

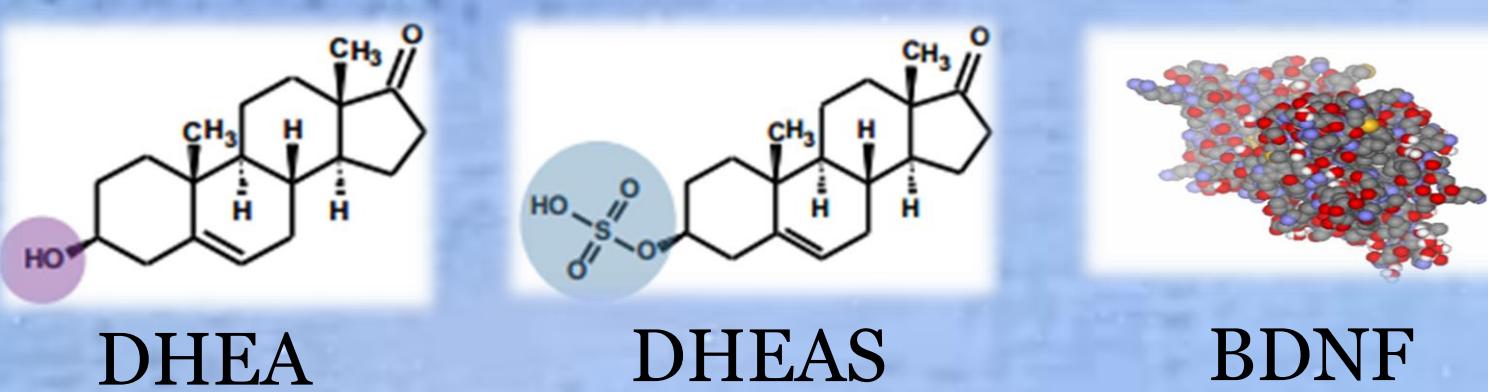
# DHEA, DHEAS I BDNF – POTENCIJALNE TERAPIJSKE METE U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI

<sup>1</sup> Institut Ruder Bošković, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

## UVOD

Alzheimerova bolest (AB) je teška neurodegenerativna bolest i najčešći oblik demencije koji će u skoroj budućnosti zbog ubrzanog starenja stanovništva postati jedan od vodećih medicinskih, društvenih i ekonomskih problema. Terapija AB svodi se na simptomatsko liječenje, a brojne studije novih učinkovitih lijekova za sada su bezuspješne. Istraživanja pokazuju da neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfat (DHEAS), kao i neurotrofin moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) posjeduju neuroprotektivno djelovanje i potencijal za prevenciju i liječenje AB.

