. SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line: In Vitro Cell Model of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. Chin. Med. J. (Engl). 2010, 123, 1086–1092.
- 141. Kume, T.; Kawato, Y.; Osakada, F.; Izumi, Y.; Katsuki, H.; Nakagawa, T.; Kaneko, S.; Niidome, T.; Takada-Takatori, Y.; Akaike, A. Dibutyryl Cyclic AMP Induces Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells into a Noradrenergic Phenotype. Neurosci. Lett. 2008, 443, 199–203.
- 142. Krishtal, J.; Bragina, O.; Metsla, K.; Palumaa, P.; Tõugu, V. In Situ Fibrillizing Amyloid-Beta 1-42 Induces Neurite Degeneration and Apoptosis of Differentiated SH-SY5Y Cells. PLoS One 2017, 12, e0186636.
- 143. Xie, D.; Deng, T.; Zhai, Z.; Sun, T.; Xu, Y. The Cellular Model for Alzheimer's Disease

Research: PC12 Cells. Front. Mol. Neurosci. 2023, 15.

- 144. Pasteuning-Vuhman, S.; de Jongh, R.; Timmers, A.; Pasterkamp, R.J. Towards Advanced IPSC-Based Drug Development for Neurodegenerative Disease. Trends Mol. Med. 2021, 27, 263–279.
- 145. Prajumwongs, P.; Weeranantanapan, O.; Jaroonwitchawan, T.; Noisa, P. Human Embryonic Stem Cells: A Model for the Study of Neural Development and Neurological Diseases. Stem Cells Int. 2016, 2016.
- 146. Muñoz, S.S.; Engel, M.; Balez, R.; Do-Ha, D.; Cabral-da-Silva, M.C.; Hernández, D.; Berg, T.; Fifita, J.A.; Grima, N.; Yang, S.; et al. A Simple Differentiation Protocol for Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Basal Forebrain-Like Cholinergic Neurons for Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Disease Modeling. Cells 2020, 9, 2018.
- Linsley, J.W.; Reisine, T.; Finkbeiner, S. Cell Death Assays for Neurodegenerative Disease Drug Discovery. Expert Opin. Drug Discov. 2019, 14, 901–913.
- 148. Mroczko, B.; Groblewska, M.; Litman-Zawadzka, A.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (AβOs) in Alzheimer's Disease. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1884.
- Leung, L.; Kalgutkar, A.S.; Obach, R.S. Metabolic Activation in Drug-Induced Liver Injury. Drug Metab. Rev. 2012, 44, 18–33.
- 150. Choi, S.H.; Kim, Y.H.; Hebisch, M.; Sliwinski, C.; Lee, S.; D'Avanzo, C.; Chen, H.; Hooli, B.; Asselin, C.; Muffat, J.; et al. A Three-Dimensional Human Neural Cell Culture Model of Alzheimer's Disease. Nature 2014, 515, 274–278.
- Ko, K.R.; Frampton, J.P. Developments in 3D Neural Cell Culture Models: The Future of Neurotherapeutics Testing? Expert Rev. Neurother. 2016, 16, 739–741.
- 152. Marotta, N.; Kim, S.; Krainc, D. Organoid and Pluripotent Stem Cells in Parkinson's Disease Modeling: An Expert View on Their Value to Drug Discovery. Expert Opin. Drug Discov. 2020, 15, 427–441.
- Bilkei-Gorzo, A. Genetic Mouse Models of Brain Ageing and Alzheimer's Disease. Pharmacol. Ther. 2014, 142, 244–257.

- Van Dam, D.; De Deyn, P.P. Animal Models in the Drug Discovery Pipeline for Alzheimer's Disease. Br. J. Pharmacol. 2011, 164, 1285–1300.
- 155. Forrest, S.L.; Kril, J.J.; Stevens, C.H.; Kwok, J.B.; Hallupp, M.; Kim, W.S.; Huang, Y.; McGinley, C. V; Werka, H.; Kiernan, M.C.; et al. Retiring the Term FTDP-17 as MAPT Mutations Are Genetic Forms of Sporadic Frontotemporal Tauopathies. Brain 2018, 141, 521–534.
- 156. Van Dam, D.; D'Hooge, R.; Staufenbiel, M.; Van Ginneken, C.; Van Meir, F.; De Deyn, P.P. Age-dependent Cognitive Decline in the APP23 Model Precedes Amyloid Deposition. Eur. J. Neurosci. 2003, 17, 388–396.
- 157. Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F.; Cole, G. Correlative Memory Deficits, Aβ Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. Science (80-.). **1996**, 274, 99–103.
- 158. Krantic, S.; Isorce, N.; Mechawar, N.; Davoli, M.A.; Vignault, E.; Albuquerque, M.; Chabot, J.-G.; Moyse, E.; Chauvin, J.-P.; Aubert, I.; et al. Hippocampal GABAergic Neurons Are Susceptible to Amyloid-β Toxicity in Vitro and Are Decreased in Number in the Alzheimer's Disease TgCRND8 Mouse Model. J. Alzheimer's Dis. 2012, 29, 293– 308.
- 159. Mucke, L.; Masliah, E.; Yu, G.-Q.; Mallory, M.; Rockenstein, E.M.; Tatsuno, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Johnson-Wood, K.; McConlogue, L. High-Level Neuronal Expression of Aβ 1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. J. Neurosci. 2000, 20, 4050–4058.
- Xu, Q.-Q.; Yang, W.; Zhong, M.; Lin, Z.-X.; Gray, N.E.; Xian, Y.-F. Animal Models of Alzheimer's Disease: Preclinical Insights and Challenges. Acta Mater. Medica 2023, 2.
- Esquerda-Canals, G.; Montoliu-Gaya, L.; Güell-Bosch, J.; Villegas, S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 2017, 57, 1171–1183.
- Elder, G.A.; Gama Sosa, M.A.; De Gasperi, R.; Dickstein, D.L.; Hof, P.R. Presenilin Transgenic Mice as Models of Alzheimer's Disease. Brain Struct. Funct. 2010, 214, 127– 143.
- 163. Lazarov, O.; Peterson, L.D.; Peterson, D.A.; Sisodia, S.S. Expression of a Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin-1 Variant Enhances Perforant Pathway Lesion-

Induced Neuronal Loss in the Entorhinal Cortex. J. Neurosci. 2006, 26, 429-434.

- 164. Tanemura, K.; Chui, D.-H.; Fukuda, T.; Murayama, M.; Park, J.-M.; Akagi, T.; Tatebayashi, Y.; Miyasaka, T.; Kimura, T.; Hashikawa, T.; et al. Formation of Tau Inclusions in Knock-in Mice with Familial Alzheimer Disease (FAD) Mutation of Presenilin 1 (PS1). J. Biol. Chem. 2006, 281, 5037–5041.
- 165. Jankowsky, J.L.; Younkin, L.H.; Gonzales, V.; Fadale, D.J.; Slunt, H.H.; Lester, H.A.; Younkin, S.G.; Borchelt, D.R. Rodent Aβ Modulates the Solubility and Distribution of Amyloid Deposits in Transgenic Mice. J. Biol. Chem. 2007, 282, 22707–22720.
- 166. Ramsden, M.; Kotilinek, L.; Forster, C.; Paulson, J.; McGowan, E.; SantaCruz, K.; Guimaraes, A.; Yue, M.; Lewis, J.; Carlson, G.; et al. Age-Dependent Neurofibrillary Tangle Formation, Neuron Loss, and Memory Impairment in a Mouse Model of Human Tauopathy (P301L). J. Neurosci. 2005, 25, 10637–10647.
- 167. Schindowski, K.; Bretteville, A.; Leroy, K.; Bégard, S.; Brion, J.-P.; Hamdane, M.; Buée, L. Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. Am. J. Pathol. 2006, 169, 599–616.
- 168. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kayed, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. Neuron 2003, 39, 409–421.
- 169. Billings, L.M.; Oddo, S.; Green, K.N.; McGaugh, J.L.; LaFerla, F.M. Intraneuronal Aβ Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. Neuron 2005, 45, 675–688.
- Caruso, D.; Barron, A.M.; Brown, M.A.; Abbiati, F.; Carrero, P.; Pike, C.J.; Garcia-Segura, L.M.; Melcangi, R.C. Age-Related Changes in Neuroactive Steroid Levels in 3xTg-AD Mice. Neurobiol. Aging 2013, 34, 1080–1089.
- Mattsson, N. CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients With Mild Cognitive Impairment. JAMA 2009, 302, 385.
- 172. Bali, J.; Gheinani, A.H.; Zurbriggen, S.; Rajendran, L. Role of Genes Linked to Sporadic Alzheimer's Disease Risk in the Production of β-Amyloid Peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 15307–15311.

- 173. Chavan, R.S.; Supalkar, K. V.; Sadar, S.S.; Vyawahare, N.S. Animal Models of Alzheimer's Disease: An Origin of Innovative Treatments and Insight to the Disease's Etiology. Brain Res. 2023, 1814, 148449.
- 174. Yang, Y.; Kimura-Ohba, S.; Thompson, J.; Rosenberg, G.A. Rodent Models of Vascular Cognitive Impairment. Transl. Stroke Res. 2016, 7, 407–414.
- 175. Andjelkovic, A. V.; Stamatovic, S.M.; Phillips, C.M.; Martinez-Revollar, G.; Keep, R.F. Modeling Blood–Brain Barrier Pathology in Cerebrovascular Disease in Vitro: Current and Future Paradigms. Fluids Barriers CNS 2020, 17, 44.
- Breschi, A.; Gingeras, T.R.; Guigó, R. Comparative Transcriptomics in Human and Mouse. Nat. Rev. Genet. 2017, 18, 425–440.
- Wevers, N.R.; De Vries, H.E. Microfluidic Models of the Neurovascular Unit: A Translational View. Fluids Barriers CNS 2023, 20, 86.
- Sabbagh, M.F.; Nathans, J. A Genome-Wide View of the de-Differentiation of Central Nervous System Endothelial Cells in Culture. Elife 2020, 9.
- 179. Ades, E.W.; Candal, F.J.; Swerlick, R.A.; George, V.G.; Summers, S.; Bosse, D.C.; Lawley, T.J. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. J. Invest. Dermatol. **1992**, 99, 683–690.
- Price, T.N.C.; Burke, J.F.; Mayne, L. V. A Novel Human Astrocyte Cell Line (A735) with Astrocyte-Specific Neurotransmitter Function. Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim. 1999, 35, 279–288.
- Parker, K.K.; Norenberg, M.D.; Vernadakis, A. "Transdifferentiation" of C6 Glial Cells in Culture. Science (80-.). 1980, 208, 179–181.
- 182. Umehara, K.; Sun, Y.; Hiura, S.; Hamada, K.; Itoh, M.; Kitamura, K.; Oshima, M.; Iwama, A.; Saito, K.; Anzai, N.; et al. A New Conditionally Immortalized Human Fetal Brain Pericyte Cell Line: Establishment and Functional Characterization as a Promising Tool for Human Brain Pericyte Studies. Mol. Neurobiol. 2018, 55, 5993–6006.
- 183. Nagai, A.; Nakagawa, E.; Hatori, K.; Choi, H.B.; McLarnon, J.G.; Lee, M.A.; Kim, S.U. Generation and Characterization of Immortalized Human Microglial Cell Lines: Expression of Cytokines and Chemokines. Neurobiol. Dis. 2001, 8, 1057–1068.

- 184. Sano, Y.; Shimizu, F.; Abe, M.; Maeda, T.; Kashiwamura, Y.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T.; Obinata, M.; Kajiwara, K.; Fujii, M.; et al. Establishment of a New Conditionally Immortalized Human Brain Microvascular Endothelial Cell Line Retaining an in Vivo Blood–Brain Barrier Function. J. Cell. Physiol. 2010, 225, 519–528.
- 185. Weksler, B.B.; Subileau, E.A.; Perrière, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; et al. Blood-brain Barrier-specific Properties of a Human Adult Brain Endothelial Cell Line. FASEB J. 2005, 19, 1872–1874.
- Åkerman, K.E.O.; Scott, I.G.; Andersson, L.C. Functional Differentiation of a Human Ganglion Cell Derived Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y Induced by a Phorbol Ester (TPA). Neurochem. Int. 1984, 6, 77–80.
- 187. Taylor, M.A.; Kan, H.L.; Gollapudi, B.B.; Marty, M.S. An in Vitro Developmental Neurotoxicity Screening Assay for Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation Using the Human NT2/D1 Cell Line. Neurotoxicology 2019, 73, 258–264.
- Deli, M.A.; Ábrahám, C.S.; Kataoka, Y.; Niwa, M. Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. Cell. Mol. Neurobiol. 2005, 25, 59–127.
- 189. Chen, J.; Sun, L.; Ding, G.; Chen, L.; Jiang, L.; Wang, J.; Wu, J. Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Induces Human Brain Microvascular Endothelial Cell Hyperpermeability Via VE-Cadherin Internalization: Roles of RhoA/ROCK2. J. Mol. Neurosci. 2019, 69, 49–59.
- Ahmad, S.; Kindelin, A.; Khan, S.A.; Ahmed, M.; Hoda, M.N.; Bhatia, K.; Ducruet, A.F.
 C3a Receptor Inhibition Protects Brain Endothelial Cells Against Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion. Exp. Neurobiol. 2019, 28, 216–228.
- 191. Kokubu, Y.; Yamaguchi, T.; Kawabata, K. In Vitro Model of Cerebral Ischemia by Using Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017, 486, 577–583.
- 192. Chen, T.; Dai, S.-H.; Li, X.; Luo, P.; Zhu, J.; Wang, Y.-H.; Fei, Z.; Jiang, X.-F. Sirt1-Sirt3 Axis Regulates Human Blood-Brain Barrier Permeability in Response to Ischemia. Redox Biol. 2018, 14, 229–236.

