Rekombinantni GABA-A receptori - model in vitro za istraživanje neurosteroida dehidroepiandrosteron sulfata

Tudor, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:197733

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Tudor

REKOMBINANTNI $GABA_A$ RECEPTORI: MODEL *IN VITRO* ZA ISTRAŽIVANJE NEUROSTEROIDA DIHIDROEPIANDROSTERON SULFATA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob Štrac, znanstvene suradnice, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije

Zahvaljujem se dragoj mentorici dr. sc. Dubravki Švob-Štrac na strpljenju, blagosti, savjetima i iznimnoj pomoći pri izradi ovog rada kao i svim djelatnicima laboratorija za neurofarmakologiju na IRB-u. Također se zahvaljujem svojoj majci, zbog svih žrtvi koje je podnijela, te prijateljima i momku na razumijevanju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

REKOMBINANTNI $GABA_A$ RECEPTORI: MODEL *IN VITRO* ZA ISTRAŽIVANJE NEUROSTEROIDA DIHIDROEPIANDROSTERON SULFATA

Lucija Tudor
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) je neurosteroid uključen u važne funkcije mozga poput neuralne plastičnosti, učenja, pamćenja i ponašanja, te pokazuje potencijal u liječenju različitih neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući i ishemijski moždani udar. Učinci DHEAS-a u središnjem živčanom sustavu posredovani su putem GABA i glutamatnog neurotransmitorskog sustava, ali i drugih. Cilj rada bio je ispitati učinke primjene DHEAS-a na rekombinantne $GABA_A$ receptore, usporedbom djelovanja ovog neurosteorida na embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK 293), netransficirane i stabilno transficirane $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, te istražiti njegovo potencijalno neuroprotektivno djelovanje u modelu deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije *in vitro* (OGDR). Istraživanje je pokazalo da se DHEAS ponaša kao alosterički antagonist rekombinantnih $GABA_A$ receptora, ali da njegova produljena primjena ne utječe na broj, afinitet, kao ni na funkcionalnu povezanost receptorskih veznih mjesta. Rezultati su također pokazali da DHEAS, primijenjen i prije i nakon OGDR djeluje protektivno na stanice HEK 293, te da se citoprotektivan učinak ovog neurosteroida barem dijelom ostvaruje putem $GABA_A$ receptora.

(62 stranica, 25 slika, 10 tablica, 149 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS); embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK 293); rekombinananti $GABA_A$ receptori; model deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGDR); citoptotektivan učinak; ishemijska ozljeda mozga

Voditelj: dr. sc. Dubravka Švob Štrac, znan. suradnik, IRB

Su-voditelj: dr. sc. Vesna Benković, izv. prof., PMF

Ocjenitelji: dr. sc. Vesna Benković, izv. prof., PMF
dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof., PMF
dr.sc. Maja Matulić, izv. prof., PMF

Rad prihvaćen: 03.03.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

RECOMBINANT $GABA_A$ RECEPTORS: *IN VITRO* MODEL TO STUDY THE EFFECTS OF NEUROSTEROID DEHYDROEPIANDROSTERONE SULPHATE

Lucija Tudor
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is a neurosteroid involved in various important brain functions such as neural plasticity, learning, memory and behavior, demonstrating the potential to treat a variety of neuropsychiatric disorders, including ischemic stroke. Effects of DHEAS in the central nervous system are mediated through GABAergic, glutamatergic and other neurotransmitter systems. The aim of this study was to investigate the effects of DHEAS on recombinant $GABA_A$ receptors by comparing the effects of this neurosteorid on human embryonic kidney (HEK) 293 cells, stably transfected and untransfected with $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ $GABA_A$ receptors, and to explore the potential neuroprotective effect of this neurosteroid using *in vitro* model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion (OGDR). The study has shown that DHEAS acts as an allosteric antagonist of recombinant $GABA_A$ receptors, but that its prolonged administration does not affect the number, affinity, or the functional coupling of receptor binding sites. The results also suggested that DHEAS, applied both before and after OGDR has protective effect on HEK 293 cells, and that cytoprotective effect of this neurosteroid is at least partly achieved via $GABA_A$ receptors.

(62 pages, 25 figures, 10 tables, 149 references, original language: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library

Key words:Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS); human embryonic kidney (HEK) 293 cells; recombinant $GABA_A$ receptors; model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion (OGDR); cytoprotective effect; ishemic brain injury

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, ResearchAssociate, RBI

Co-supervisor: Vesna Benković, Assoc. Prof., Faculty of Science

Reviewers: Vesna Benković, Assoc. Prof., Faculty of Science
Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof., Faculty of Science
Maja Matulić, Assoc. Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: 03.03.2016.

KRATICE

Aβ - amiloidni beta protein

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

DHEA – dihidroepiandrosteron

DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

GABA – γ-aminomaslačna kiselina (od eng. γ-*amino-butyric acid*)

HEK - embrionalne stanice bubrega čovjeka (od eng. *human embryonic kidney cells*,)

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

HST - hidroksisteroid sulfotransferaza

ICAM – međustanična adhezijska molekula (od eng. *intercellular adhesion molecule*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NF-κB – nuklearni faktor kappa B (od eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)*

NMDA–N-metil-D-aspartat

NOS – sintaza dušikovog oksida (od eng. *nitric oxid synthase)*

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

P450c17 – 17a-hidroksilaza/c17,20-lijaza

P450scc – dezmolaza

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (od eng. *reactive oxygen species*)

SULT2A1 – hidroksisteroid sulfotransferaza

SŽS – središnji živčani sustav

t-Pa – tkivni aktivator plazminogena

VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula (od eng. *vascular cell adhesion molecule)*

VEGF–vaskularni čimbenik rasta (od eng. *vascular endothelial growth factor*)