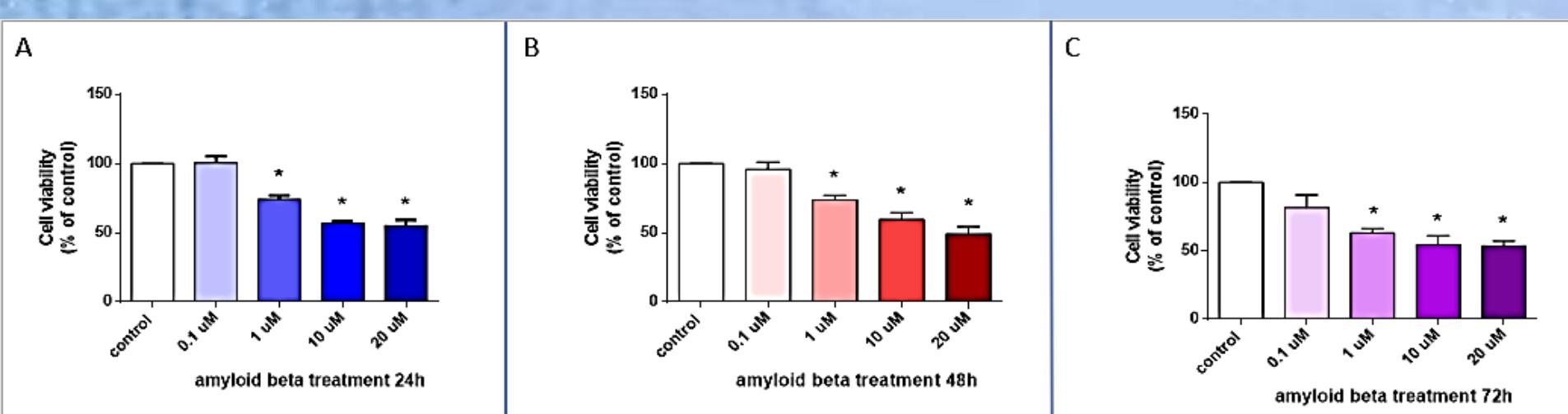


Složene interakcije i molekularni mehanizmi djelovanja DHEA, DHEAS i BDNF nisu u potpunosti razjašnjeni, stoga je cilj ovog istraživanja njihovo bolje razumijevanje.

**DEMENTIA**  
An "umbrella" term used to describe a range of symptoms associated with cognitive impairment.

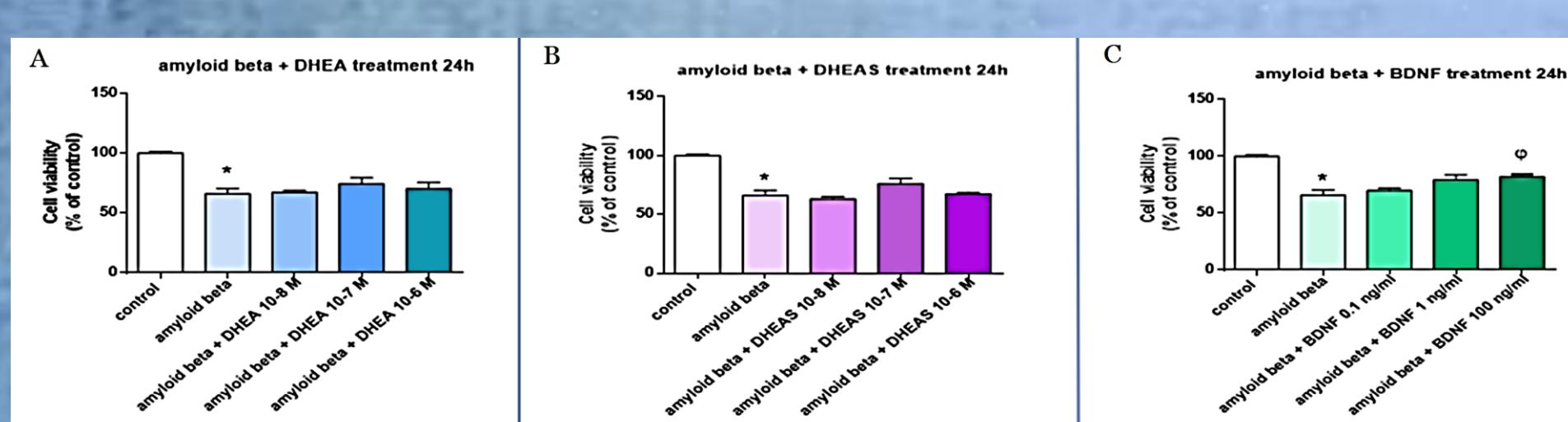
## REZULTATI

Rezultati MTT testa pokazali su da je koncentracija A<sub>β</sub>42 oligomera od 10 μM primijenjena tijekom 24h optimalna je za izazivanje toksičnosti u primarnoj kulturi neurona (Slika 5.).