- 193. Vemula, S.; Roder, K.E.; Yang, T.; Bhat, G.J.; Thekkumkara, T.J.; Abbruscato, T.J. A Functional Role for Sodium-Dependent Glucose Transport across the Blood-Brain Barrier during Oxygen Glucose Deprivation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 328, 487– 495.
- 194. Alluri, H.; Anasooya Shaji, C.; Davis, M.L.; Tharakan, B. Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation as an In Vitro Ischemia-Reperfusion Injury Model for Studying Blood-Brain Barrier Dysfunction. J. Vis. Exp. 2015.
- Andjelkovic, A. V; Stamatovic, S.M.; Keep, R.F. The Protective Effects of Preconditioning on Cerebral Endothelial Cells in Vitro. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2003, 23, 1348–1355.
- Rutkowski, K.; Sowa, P.; Rutkowska-Talipska, J.; Kuryliszyn-Moskal, A.; Rutkowski, R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): Hypes and Hopes. Drugs 2014, 74, 1195–1207.
- 197. Leowattana, W. DHEAS as a New Diagnostic Tool. Clin. Chim. Acta 2004, 341, 1–15.
- Kroboth, P.D.; Salek, F.S.; Pittenger, A.L.; Fabian, T.J.; Frye, R.F. DHEA and DHEA-S: A Review. J. Clin. Pharmacol. 1999, 39, 327–348.
- Baulieu, E.E. Dehydroepiandrosterone (DHEA): A Fountain of Youth? J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996, 81, 3147–3151.
- 200. Berr, C.; Lafont, S.; Debuire, B.; Dartigues, J.-F.; Baulieu, E.-E. Relationships of Dehydroepiandrosterone Sulfate in the Elderly with Functional, Psychological, and Mental Status, and Short-Term Mortality: A French Community-Based Study. Proc. Natl. Acad. Sci. **1996**, 93, 13410–13415.
- Sorwell, K.G.; Urbanski, H.F. Dehydroepiandrosterone and Age-Related Cognitive Decline. Age (Omaha). 2010, 32, 61–67.
- Oberbeck, R.; Kobbe, P. Dehydroepiandrosterone (DHEA): A Steroid with Multiple Effects. Is There Any Possible Option in the Treatment of Critical Illness? Curr. Med. Chem. 2010, 17, 1039–1047.
- Leowattana, W. DHEA(S): The Fountain of Youth. J. Med. Assoc. Thai. 2001, 84 Suppl 2, S605-12.
- 204. Rainey, W.E.; Carr, B.R.; Sasano, H.; Suzuki, T.; Mason, J.I. Dissecting Human Adrenal

Androgen Production. Trends Endocrinol. Metab. 2002, 13, 234-239.

- Longcope, C. Dehydroepiandrosterone Metabolism. J. Endocrinol. 1996, 150 Suppl, S125-7.
- Flynn, M.A.; Weaver-Osterholtz, D.; Sharpe-Timms, K.L.; Allen, S.; Krause, G. Dehydroepiandrosterone Replacement in Aging Humans¹. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999, 84, 1527–1533.
- Baulieu, E.-E.; Robel, P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) as Neuroactive Neurosteroids. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, 95, 4089– 4091.
- Friess, E.; Schiffelholz, T.; Steckler, T.; Steiger, A. Dehydroepiandrosterone a Neurosteroid. Eur. J. Clin. Invest. 2000, 30, 46–50.
- Chimote, B.N.; Chimote, N.M. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulfate (DHEA-S) in Mammalian Reproduction: Known Roles and Novel Paradigms. In; 2018; pp. 223–250.
- Bernhardt, R.; Waterman, M.R. Cytochrome P450 and Steroid Hormone Biosynthesis. In The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins; Wiley. 2007, 361–396.
- Lisurek, M.; Bernhardt, R. Modulation of Aldosterone and Cortisol Synthesis on the Molecular Level. Mol. Cell. Endocrinol. 2004, 215, 149–159.
- Neunzig, J.; Bernhardt, R. Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) Stimulates the First Step in the Biosynthesis of Steroid Hormones. PLoS One 2014, 9, e89727.
- Klinge, C.M.; Clark, B.J.; Prough, R.A. Dehydroepiandrosterone Research: Past, Current, and Future. Vitam Horm. 2018, 108, 1-28.
- Coughtrie, M.W.; Sharp, S.; Maxwell, K.; Innes, N.P. Biology and Function of the Reversible Sulfation Pathway Catalysed by Human Sulfotransferases and Sulfatases. Chem. Biol. Interact. 1998, 109, 3–27.
- Lipmann, F. Biological Sulfate Activation and Transfer. Science (80-.). 1958, 128, 575– 580.
- 216. Schulze, J.; Johansson, M.; Thörngren, J.-O.; Garle, M.; Rane, A.; Ekström, L. SULT2A1 Gene Copy Number Variation Is Associated with Urinary Excretion Rate of

Steroid Sulfates. Front. Endocrinol. (Lausanne). 2013, 4.

- 217. Blanchard, R.L.; Freimuth, R.R.; Buck, J.; Weinshilboum, R.M.; Coughtrie, M.W. A Proposed Nomenclature System for the Cytosolic Sulfotransferase (SULT) Superfamily. Pharmacogenetics 2004, 14, 199–211.
- Falany, C.N.; Vazquez, M.E.; Kalb, J.M. Purification and Characterization of Human Liver Dehydroepiandrosterone Sulphotransferase. Biochem. J. 1989, 260, 641–646.
- Suzuki, T.; Sasano, H.; Takeyama, J.; Kaneko, C.; Freije, W.A.; Carr, B.R.; Rainey, W.E. Developmental Changes in Steroidogenic Enzymes in Human Postnatal Adrenal Cortex: Immunohistochemical Studies. Clin. Endocrinol. (Oxf). 2000, 53, 739–747.
- 220. Zhai, G.; Teumer, A.; Stolk, L.; Perry, J.R.B.; Vandenput, L.; Coviello, A.D.; Koster, A.; Bell, J.T.; Bhasin, S.; Eriksson, J.; et al. Eight Common Genetic Variants Associated with Serum DHEAS Levels Suggest a Key Role in Ageing Mechanisms. PLoS Genet. 2011, 7, e1002025.
- 221. Goodarzi, M.O.; Antoine, H.J.; Azziz, R. Genes for Enzymes Regulating Dehydroepiandrosterone Sulfonation Are Associated with Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Polycystic Ovary Syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007, 92, 2659–2664.
- Clark, B.J.; Prough, R.A.; Klinge, C.M. Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. Vitam Horm. 2018, 108, 29-73.
- Liu, D.; Dillon, J.S. Dehydroepiandrosterone Activates Endothelial Cell Nitric-Oxide Synthase by a Specific Plasma Membrane Receptor Coupled to Gαi2,3. J. Biol. Chem. 2002, 277, 21379–21388.
- Charalampopoulos, I.; Alexaki, V.; Lazaridis, I.; Dermitzaki, E.; Avlonitis, N.; Tsatsanis, C.; Calogeropoulou, T.; Margioris, A.N.; Castanas, E.; Gravanis, A. G Proteinassociated, Specific Membrane Binding Sites Mediate the Neuroprotective Effect of Dehydroepiandrosterone. FASEB J. 2006, 20, 577–579.
- 225. Yoon, S.; Roh, D.; Seo, H.; Kang, S.; Han, H.; Beitz, A.J.; Lee, J. Intrathecal Injection of the Neurosteroid, DHEAS, Produces Mechanical Allodynia in Mice: Involvement of Spinal Sigma-1 and GABA A Receptors. Br. J. Pharmacol. 2009, 157, 666–673.
- 226. Johansson, T.; Elfverson, M.; Zhou, Q.; Nyberg, F. Allosteric Modulation of the NMDA

Receptor by Neurosteroids in Rat Brain and the Impact of Long Term Morphine Administration. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2010**, 401, 504–508.

- 227. Wang, R.; Reddy, P.H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. **2017**, 57, 1041–1048.
- 228. Alharbi, B.; Al-kuraishy, H.M.; Al-Gareeb, A.I.; Elekhnawy, E.; Alharbi, H.; Alexiou, A.; Papadakis, M.; Batiha, G.E.-S. Role of GABA Pathway in Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease: A Bidirectional Circuit. Eur. J. Med. Res. 2024, 29, 205.
- Bergeron, R.; de Montigny, C.; Debonnel, G. Potentiation of Neuronal NMDA Response Induced by Dehydroepiandrosterone and Its Suppression by Progesterone: Effects Mediated via Sigma Receptors. J. Neurosci. 1996, 16, 1193–1202.
- 230. Maurice, T.; Phan, V.; Urani, A.; Guillemain, I. Differential Involvement of the Sigma $_1$ (σ_1) Receptor in the Anti-amnesic Effect of Neuroactive Steroids, as Demonstrated Using an in Vivo Antisense Strategy in the Mouse. Br. J. Pharmacol. **2001**, 134, 1731–1741.
- 231. Pérez-Neri, I.; Montes, S.; Ojeda-López, C.; Ramírez-Bermúdez, J.; Ríos, C. Modulation of Neurotransmitter Systems by Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate: Mechanism of Action and Relevance to Psychiatric Disorders. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 2008, 32, 1118–1130.
- 232. Švob Štrac, D.; Jazvinšćak Jembrek, M.; Erhardt, J.; Mirković Kos, K.; Peričić, D. Modulation of Recombinant GABA<Sub>A</Sub> Receptors by Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Sulfate. Pharmacology 2012, 89, 163–171.
- 233. Lazaridis, I.; Charalampopoulos, I.; Alexaki, V.-I.; Avlonitis, N.; Pediaditakis, I.; Efstathopoulos, P.; Calogeropoulou, T.; Castanas, E.; Gravanis, A. Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis. PLoS Biol. 2011, 9, e1001051.
- 234. Brown, R. Oxidative Stress-Mediated DHEA Formation in Alzheimer's Disease Pathology. Neurobiol. Aging **2003**, 24, 57–65.
- 235. Rammouz, G.; Lecanu, L.; Papadopoulos, V. Oxidative Stress-Mediated Brain Dehydroepiandrosterone (DHEA) Formation in Alzheimer?S Disease Diagnosis. Front.

Endocrinol. (Lausanne). 2011, 2.

- Weill-Engerer, S.; David, J.-P.; Sazdovitch, V.; Liere, P.; Eychenne, B.; Pianos, A.; Schumacher, M.; Delacourte, A.; Baulieu, E.-E.; Akwa, Y. Neurosteroid Quantification in Human Brain Regions: Comparison between Alzheimer's and Nondemented Patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002, 87, 5138–5143.
- 237. YANASE, T.; FUKAHORI, M.; TANIGUCHI, S.; NISHI, Y.; SAKAI, Y.; TAKAYANAGI, R.; HAJI, M.; NAWATA, H. Serum Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-Sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's Disease and in Cerebrovascular Dementia. Endocr. J. **1996**, 43, 119–123.
- 238. Ray, L.; Khemka, V.K.; Behera, P.; Bandyopadhyay, K.; Pal, S.; Pal, K.; Basu, D.; Chakrabarti, S. Serum Homocysteine, Dehydroepiandrosterone Sulphate and Lipoprotein (a) in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. Aging Dis. 2013, 4, 57– 64.
- 239. Zhang, L.; Li, B. shen; Ma, W.; Barker, J.L.; Chang, Y.H.; Zhao, W.; Rubinow, D.R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulfated Derivative (DHEAS) Regulate Apoptosis during Neurogenesis by Triggering the Akt Signaling Pathway in Opposing Ways. Mol. Brain Res. 2002, 98, 58–66.
- Mellon, S.H. Neurosteroid Regulation of Central Nervous System Development. Pharmacol. Ther. 2007, 116, 107–124.
- Kaasik, A.; Kalda, A.; Jaako, K.; Zharkovsky, A. Dehydroepiandrosterone Sulphate Prevents Oxygen–Glucose Deprivation-Induced Injury in Cerebellar Granule Cell Culture. Neuroscience 2001, 102, 427–432.
- Li, H.; Klein, G.; Sun, P.; Buchan, A.M. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Reduces Neuronal Injury in a Rat Model of Global Cerebral Ischemia. Brain Res. 2001, 888, 263– 266.
- 243. Kurata, K.; Takebayashi, M.; Morinobu, S.; Yamawaki, S. β-Estradiol, Dehydroepiandrosterone, and Dehydroepiandrosterone Sulfate Protect against N -Methyl-d-Aspartate-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004, 311, 237–245.
- 244. Iwasaki, Y.; Asai, M.; Yoshida, M.; Nigawara, T.; Kambayashi, M.; Nakashima, N.

Dehydroepiandrosterone-Sulfate Inhibits Nuclear Factor-KB-Dependent Transcription in Hepatocytes, Possibly through Antioxidant Effect. J. Clin. Endocrinol. Metab. **2004**, 89, 3449–3454.

- Fedotova, J.; Sapronov, N. Behavioral Effects of Dehydroepiandrosterone in Adult Male Rats. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 2004, 28, 1023–1027.
- MAAYAN, R.; TOUATIWERNER, D.; RAM, E.; STROUS, R.; KEREN, O.; WEIZMAN, A. The Protective Effect of Frontal Cortex Dehydroepiandrosterone in Anxiety and Depressive Models in Mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 2006, 85, 415– 421.
- 247. Milman, A.; Zohar, O.; Maayan, R.; Weizman, R.; Pick, C.G. DHEAS Repeated Treatment Improves Cognitive and Behavioral Deficits after Mild Traumatic Brain Injury. Eur. Neuropsychopharmacol. 2008, 18, 181–187.
- Gandy, S. Molecular Basis for Anti-Amyloid Therapy in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. Neurobiol. Aging 2002, 23, 1009–1016.
- 249. Li, L.; Xu, B.; Zhu, Y.; Chen, L.; Sokabe, M.; Chen, L. DHEA Prevents Aβ25–35-Impaired Survival of Newborn Neurons in the Dentate Gyrus through a Modulation of PI3K-Akt-MTOR Signaling. Neuropharmacology 2010, 59, 323–333.
- 250. Grimm, A.; Biliouris, E.E.; Lang, U.E.; Götz, J.; Mensah-Nyagan, A.G.; Eckert, A. Sex Hormone-Related Neurosteroids Differentially Rescue Bioenergetic Deficits Induced by Amyloid-β or Hyperphosphorylated Tau Protein. Cell. Mol. Life Sci. 2016, 73, 201–215.
- 251. Rojo, A.I.; McBean, G.; Cindric, M.; Egea, J.; López, M.G.; Rada, P.; Zarkovic, N.; Cuadrado, A. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. Antioxid. Redox Signal. 2014, 21, 1766–1801.
- 252. Cha, M.-Y.; Han, S.-H.; Son, S.M.; Hong, H.-S.; Choi, Y.-J.; Byun, J.; Mook-Jung, I. Mitochondria-Specific Accumulation of Amyloid β Induces Mitochondrial Dysfunction Leading to Apoptotic Cell Death. PLoS One 2012, 7, e34929.
- 253. Jacob, M.H.V.M.; Janner, D. da R.; Belló-Klein, A.; Llesuy, S.F.; Ribeiro, M.F.M. Dehydroepiandrosterone Modulates Antioxidant Enzymes and Akt Signaling in Healthy Wistar Rat Hearts. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2008, 112, 138–144.
- 254. Li, L.; Zhao, J.; Ge, C.; Yu, L.; Ma, H. Dehydroepiandrosterone Rehabilitate BRL-3A
Cells Oxidative Stress Damage Induced by Hydrogen Peroxide. J. Cell. Physiol. **2018**, 233, 6262–6272.