3βHSD – 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza

SADRŽAJ

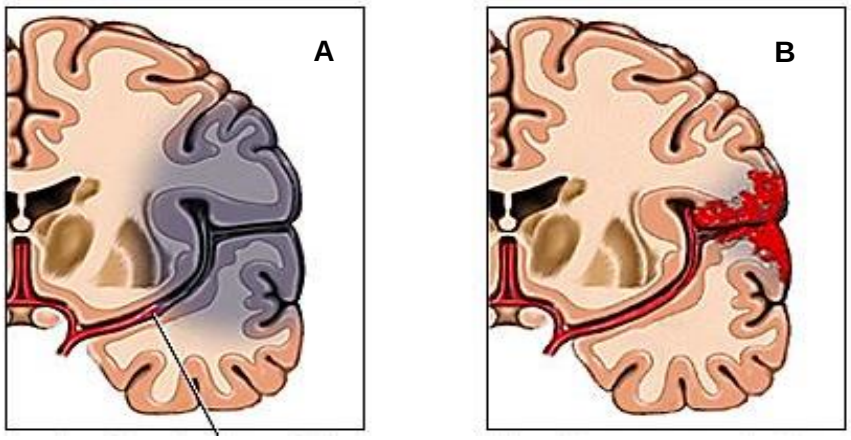
1. Uvod ... 1
1.1. Moždani udar ... 1
1.1.1. Mehanizam ishemijsko-reperfuzijske ozljede ... 1
1.1.2. Modeli za istraživanje ishemičnog moždanog udara ... 4
1.1.2.1. Modeli in vivo ... 4
1.1.2.2. Modeli in vitro ... 5
1.1.3. Terapija moždanog udara ... 6
1.1.3.1. Neuroprotektivne strategije ... 7
1.2. Neurosteroidi DHEA i DHEAS ... 9
1.2.1. DHEA(S) u središnjem živčanom sustavu ... 10
1.2.2. Biosinteza DHEA(S) ... 11
1.2.3. Mehanizam djelovanja DHEA(S) ... 11
1.2.4. Neurobiološka funkcija DHEA(S) ... 13
1.2.4.1. Neuroprotektivno djelovanje DHEA(S) ... 13
1.2.4.2. Utjecaj DHEA(S) na rast neurita i neurogenezu ... 13
1.2.4.3. Uloga DHEA(S) u metabolizmu neurotransmitora ... 14
1.2.4.4. Antioksidativna, protuupalna i antiglukokortikoidna svojstva DHEA(S) ... 14
1.2.5. Terapeutski potencijal DHEA(S) ... 15
2. Cilj istraživanja ... 16
3. Materijali i metode ... 17
3.1. Materijali ... 17
3.1.1. Kultura embrionalnih stanica bubrega čovjeka 293 ... 17
3.1.2. Kultura stanica HEK 293 stabilno transficiranih rekombinantim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ ... 17
3.1.3. Uzgoj stanica ... 17
3.1.4. Lijekovi ... 17
3.1.5. Izolacija staničnih membrana ... 18
3.1.6. Određivanje proteina ... 18
3.1.7. Vezanje radioaktivno obilježenog liganda ... 18
3.1.8. Kemikalije ... 19
3.2. Metode ... 19
3.2.1. Odmrzavanje stanica ... 19
3.2.2. Održavanje kulture stanica ... 20
3.2.3. Presađivanje stanica ... 20

3.2.4. Deprivacija glukoze i kisika, te reperfuzija (OGDR) 20
3.2.5. Primjena lijekova 20
3.2.6. Brojanje stanica 21
3.2.7. Izolacija membrana 21
3.2.8. Određivanje koncentracije proteina 22
3.2.9. Metoda vezanja radioaktivno obilježenog liganda za receptore 22
3.2.10. Mjerenje na β-scintilacijskom brojilu 28
3.2.11. Statistička obrada podataka 28
4. Rezultati 29
4.1. Vezivanje [3H]DHEAS-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ 29
4.2. Učinak DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]flunitrazepama na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ 30
4.3. Učinak DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]TBOB-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ 31
4.4. Učinak produljene primjene DHEAS-a na svojstva benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ 32
4.5. Učinak produljene primjene DHEAS-a na svojstva veznih mjesta za konvuzive na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ 36
4.6. Protektivno djelovanje DHEAS-a na stanice HEK 293 u modelu deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGDR) 40
5. Rasprava 44
6. Zaključak 50
7. Literatura 52
8. Životopis 62

1. Uvod

1.1. Moždani udar

Moždani udar jedan je od 5 najčešćih uzroka smrti u svijetu, a kod ljudi koji ga prežive često ostavlja teška i trajna oštećenja mozga. Trenutno ne postoji puno terapeutskih strategija koje bi spriječile oštećenja tkiva nakon moždanog udara, pogotovo ako se ne reagira unutar nekoliko sati. Simptomi moždanog udara mogu biti paraliza ili gubitak osjeta na jednoj strani tijela, problemi u govoru i njegovom razumijevanju, vrtoglavica i gubitak vida na jedno oko, ovisno o tome koja je regija mozga pogođena i u kojoj mjeri. Ukoliko se pravovremeno ne uspostavi normalan protok krvi, moždani udar može izazvati trajna oštećenja mozga i smrt (Nour i sur. 2012). Postoje dva glavna tipa moždanog udara*:* hemoragijski, uzrokovan izlijevanjem krvi u određeni dio mozga i ishemijski koji čini 85% svih moždanih udara, a čiji je uzrok privremeni zastoj protoka krvi i time nedovoljna opskrba stanica kisikom i hranjivim tvarima (Slika 1.) (Kidwell i Warach 2003, Nour i sur. 2012).

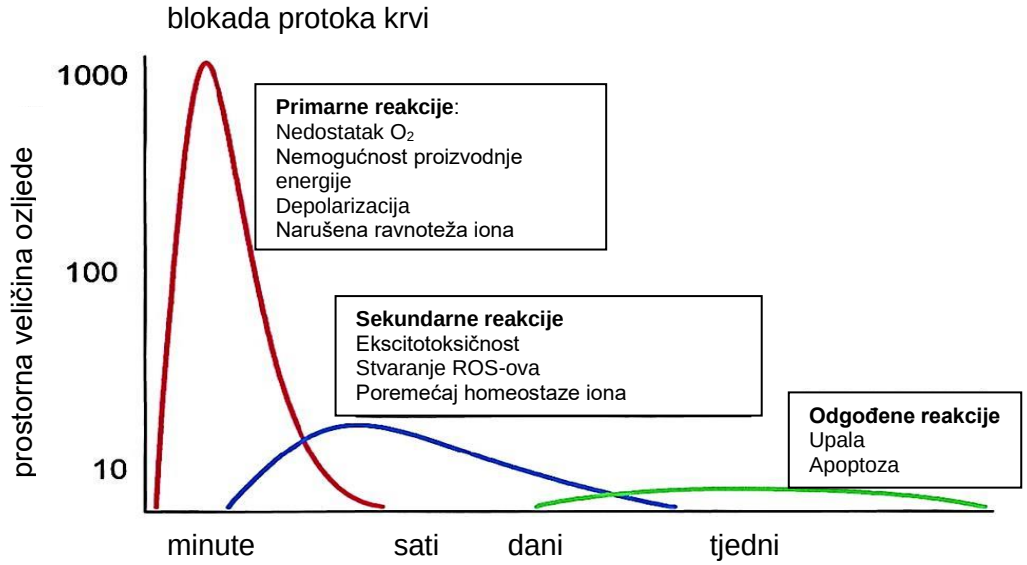


Slika 1. Shema ishemijskog (A) i hemoragijskog (B) moždanog udara. Ishemijski moždani udar nastaje uslijed začepljenja moždane arterije pri čemu dio mozga privremeno ostaje bez kisika i hranjivih tvari,te može doći do oštećenja i smrti moždanog tkiva. Hemoragijski moždani udar je uzrokovan prsnućem arterije, te izlijevanjem krvi u određeni dio mozga. Nakupljena krv stvara pritisak na neurone i dolazi do njihovog oštećenja i smrti (preuzeto s http://www.webmd.com/stroke/ischemic-versus-hemorrhagic-stroke).