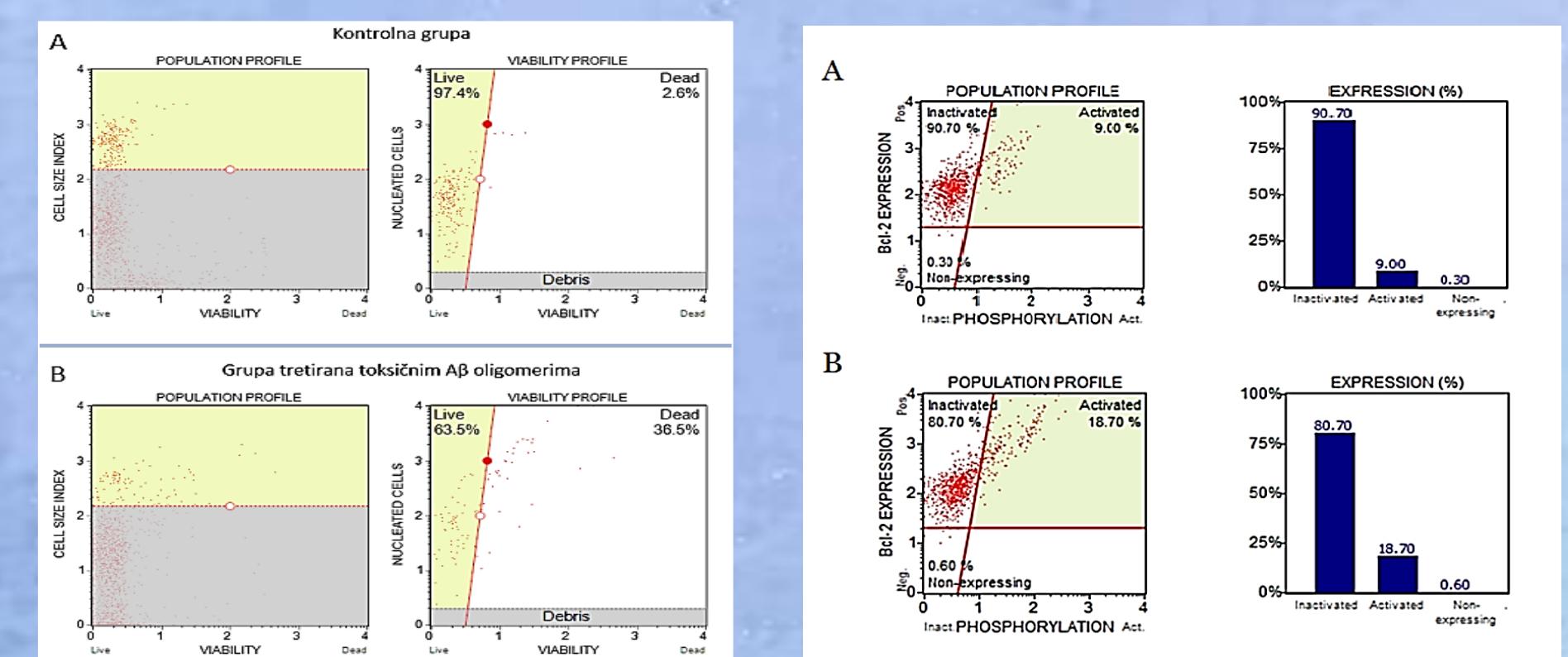
Slika 5. Utjecaj različitih koncentracija A<sub>β</sub>42 oligomera na preživljavanje neurona tijekom 24 h (A), 48 h (B) i 72 h (C)

Koncentracije DHEA(S) od 0.1 μM i BDNF-a od 100 ng/mL primijenjene tijekom 24 h pokazale su najbolji neuroprotektivni učinak na neurone tretirane toksičnim A<sub>β</sub>42 oligomerima (Slika 8.).