- 255. Maurice, T.; Phan, V.-L.; Sandillon, F.; Urani, A. Differential Effect of Dehydroepiandrosterone and Its Steroid Precursor Pregnenolone against the Behavioural Deficits in CO-Exposed Mice. Eur. J. Pharmacol. 2000, 390, 145–155.
- 256. Yabuki, Y.; Shinoda, Y.; Izumi, H.; Ikuno, T.; Shioda, N.; Fukunaga, K. Dehydroepiandrosterone Administration Improves Memory Deficits Following Transient Brain Ischemia through Sigma-1 Receptor Stimulation. Brain Res. 2015, 1622, 102–113.
- 257. Vieira-Marques, C.; Arbo, B.D.; Ruiz-Palmero, I.; Ortiz-Rodriguez, A.; Ghorbanpoor, S.; Kucharski, L.C.; Arevalo, M.A.; Garcia-Segura, L.M.; Ribeiro, M.F.M. Dehydroepiandrosterone Protects Male and Female Hippocampal Neurons and Neuroblastoma Cells from Glucose Deprivation. Brain Res. 2016, 1644, 176–182.
- Grimm, A.; Schmitt, K.; Lang, U.E.; Mensah-Nyagan, A.G.; Eckert, A. Improvement of Neuronal Bioenergetics by Neurosteroids: Implications for Age-Related Neurodegenerative Disorders. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2014, 1842, 2427–2438.
- 259. El Bitar, F.; Meunier, J.; Villard, V.; Alméras, M.; Krishnan, K.; Covey, D.F.; Maurice, T.; Akwa, Y. Neuroprotection by the Synthetic Neurosteroid Enantiomers Ent-PREGS and Ent-DHEAS against Aβ25–35 Peptide-Induced Toxicity in Vitro and in Vivo in Mice. Psychopharmacology (Berl). 2014, 231, 3293–3312.
- 260. Pan, X.; Wu, X.; Kaminga, A.C.; Wen, S.W.; Liu, A. Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front. Aging Neurosci. 2019, 11.
- Aly, H.F.; Metwally, F.M.; Ahmed, H.H. Neuroprotective Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Rat Model of Alzheimer's Disease. Acta Biochim. Pol. 2011, 58, 513–520.
- Dayal, M.; Sammel, M.D.; Zhao, J.; Hummel, A.C.; Vandenbourne, K.; Barnhart, K.T. Supplementation with DHEA: Effect on Muscle Size, Strength, Quality of Life, and Lipids. J. Women's Heal. 2005, 14, 391–400.

- 263. T. Wolf, O.; M. Kudielka, B.; H. Hellhammer, D.; Hellhammer, J.; Kirschbaum, C. OPPOSING EFFECTS OF DHEA REPLACEMENT IN ELDERLY SUBJECTS ON DECLARATIVE MEMORY AND ATTENTION AFTER EXPOSURE TO A LABORATORY STRESSOR. Psychoneuroendocrinology 1998, 23, 617–629.
- 264. van Niekerk, J.K.; Huppert, F.A.; Herbert, J. Salivary Cortisol and DHEA: Association with Measures of Cognition and Well-Being in Normal Older Men, and Effects of Three Months of DHEA Supplementation. Psychoneuroendocrinology 2001, 26, 591–612.
- 265. Kritz-Silverstein, D.; Von Mühlen, D.; Laughlin, G.A.; Bettencourt, R. Effects of Dehydroepiandrosterone Supplementation on Cognitive Function and Quality of Life: The DHEA and Well-Ness (DAWN) Trial. J. Am. Geriatr. Soc. 2008, 56, 1292–1298.
- Wolkowitz, O.M.; Kramer, J.H.; Reus, V.I.; Costa, M.M.; Yaffe, K.; Walton, P.; Raskind, M.; Peskind, E.; Newhouse, P.; Sack, D.; et al. DHEA Treatment of Alzheimer's Disease. Neurology 2003, 60, 1071–1076.
- 267. Yamada, S.; Akishita, M.; Fukai, S.; Ogawa, S.; Yamaguchi, K.; Matsuyama, J.; Kozaki, K.; Toba, K.; Ouchi, Y. Effects of Dehydroepiandrosterone Supplementation on Cognitive Function and Activities of Daily Living in Older Women with Mild to Moderate Cognitive Impairment. Geriatr. Gerontol. Int. 2010, 10, 280–287.
- Azuma, T.; Nagai, Y.; Saito, T.; Funauchi, M.; Matsubara, T.; Sakoda, S. The Effect of Dehydroepiandrosterone Sulfate Administration to Patients with Multi-Infarct Dementia. J. Neurol. Sci. 1999, 162, 69–73.
- Li, Y.; Li, F.; Qin, D.; Chen, H.; Wang, J.; Wang, J.; Song, S.; Wang, C.; Wang, Y.; Liu, S.; et al. The Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System. Front. Aging Neurosci. 2022, 14.
- 270. Binder, D.K.; Scharfman, H.E. Mini Review. Growth Factors 2004, 22, 123-131.
- Kakizawa, S. Neurotrophin Family. In Handbook of Hormones; Elsevier. 2021, 471– 473.
- 272. Cunha A Simple Role for BDNF in Learning and Memory? Front. Mol. Neurosci. 2010, 3, 1.
- 273. Wang, L.; Lin, F.; Wang, J.; Wu, J.; Han, R.; Zhu, L.; DiFiglia, M.; Qin, Z. Expression of Mutant N-Terminal Huntingtin Fragment (Htt552-100Q) in Astrocytes Suppresses the

Secretion of BDNF. Brain Res. 2012, 1449, 69-82.

- 274. Mowla, S.J.; Farhadi, H.F.; Pareek, S.; Atwal, J.K.; Morris, S.J.; Seidah, N.G.; Murphy, R.A. Biosynthesis and Post-Translational Processing of the Precursor to Brain-Derived Neurotrophic Factor. J. Biol. Chem. 2001, 276, 12660–12666.
- Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K.K.; Hempstead, B.L. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. Science (80-.). 2001, 294, 1945–1948.
- Leßmann, V.; Brigadski, T. Mechanisms, Locations, and Kinetics of Synaptic BDNF Secretion: An Update. Neurosci. Res. 2009, 65, 11–22.
- 277. Yang, J.-L.; Lin, Y.-T.; Chuang, P.-C.; Bohr, V.A.; Mattson, M.P. BDNF and Exercise Enhance Neuronal DNA Repair by Stimulating CREB-Mediated Production of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. NeuroMolecular Med. 2014, 16, 161–174.
- Bathina, S.; Das, U.N. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Clinical Implications. Arch. Med. Sci. 2015, 6, 1164–1178.
- 279. Petryshen, T.L.; Sabeti, P.C.; Aldinger, K.A.; Fry, B.; Fan, J.B.; Schaffner, S.F.; Waggoner, S.G.; Tahl, A.R.; Sklar, P. Population Genetic Study of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene. Mol. Psychiatry **2010**, 15, 810–815.
- Colucci-D'Amato, L.; Speranza, L.; Volpicelli, F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 7777.
- 281. Egan, M.F.; Kojima, M.; Callicott, J.H.; Goldberg, T.E.; Kolachana, B.S.; Bertolino, A.; Zaitsev, E.; Gold, B.; Goldman, D.; Dean, M.; et al. The BDNF Val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. Cell **2003**, 112, 257–269.
- 282. Hariri, A.R.; Goldberg, T.E.; Mattay, V.S.; Kolachana, B.S.; Callicott, J.H.; Egan, M.F.; Weinberger, D.R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val ⁶⁶ Met Polymorphism Affects Human Memory-Related Hippocampal Activity and Predicts Memory Performance. J. Neurosci. **2003**, 23, 6690–6694.
- 283. Montag, C.; Weber, B.; Fliessbach, K.; Elger, C.; Reuter, M. The BDNF Val66Met Polymorphism Impacts Parahippocampal and Amygdala Volume in Healthy Humans: Incremental Support for a Genetic Risk Factor for Depression. Psychol. Med. 2009, 39,

1831-1839.

- 284. Xia, H.; Du, X.; Yin, G.; Zhang, Y.; Li, X.; Cai, J.; Huang, X.; Ning, Y.; Soares, J.C.; Wu, F.; et al. Effects of Smoking on Cognition and BDNF Levels in a Male Chinese Population: Relationship with BDNF Val66Met Polymorphism. Sci. Rep. 2019, 9, 217.
- 285. Franzmeier, N.; Ren, J.; Damm, A.; Monté-Rubio, G.; Boada, M.; Ruiz, A.; Ramirez, A.; Jessen, F.; Düzel, E.; Rodríguez Gómez, O.; et al. The BDNFVal66Met SNP Modulates the Association between Beta-Amyloid and Hippocampal Disconnection in Alzheimer's Disease. Mol. Psychiatry 2021, 26, 614–628.
- Yin, Y.; Su, X.; Pan, L.; Li, C. BDNF Val66Met Polymorphism and Cognitive Impairment in Parkinson's Disease—a Meta-Analysis. Neurol. Sci. 2019, 40, 1901– 1907.
- Brown, A.; Machan, J.T.; Hayes, L.; Zervas, M. Molecular Organization and Timing of Wnt1 Expression Define Cohorts of Midbrain Dopamine Neuron Progenitors in Vivo. J. Comp. Neurol. 2011, 519, 2978–3000.
- Balkaya, M.; Cho, S. Genetics of Stroke Recovery: BDNF Val66met Polymorphism in Stroke Recovery and Its Interaction with Aging. Neurobiol. Dis. 2019, 126, 36–46.
- Ramos-Cejudo, J.; Gutiérrez-Fernández, M.; Otero-Ortega, L.; Rodríguez-Frutos, B.; Fuentes, B.; Vallejo-Cremades, M.T.; Hernanz, T.N.; Cerdán, S.; Díez-Tejedor, E. Brain-Derived Neurotrophic Factor Administration Mediated Oligodendrocyte Differentiation and Myelin Formation in Subcortical Ischemic Stroke. Stroke 2015, 46, 221–228.
- Lohia, R.; Salari, R.; Brannigan, G. Sequence Specificity despite Intrinsic Disorder: How a Disease-Associated Val/Met Polymorphism Rearranges Tertiary Interactions in a Long Disordered Protein. PLOS Comput. Biol. 2019, 15, e1007390.
- 291. Lim, Y.Y.; Hassenstab, J.; Cruchaga, C.; Goate, A.; Fagan, A.M.; Benzinger, T.L.S.; Maruff, P.; Snyder, P.J.; Masters, C.L.; Allegri, R.; et al. BDNF Val66Met Moderates Memory Impairment, Hippocampal Function and Tau in Preclinical Autosomal Dominant Alzheimer's Disease. Brain 2016, 139, 2766–2777.
- 292. Lim, Y.Y.; Villemagne, V.L.; Laws, S.M.; Ames, D.; Pietrzak, R.H.; Ellis, K.A.; Harrington, K.D.; Bourgeat, P.; Salvado, O.; Darby, D.; et al. BDNF Val66Met, Aβ

Amyloid, and Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease. Neurobiol. Aging **2013**, 34, 2457–2464.

- 293. Cechova, K.; Andel, R.; Angelucci, F.; Chmatalova, Z.; Markova, H.; Laczó, J.; Vyhnalek, M.; Matoska, V.; Kaplan, V.; Nedelska, Z.; et al. Impact of APOE and BDNF Val66Met Gene Polymorphisms on Cognitive Functions in Patients with Amnestic Mild Cognitive Impairment. J. Alzheimer's Dis. **2020**, 73, 247–257.
- 294. Olin, D.; MacMurray, J.; Comings, D.E. Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease Associated with BDNF C270T Polymorphism. Neurosci. Lett. **2005**, 381, 275–278.
- Rodriguez-Tebar, A.; Barde, Y. Binding Characteristics of Brain-Derived Neurotrophic Factor to Its Receptors on Neurons from the Chick Embryo. J. Neurosci. 1988, 8, 3337– 3342.
- 296. Volosin, M.; Song, W.; Almeida, R.D.; Kaplan, D.R.; Hempstead, B.L.; Friedman, W.J. Interaction of Survival and Death Signaling in Basal Forebrain Neurons: Roles of Neurotrophins and Proneurotrophins. J. Neurosci. 2006, 26, 7756–7766.
- 297. Zagrebelsky, M.; Holz, A.; Dechant, G.; Barde, Y.-A.; Bonhoeffer, T.; Korte, M. The P75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons. J. Neurosci. 2005, 25, 9989–9999.
- Meeker, R.; Williams, K. The P75 Neurotrophin Receptor: At the Crossroad of Neural Repair and Death. Neural Regen. Res. 2015, 10, 721.
- 299. Woo, N.H.; Teng, H.K.; Siao, C.-J.; Chiaruttini, C.; Pang, P.T.; Milner, T.A.; Hempstead, B.L.; Lu, B. Activation of P75NTR by ProBDNF Facilitates Hippocampal Long-Term Depression. Nat. Neurosci. 2005, 8, 1069–1077.
- Friedman, W.J. Proneurotrophins, Seizures, and Neuronal Apoptosis. Neurosci. 2010, 16, 244–252.
- 301. Mohammadi, A.; Amooeian, V.G.; Rashidi, E. Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases. Curr. Gene Ther. 2018, 18, 45–63.
- 302. Alam, M.A.; Subramanyam Rallabandi, V.P.; Roy, P.K. Systems Biology of Immunomodulation for Post-Stroke Neuroplasticity: Multimodal Implications of Pharmacotherapy and Neurorehabilitation. Front. Neurol. 2016, 7.