1.1.1. Mehanizam ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Nakon ishemijskog moždanog udara, nedovoljna opskrba kisikom i glukozom, te nakupljanje potencijalno toksičnih tvari dovodi do metaboličkog stresa, zatajenja energetskog sustava, poremećaja iona i pokretanja kompleksne kaskade biokemijskih i molekularnih događanja (Slika 2. i Slika 3.), koje u konačnici dovode do oštećenja i odumiranja neurona (Iadecola i Anrather 2011, Nour i sur. 2012). Reperfuzija je proces koji

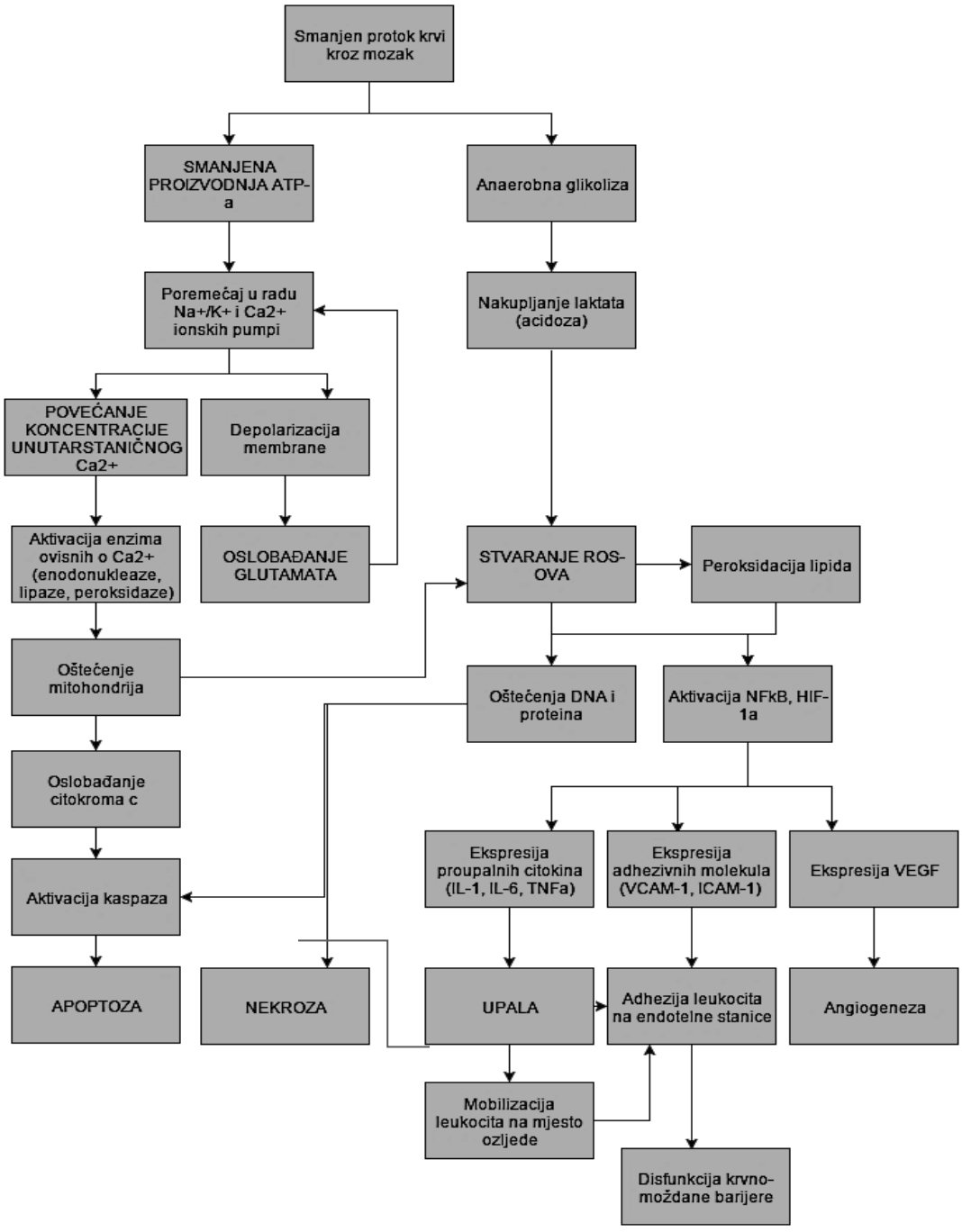
prati ishemiju. U tom se periodu obnavljaju krvne žile i reoksigenira ugroženo tkivo. Iako se izvorna hipoksija ublažila, reperfuzija može uzrokovati dodatna oštećenja tkiva što je pokazano na različitim organima uključujući mozak, srce i bubrege u slučajevima moždanog udara, srčanog infarkta i akutne ozljede bubrega (Park i sur. 2011). Stoga se posljedice moždanog udara na stanicu mogu podijeliti na ishemijske, uzrokovane izravnim nedostatkom kisika i hranjivih tvari i sekundarne, reperfuzijske, uzrokovane imunološkim odgovorom na ozljedu. Mehanizam i intezitet ishemijsko-reperfuzijske ozljede prikazani su na Slici 2. (Eltzschig i Eckle 2011).



Slika 2. Hipotetski model prostorne veličine ishemijsko-reperfuzijske ozljede i njenog razvoja tijekom vremena. Primarne reakcije nedostatka krvi odgovorne su za većinu oštećenja, dok sekundarne i odgođene reakcije puno manje doprinose ukupnom oštećenju tkiva (preuzeto i modificirano prema Heiss i sur. 1999).

Zbog nedovoljne opskrbe stanica kisikom i glukozom, narušava se proces proizvodnje energije (ATP-a, fosfokreatina) procesom glikolize i oksidativne fosforilacije, te kao posljedica anaerobne glikolize, dolazi do nakupljanja laktata i acidoze stanice. To dovodi do poremećaja u radu brojnih proteina koji ovise o ATP-u, između ostalih i ionskih pumpi na površini stanice. Disfunkcija Na^+/K^+ ATP-aze i Ca^{2+} ionskih pumpi uzrokuje prekomjerni ulazak Na^+ i Ca^{2+} u stanicu, kojeg prati ulazak vode što uzrokuje bubrenje stanice i stvaranje edema. Povećana unutarstanična koncentracija Na^+ uzrokuje depolarizaciju membrane, dok Ca^{2+} aktivira brojne stanične enzime (lipaze, fosfataze, endonukleaze...) te oštećuje mitohondrij. Mitohondrij počinje oslobađati slobodne radikale i citokrom c u citoplazmu što aktivira kaskadu kaspaza koje vode do apoptoze (Martin i sur. 1994, Eltzschig i Collard 2004, Woodruff i sur. 2011, Nour i sur. 2012). Ionska neravnoteža dovodi do prekomjernog oslobađanja glutamata koji je ekscitacijski neurotransmitor, a u prekomjernoj količini je neurotoksičan. Nakuplja se u prostoru između neurona te stalno

aktivira njihove receptore što uzrokuje dodatnu neravnotežu iona u stanici (Martin i Wang, 2010).



Slika 3. Kaskada glavnih događaja prilikom ishemije i kasnije reperfuzije. HIF-1α- čimbenik 1α induciran hipoksijom, NFκB - nuklearni faktor *kappa* B, ROS – reaktivni kisikovi spojevi, VEGF – vaskularni faktor rasta (preuzeto i modificirano prema Venketasubramanian i sur. 2011).

Oksidacijski stres nastaje nakupljanjem ROS-ova u stanici. Uzrokovan je primarnom ishemijskom ozljedom, ali i sekundarnom, reperfuzijskom. Primarno nastajanje ROS-ova događa se zbog oštećenja mitohondrija i poremećaja u procesu oksidativne fosforilacije.