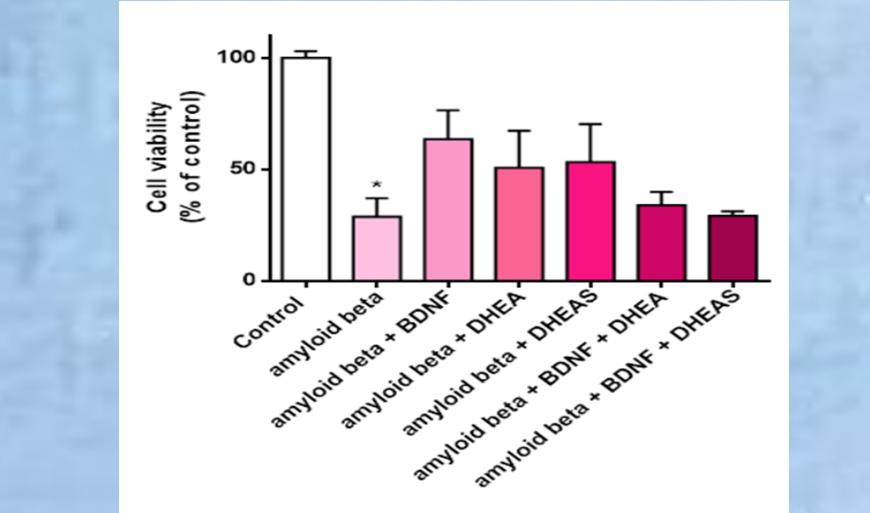
Slika 8. Neuroprotektivni učinak različitih koncentracija DHEA (A), DHEAS (B) i BDNF (C) na neurone tretirane tijekom 24h s 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima

Analize protočnim citometrom MUSE potvrdile su neurotoksičnost tretmana neurona s 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima kroz 24h (Slike 6.) kao i posljedičnu blagu aktivaciju Bcl-2 proteina koji djeluje kao regulator apoptoze (Slika 7.).



Slika 6. Viyabilnost neurona tretiranih 24h otapalom (A) i neuronima tretiranim 24h otapalom s 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima (B) (A) i s 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima (B)

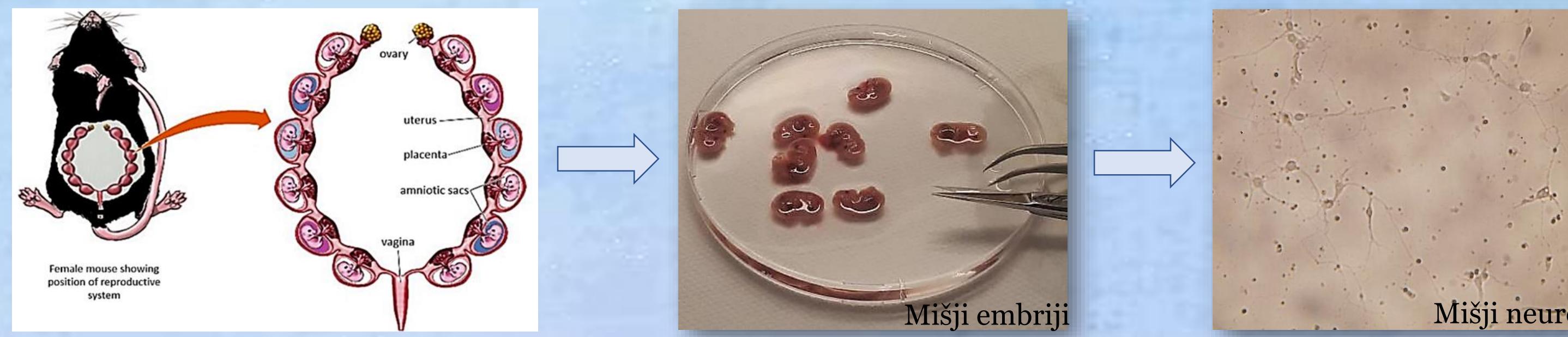
Neuroprotektivni učinak 0.1 μM DHEA i DHEAS te 100 ng/mL BDNF na neurone tretirane toksičnim 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima kroz 24h gubi se kada se primjeni njihova kombinacija (Slika 9.).