- 303. Lanuza, M.A.; Just-Borràs, L.; Hurtado, E.; Cilleros-Mañé, V.; Tomàs, M.; Garcia, N.; Tomàs, J. The Impact of Kinases in Amyotrophic Lateral Sclerosis at the Neuromuscular Synapse: Insights into BDNF/TrkB and PKC Signaling. Cells 2019, 8, 1578.
- Nikoletopoulou, V.; Sidiropoulou, K.; Kallergi, E.; Dalezios, Y.; Tavernarakis, N. Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity. Cell Metab. 2017, 26, 230-242.e5.
- 305. Jaworski, J.; Spangler, S.; Seeburg, D.P.; Hoogenraad, C.C.; Sheng, M. Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase–Akt–Mammalian Target of Rapamycin Pathway. J. Neurosci. 2005, 25, 11300–11312.
- Kumar, V.; Zhang, M.-X.; Swank, M.W.; Kunz, J.; Wu, G.-Y. Regulation of Dendritic Morphogenesis by Ras–PI3K–Akt–MTOR and Ras–MAPK Signaling Pathways. J. Neurosci. 2005, 25, 11288–11299.
- 307. Gonzalez, A.; Moya-Alvarado, G.; Gonzalez-Billaut, C.; Bronfman, F.C. Cellular and Molecular Mechanisms Regulating Neuronal Growth by Brain-derived Neurotrophic Factor. Cytoskeleton 2016, 73, 612–628.
- Kwon, M.; Fernandez, J.R.; Zegarek, G.F.; Lo, S.B.; Firestein, B.L. BDNF-Promoted Increases in Proximal Dendrites Occur via CREB-Dependent Transcriptional Regulation of Cypin. J. Neurosci. 2011, 31, 9735–9745.
- Andero, R.; Choi, D.C.; Ressler, K.J. BDNF–TrkB Receptor Regulation of Distributed Adult Neural Plasticity, Memory Formation, and Psychiatric Disorders. Prog Mol Biol Transl Sci. 2014, 122, 169-92.
- 310. Eyileten, C.; Sharif, L.; Wicik, Z.; Jakubik, D.; Jarosz-Popek, J.; Soplinska, A.; Postula, M.; Czlonkowska, A.; Kaplon-Cieslicka, A.; Mirowska-Guzel, D. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. Mol. Neurobiol. 2021, 58, 329–347.
- Wang, M.; Xie, Y.; Qin, D. Proteolytic Cleavage of ProBDNF to MBDNF in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Diseases. Brain Res. Bull. 2021, 166, 172–184.
- 312. Ng, T.; Ho, C.; Tam, W.; Kua, E.; Ho, R. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 257.

- 313. Fleitas, C.; Piñol-Ripoll, G.; Marfull, P.; Rocandio, D.; Ferrer, I.; Rampon, C.; Egea, J.; Espinet, C. ProBDNF Is Modified by Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Disease and Causes Neuronal Apoptosis by Inducing P75 Neurotrophin Receptor Processing. Mol. Brain 2018, 11, 68.
- 314. Rosa, E.; Mahendram, S.; Ke, Y.D.; Ittner, L.M.; Ginsberg, S.D.; Fahnestock, M. Tau Downregulates BDNF Expression in Animal and Cellular Models of Alzheimer's Disease. Neurobiol. Aging 2016, 48, 135–142.
- 315. Jiao, S.-S.; Shen, L.-L.; Zhu, C.; Bu, X.-L.; Liu, Y.-H.; Liu, C.-H.; Yao, X.-Q.; Zhang, L.-L.; Zhou, H.-D.; Walker, D.G.; et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects against Tau-Related Neurodegeneration of Alzheimer's Disease. Transl. Psychiatry 2016, 6, e907–e907.
- Li, Z.; Wang, H.; Xiao, G.; Du, H.; He, S.; Feng, Y.; Zhang, B.; Zhu, Y. Recovery of Post-Stroke Cognitive and Motor Deficiencies by Shuxuening Injection via Regulating Hippocampal BDNF-Mediated Neurotrophin/Trk Signaling. Biomed. Pharmacother. 2021, 141, 111828.
- 317. Lasek-Bal, A.; Jędrzejowska-Szypułka, H.; Różycka, J.; Bal, W.; Holecki, M.; Duława, J.; Lewin-Kowalik, J. Low Concentration of BDNF in the Acute Phase of Ischemic Stroke as a Factor in Poor Prognosis in Terms of Functional Status of Patients. Med. Sci. Monit. 2015, 21, 3900–3905.
- Nagahara, A.H.; Tuszynski, M.H. Potential Therapeutic Uses of BDNF in Neurological and Psychiatric Disorders. Nat. Rev. Drug Discov. 2011, 10, 209–219.
- 319. Xiang, J.; Wang, Z.-H.; Ahn, E.H.; Liu, X.; Yu, S.-P.; Manfredsson, F.P.; Sandoval, I.M.; Ju, G.; Wu, S.; Ye, K. Delta-Secretase-Cleaved Tau Antagonizes TrkB Neurotrophic Signalings, Mediating Alzheimer's Disease Pathologies. Proc. Natl. Acad. Sci. 2019, 116, 9094–9102.
- 320. Blurton-Jones, M.; Kitazawa, M.; Martinez-Coria, H.; Castello, N.A.; Müller, F.-J.; Loring, J.F.; Yamasaki, T.R.; Poon, W.W.; Green, K.N.; LaFerla, F.M. Neural Stem Cells Improve Cognition via BDNF in a Transgenic Model of Alzheimer Disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 2009, 106, 13594–13599.
- Poduslo, J.F.; Curran, G.L. Permeability at the Blood-Brain and Blood-Nerve Barriers of the Neurotrophic Factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. Mol. Brain Res. 1996, 36.

- Zuccato, C.; Cattaneo, E. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurodegenerative Diseases. Nat. Rev. Neurol. 2009, 5, 311–322.
- Gao, L.; Zhang, Y.; Sterling, K.; Song, W. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease and Its Pharmaceutical Potential. Transl. Neurodegener. 2022, 11, 4.
- 324. Li, M.; Li, Y.; Peng, K.; Wang, Y.; Gong, T.; Zhang, Z.; He, Q.; Sun, X. Engineering Intranasal MRNA Vaccines to Enhance Lymph Node Trafficking and Immune Responses. Acta Biomater. 2017, 64, 237–248.
- 325. Li, X.; Du, L.; Chen, X.; Ge, P.; Wang, Y.; Fu, Y.; Sun, H.; Jiang, Q.; Jin, Y. Nasal Delivery of Analgesic Ketorolac Tromethamine Thermo- and Ion-Sensitive in Situ Hydrogels. Int. J. Pharm. 2015, 489, 252–260.
- 326. Frey, W.H.; Liu, J.; Chen, X.; Thorne, R.G.; Fawcett, J.R.; Ala, T.A.; Rahman, Y.-E. Delivery of ¹²⁵ I-NGF to the Brain via the Olfactory Route. Drug Deliv. **1997**, 4, 87–92.
- 327. Tosi, G.; Vergoni, A.V.; Ruozi, B.; Bondioli, L.; Badiali, L.; Rivasi, F.; Costantino, L.; Forni, F.; Vandelli, M.A. Sialic Acid and Glycopeptides Conjugated PLGA Nanoparticles for Central Nervous System Targeting: In Vivo Pharmacological Evidence and Biodistribution. J. Control. Release 2010, 145, 49–57.
- 328. Gelperina, S.; Maksimenko, O.; Khalansky, A.; Vanchugova, L.; Shipulo, E.; Abbasova, K.; Berdiev, R.; Wohlfart, S.; Chepurnova, N.; Kreuter, J. Drug Delivery to the Brain Using Surfactant-Coated Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Influence of the Formulation Parameters. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010, 74, 157–163.
- Aravamudhan, A.; Ramos, D.M.; Nada, A.A.; Kumbar, S.G. Natural Polymers. In Natural and Synthetic Biomedical Polymers; Elsevier, 2014, 67–89.
- Gao, L.; Zhang, Y.; Sterling, K.; Song, W. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease and Its Pharmaceutical Potential. Transl. Neurodegener. 2022, 11.
- 331. Nagahara, A.H.; Wilson, B.R.; Ivasyk, I.; Kovacs, I.; Rawalji, S.; Bringas, J.R.; Pivirotto, P.J.; Sebastian, W.S.; Samaranch, L.; Bankiewicz, K.S.; et al. MR-Guided Delivery of AAV2-BDNF into the Entorhinal Cortex of Non-Human Primates. Gene Ther. 2018, 25, 104–114.
- 332. Gaitán, J.M.; Moon, H.Y.; Stremlau, M.; Dubal, D.B.; Cook, D.B.; Okonkwo, O.C.; van

Praag, H. Effects of Aerobic Exercise Training on Systemic Biomarkers and Cognition in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer's Disease. Front. Endocrinol. (Lausanne). **2021**, 12.

- Biedler, J.L.; Helson, L.; Spengler, B.A. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. Cancer Res. 1973, 33, 2643–2652.
- 334. Sarkar, S.; Pandey, A.; Kumar Yadav, S.; Haris Siddiqui, M.; Pant, A.B.; Yadav, S. Differentiated and Mature Neurons Are More Responsive to Neurotoxicant Exposure at Both Transcriptional and Translational Levels. Neuroscience 2025, 564, 110–125.
- 335. Kaya, Z.B.; Santiago-Padilla, V.; Lim, M.; Boschen, S.L.; Atilla, P.; McLean, P.J. Optimizing SH-SY5Y Cell Culture: Exploring the Beneficial Effects of an Alternative Media Supplement on Cell Proliferation and Viability. Sci. Rep. 2024, 14, 4775.
- Stine, W.B.; Jungbauer, L.; Yu, C.; LaDu, M.J. Preparing Synthetic Aβ in Different Aggregation States. Methods Mol Biol. 2011, 670, 13-32.
- 337. Bacelj, N. Terapijski Potencijal Moždanog Neurotrofnog Čimbenika, Neurosteroida Dehidroepiandrosterona i Dehidroepiandrosteron Sulfata u in Vitro Modelu Parkinsonove Bolesti, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet : Zagreb, 2022.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. Methods 2001, 25, 402-408.
- Bryant, C.D. The Blessings and Curses of C57BL/6 Substrains in Mouse Genetic Studies. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2011, 1245, 31–33.
- 340. Bourdi, M.; Davies, J.S.; Pohl, L.R. Mispairing C57BL/6 Substrains of Genetically Engineered Mice and Wild-Type Controls Can Lead to Confounding Results as It Did in Studies of JNK2 in Acetaminophen and Concanavalin A Liver Injury. Chem. Res. Toxicol. 2011, 24, 794–796.
- Taylor, Z. V.; Khand, B.; Porgador, A.; Monsonego, A.; Eremenko, E. An Optimized Intracerebroventricular Injection of CD4+ T Cells into Mice. STAR Protoc. 2021, 2, 100725.
- 342. Oddo, S. Amyloid Deposition Precedes Tangle Formation in a Triple Transgenic Model

of Alzheimer's Disease. Neurobiol. Aging 2003, 24, 1063-1070.

- 343. Belfiore, R.; Rodin, A.; Ferreira, E.; Velazquez, R.; Branca, C.; Caccamo, A.; Oddo, S. Temporal and Regional Progression of Alzheimer's Disease-like Pathology in 3xTg-AD Mice. Aging Cell 2019, 18.
- Wendelmuth, M.; Willam, M.; Todorov, H.; Radyushkin, K.; Gerber, S.; Schweiger, S. Dynamic Longitudinal Behavior in Animals Exposed to Chronic Social Defeat Stress. PLoS One 2020, 15, e0235268.
- Cysneiros, R.M.; Ribeiro, F.T. The Endocannabinoid System: Signaling and Social Motivation. In Neurobiology and Physiology of the Endocannabinoid System; Elsevier. 2023, 469–478.
- Kraeuter, A.-K.; Guest, P.C.; Sarnyai, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol. 2019, 1916, 99-103.
- Gorman-Sandler, E.; Hollis, F. The Forced Swim Test: Giving up on Behavioral Despair (Commentary on Molendijk & amp; de Kloet, 2021). Eur. J. Neurosci. 2022, 55, 2832– 2835.
- 348. Várkonyi, D.; Török, B.; Sipos, E.; Fazekas, C.L.; Bánrévi, K.; Correia, P.; Chaves, T.; Farkas, S.; Szabó, A.; Martínez-Bellver, S.; et al. Investigation of Anxiety- and Depressive-like Symptoms in 4- and 8-Month-Old Male Triple Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10816.
- McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E.M. Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease. Neurology 1984, 34, 939–939.
- Cockrell, J.R.; Folstein, M.F. Mini-Mental State Examination (MMSE). Psychopharmacol. Bull. 1988, 24, 689–692.
- 351. Arevalo-Rodriguez, I.; Smailagic, N.; Roqué i Figuls, M.; Ciapponi, A.; Sanchez-Perez, E.; Giannakou, A.; Pedraza, O.L.; Bonfill Cosp, X.; Cullum, S. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the Detection of Alzheimer's Disease and Other Dementias in People with Mild Cognitive Impairment (MCI). Cochrane Database Syst. Rev. 2015.
- Zhang, S.; Qiu, Q.; Qian, S.; Lin, X.; Yan, F.; Sun, L.; Xiao, S.; Wang, J.; Fang, Y.; Li, X. Determining Appropriate Screening Tools and Cutoffs for Cognitive Impairment in the Chinese Elderly. Front. Psychiatry **2021**, 12.

- 353. McCarthy, L.; Rubinsztein, J.; Lowry, E.; Flanagan, E.; Menon, V.; Vearncombe, S.; Mioshi, E.; Hornberger, M. Cut-off Scores for Mild and Moderate Dementia on the Addenbrooke's Cognitive Examination-III and the Mini-Addenbrooke's Cognitive Examination Compared with the Mini-Mental State Examination. BJPsych Bull. 2024, 48, 12–18.
- 354. Lin, J.S.; O'Connor, E.; Rossom, R.C.; Perdue, L.A.; Eckstrom, E. Screening for Cognitive Impairment in Older Adults: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann. Intern. Med. 2013.
- 355. A New Rating Scale for Alzheimer's Disease. Am. J. Psychiatry 1984, 141, 1356-1364.
- Sunderland, T.; Hill, J.L.; Mellow, A.M.; Lawlor, B.A.; Gundersheimer, J.; Newhouse, P.A.; Grafman, J.H. Clock Drawing in Alzheimer's Disease. J. Am. Geriatr. Soc. 1989, 37, 725–729.
- 357. Rockwood, K.; Fay, S.; Gorman, M.; Carver, D.; Graham, J.E. The Clinical Meaningfulness of ADAS-Cog Changes in Alzheimer's Disease Patients Treated with Donepezil in an Open-Label Trial. BMC Neurol. 2007, 7, 26.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. Nucleic Acids Res. 1988, 16, 1215–1215.
- 359. Beltz, K.; Tsang, D.; Wang, J.; Rose, S.; Bao, Y.; Wang, Y.; Larkin, K.; Rupp, S.; Schrepfer, D.; Datta, K.; et al. A High-Performing and Cost-Effective SNP Genotyping Method Using RhPCR and Universal Reporters. Adv. Biosci. Biotechnol. 2018, 09, 497– 512.
- Schreiner, T.G.; Schreiner, O.D.; Adam, M.; Popescu, B.O. The Roles of the Amyloid Beta Monomers in Physiological and Pathological Conditions. Biomedicines 2023, 11, 1411.
- 361. Penke, B.; Szűcs, M.; Bogár, F. Oligomerization and Conformational Change Turn Monomeric β-Amyloid and Tau Proteins Toxic: Their Role in Alzheimer's Pathogenesis. Molecules 2020, 25, 1659.
- Verma, M.; Vats, A.; Taneja, V. Toxic Species in Amyloid Disorders: Oligomers or Mature Fibrils. Ann. Indian Acad. Neurol. 2015, 18, 138.
- 363. Ganbat, D.; Jeon, J.K.; Lee, Y.; Kim, S.S. Exploring the Pathological Effect of Aβ42

Oligomers on Neural Networks in Primary Cortical Neuron Culture. Int. J. Mol. Sci. **2023**, 24, 6641.