Osim toga, ROS-ovi se stvaraju djelovanjem nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze i neuralne sintaze dušikova oksida (nNOS) aktivirane nakupljenim Ca^{2+} (Suh i sur. 2008). NO u ovakvim staničnim uvjetima lako prelazi u reaktivni peroksinitrit, te zajedno s kisikovim radikalima dodatno aktivira signalne puteve koji vode upali i staničnoj smrti (Allen i Bayraktutan 2009). ROS-ovi uzrokuju oštećenja DNA, proteina i lipida, stimuliraju proizvodnju p53 proteina i suprimiraju transkripciju anti-apoptotskih proteina iz porodice Bcl-2. Sve ovo vodi staničnoj smrti bilo nekrozom ili apoptozom (Shen i sur. 2003). Slobodni radikali aktiviraju nuklearni faktor *kappa* B (NFκB), čimbenik 1α induciran hipoksijom (HIF-1α, od eng. *hypoxia-inducible factor*), transkripcijske faktore koji potiču ekspresiju gena za proupalne citokine i kemokine interleukin 1, 6, 8, TNFα (od eng. *tumor necrosis factor*), adhezijske molekule ICAM-1 i VCAM-1 te vaskularni faktor rasta koji potiče angiogenezu, odnosno stvaranje krvnih žila (Ridder i Schwaninger 2009, Woodruff i sur. 2011).

Proupalni citokini i kemokini koji stižu na mjesto ozljede privlače i aktiviraju stanice imunološkog sustava, prvenstveno neutrofile koji se lijepe za endotelne stanice krvnih žila preko adhezijskih molekula ICAM-1 i VCAM-1 kako bi spriječili širenje ozljede (Ishikawa 2004). Osim njih aktiviraju se komponente komplementa i čimbenici zgrušavanja krvi koji uzrokuju upalu endotelnih stanica, povećavaju propusnost žila što može dovesti do stvaranja edema, te uz oštećenja nastala ROS-ovima, do smanjene funkcije krvno-moždane barijere i potencijalnog širenja toksina u mozak (Eltzschig i Collard 2004, Yilmaz i Granger 2010).

1.1.2. Modeli za istraživanje ishemijskog moždanog udara

Ishemijski moždani udar može se prilično vjerno reproducirati u laboratorijskim uvjetima u kulturama stanica ili na animalnim modelima *in vivo*. Animalni modeli daju nam točnije rezultate jer uključuju strukturne i fiziološke karakteristike susjednih stanica, utjecaj imunološkog sustava te cjelokupni fiziološki odgovor organizma na ishemiju, dok je prednost modela *in vitro* u jednostavnosti i mogućnosti potpune kontrole uvjeta deprivacije kisika i hranjivih tvari, te koncentracije prisutnih komponenti u mediju. Za najtočnije zaključke, optimalno je kombinirati oba metodološka pristupa (Woodruff i sur. 2011).

1.1.2.1. Modeli in vivo

Životinjski modeli koji oponašaju patogeni okoliš neurona u mozgu osoba s ishemijom, značajno doprinose razumijevanju složene stanične i molekularne patofiziologije moždanog udara, kao i razvoju novih terapijskih postupaka. Istraživanje ishemijskog moždanog udara uglavnom se provodi na miševima i štakorima na kojima se mogu zorno reproducirati

ozljede nastale kod ljudi nakon moždanog udara. Postoje tri osnovna tipa animalnih modela za istraživanje ishemijskog moždanog udara:

1) globalna ishemija
2) žarišna (fokalna) ishemija
3) hipoksija / ishemija

Globalna ishemija obično se provodi stvaranjem okluzija na nekoliko krvnih žila, obično četiri ili dvije, rjeđe potpunim prekidom cerebralnog krvotoka. Iako se fokalna ishemija smatra vjernijim modelom za istraživanje moždanog udara, globalna ishemija daje bitne parametre o mehanizmima fiziološkog odgovora na srčani zastoj ili asfiksiju (gušenje) kod ljudi (McBean i Kelly 1998, Traystman 2003). Fokalna ishemija se izaziva okluzijom jedne cerebralne arterije, zbog čega je ishemijska ozljeda puno blaža nego kod globalne. Puno je kompleksniji i realniji model za moždani udar kod ljudi (Woodruff i sur. 2011). Ishemija mozga može biti privremena i trajna. Kod privremene, žile su blokirane na period od nekoliko sati, nakon čega slijedi period reperfuzije. Kod trajne, arterija je blokirana tijekom cijelog ekperimenta (Traystman 2003, Braeuninger i Kleinschnitz 2009). Model hipoksije i ishemije je kombinacija začepljenja krvnih žila i udisanja hipoksičnih plinova (Woodruff i sur. 2011).

Jačina ozljede *in vivo* nakon moždane ishemije mjeri se analizom protoka krvi kroz mozak i fizioloških varijabli poput krvnog tlaka, rektalne temperature i koncentracije plinova u krvi, analizom volumena mozga zahvaćenog lezijom te nastalog edema, mjerenjem funkcije krvno-moždane barijere, uglavnom preko izlijevanja albumina. Osim toga može se pratiti mobilizacija leukocita i adhezija krvnih pločica, mjeriti koncentracije određene mRNA i proteina u stanici, dok se magnetnom rezonancom mogu dobiti podatci o veličini edema, strukturi tkiva, aktivaciji neurona, migraciji stanica i slično (Woodruff i sur. 2011).

1.1.2.2. Modeli in vitro

Kao modeli *in vitro* za istraživanje ishemijskog moždanog udara koriste se prerezi mozga te primarne kulture glija stanica i neurona različitih dijelova mozga. Glija stanice, točnije astrociti, čine 50% stanica u mozgu, osiguravaju strukturnu i metaboličku potporu neuronima i štite ih od ozljeda, a otporniji su na ishemiju pa se na ovaj način ispituje i njihova uloga u ishemijskom moždanom udaru (Yu i sur. 2001). Organotipski prerezi imaju prednost naspram primarnih staničnih kultura zato što su u njima zadržani stanični i anatomski odnosi te povezanost među stanicama (Stoppini i sur. 1991).

Iako se ishemija mozga ne može u potpunosti reproducirati u staničnoj kulturi, smatra se da model deprivacije kisika i glukoze, te nakon toga reperfuzije *in vitro* (OGDR od eng.

oxygen-glucose deprivation/reperfusion), oponaša ishemijske uvjete i patološka stanja (Mattson i sur. 2000), te predstavlja pogodan način za testiranje potencijalno neuroprotektivnih supstanci (Goldberg i Choi 1993) na različitim staničnim linijama (Malagelada i sur. 2005, Canas i sur. 2006, Shi i Liu 2006, Fordel i sur. 2007). Deprivacija kisika se provodi tako da se stanice drže u mediju koja sadrži dušik (N_2) umjesto kisika, pri čemu se obično stanice drže u inkubatoru čija je atmosfera ispunjena dušikom (Woodruff i sur. 2011). Nedostatak glukoze također uzrokuje oštećenja slična onima primijećenima kod ishemijskih ozljeda *in vivo* (Martin i sur. 1994). Anoksija se može postići i korištenjem kemijskih spojeva poput cijanida, a tada su ozljede puno veće zbog povećanog stvaranja ROS-ova. Ukoliko se stanice drže bez kisika i glukoze, radi se o OGD-u (Woodruff i sur. 2011).

Mjerenje ishemijske ozljede u modelima *in vitro* zasniva se prvenstveno na mjerenju vijabilnosti stanica korištenjem tripanskog modrila koje boji mrtve stanice u plavo zbog oštećenja i povećane propusnosti membrana ili MTT-testom koji tetrazolijevu sol žute boje u metabolički aktivnim stanicama pretvara u netopljivi formazan ljubičaste boje (Stoddart i sur., 2011). Apoptotične i nekrotične stanice nastale kao posljedica (O)GD-a mogu se pratiti fluorescentnim bojama poput propidij jodida koji boji mrtve stanice u crveno na sličan način kao i tripansko modrilo (Nicoletti i sur. 1991).