Slika 9. Učinak DHEA, DHEAS i BDNF, te njihove kombinacije na neurone tretirane 24h s 10 μM A<sub>β</sub>42 oligomerima

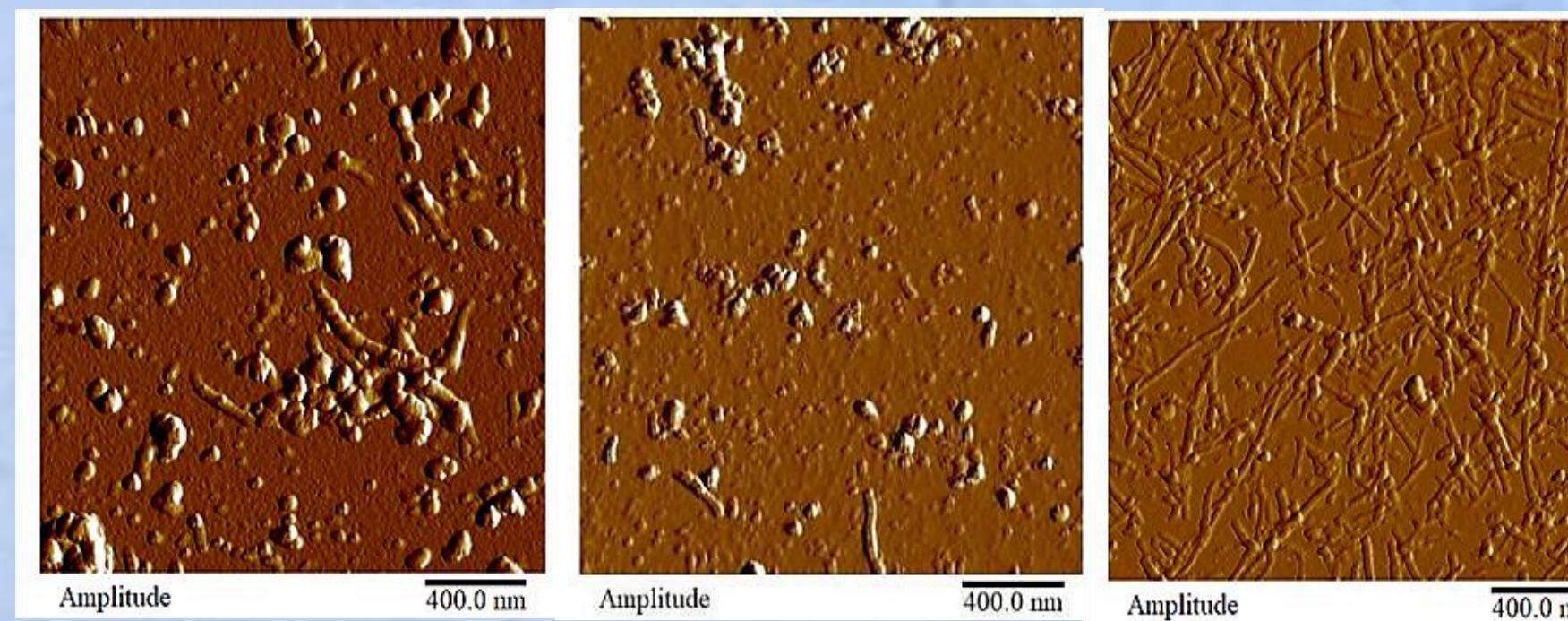
## MATERIJAL I METODE

In vitro istraživanja provedena su u primarnoj kulturi neurona, izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa starih 15 dana (Slika 1.). Iz mišice trudne 15 dana najprije su uklonjeni embriji, a zatim je izdvojen njihov mozak. Pod disekcijskom lupom uklonjene su meninge i mali mozak, a tkivo korteksa je isprano, tripsinizirano, trituirano, te propušteno kroz 70 μm filter do homogene suspenzije stanica. Neuroni su nasadeni u neurobasalnom mediju s dodatkom B27 i glutamina na pločice prethodno obložene D-lizinom.