- 364. Karran, E.; De Strooper, B. The Amyloid Hypothesis in Alzheimer Disease: New Insights from New Therapeutics. Nat. Rev. Drug Discov. 2022, 21, 306–318.
- 365. Picone, P.; Carrotta, R.; Montana, G.; Nobile, M.R.; San Biagio, P.L.; Di Carlo, M. Aβ Oligomers and Fibrillar Aggregates Induce Different Apoptotic Pathways in LAN5 Neuroblastoma Cell Cultures. Biophys. J. 2009, 96, 4200–4211.
- Baloyannis, S.J. Mitochondrial Alterations in Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 2006, 9, 119–126.
- 367. Arrázola, M.S.; Ramos-Fernández, E.; Cisternas, P.; Ordenes, D.; Inestrosa, N.C. Wnt Signaling Prevents the Aβ Oligomer-Induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Preserving Mitochondrial Structure in Hippocampal Neurons. PLoS One 2017, 12, e0168840.
- Perez Ortiz, J.M.; Swerdlow, R.H. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: Role in Pathogenesis and Novel Therapeutic Opportunities. Br. J. Pharmacol. 2019, 176, 3489–3507.
- 369. Meng, X.; Song, Q.; Liu, Z.; Liu, X.; Wang, Y.; Liu, J. Neurotoxic β-Amyloid Oligomers Cause Mitochondrial Dysfunction—the Trigger for PANoptosis in Neurons. Front. Aging Neurosci. 2024, 16.
- 370. Trump, B.F.; Goldblatt, P.J.; Stowell, R.E. Studies of Necrosis in Vitro of Mouse Hepatic Parenchymal Cells. Ultrastructural Alterations in Endoplasmic Reticulum, Golgi Apparatus, Plasma Membrane, and Lipid Droplets. Lab. Invest. 1965, 14, 2000–2028.
- Nieminen, A.-L. Apoptosis and Necrosis in Health and Disease: Role of Mitochondria. Int Rev Cytol. 2003, 224, 29-55.
- 372. Khan, H.; Bangar, A.; Grewal, A.K.; Bansal, P.; Singh, T.G. Caspase-Mediated Regulation of the Distinct Signaling Pathways and Mechanisms in Neuronal Survival. Int. Immunopharmacol. 2022, 110, 108951.
- Green, D.R. Caspases and Their Substrates. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2022, 14, a041012.

- Shimohama, S.; Tanino, H.; Fujimoto, S. Changes in Caspase Expression in Alzheimer's Disease: Comparison with Development and Aging. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 256, 381–384.
- 375. Yang, F.; Sun, X.; Beech, W.; Teter, B.; Wu, S.; Sigel, J.; Vinters, H. V; Frautschy, S.A.; Cole, G.M. Antibody to Caspase-Cleaved Actin Detects Apoptosis in Differentiated Neuroblastoma and Plaque-Associated Neurons and Microglia in Alzheimer's Disease. Am. J. Pathol. **1998**, 152, 379–389.
- Harada, J.; Sugimoto, M. Activation of Caspase-3 in β-Amyloid-Induced Apoptosis of Cultured Rat Cortical Neurons. Brain Res. 1999, 842, 311–323.
- 377. Reifert, J.; Hartung-Cranston, D.; Feinstein, S.C. Amyloid β-Mediated Cell Death of Cultured Hippocampal Neurons Reveals Extensive Tau Fragmentation without Increased Full-Length Tau Phosphorylation. J. Biol. Chem. 2011, 286, 20797–20811.
- Hussar, P.; Žuravskaja, M.; Kärner, M. Apoptosis Regulator BCL-2. Pap. Anthropol. 2013, 22, 63.
- Banjara, S.; Suraweera, C.D.; Hinds, M.G.; Kvansakul, M. The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. Biomolecules 2020, 10, 128.
- Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. Cell Death Differ. 2018, 25, 65–80.
- 381. Urbani, A.; Prosdocimi, E.; Carrer, A.; Checchetto, V.; Szabò, I. Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 8.
- Hussar, P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. Encyclopedia 2022, 2, 1624– 1636.
- 383. Hammouda, S.; Ghzaiel, I.; Picón-Pagès, P.; Meddeb, W.; Khamlaoui, W.; Hammami, S.; Muñoz, F.J.; Hammami, M.; Zarrouk, A. Nigella and Milk Thistle Seed Oils: Potential Cytoprotective Effects against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity on SH-SY5Y Cells. Biomolecules 2021, 11, 797.
- 384. Nunomura, A.; Tamaoki, T.; Motohashi, N.; Nakamura, M.; McKeel, D.W.; Tabaton, M.; Lee, H.; Smith, M.A.; Perry, G.; Zhu, X. The Earliest Stage of Cognitive Impairment in Transition From Normal Aging to Alzheimer Disease Is Marked by Prominent RNA

Oxidation in Vulnerable Neurons. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2012, 71, 233-241.

- 385. Bose, C.; Kshirsagar, S.; Vijayan, M.; Kumar, S.; Singh, S.P.; Hindle, A.; Reddy, P.H. The Role of RLIP76 in Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction: Evidence Based on Autopsy Brains from Alzheimer's Disease Patients. Biochim. Biophys. Acta -Mol. Basis Dis. 2024, 1870, 166932.
- Halliwell, B. Oxidative Stress and Neurodegeneration: Where Are We Now? J. Neurochem. 2006, 97, 1634–1658.
- Montine, T.J.; Morrow, J.D. Fatty Acid Oxidation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Am. J. Pathol. 2005, 166, 1283–1289.
- Jové, M.; Mota-Martorell, N.; Obis, È.; Sol, J.; Martín-Garí, M.; Ferrer, I.; Portero-Otín, M.; Pamplona, R. Lipid Adaptations against Oxidative Challenge in the Healthy Adult Human Brain. Antioxidants 2023, 12, 177.
- 389. Tamagno, E.; Bardini, P.; Obbili, A.; Vitali, A.; Borghi, R.; Zaccheo, D.; Pronzato, M.A.; Danni, O.; Smith, M.A.; Perry, G.; et al. Oxidative Stress Increases Expression and Activity of BACE in NT2 Neurons. Neurobiol. Dis. **2002**, 10, 279–288.
- 390. Coma, M.; Guix, F.X.; Ill-Raga, G.; Uribesalgo, I.; Alameda, F.; Valverde, M.A.; Muñoz, F.J. Oxidative Stress Triggers the Amyloidogenic Pathway in Human Vascular Smooth Muscle Cells. Neurobiol. Aging 2008, 29, 969–980.
- Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer's Disease. Redox Biol. 2018, 14, 450–464.
- Susnow, N.; Zeng, L.; Margineantu, D.; Hockenbery, D.M. Bcl-2 Family Proteins as Regulators of Oxidative Stress. Semin. Cancer Biol. 2009, 19, 42–49.
- 393. Cizas, P.; Budvytyte, R.; Morkuniene, R.; Moldovan, R.; Broccio, M.; Lösche, M.; Niaura, G.; Valincius, G.; Borutaite, V. Size-Dependent Neurotoxicity of β-Amyloid Oligomers. Arch. Biochem. Biophys. 2010, 496, 84–92.
- 394. Riegerová, P.; Brejcha, J.; Bezděková, D.; Chum, T.; Mašínová, E.; Čermáková, N.; Ovsepian, S. V.; Cebecauer, M.; Štefl, M. Expression and Localization of AβPP in SH-SY5Y Cells Depends on Differentiation State. J. Alzheimer's Dis. 2021, 82, 485–491.

- 395. Han, X.-J.; Hu, Y.-Y.; Yang, Z.-J.; Jiang, L.-P.; Shi, S.-L.; Li, Y.-R.; Guo, M.-Y.; Wu, H.-L.; Wan, Y.-Y. Amyloid β-42 Induces Neuronal Apoptosis by Targeting Mitochondria. Mol. Med. Rep. 2017, 16, 4521–4528.
- 396. Morishima, Y.; Gotoh, Y.; Zieg, J.; Barrett, T.; Takano, H.; Flavell, R.; Davis, R.J.; Shirasaki, Y.; Greenberg, M.E. β-Amyloid Induces Neuronal Apoptosis Via a Mechanism That Involves the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway and the Induction of Fas Ligand. J. Neurosci. 2001, 21, 7551–7560.
- 397. Kadowaki, H.; Nishitoh, H.; Urano, F.; Sadamitsu, C.; Matsuzawa, A.; Takeda, K.; Masutani, H.; Yodoi, J.; Urano, Y.; Nagano, T.; et al. Amyloid β Induces Neuronal Cell Death through ROS-Mediated ASK1 Activation. Cell Death Differ. 2005, 12, 19–24.
- 398. Ivins, K.J.; Thornton, P.L.; Rohn, T.T.; Cotman, C.W. Neuronal Apoptosis Induced by β-Amyloid Is Mediated by Caspase-8. Neurobiol. Dis. 1999, 6, 440–449.
- Behl, C.; Davis, J.B.; Klier, F.G.; Schubert, D. Amyloid β Peptide Induces Necrosis Rather than Apoptosis. Brain Res. 1994, 645, 253–264.
- 400. Song, Z.; He, C.; Yu, W.; Yang, M.; Li, Z.; Li, P.; Zhu, X.; Xiao, C.; Cheng, S. Baicalin Attenuated A β 1-42 -Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells by Inhibiting the Ras-ERK Signaling Pathway. Biomed Res. Int. **2022**, 2022.
- 401. Ronsisvalle, N.; Benedetto, G.; Parenti, C.; Amoroso, S.; Bernardini, R.; Cantarella, G. CHF5074 Protects SH-SY5Y Human Neuronal-like Cells from Amyloidbeta 25-35 and Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Toxicity In Vitro. Curr. Alzheimer Res. 2014, 11, 714–724.
- 402. Li, Y.-P.; Bushnell, A.F.; Lee, C.-M.; Perlmutter, L.S.; Wong, S.K.-F. β-Amyloid Induces Apoptosis in Human-Derived Neurotypic SH-SY5Y Cells. Brain Res. 1996, 738, 196–204.
- Kunz, A.; Iadecola, C. Chapter 14 Cerebral Vascular Dysregulation in the Ischemic Brain. Handb Clin Neurol. 2009, 92, 283-305.
- Puig, B.; Brenna, S.; Magnus, T. Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 2834.
- 405. Lee, R.C.; Lee, M.H.; Wu, C.C.; Couto e Silva, A.; Possoit, H.; Hsieh, T.-H.; Minagar, A.; Lin, H. Cerebral Ischemia and Neuroregeneration. Neural Regen. Res. 2018, 13, 373.

- Janardhan, V.; Qureshi, A.I. Mechanisms of Ischemic Brain Injury. Curr. Cardiol. Rep. 2004, 6, 117–123.
- 407. Goldberg, M.; Choi, D. Combined Oxygen and Glucose Deprivation in Cortical Cell Culture: Calcium-Dependent and Calcium-Independent Mechanisms of Neuronal Injury. J. Neurosci. 1993, 13, 3510–3524.
- 408. Fordel, E.; Thijs, L.; Martinet, W.; Schrijvers, D.; Moens, L.; Dewilde, S. Anoxia or Oxygen and Glucose Deprivation in SH-SY5Y Cells: A Step Closer to the Unraveling of Neuroglobin and Cytoglobin Functions. Gene 2007, 398, 114–122.
- 409. Xu, S.; Li, Y.; Chen, J.; Li, D.-Z.; Jiang, Q.; Wu, T.; Zhou, X. Oxygen Glucose Deprivation/Re-Oxygenation-Induced Neuronal Cell Death Is Associated with Lnc-D63785 M6A Methylation and MiR-422a Accumulation. Cell Death Dis. 2020, 11, 816.
- Charalampopoulos, I.; Margioris, A.N.; Gravanis, A. Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Exerts Anti-apoptotic Effects by Membrane-mediated, Integrated Genomic and Non-genomic Pro-survival Signaling Pathways. J. Neurochem. 2008, 107, 1457–1469.
- 411. Marx, C.E.; Jarskog, L.F.; Lauder, J.M.; Gilmore, J.H.; Lieberman, J.A.; Morrow, A.L. Neurosteroid Modulation of Embryonic Neuronal Survival in Vitro Following Anoxia. Brain Res. 2000, 871, 104–112.
- Young Shin, C.; Choi, J.-W.; Sook Jang, E.; Ju, C.; Kim, W.-K.; Kim, H.-C.; Choi, C.-R.; Ho Ko, K. Dehydroepiandrosterone Inhibits the Death of Immunostimulated Rat C6 Glioma Cells Deprived of Glucose. Brain Res. 2001, 922, 267–275.
- 413. Jian, Z.; Nonaka, I.; Hattori, S.; Nakamura, S. Activation of Ras and Protection from Apoptotic Cell Death by BDNF in PC12 Cells Expressing TrkB. Cell. Signal. 1996, 8, 365–370.
- 414. Matrone, C.; Ciotti, M.T.; Mercanti, D.; Marolda, R.; Calissano, P. NGF and BDNF Signaling Control Amyloidogenic Route and Aβ Production in Hippocampal Neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 2008, 105.
- Shin, M.-K.; Kim, H.-G.; Kim, K.-L. A Novel Brain-Derived Neurotrophic Factor-Modulating Peptide Attenuates Aβ1-42-Induced Neurotoxicity in Vitro. Neurosci. Lett. 2015, 595, 63–68.