1.1.3. Terapija moždanog udara

Iako je rani početak liječenja nakon ishemije ključan u smanjenju oštećenja mozga, samo mali broj terapeutskih strategija pokazao se učinkovitim, a terapija je velikim dijelom simptomatska (Green i Shuaib 2006). Jedina odobrena terapija za liječenje ishemijskog moždanog udara je rekombinantni tkivni aktivator plazminogena (rt-Pa, od eng. *recombinant tissue plasminogen activator*) koji povećava mogućnost oporavka ako se primjeni intravenozno najkasnije 3 (do 4,5) sata nakon moždanog udara. rt-Pa oponaša djelovanje endogenog t-Pa, katalizira cijepanje plazminogena u aktivni oblik plazmin koji razgrađuje čvrste fibrinske mreže krvnog ugruška i time omogućuje ponovni protok krvi kroz zahvaćeno područje (Parise i sur. 1995, The National Institute of Neurological Disorders and Stroke Study Group 1995, Mestre i sur. 2013).

Osim rt-Pa, potencijal u smanjenju simptoma ima aspirin, koji ima protuupalno djelovanje i sprječava stvaranje i širenje ugruška, antikoagulansi kao heparin, kumarini (npr. varfarin) te noviji, sigurniji spojevi poput dabigatrana i apiksabana, koji inhibiraju čimbenike zgrušavanja krvi. Obje terapije se koriste samo preventivno ili nekoliko dana nakon udara i primjene rt-Pa kako bi spriječili ponovno nastajanje ugruška (Tijssen 1998, Miller i sur. 2008). Međutim, rt-Pa može izazvati krvarenja u mozgu razgradnjom krvnih ugrušaka, te

narušava funkciju krvno-moždane barijere zbog čega se primjenjuje u strogim vremenskim okvirima i dozama (Mestre i sur. 2013). Intenzivno se istražuju novi, modificirani plazminolitici (poput dezmoplaze i reteplaze) koji bi se mogli primijeniti i nakon 3 sata, te ne bi imali toliko popratnih nuspojava (Hacke i sur. 2004).

1.1.3.1. Neuroprotektivne strategije

Neuroprotektivne strategije za liječenje moždanog udara mogu se temeljiti na zaustavljanju ishemijske kaskade staničnih događanja ili smanjenju reperfuzijske ozljede (Danton i Dietrich 2004) (Slika 4.). Najbitnije je što prije ponovno uspostaviti protok krvi kroz pogođena područja, što se uspješno čini dodatkom trombolitika t-Pa. (Erecinska i sur. 2003).



Slika 4. Terapeutski pristupi liječenja moždanog udara (preuzeto i modificirano prema Mestre i sur. 2013).

Hipotermija, odnosno kontrolirano pothlađivanje pacijenta nakon moždanog udara pokazala se korisnom u snižavanju intrakranijalnog tlaka, ishemijske ozljede i edema. Međutim, tijekom ponovnog zagrijavanja u određenom broju pacijenata došlo je krvarenja u mozgu (Leonov i sur. 1990, Georgiadis i sur. 2001). Unatoč tome hipotermija predstavlja

veliki potencijal u smanjenju posljedica udara, ali se mora još raditi na optimizaciji samog postupka (Danton i Dietrich 2004).

Ciljanje rane kaskade događaja (povećanje koncentracije Na^+ i Ca^{2+}, depolarizacija membrane, opuštanje glutamata) tijekom ishemije primjenom inhibitora Na^+ i Ca^{2+} kanala, antagonista N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i agonista GABA receptora, iako je pokazivalo potencijal u ranim fazama istraživanja, u kliničkim studijama nije dalo konkretne rezultate ili je rezultirala pogoršanjem simptoma zbog kojih su studije morale biti prekinute (Danton i Dietrich 2004).

Sljedeća meta je djelovanje na ROS-ove. Jedan od načina je udisanje terapeutskih plinova čije je djelovanje prikazano u Tablici 1. (Siriussawakul i sur. 2012). Potencijal leži i u inhibiciji NADPH oksidaza koje su jedne od glavnih proizvođača ROS-ova ili povećanju koncentracije superoksid dismutaze koja ih neutralizira (Kahles i Brandes 2012).

Tablica 1. Pregled plinova s mogućim terapeutskim učinkom na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu i njihovo djelovanje.

Terapeutski plin	**Način djelovanja**
H_2	Antioksidans, neutralizira ROS-ove
NO	Potiče vazodilataciju, povećava protok krvi
H_2S	Neutralizira ROS-ove, štiti mitohondrije od oštećenja
CO	Aktivira HIF-1α ovisnu transkripciju, djeluje protuupalno i anti-apoptotski

HIF-1α – čimbenik-1α induciran hipoksijom, ROS – reaktivni kisikovi spojevi

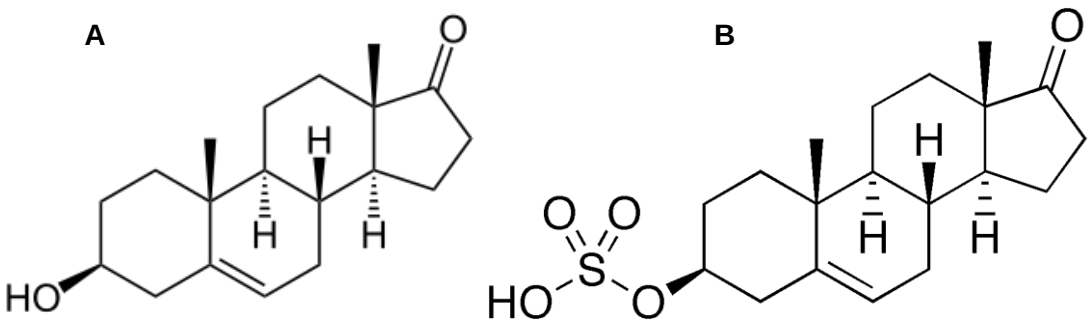
Smatra se da je ishemijsko kondicioniranje odnosno izlaganje kratkim, neletalnim periodima ishemije smanjuje učinke naknadne ishemije. Mogući mehanizam na koji se to postiže je aktivacija HIF-1α koji potiče transkripciju gena uključenih u angiogenezu i eritropoezu. Bolja vaskularizacija i veća oksigenacija tkiva smanjuje učinke ishemije tijekom moždanog udara (Dunn i sur. 2012).

Moguće je ublažiti ishemijsku ozljedu stimulacijom vaskularizacije tkiva preko netrina koji potiču adheziju endotelnih stanica (Park i sur. 2004) ili djelovanjem na imunološki sustav kako bi se smanjila upala. U tu svrhu se istražuje kopolimer-1 (Cop-1) koji je odobrena terapija kod multiple skleroze, a pokazao je pozitivan učinak na regeneraciju mozga nakon moždanog udara. On pomaže održavanju pravilnog omjera regulatornih i citotoksičnih limfocita T, te inhibira prezentaciju antigena limfocitima T (Gorantla i sur. 2007). Osim toga, potiče ekspresiju protuupalnih citokina i moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a, od eng. *brain-derived neurotrophic factor*), koji omogućuje diferencijaciju neurona i stvaranje sinapsi (Ibarra i sur. 2007, Mestre i sur. 2013).