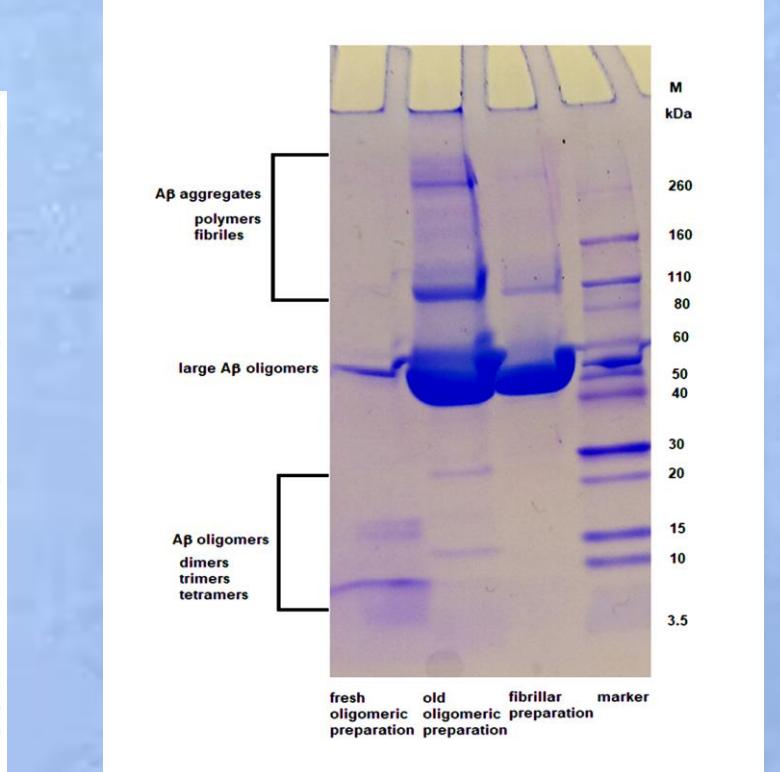


Slika 1. Izolacija C57BL/6 mišjih embrija i neurona

A<sub>β</sub>42 peptid otopljen je u HFIP-u, a nakon uklanjanja otapala, tanki sloj A<sub>β</sub>42 peptida otopljen je u DMSO, vorteksiran, centrifugiran i sonificiran. Iz ovih uzoraka pripremljeni su 10 μM A<sub>β</sub> monomeri, oligomeri i polimeri prema protokolu Stine i sur. (2011.), a njihovo stvaranje provjereno je mikroskopijom atomskih sila (AFM) (Slika 2.) i denaturirajućom elektroforezom na 4-20% poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) (Slika 3.).