- 416. Kawahara, M. Neurosteroids Block the Increase in Intracellular Calcium Level Induced by Alzheimer&Rsquo;s Β-Amyloid Protein in Long-Term Cultured Rat Hippocampal Neurons. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2008, 209.
- 417. Cardounel, A.; Regelson, W.; Kalimi, M. Dehydroepiandrosterone Protects Hippocampal Neurons Against Neurotoxin-Induced Cell Death: Mechanism of Action ². Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1999**, 222, 145–149.
- Kumar, M.; Bansal, N. Implications of Phosphoinositide 3-Kinase-Akt (PI3K-Akt) Pathway in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Mol. Neurobiol. 2022, 59, 354– 385.
- 419. Long, H.-Z.; Cheng, Y.; Zhou, Z.-W.; Luo, H.-Y.; Wen, D.-D.; Gao, L.-C. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. Front. Pharmacol. 2021, 12.
- 420. Huang, M.; Duan, W.; Chen, N.; Lin, G.; Wang, X. Synthesis and Antitumor Evaluation of Menthone-Derived Pyrimidine-Urea Compounds as Potential PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway Inhibitor. Front. Chem. 2022, 9.
- 421. Liu, F.; Chen, G.-D.; Fan, L.-K. Knockdown of PDX1 Enhances the Osteogenic Differentiation of ADSCs Partly via Activation of the PI3K/Akt Signaling Pathway. J. Orthop. Surg. Res. 2022, 17, 107.
- 422. Yuan, L.; Yu, L.; Zhang, J.; Zhou, Z.; Li, C.; Zhou, B.; Hu, X.; Xu, G.; Tang, Y. Long Non-coding RNA H19 Protects H9c2 Cells against Hypoxia-induced Injury by Activating the PI3K/AKT and ERK/P38 Pathways. Mol. Med. Rep. 2020.
- 423. Meng, Y.; Yin, Q.; Ma, Q.; Qin, H.; Zhang, J.; Zhang, B.; Pang, H.; Tian, H. FXII Regulates the Formation of Deep Vein Thrombosis via the PI3K/AKT Signaling Pathway in Mice. Int. J. Mol. Med. **2021**, 47, 87.
- 424. Jiao, W.; Hao, J.; Xie, Y.; Meng, M.; Gao, W. EZH2 Mitigates the Cardioprotective Effects of Mesenchymal Stem Cell-Secreted Exosomes against Infarction via HMGA2-Mediated PI3K/AKT Signaling. BMC Cardiovasc. Disord. 2022, 22, 95.
- 425. Zhang, R.; Deng, X.; Liu, Q.; Zhang, X.; Bai, X.; Weng, S.; Chen, M. Global Research Trends and Hotspots of PI3K/Akt Signaling Pathway in the Field of Osteoarthritis: A Bibliometric Study. Medicine (Baltimore). 2023, 102, e33489.

- 426. Pan, J.; Yao, Q.; Wang, Y.; Chang, S.; Li, C.; Wu, Y.; Shen, J.; Yang, R. The Role of PI3K Signaling Pathway in Alzheimer's Disease. Front. Aging Neurosci. **2024**, 16.
- 427. Wang, C.; Hao, J.; Liu, X.; Li, C.; Yuan, X.; Lee, R.J.; Bai, T.; Wang, D. Isoforsythiaside Attenuates Alzheimer's Disease via Regulating Mitochondrial Function Through the PI3K/AKT Pathway. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 5687.
- Khezri, M.R.; Ghasemnejad-Berenji, M. The Role of Caspases in Alzheimer's Disease: Pathophysiology Implications and Pharmacologic Modulation. J. Alzheimer's Dis. 2023, 91, 71–90.
- Rickle, A.; Bogdanovic, N.; Volkman, I.; Winblad, B.; Ravid, R.; Cowburn, R.F. Akt Activity in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. Neuroreport 2004, 15, 955–959.
- Jahani-Asl, A.; Basak, A.; Tsang, B.K. Caspase-3-mediated Cleavage of Akt: Involvement of Non-consensus Sites and Influence of Phosphorylation. FEBS Lett. 2007, 581, 2883–2888.
- 431. Benedictus, M.R.; Leeuwis, A.E.; Binnewijzend, M.A.A.; Kuijer, J.P.A.; Scheltens, P.; Barkhof, F.; van der Flier, W.M.; Prins, N.D. Lower Cerebral Blood Flow Is Associated with Faster Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. Eur. Radiol. 2017, 27, 1169– 1175.
- Daulatzai, M.A. Early Stages of Pathogenesis in Memory Impairment during Normal Senescence and Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 2010, 20, 355–367.
- 433. Hu, B.R.; Liu, C.L.; Ouyang, Y.; Blomgren, K.; Siesjö, B.K. Involvement of Caspase-3 in Cell Death after Hypoxia–Ischemia Declines during Brain Maturation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2000, 20, 1294–1300.
- 434. Sankar, S.B.; Pybus, A.F.; Liew, A.; Sanders, B.; Shah, K.J.; Wood, L.B.; Buckley, E.M. Low Cerebral Blood Flow Is a Non-Invasive Biomarker of Neuroinflammation after Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. Neurobiol. Dis. 2019, 124, 544–554.
- 435. Sarbassov, D.D.; Guertin, D.A.; Ali, S.M.; Sabatini, D.M. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex. Science (80-.). 2005, 307, 1098–1101.
- 436. Want, A.; Nan, X.; Kokkali, E.; Barde, Y.-A.; Morgan, J.E. Brain-Derived Neurotrophic

Factor Released from Blood Platelets Prevents Dendritic Atrophy of Lesioned Adult Central Nervous System Neurons. Brain Commun. **2023**, 5.

- 437. Erhardt, J.Z.J.. D.D.G.I.. S.S.K.Ž.J.A.. Š.Š.D. Therapeutic Opportunities of Neurosteroids in Ischemic Brain Injury. In Proceedings of the 6th Croatian Neuroscience Congress : Abstracts; Heffer, M., Ed.; Osijek, Croatia. 2017, 96–96.
- 438. Martinovic, J.D.D.G.I.Z.M.G.-S.I.M.N.K.Z.E.J.S.S.D. DHEA(S) Restored Memory Impairment and Modulated Apoptotic Signalling Following Ischemic Brain Injury in Male Wistar Rats . In Proceedings of the 3rd Congress of Croatian Laboratory Animal Science Association (CroLASA) and 2nd joint CroLASA and Society for Laboratory Animals of Slovenia (SLAS) Congress with international participation; Erhardt, J., Lang Balija, M., Lazarus, M., Svob Strac, D., Eds.; Croatian Laboratory Animal Science Association: Zagreb, 2018; pp. 46–46.
- Bromley-Brits, K.; Deng, Y.; Song, W. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. J. Vis. Exp. 2011.
- 440. Pavisic, I.M.; Nicholas, J.M.; Pertzov, Y.; O'Connor, A.; Liang, Y.; Collins, J.D.; Lu, K.; Weston, P.S.J.; Ryan, N.S.; Husain, M.; et al. Visual Short-Term Memory Impairments in Presymptomatic Familial Alzheimer's Disease: A Longitudinal Observational Study. Neuropsychologia 2021, 162, 108028.
- 441. Lin, Y.-S.; Lin, Y.-F.; Chen, K.C.; Yang, Y.K.; Hsiao, Y.-H. Collapsin Response Mediator Protein 5 (CRMP5) Causes Social Deficits and Accelerates Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer's Disease. Neuropharmacology 2019, 157, 107673.
- 442. Torres-Lista, V.; López-Pousa, S.; Giménez-Llort, L. Impact of Chronic Risperidone Use on Behavior and Survival of 3xTg-AD Mice Model of Alzheimer's Disease and Mice With Normal Aging. Front. Pharmacol. 2019, 10.
- 443. Zhang, Y.-L.; Xing, R.-Z.; Luo, X.-B.; Xu, H.; Chang, R.C.-C.; Zou, L.-Y.; Liu, J.-J.; Yang, X.-F. Anxiety-like Behavior and Dysregulation of MiR-34a in Triple Transgenic Mice of Alzheimer's Disease. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2016, 20, 2853–2862.
- 444. Nguyen, E.T.; Selmanovic, D.; Maltry, M.; Morano, R.; Franco-Villanueva, A.; Estrada, C.M.; Solomon, M.B. Endocrine Stress Responsivity and Social Memory in 3xTg-AD Female and Male Mice: A Tale of Two Experiments. Horm. Behav. 2020, 126, 104852.

- 445. Botto, R.; Callai, N.; Cermelli, A.; Causarano, L.; Rainero, I. Anxiety and Depression in Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Pathogenetic Mechanisms and Relation to Cognitive Decline. Neurol. Sci. 2022, 43, 4107–4124.
- 446. Chambon, C.; Wegener, N.; Gravius, A.; Danysz, W. Behavioural and Cellular Effects of Exogenous Amyloid-β Peptides in Rodents. Behav. Brain Res. 2011, 225, 623–641.
- 447. Puzzo, D.; Gulisano, W.; Palmeri, A.; Arancio, O. Rodent Models for Alzheimer's Disease Drug Discovery. Expert Opin. Drug Discov. 2015, 10, 703–711.
- 448. Jhoo, J.H.; Kim, H.-C.; Nabeshima, T.; Yamada, K.; Shin, E.-J.; Jhoo, W.-K.; Kim, W.; Kang, K.-S.; Jo, S.A.; Woo, J.I. β-Amyloid (1–42)-Induced Learning and Memory Deficits in Mice: Involvement of Oxidative Burdens in the Hippocampus and Cerebral Cortex. Behav. Brain Res. 2004, 155, 185–196.
- 449. Glascock, J.J.; Osman, E.Y.; Coady, T.H.; Rose, F.F.; Shababi, M.; Lorson, C.L. Delivery of Therapeutic Agents Through Intracerebroventricular (ICV) and Intravenous (IV) Injection in Mice. J. Vis. Exp. 2011.
- 450. Morroni, F.; Sita, G.; Tarozzi, A.; Rimondini, R.; Hrelia, P. Early Effects of Aβ 1-42 Oligomers Injection in Mice: Involvement of PI3K/Akt/GSK3 and MAPK/ERK1/2 Pathways. Behav. Brain Res. 2016, 314, 106–115.
- 451. Ledo, J.H.; Azevedo, E.P.; Beckman, D.; Ribeiro, F.C.; Santos, L.E.; Razolli, D.S.; Kincheski, G.C.; Melo, H.M.; Bellio, M.; Teixeira, A.L.; et al. Cross Talk Between Brain Innate Immunity and Serotonin Signaling Underlies Depressive-Like Behavior Induced by Alzheimer's Amyloid-β Oligomers in Mice. J. Neurosci. 2016, 36, 12106–12116.
- 452. Van Ooteghem, K.; Musselman, K.E.; Mansfield, A.; Gold, D.; Marcil, M.N.; Keren, R.; Tartaglia, M.C.; Flint, A.J.; Iaboni, A. Key Factors for the Assessment of Mobility in Advanced Dementia: A Consensus Approach. Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv. 2019, 5, 409–419.
- 453. Barber, A.J.; Del Genio, C.L.; Swain, A.B.; Pizzi, E.M.; Watson, S.C.; Tapiavala, V.N.; Zanazzi, G.J.; Gaur, A.B. Age, Sex and Alzheimer's Disease: A Longitudinal Study of 3xTg-AD Mice Reveals Sex-Specific Disease Trajectories and Inflammatory Responses Mirrored in Postmortem Brains from Alzheimer's Patients. bioRxiv Prepr. Serv. Biol. 2023.

- 454. Morales, A.J.; Nolan, J.J.; Nelson, J.C.; Yen, S.S. Effects of Replacement Dose of Dehydroepiandrosterone in Men and Women of Advancing Age. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1994, 78, 1360–1367.
- 455. Alhaj, H.A.; Massey, A.E.; McAllister-Williams, R.H. Effects of DHEA Administration on Episodic Memory, Cortisol and Mood in Healthy Young Men: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Psychopharmacology (Berl). 2006, 188, 541–551.
- 456. Grimley Evans, J.; Malouf, R.; Huppert, F.A.; Van Niekerk, J.K. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Supplementation for Cognitive Function in Healthy Elderly People. Cochrane Database Syst. Rev. 2006, 2010.
- 457. Vallée, M.; Mayo, W.; Le Moal, M. Role of Pregnenolone, Dehydroepiandrosterone and Their Sulfate Esters on Learning and Memory in Cognitive Aging. Brain Res. Rev. 2001, 37, 301–312.
- Schmidt, P.J.; Daly, R.C.; Bloch, M.; Smith, M.J.; Danaceau, M.A.; Simpson St. Clair, L.; Murphy, J.H.; Haq, N.; Rubinow, D.R. Dehydroepiandrosterone Monotherapy in Midlife-Onset Major and Minor Depression. Arch. Gen. Psychiatry 2005, 62, 154.
- 459. Strous, R.D.; Maayan, R.; Lapidus, R.; Stryjer, R.; Lustig, M.; Kotler, M.; Weizman, A. Dehydroepiandrosterone Augmentation in the Management of Negative, Depressive, and Anxiety Symptoms in Schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry 2003, 60, 133.
- 460. Lin, H.-Y.; Feng, Y.-H.; Kao, T.-J.; Chen, H.-C.; Chen, G.-Y.; Ko, C.-Y.; Hsu, T.-I. Exploring Neuron-Specific Steroid Synthesis and DHEAS Therapy in Alzheimer's Disease. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2024, 243, 106585.
- 461. Farr, S.A.; Banks, W.A.; Uezu, K.; Gaskin, F.S.; Morley, J.E. DHEAS Improves Learning and Memory in Aged SAMP8 Mice but Not in Diabetic Mice. Life Sci. 2004, 75, 2775–2785.
- 462. Maurice, T.; Su, T.-P.; Privat, A. Sigma1 (Σ1) Receptor Agonists and Neurosteroids Attenuate B25–35-Amyloid Peptide-Induced Amnesia in Mice through a Common Mechanism. Neuroscience **1998**, 83, 413–428.
- 463. Xu, B.; Yang, R.; Chang, F.; Chen, L.; Xie, G.; Sokabe, M.; Chen, L. Neurosteroid PREGS Protects Neurite Growth and Survival of Newborn Neurons in the Hippocampal Dentate Gyrus of APPswe/PS1dE9 Mice. Curr. Alzheimer Res. 2012, 9, 361–372.