Tkivno inženjerstvo jedna je od novih obećavajućih metoda za liječenje moždanog udara jer omogućuje uzgoj i bolje preživljavanje neuroprotektivnih stanica u 3D okruženju, kao i dugoročnu, kontroliranu primjenu neuroprotektivnih čimbenika poput različitih faktora rasta koji stimuliraju proliferaciju i diferencijaciju stanica mozga (Duarte i sur. 2012, Wang i sur. 2014). Stanična terapija već se pokazala učinkovitom u nekoliko kliničkih studija. Neke od stanica koje se koriste su: neuralne matične stanice, mezenhimske matične stanice iz koštane srži, inducirane pluripotentne stanice koje se dodatkom specifičnih čimbenika rasta uspješno diferenciraju u zrele neurone, a ukoliko se primjene *in vivo* putuju na mjesto ozljede i pomažu regeneraciji tkiva (Chen i sur. 2001, Toda i sur. 2001, Yu i Morshead 2011). Drugi potencijalni pristup, je potaknuti neurogenezu u samom mozgu pacijenta, što se može postići ubrizgavanjem BDNF-a fuzioniranog s 3D bionosačem (poput kolagena, hijaluronske kiseline i alginata) (Guan i sur. 2012, Seliktar 2012, Wang i sur. 2014).

1.2. Neurosteroidi DHEA i DHEAS

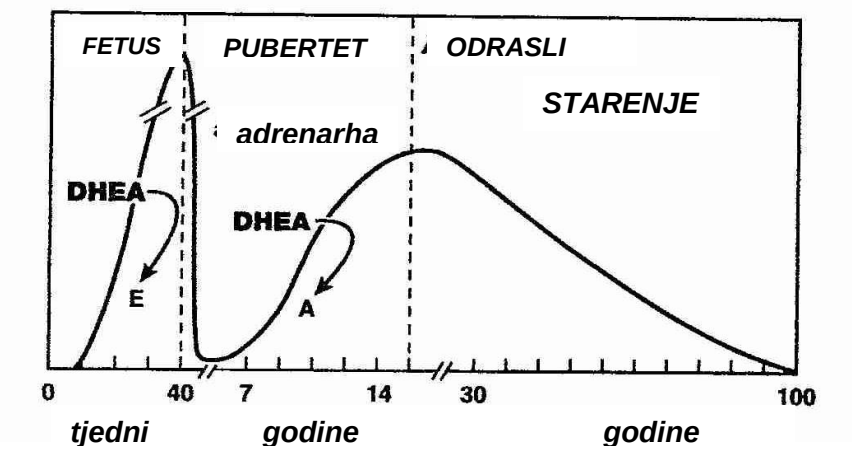
Dihidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni ester (DHEAS) (Slika 5.*)* najzastupljeniji su steroidi u krvi čovjeka čija koncentracija značajno opada sa starenjem. Zbog svojih brojnih pozitivnih učinaka kao i potencijala za prevenciju neurodegenerativnih bolesti, očuvanja kognitivnih sposobnosti koje opadaju sa starenjem, te općenito za očuvanja zdravlja i vitalnosti ova dva steroida dobili su titulu “fontane mladosti” (Maninger i sur. 2009).



Slika 5. Kemijska struktura dihidroepiandrosterona (DHEA) (A) i dihidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) (B) (preuzeto s https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DHEA_sulfate#section=Top).

Razina DHEA i DHEAS (u daljnjem tekstu DHEA(S) kad se odnosi na oba spoja) se mijenja tijekom života (Slika 6*.).* Tijekom embrionalnog razvoja, fetalna jetra luči velike količine DHEA(S)-a, da bi nakon rođenja njihova koncentracija naglo pala. Od 7. godine kora nadbubrežne žlijezde počinje lučiti DHEA(S), a kod odraslih DHEA-u luče i jajnici, odnosno testisi, čime se povećava koncentracija DHEA(S)-a, koja svoj maksimum doseže u 20.-tim godinama života (Nieschlag i sur. 1973, Parker i Odell 1980). Potom njihova

koncentracija počinje progresivno padati da bi u starijoj životnoj dobi (od 70 godina nadalje) pala na 20% maksimalne koncentracije (Tannenbaum i sur. 2004).



Slika 6. Promjena koncentracije dihidroepiandrosterona (DHEA) tijekom života. Nakon rođenja doseže svoju maksimalnu vrijednost u 20.-tim godinama života (preuzeto i modificirano prema http://www.benbest.com/nutrceut/DHEA.html).

Koncentracije DHEA(S)-a razlikuju se u različitim dijelovima tijela; najviše ih ima u mozgu, čak 6 puta više nego u krvnoj plazmi što je u ranim istraživanjima dalo naslutiti da se radi o neurosteroidima, te da se dio DHEA(S)-a sintetizira u mozgu (Lanthier i Patwardhan 1986, Liere i sur. 2004). Najniže koncentracije su prisutne u cerebrospinalnoj tekućini, skoro 20 puta manje nego u krvnoj plazmi (Guazzo i sur. 1996).

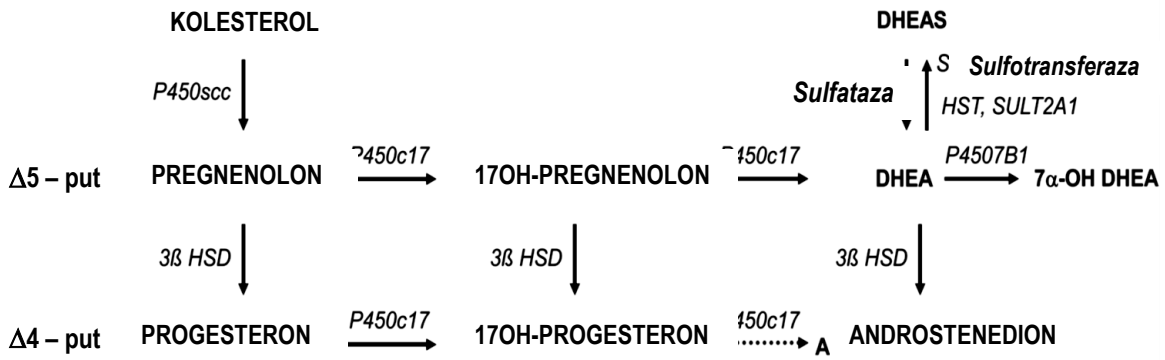
1.2.1. DHEA(S) u središnjem živčanom sustavu

DHEA i DHEAS su među prvim neurosteroidima otkrivenim kod glodavaca (Corpechot i sur. 1981). Nađeno je da stanice mozga eksprimiraju enzim dezmolazu (P450scc) i jednu formu 11β-hidroksilaze te P450c17 koji sudjeluju u biosintezi DHEA(S)-a (Compagnone i sur. 1995, Hojo i sur. 2003, Schonemann i sur. 2012). Bitno je napomenuti neke razlike u metabolizmu DHEA(S) kod ljudi i glodavaca. Glodavci ne sintetiziraju DHEA(S) u nadbubrežnoj žlijezdi, već samo u gonadama i mozgu i stoga su dobri modeli za proučavanje ovih neurosteroida u mozgu, ali ne i na periferiji. Također, DHEAS je najzastupljeniji steroid u krvi kod ljudi, dok je kod glodavaca prisutan u puno nižim koncentracijama (Maninger i sur. 2009). Rana su istraživanja pokazala kod ljudskih prereza fetalnog mozga i *in vivo* kod *rhesus* majmuna da DHEA prelazi u DHEAS u središnjem živčanom sustavu (SŽS) (Knapstein i sur. 1968) pomoću enzima hidroksil-sulfotransferaze (HST ili SULT2A1) čija je aktivnost u mozgu također dokazana (Shimada i sur. 2001).