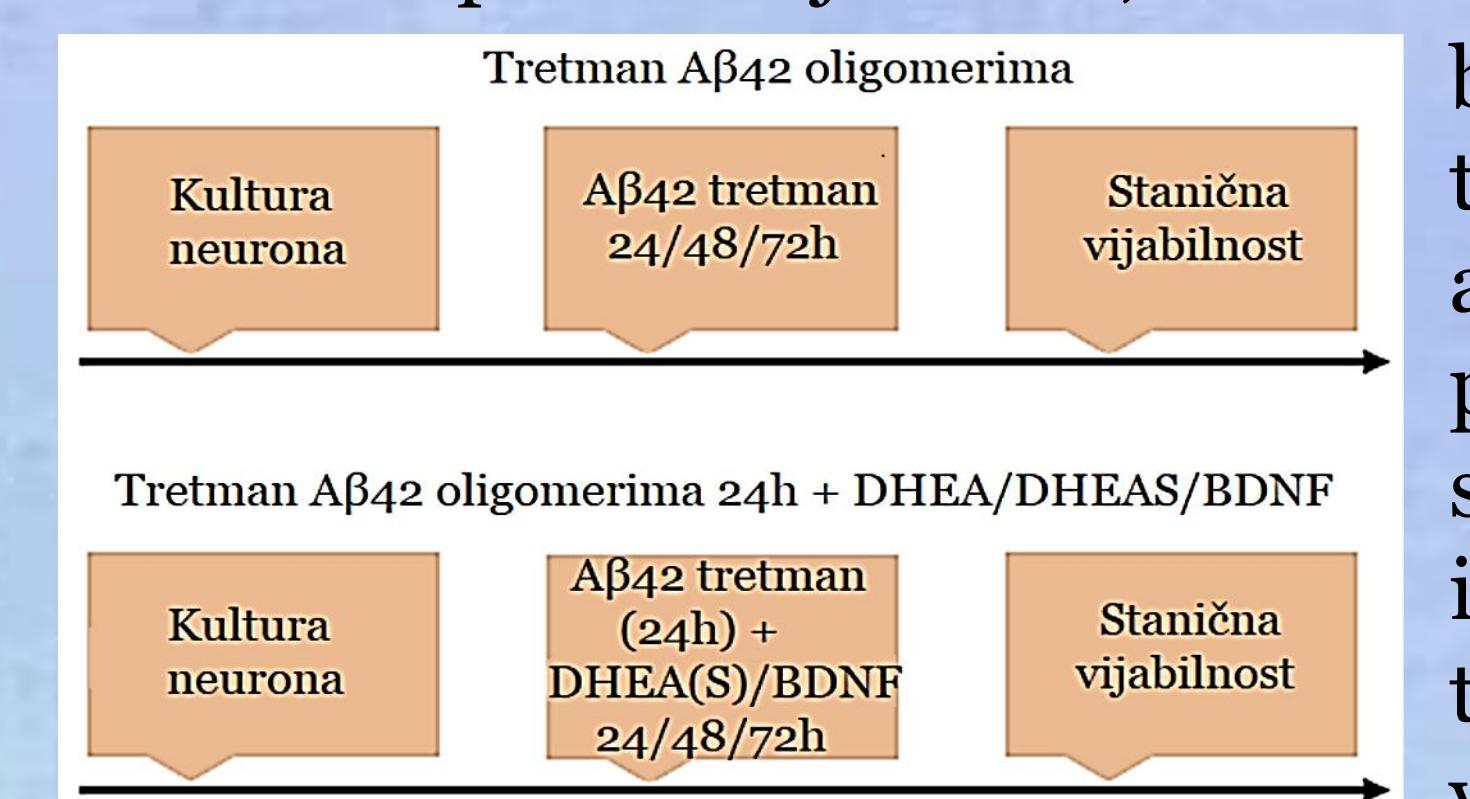


Slika 2. Preparacije A<sub>β</sub> monomera (lijevo), oligomera (sredina) i polimera (desno) detektirane AFM-om



Slika 3. A<sub>β</sub> oligomeri detektirani s SDS-PAGE

Djelovanje A<sub>β</sub>42 oligomera, koji se smatraju odgovornima za neurotoksični učinak u mozgu osoba s AB, na vijabilnost neurona u primarnoj kulturi, istraženo je primjenom MTT testa i staničnog analizatora MUSE. Kolorimetrijski MTT test



Slika 4. Tretman primarnih neurona miša A<sub>β</sub>42 oligomerima i s DHEA, DHEAS i BDNF

bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjeranjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Očitana apsorbancija na 570 nm proporcionalna je broju živih stanica u uzorku. MUSE test predstavlja mini protočni citometar kojim se može ispitati niz parametara staničnog zdravlja, apoptoze, oksidativnog stresa, stanične signalizacije te imunološkog odgovora. Nakon analiza raznih doza i vremenskih perioda djelovanja toksičnih A<sub>β</sub>42 oligomera na neurone, istražene su i razne koncentracije i vremenski periodi neuroprotektivnih učinaka DHEA, DHEAS i BDNF u primarnoj kulturi neurona (Slika 4). Dobiveni rezultati obrađeni su i grafički prikazani primjenom GraphPad Prism programa.

## ZAKLJUČAK

Rezultati upućuju na značajan toksični učinak A<sub>β</sub>42 oligomera u primarnoj kulturi mišjih neurona, koji se djelomično ostvaruje aktivacijom apoptoze. Tretmani s DHEA, DHEAS i BDNF pokazuju neuroprotektivni učinak, no njihova kombinacija nema neuroprotektivno djelovanje što upućuje na iste stanične ciljeve ovih supstanci i potencijalni antagonizam njihovih pozitivnih učinaka. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja na staničnim i animalnim modelima, kao i na ispitnicima oboljelim od AB, kako bi se razjasnili kompleksni mehanizmi djelovanja ovih neurosteroida i neurotrofina u svrhu njihove potencijalne primjene u ranom otkrivanju bolesti, kao i prevenciji i/ili liječenju simptoma AB.