- 464. Yoo, A.; Harris, J.; Dubrovsky, B. Dose–Response Study of Dehydroepiandrosterone Sulfate on Dentate Gyrus Long Term Potentiation. Exp. Neurol. 1996, 137, 151–156.
- 465. Roberts, E.; Bologa, L.; Flood, J.F.; Smith, G.E. Effects of Dehydroepiandrosterone and Its Sulfate on Brain Tissue in Culture and on Memory in Mice. Brain Res. 1987, 406, 357–362.
- Scheff, S.W.; Price, D.A. Alzheimer's Disease-Related Alterations in Synaptic Density: Neocortex and Hippocampus. J. Alzheimer's Dis. 2006, 9, 101–115.
- 467. Ono, M.; Ito, T.; Yamaki, S.; Hori, Y.; Zhou, Q.; Zhao, X.; Muramoto, S.; Yamamoto, R.; Furuyama, T.; Sakata-Haga, H.; et al. Spatiotemporal Development of the Neuronal Accumulation of Amyloid Precursor Protein and the Amyloid Plaque Formation in the Brain of 3xTg-AD Mice. Heliyon 2024, 10, e28821.
- 468. Do, T.D.; Economou, N.J.; Chamas, A.; Buratto, S.K.; Shea, J.-E.; Bowers, M.T. Interactions between Amyloid-β and Tau Fragments Promote Aberrant Aggregates: Implications for Amyloid Toxicity. J. Phys. Chem. B 2014, 118, 11220–11230.
- Kitagishi, Y.; Nakanishi, A.; Ogura, Y.; Matsuda, S. Dietary Regulation of PI3K/AKT/GSK-3β Pathway in Alzheimer's Disease. Alzheimers. Res. Ther. 2014, 6, 35.
- 470. Zeng, K.-W.; Wang, X.-M.; Ko, H.; Kwon, H.C.; Cha, J.W.; Yang, H.O. Hyperoside Protects Primary Rat Cortical Neurons from Neurotoxicity Induced by Amyloid β-Protein via the PI3K/Akt/Bad/BclXL-Regulated Mitochondrial Apoptotic Pathway. Eur. J. Pharmacol. 2011, 672, 45–55.
- 471. Matsuda, S.; Nakagawa, Y.; Tsuji, A.; Kitagishi, Y.; Nakanishi, A.; Murai, T. Implications of PI3K/AKT/PTEN Signaling on Superoxide Dismutases Expression and in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Diseases 2018, 6, 28.
- 472. Cui, W.; Wang, S.; Wang, Z.; Wang, Z.; Sun, C.; Zhang, Y. Inhibition of PTEN Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis via Activation of PI3K/AKT Pathway in Alzheimer's Disease. Neurochem. Res. 2017, 42, 3052–3060.
- Wang, Y.; Lin, Y.; Wang, L.; Zhan, H.; Luo, X.; Zeng, Y.; Wu, W.; Zhang, X.; Wang, F. TREM2 Ameliorates Neuroinflammatory Response and Cognitive Impairment via PI3K/AKT/FoxO3a Signaling Pathway in Alzheimer's Disease Mice.

Aging (Albany. NY). 2020, 12, 20862-20879.

- 474. Razani, E.; Pourbagheri-Sigaroodi, A.; Safaroghli-Azar, A.; Zoghi, A.; Shanaki-Bavarsad, M.; Bashash, D. The PI3K/Akt Signaling Axis in Alzheimer's Disease: A Valuable Target to Stimulate or Suppress? Cell Stress Chaperones 2021, 26, 871–887.
- 475. Horwood, J.M.; Dufour, F.; Laroche, S.; Davis, S. Signalling Mechanisms Mediated by the Phosphoinositide 3-kinase/Akt Cascade in Synaptic Plasticity and Memory in the Rat. Eur. J. Neurosci. 2006, 23, 3375–3384.
- 476. Visser, P.J.; Reus, L.M.; Gobom, J.; Jansen, I.; Dicks, E.; van der Lee, S.J.; Tsolaki, M.; Verhey, F.R.J.; Popp, J.; Martinez-Lage, P.; et al. Cerebrospinal Fluid Tau Levels Are Associated with Abnormal Neuronal Plasticity Markers in Alzheimer's Disease. Mol. Neurodegener. 2022, 17, 1–16.
- 477. Hu, X.; Li, X.; Zhao, M.; Gottesdiener, A.; Luo, W.; Paul, S. Tau Pathogenesis Is Promoted by Aβ1-42 but Not Aβ1-40. Mol. Neurodegener. 2014, 9, 52.
- 478. Li, L.; Jiang, Y.; Hu, W.; Tung, Y.C.; Dai, C.; Chu, D.; Gong, C.-X.; Iqbal, K.; Liu, F. Pathological Alterations of Tau in Alzheimer's Disease and 3xTg-AD Mouse Brains. Mol. Neurobiol. 2019, 56, 6168–6183.
- Fahnestock, M. Brain-Derived Neurotrophic Factor: The Link between Amyloid-β and Memory Loss. Future Neurol. 2011, 6, 627–639.
- Lu, B.; Nagappan, G.; Lu, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. Handb Exp Pharmacol. 2014, 220, 223-50.
- Huang, E.J.; Reichardt, L.F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. Annu. Rev. Neurosci. 2001, 24, 677–736.
- Lu, Y.; Christian, K.; Lu, B. BDNF: A Key Regulator for Protein Synthesis-Dependent LTP and Long-Term Memory? Neurobiol. Learn. Mem. 2008, 89, 312–323.
- 483. Qiao, X.; Gai, H.; Su, R.; Deji, C.; Cui, J.; Lai, J.; Zhu, Y. PI3K-AKT-GSK3β-CREB Signaling Pathway Regulates Anxiety-like Behavior in Rats Following Alcohol Withdrawal. J. Affect. Disord. 2018, 235, 96–104.
- 484. Karishma, K.K.; Herbert, J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Stimulates Neurogenesis in the Hippocampus of the Rat, Promotes Survival of Newly Formed Neurons and

Prevents Corticosterone-induced Suppression. Eur. J. Neurosci. 2002, 16, 445-453.

- Compagnone, N.A.; Mellon, S.H. Dehydroepiandrosterone: A Potential Signalling Molecule for Neocortical Organization during Development. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, 95, 4678–4683.
- 486. Suzuki, M.; Wright, L.S.; Marwah, P.; Lardy, H.A.; Svendsen, C.N. Mitotic and Neurogenic Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Human Neural Stem Cell Cultures Derived from the Fetal Cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004, 101, 3202–3207.
- 487. Naert, G.; Maurice, T.; Tapia-Arancibia, L.; Givalois, L. Neuroactive Steroids Modulate HPA Axis Activity and Cerebral Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein Levels in Adult Male Rats. Psychoneuroendocrinology 2007, 32, 1062–1078.
- 488. Pluchino, N.; Russo, M.; Santoro, A.N.; Litta, P.; Cela, V.; Genazzani, A.R. Steroid Hormones and BDNF. Neuroscience 2013, 239, 271–279.
- 489. Sakr, H.F.; Khalil, K.I.; Hussein, A.M.; Zaki, M.S.A.; Eid, R.A.; Alkhateeb, M. Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Memory and Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in a Rat Model of Vascular Dementia. J. Physiol. Pharmacol. 2014, 65, 41–53.
- 490. Beam, C.R.; Kaneshiro, C.; Jang, J.Y.; Reynolds, C.A.; Pedersen, N.L.; Gatz, M. Differences Between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 2018, 64, 1077–1083.
- 491. Mielke, M.; Vemuri, P.; Rocca, W. Clinical Epidemiology of Alzheimer&Rsquo;s Disease: Assessing Sex and Gender Differences. Clin. Epidemiol. 2014, 37.
- 492. Berger, A.L. Insulin Resistance and Reduced Brain Glucose Metabolism in the Aetiology of Alzheimer's Disease. J. Metab. Heal. **2016**, 1.
- Butterfield, D.A.; Halliwell, B. Oxidative Stress, Dysfunctional Glucose Metabolism and Alzheimer Disease. Nat. Rev. Neurosci. 2019, 20, 148–160.
- 494. Aldred, S.; Mecocci, P. Decreased Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) Concentrations in Plasma of Alzheimer's Disease (AD) Patients. Arch. Gerontol. Geriatr. 2010, 51, e16–e18.
- 495. Notkola, I.-L.; Sulkava, R.; Pekkanen, J.; Erkinjuntti, T.; Ehnholm, C.; Kivinen, P.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A. Serum Total Cholesterol, Apolipoprotein E {FC12}e4

Allele, and Alzheimer's Disease. Neuroepidemiology 1998, 17, 14-20.

- 496. Kivipelto, M.; Helkala, E.-L.; Laakso, M.P.; Hänninen, T.; Hallikainen, M.; Alhainen, K.; Iivonen, S.; Mannermaa, A.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A.; et al. Apolipoprotein E E4 Allele, Elevated Midlife Total Cholesterol Level, and High Midlife Systolic Blood Pressure Are Independent Risk Factors for Late-Life Alzheimer Disease. Ann. Intern. Med. 2002, 137, 149.
- 497. Tan, Z.S.; Seshadri, S.; Beiser, A.; Wilson, P.W.F.; Kiel, D.P.; Tocco, M.; D'Agostino, R.B.; Wolf, P.A. Plasma Total Cholesterol Level as a Risk Factor for Alzheimer Disease. Arch. Intern. Med. 2003, 163, 1053.
- 498. Mielke, M.M.; Zandi, P.P.; Shao, H.; Waern, M.; Östling, S.; Guo, X.; Björkelund, C.; Lissner, L.; Skoog, I.; Gustafson, D.R. The 32-Year Relationship between Cholesterol and Dementia from Midlife to Late Life. Neurology **2010**, 75, 1888–1895.
- 499. Mielke, M.M.; Zandi, P.P.; Sjögren, M.; Gustafson, D.; Östling, S.; Steen, B.; Skoog, I. High Total Cholesterol Levels in Late Life Associated with a Reduced Risk of Dementia. Neurology 2005, 64, 1689–1695.
- Reitz, C.; Tang, M.-X.; Luchsinger, J.; Mayeux, R. Relation of Plasma Lipids to Alzheimer Disease and Vascular Dementia. Arch. Neurol. 2004, 61, 705.
- 501. Iwagami, M.; Qizilbash, N.; Gregson, J.; Douglas, I.; Johnson, M.; Pearce, N.; Evans, S.; Pocock, S. Blood Cholesterol and Risk of Dementia in More than 1.8 Million People over Two Decades: A Retrospective Cohort Study. Lancet Heal. Longev. 2021, 2, e498–e506.
- 502. Kueper, J.K.; Speechley, M.; Montero-Odasso, M. The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. J. Alzheimers. Dis. 2018, 63, 423–444.
- 503. Wessels, A.M.; Dowsett, S.A.; Sims, J.R. Detecting Treatment Group Differences in Alzheimer's Disease Clinical Trials: A Comparison of Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive Subscale (ADAS-Cog) and the Clinical Dementia Rating - Sum of Boxes (CDR-SB). J. Prev. Alzheimer's Dis. 2018, 5, 15–20.
- 504. Cano, S.J.; Posner, H.B.; Moline, M.L.; Hurt, S.W.; Swartz, J.; Hsu, T.; Hobart, J.C. The ADAS-Cog in Alzheimer's Disease Clinical Trials: Psychometric Evaluation of the Sum

and Its Parts. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2010, 81, 1363-1368.

- 505. Raghavan, N.; Samtani, M.N.; Farnum, M.; Yang, E.; Novak, G.; Grundman, M.; Narayan, V.; DiBernardo, A. The ADAS-Cog Revisited: Novel Composite Scales Based on ADAS-Cog to Improve Efficiency in MCI and Early AD Trials. Alzheimer's Dement. 2013, 9.
- 506. Lommatzsch, M.; Zingler, D.; Schuhbaeck, K.; Schloetcke, K.; Zingler, C.; Schuff-Werner, P.; Virchow, J.C. The Impact of Age, Weight and Gender on BDNF Levels in Human Platelets and Plasma. Neurobiol. Aging 2005, 26, 115–123.
- 507. Bo, M.; Massaia, M.; Zannella, P.; Cappa, G.; Ferrario, E.; Rainero, I.; Arvat, E.; Giordano, R.; Molaschi, M. Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEA-S) and Alzheimer's Dementia in Older Subjects. Int. J. Geriatr. Psychiatry 2006, 21, 1065– 1070.
- Hillen, T.; Lun, A.; Reischies, F.M.; Borchelt, M.; Steinhagen-Thiessen, E.; Schaub, R.T. DHEA-S Plasma Levels and Incidence of Alzheimer's Disease. Biol. Psychiatry 2000, 47, 161–163.
- 509. Cho, S.; Jung, B.H.; Lee, W.; Chung, B.C. Rapid Column-switching Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Assay for DHEA-sulfate in the Plasma of Patients with Alzheimer's Disease. Biomed. Chromatogr. 2006, 20, 1093–1097.
- 510. Armanini, D.; Vecchio, F.; Basso, A.; Milone, F.F.; Simoncini, M.; Fiore, C.; Mattarello, M.J.; Sartorato, P.; Karbowiak, I. Alzheimer's Disease: Pathophysiological Implications of Measurement of Plasma Cortisol, Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate, and Lymphocytic Corticosteroid Receptors. Endocrine 2003, 22, 113–118.
- 511. Rammouz, G.; Lecanu, L.; Aisen, P.; Papadopoulos, V. A Lead Study on Oxidative Stress-Mediated Dehydroepiandrosterone Formation in Serum: The Biochemical Basis for a Diagnosis of Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 2011, 24, 5–16.
- 512. Rasmuson, S.; Näsman, B.; Olsson, T. Increased Serum Levels of Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Interleukin-6 (IL-6) in Women with Mild to Moderate Alzheimer's Disease. Int. Psychogeriatrics 2011, 23, 1386–1392.
- Naylor, J.C.; Hulette, C.M.; Steffens, D.C.; Shampine, L.J.; Ervin, J.F.; Payne, V.M.; Massing, M.W.; Kilts, J.D.; Strauss, J.L.; Calhoun, P.S.; et al. Cerebrospinal Fluid

Dehydroepiandrosterone Levels Are Correlated with Brain Dehydroepiandrosterone Levels, Elevated in Alzheimer's Disease, and Related to Neuropathological Disease Stage. J. Clin. Endocrinol. Metab. **2008**, 93, 3173–3178.