1.2.2. Biosinteza DHEA(S)

DHEA je steroid koji se sintetizira iz kolesterola u *zoni reticularis* kore nabubrežne žlijezde, jajnicima ili testisima, te u glijalnim i živčanim stanicama mozga.

Postoje dva puta sinteze steroidnih hormona iz kolesterola: Δ5-put koji je preferentni kod ljudi i vodi sintezi DHEA-e i Δ4-put, koji dominira kod glodavaca, a vodi sintezi androstenediona, intermedijera u sintezi testosterona i estrogena (Slika 7.). Prvi, a ujedno i odlučujući korak u sintezi svih steroidnih hormona je pretvorba kolesterola u pregnenolon uz pomoć mitohondrijskog enzima dezmolaze (P450scc) iz porodice citokroma P450. Pregnenolon se pretvara u DHEA pomoću citokroma P450c17. DHEAS je hidrofilniji i stabilniji oblik, pa je stoga upravo DHEAS najzastupljeniji cirkulirajući steroid u krvi, dok je DHEA lakše prelazi krvno-moždanu barijeru te je prisutnija u CSF-u (Auchus 2004, Maninger i sur. 2009).



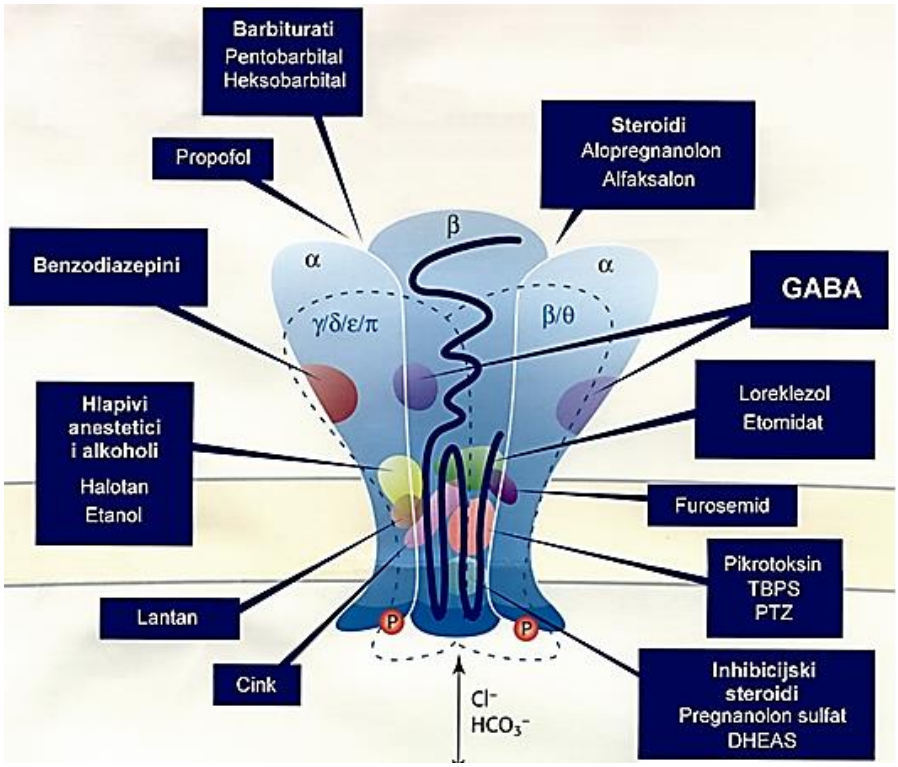
Slika 7. Sinteza dihidroepiandrosterona i njegovog sulfata (DHEA(S)). Kratice označavaju enzime koji kataliziraju navedene reakcije: HST, SULT2A1 – hidroksisteroid sulfotransferaza, P450c17 – 17a-hidroksilaza/c17,20-lijaza, P450scc – dezmolaza, 3βHSD – 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza. Isprekidana linija označava reakciju koja se ne događa kod ljudi (preuzeto iz Maninger i sur. 2009).

1.2.3. Mehanizam djelovanja DHEA(S)

Pretpostavlja se da mehanizam djelovanja u stanicama poput jetre, kože i sl. uključuje pretvorbu u spolne steroide (estrogen, testosterone) koji puno jače potiču transkripciju gena vezujući se na jezgrine receptore koji prepoznaju specifične slijedove DNA. Međutim, u mozgu, DHEA(S) modulira djelovanje različitih receptora na membrani (Labrie 2004).

γ-aminomaslačna kiselina (GABA, od eng. *γ-Amino-Butiric Acid*) glavni je inhibicijski neurotransmitor koji svoje djelovanje ostvaruje vezujući se na ionotropne $GABA_A$ ili metabotropne $GABA_B$ receptore. $GABA_A$ receptori se sastoje od kloridnog kanalića okruženog s pet podjedinica, a regulirani su ligandom (Davies 2003). Velika raznolikost

pentamera receptora uvjetovana je brojnim varijacijama u sastavu podjedinica, pa tako receptor može biti građen od podjedinica α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, θ i π (Lobo i Harris 2008). U mozgu sisavaca najčešći je podtip koji sadrži podjedinice α1, β2 i γ2 (Davies 2003). $GABA_A$ receptorima dva vezna mjesta za vezivanje GABA-e, te brojna alosterički povezana mjesta za vezanje benzodiazapina, barbiturata, steroidnih hormona, anestetika i pikrotoksina (Slika 8.) (Olsen i Tobin 1990, Majewska 1992). Funkcionalna i farmakološka svojstva $GABA_A$ receptora uvjetovana su različitim kombinacijama podjedinica u receptoru (Davies 2003).



Slika 8. $GABA_A$ receptor s mjestima djelovanja pojedinih lijekova. $GABA_A$ receptor sastoji se od 5 podjedinica i ima dva vezna mjesta za GABA-u, ali i brojna alosterička vezna mjesta za benzodiazapine, barbiturate, steroidne hormone, anestetike i pikrotoksin (preuzeto i modificirano prema Bowery i sur. 2002).

DHEA(S) uglavnom djeluje kao nekompetitivni antagonist $GABA_A$ receptora, s tim da je antagonističko djelovanje DHEAS jače od djelovanja DHEA (Majewska 1992). S obzirom da GABA u hipokampusu ima inhibicijski učinak na stvaranje dugoročne potencijacije (LTR, od eng. *long term potentiation*), odnosno konsolidacije pamćenja, smatra se da antagonisti $GABA_A$ receptora, poput DHEA(S) imaju pozitivan učinak na pamćenje i kogniciju (Foeller i sur. 2005). Oba neurosteroda djeluju kao pozitivni alosterički modulatori glutamatnih NMDA receptora, vjerojatno posredstvom receptora sigma-1 (σ1) čiji su agonisti (Baulieu 1998). NMDA receptor, koji vezuje glutamat (glavni ekscitacijski neurotransmitor) ima značajnu ulogu u plastičnosti sinapsi i učenju. Aktivacijom NMDA receptora u hipokampusu

pospješuje se stvaranje sinapsi i dugoročna potencijacija (Kostakis i sur. 2013). Osim navedenih, receptor za DHEA se nalazi i na membrani endotelnih stanica i povezan je sa sintazom dušikovog oksida (eNOS). DHEA se veže s proteinom pridruženim mikrotubulima - (MAP)2C (od eng. *microtubule-associated protein*) koji se eksprimira u tkivima u kojima postoji neurogeneza te može ostvarivati interakcije s drugim receptorima (Webb i sur. 2006).