- 514. Kim, S.-B.; Hill, M.; Kwak, Y.-T.; Hampl, R.; Jo, D.-H.; Morfin, R. Neurosteroids: Cerebrospinal Fluid Levels for Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Diagnostics. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 5199–5206.
- 515. Milos, T.; Rojo, D.; Nedic Erjavec, G.; Konjevod, M.; Tudor, L.; Vuic, B.; Svob Strac, D.; Uzun, S.; Mimica, N.; Kozumplik, O.; et al. Metabolic Profiling of Alzheimer's Disease: Untargeted Metabolomics Analysis of Plasma Samples. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry **2023**, 127, 110830.
- 516. Laske, C.; Stransky, E.; Leyhe, T.; Eschweiler, G.W.; Maetzler, W.; Wittorf, A.; Soekadar, S.; Richartz, E.; Koehler, N.; Bartels, M.; et al. BDNF Serum and CSF Concentrations in Alzheimer's Disease, Normal Pressure Hydrocephalus and Healthy Controls. J. Psychiatr. Res. 2007, 41.
- 517. Forlenza, O.V.; Diniz, B.S.; Teixeira, A.L.; Ojopi, E.B.; Talib, L.L.; Mendonça, V.A.; Izzo, G.; Gattaz, W.F. Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism and Serum Levels on the Progression of Mild Cognitive Impairment. World J. Biol. Psychiatry **2010**, 11, 774–780.
- 518. Yu, H.; Zhang, Z.; Shi, Y.; Bai, F.; Xie, C.; Quian, Y.; Yuan, Y.; Deng, L. Association Study of the Decreased Serum BDNF Concentrations in Amnestic Mild Cognitive Impairment and the Val66Met Polymorphism in Chinese Han. J. Clin. Psychiatry 2008, 69.
- 519. Pláteník, J.; Fišar, Z.; Buchal, R.; Jirák, R.; Kitzlerová, E.; Zvěřová, M.; Raboch, J. GSK3β, CREB, and BDNF in Peripheral Blood of Patients with Alzheimer's Disease and Depression. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 2014, 50.
- 520. Angelucci, F.; Spalletta, G.; Iulio, F.; Ciaramella, A.; Salani, F.; Varsi, A.; Gianni, W.; Sancesario, G.; Caltagirone, C.; Bossu, P. Alzheimers Disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) Patients Are Characterized by Increased BDNF Serum Levels. Curr. Alzheimer Res. 2010, 7, 15–20.
- 521. Faria, M.C.; Gonçalves, G.S.; Rocha, N.P.; Moraes, E.N.; Bicalho, M.A.; Gualberto Cintra, M.T.; Jardim de Paula, J.; José Ravic de Miranda, L.F.; Clayton de Souza

Ferreira, A.; Teixeira, A.L.; et al. Increased Plasma Levels of BDNF and Inflammatory Markers in Alzheimer's Disease. J. Psychiatr. Res. **2014**, 53.

- 522. Nettiksimmons, J.; Simonsick, E.M.; Harris, T.; Satterfield, S.; Rosano, C.; Yaffe, K. The Associations between Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Potential Confounders, and Cognitive Decline: A Longitudinal Study. PLoS One 2014, 9.
- Ng, T.K.S.; Coughlan, C.; Heyn, P.C.; Tagawa, A.; Carollo, J.J.; Kua, E.H.; Mahendran, R. Increased Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) as a Potential Biomarker for and Compensatory Mechanism in Mild Cognitive Impairment: A Case-Control Study. Aging (Albany. NY). 2021, 13, 22666–22689.
- 524. Nikolac Perkovic, M.; Borovecki, F.; Filipcic, I.; Vuic, B.; Milos, T.; Nedic Erjavec, G.; Konjevod, M.; Tudor, L.; Mimica, N.; Uzun, S.; et al. Relationship between Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cognitive Decline in Patients with Mild Cognitive Impairment and Dementia. Biomolecules **2023**, 13, 570.
- 525. Laske, C.; Stransky, E.; Leyhe, T.; Eschweiler, G.W.; Wittorf, A.; Richartz, E.; Bartels, M.; Buchkremer, G.; Schott, K. Stage-Dependent BDNF Serum Concentrations in Alzheimer's Disease. J. Neural Transm. 2006, 113.
- 526. Yasutake, C.; Kuroda, K.; Yanagawa, T.; Okamura, T.; Yoneda, H. Serum BDNF, TNFα and IL-1β Levels in Dementia Patients. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2006, 256, 402–406.
- 527. Savaskan, E.; Müller-Spahn, F.; Olivieri, G.; Bruttel, S.; Otten, U.; Rosenberg, C.; Hulette, C.; Hock, C. Alterations in Trk A, Trk B and Trk C Receptor Immunoreactivities in Parietal Cortex and Cerebellum in Alzheimer's Disease. Eur. Neurol. 2000, 44, 172– 180.
- Pan, W.; Banks, W.A.; Fasold, M.B.; Bluth, J.; Kastin, A.J. Transport of Brain-Derived Neurotrophic Factor across the Blood–Brain Barrier. Neuropharmacology 1998, 37.
- Karege, F.; Schwald, M.; Cisse, M. Postnatal Developmental Profile of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rat Brain and Platelets. Neurosci. Lett. 2002, 328.
- 530. Qin, X.-Y.; Cao, C.; Cawley, N.X.; Liu, T.-T.; Yuan, J.; Loh, Y.P.; Cheng, Y. Decreased Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis Study (N=7277). Mol. Psychiatry 2017, 22.

- 531. Weinstein, G.; Beiser, A.S.; Choi, S.H.; Preis, S.R.; Chen, T.C.; Vorgas, D.; Au, R.; Pikula, A.; Wolf, P.A.; DeStefano, A.L.; et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor and the Risk for Dementia. JAMA Neurol. 2014, 71.
- 532. Kim, B.Y.; Lee, S.H.; Graham, P.L.; Angelucci, F.; Lucia, A.; Pareja-Galeano, H.; Leyhe, T.; Turana, Y.; Lee, I.R.; Yoon, J.H.; et al. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis. Mol. Neurobiol. 2017, 54.
- 533. Fujimura, H.; Altar, C.A.; Chen, R.; Nakamura, T.; Nakahashi, T.; Kambayashi, J.; Sun, B.; Tandon, N.N. Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Stored in Human Platelets and Released by Agonist Stimulation. Thromb. Haemost. 2002, 87.
- 534. Lommatzsch, M.; Zingler, D.; Schuhbaeck, K.; Schloetcke, K.; Zingler, C.; Schuff-Werner, P.; Virchow, J.C. The Impact of Age, Weight and Gender on BDNF Levels in Human Platelets and Plasma. Neurobiol. Aging 2005, 26.
- 535. Kerschensteiner, M.; Gallmeier, E.; Behrens, L.; Leal, V.V.; Misgeld, T.; Klinkert, W.E.F.; Kolbeck, R.; Hoppe, E.; Oropeza-Wekerle, R.-L.; Bartke, I.; et al. Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-Derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? J. Exp. Med. **1999**, 189.
- 536. Li, G.; Peskind, E.R.; Millard, S.P.; Chi, P.; Sokal, I.; Yu, C.-E.; Bekris, L.M.; Raskind, M.A.; Galasko, D.R.; Montine, T.J. Cerebrospinal Fluid Concentration of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cognitive Function in Non-Demented Subjects. PLoS One 2009, 4.
- 537. Cargill, M.; Altshuler, D.; Ireland, J.; Sklar, P.; Ardlie, K.; Patil, N.; Lane, C.R.; Lim, E.P.; Kalyanaraman, N.; Nemesh, J.; et al. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in Coding Regions of Human Genes. Nat. Genet. **1999**, 22, 231–238.
- 538. Zdanys, K.F.; Kleiman, T.G.; Zhang, H.; Ozbay, F.; MacAvoy, M.G.; Gelernter, J.; van Dyck, C.H. BDNF Variants, Premorbid Educational Attainment, and Disease Characteristics in Alzheimer's Disease: An Exploratory Study. J. Alzheimer's Dis. 2009, 17, 887–898.
- Lim, Y.Y.; Villemagne, V.L.; Laws, S.M.; Pietrzak, R.H.; Snyder, P.J.; Ames, D.; Ellis, K.A.; Harrington, K.; Rembach, A.; Martins, R.N.; et al. APOE and BDNF 193

Polymorphisms Moderate Amyloid β-Related Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease. Mol. Psychiatry **2015**, 20, 1322–1328.

- 540. Lin, Y.; Cheng, S.; Xie, Z.; Zhang, D. Association of Rs6265 and Rs2030324 Polymorphisms in Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene with Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. PLoS One 2014, 9, e94961.
- 541. Li, G.-D.; Bi, R.; Zhang, D.-F.; Xu, M.; Luo, R.; Wang, D.; Fang, Y.; Li, T.; Zhang, C.; Yao, Y.-G. Female-Specific Effect of the BDNF Gene on Alzheimer's Disease. Neurobiol. Aging 2017, 53, 192.e11-192.e19.
- 542. Fukumoto, N.; Fujii, T.; Combarros, O.; Kamboh, M.I.; Tsai, S.; Matsushita, S.; Nacmias, B.; Comings, D.E.; Arboleda, H.; Ingelsson, M.; et al. Sexually Dimorphic Effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on Susceptibility to Alzheimer's Disease: New Data and Meta-analysis. Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. 2010, 153B, 235–242.
- 543. Bessi, V.; Mazzeo, S.; Bagnoli, S.; Padiglioni, S.; Carraro, M.; Piaceri, I.; Bracco, L.; Sorbi, S.; Nacmias, B. The Implication of BDNF Val66Met Polymorphism in Progression from Subjective Cognitive Decline to Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A 9-Year Follow-up Study. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2020, 270, 471–482.
- 544. Abanmy, N.; Alsabhan, J.; Gard, P.; Scutt, G. Association between the Val66Met Polymorphism (Rs6265/G196A) of the BDNF Gene and Cognitive Performance with SSRI Use in Arab Alzheimer's Disease Patients. Saudi Pharm. J. 2021, 29, 1392–1398.
- 545. Yao, X.; Yang, G.; Fang, T.; Tian, Z.; Lu, Y.; Chen, F.; Che, P.; Chen, J.; Zhang, N. Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Polymorphism Affects Cognitive Function and Neurofilament Light Chain Level in Patients with Subcortical Ischaemic Vascular Dementia. Front. Aging Neurosci. 2023, 15.
- 546. Haring, R.; Wallaschofski, H.; Teumer, A.; Kroemer, H.; Taylor, A.E.; Shackleton, C.H.L.; Nauck, M.; Völker, U.; Homuth, G.; Arlt, W. A SULT2A1 Genetic Variant Identified by GWAS as Associated with Low Serum DHEAS Does Not Impact on the Actual DHEA/DHEAS Ratio. J. Mol. Endocrinol. 2013, 50, 73–77.
- 547. Phillips, H.S.; Hains, J.M.; Armanini, M.; Laramee, G.R.; Johnson, S.A.; Winslow, J.W. BDNF MRNA Is Decreased in the Hippocampus of Individuals with Alzheimer's

Disease. Neuron. 1991, 7(5), 695-702.

- Fahnestock, M.; Garzon, D.; Holsinger, R.M.D.; Michalski, B. Neurotrophic Factors and Alzheimer's Disease: Are We Focusing on the Wrong Molecule? J Neural Transm Suppl. 2002, 62, 241-52.
- 549. Ferrer, I.; Marín, C.; Rey, M.J.; Ribalta, T.; Goutan, E.; Blanco, R.; Tolosa, E.; Martí, E. BDNF and Full-Length and Truncated TrkB Expression in Alzheimer Disease. Implications in Therapeutic Strategies. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **1999**, 58, 729–739.
- 550. Holsinger, R.M.D.; Schnarr, J.; Henry, P.; Castelo, V.T.; Fahnestock, M. Quantitation of BDNF MRNA in Human Parietal Cortex by Competitive Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: Decreased Levels in Alzheimer's Disease. Mol. Brain Res. 2000, 76, 347–354.
- 551. Ginsberg, S.D.; Malek-Ahmadi, M.H.; Alldred, M.J.; Chen, Y.; Chen, K.; Chao, M. V.; Counts, S.E.; Mufson, E.J. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and TrkB Hippocampal Gene Expression Are Putative Predictors of Neuritic Plaque and Neurofibrillary Tangle Pathology. Neurobiol. Dis. 2019, 132.
- Connor, B.; Young, D.; Yan, Q.; Faull, R.L..; Synek, B.; Dragunow, M. Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Reduced in Alzheimer's Disease. Mol. Brain Res. 1997, 49, 71– 81.
- 553. Allen, S.J.; Wilcock, G.K.; Dawbarn, D. Profound and Selective Loss of Catalytic TrkB Immunoreactivity in Alzheimer's Disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 264, 648–651.

Poveznice

http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH200105.pdf https://agnthos.se/alzet-osmotic-pumps/1483-alzet-pumps-overview.html https://brainstuff.org/blog/why-do-scientists-study-the-c57bl6-mouse https://brincubator.com/modular-incubator-chamber/ https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/ https://promega.showpad.com/share/o9dbG29xoCpAmEZQkhR7h https://theory.labster.com/mtt-assay/ https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Count-&-Viability-Kit-RSP.pdf. https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Oxidative-Stress-Kit-QRC.pdf https://www.ataxia.org/scasourceposts/snapshot-morris-water-maze-test/ https://www.biocompare.com/26776-Western-Blot-Analysis/ https://www.bioted.es/1-1-extraction-and-purification-of-nucleics-acids/ https://www.jax.org/strain/004807# https://www.leadgenebio.com/services/index/elisa-kit-development https://www.mantacc.com/differences-of-pcr-tech

8. PRILOZI



Prilog 1. Primarni neuroni miša snimljeni fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 nakon 5-7 dana od nasađivanja. Zelenom bojom (Anti-β III Tubulin + Goat Anti-Rabbit IgG H&L) označeni su dendriti, a plavom bojom (Hoechst 33342) jezgre neurona.



Prilog 2. Izgled i veličina 10 μM A) monomera, B) oligomera i C) polimera Aβ₄₂ utvrđenih mikroskopijom atomskih sila (AFM). Mjerna skala: 400 nm.



9. ŽIVOTOPIS

Barbara Vuić rođena je 09. prosinca 1995. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju. S velikom pohvalom (Magna cum laude) završila je preddiplomski studij Biologije 2017. godine i Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, 2019. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, uz pohvalnicu za izuzetan uspjeh u studiju. Godine 2020. zapošljava se kao asistentica na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, Zavoda za molekularnu medicinu, te upisuje Poslijediplomski doktorski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao suradnica sudjelovala je u istraživačkom projektu "Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji" Hrvatske zaklade za znanost te bilateralnim projektima sa Slovenijom i Mađarskom, u okviru kojih se u 5 navrata usavršavala u Ljubljani, Pečuhu i Budimpešti te objavila 10 znanstvenih radova, jedno poglavlje u knjizi i 15 sažetaka u zbornicima. Usavršavala se na 10 seminara, 8 radionica i 2 tečaja te sudjelovala na 16 znanstvenih konferencija. Dobitnica je stipendija za sudjelovanje na konferencijama "Steroids and Nervous System 2022", "Sinapsa Neuroscience Conference 2023" i "FENS Forum 2024", stipendije Vlade Mađarske za studijski boravak na Sveučilištu u Pečuhu te potpore grada Zagreba za studijski posjet Sveučilištu u Ljubljani 2023. godine. Članica je Hrvatskog društva farmakologa, Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i Hrvatskog društva za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju te je bila aktivna u popularizaciji znanosti u okviru Otvorenih dana Instituta Ruđer Bošković.