1.2.4. Neurobiološka funkcija DHEA(S)

Pokazano je da DHEA(S) ima neuroprotektivno djelovanje, uzrokuje rast neurita, igra ulogu u neurogenezi, apoptozi, metabolizmu kateholamina, te ima antiupalno, antioksidativno i antiglukokortikoidno djelovanje (Maninger i sur. 2009).

1.2.4.1. Neuroprotektivno djelovanje DHEA(S)

Neuroprotektivno djelovanje DHEA(S) pokazano je na nizu pokusa u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Na miševima je pokazana smanjena osjetljivost na ishemiju ukoliko je DHEA bila primijenjena prije ishemijske ozljede (Li i sur. 2001). Također je zabilježen bolji oporavak lokomotornih sposobnosti i refleksa, kao i više bijele tvari u epicentru ozljede kod miševa tretiranih s DHEA nakon ozljede leđne moždine (Fiore i sur. 2004). U kulturama stanica koje su bile podvrgnute anoksičnim uvjetima ili OGD-u, primijećen je viši postotak preživljavanja stanica ukoliko su bili prethodno tretirani s DHEA ili DHEAS (Marx i sur. 2000, Kaasik i sur. 2001).

Smatra se da DHEAS ostvaruje neuroprotektivni učinak putem $GABA_A$ receptora, međutim postoje kontradiktorni rezultati. Naime agonisti, ali i antagonisti $GABA_A$ receptora, koji su se primijenili zajedno s DHEAS, smanjuju neuroprotektivni učinak DHEAS tako da je moguće da djeluju putem različitih podtipova $GABA_A$ receptora (Kaasik i sur. 2001). Nadalje, DHEAS štiti od toksičnih utjecaja amiloidnog β ($A\beta$) proteina, glutamata, NMDA, 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), kolhicina i slobodnih kisikovih radikala (Cardounel i sur. 1999, Kaasik i sur. 2001). Kako je DHEA(S) stimulator NMDA receptora, samim time trebao bi povećati toksičnost NMDA, ali DHEAS zapravo pokazuje protektivni učinak najvjerojatnije djelujući preko sigma receptora 1 ili sprječavajući preveliki ulazak Ca^{2+} u mitohondrij (Kaasik i sur. 2003), dok DHEA inhibira NOS induciranu NMDA receptorom što je jedan od pokazatelja da DHEA i DHEAS imaju različite mehanizme kojima ostvaruju svoje biološke funkcije (Kurata i sur. 2004).

1.2.4.2. Utjecaj DHEA(S) na rast neurita i neurogenezu

DHEA i DHEAS potiču rast neurita kod mišjih embrija s time da DHEA potiče rast aksona, najvjerojatnije preko NMDA receptora i povećanog ulaska Ca^{2+} u stanicu, dok

DHEAS potiče rast dendrita. Kako NMDA receptor sudjeluje u stvaranju sinapsi i razvoju mozga, kao i induciranjem dugoročne potencijacije, moguće je da DHEA ima ulogu u organizaciji mozga tijekom neurogeneze (Compagnone i sur. 1998). Osim toga, potiče neurogenezu i preživljavanje neurona. Jedan od vjerojatnih mehanizama je promjena koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF, od eng. *brain-derived neurotrophic factor*) u različitim regijama mozga (Naert i sur. 2007) ili inhibicijom apoptoze (Zhang i sur. 2002). U embrionalnim stanicama velikog mozga DHEA aktivira serin-treoninsku kinazu Akt koja dalje signalnom kaskadom inhibira apoptozu, dok DHEAS inhibira djelovanje Akt i time potiče apoptozu (Zhang i sur. 2002). Međutim u kromafinskim stanicama i DHEA i DHEAS potiču preživljavanje neurona aktivacijom NFκB koji potiče transkripciju anti-apoptotskih proteina iz porodice Bcl-2, aktivaciju imunološkog sustava i zaštitu stanice od toksina (Mao i Barger 1998, Suzuki i sur. 2004), iako utjecaj DHEAS-a na NFκB može biti dvojak ovisno o stimulusu (Iwasaki i sur. 2004).

1.2.4.3. Uloga DHEA(S) u metabolizmu neurotransmitora

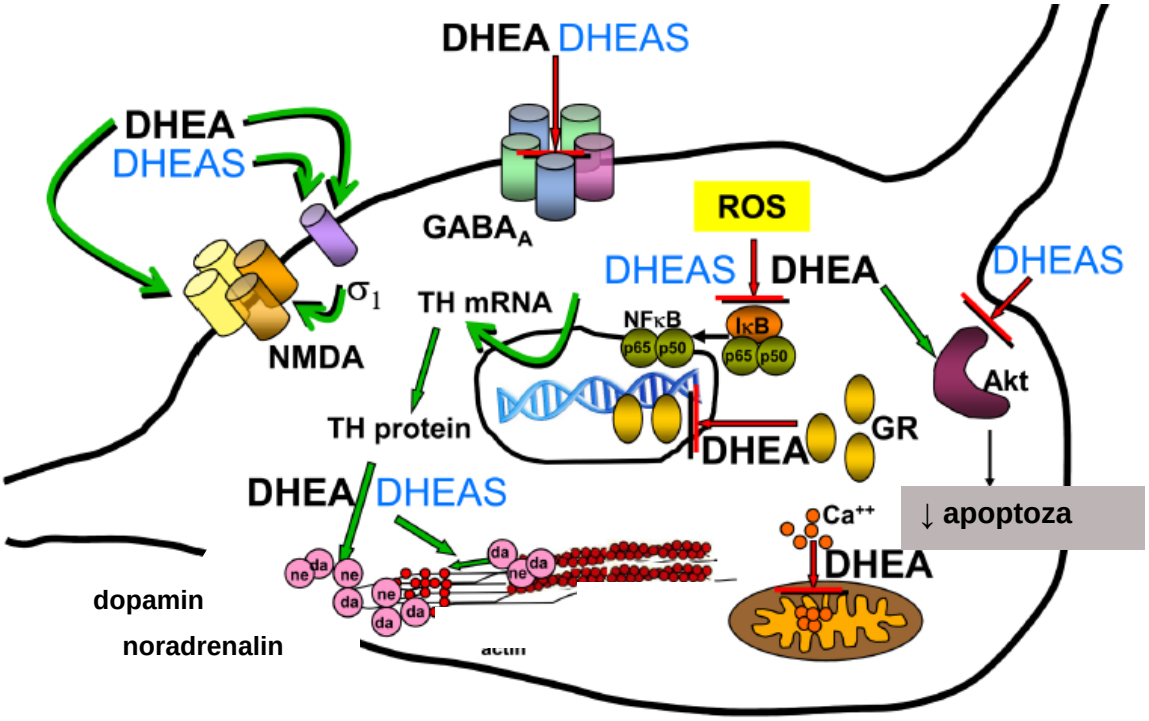
Pokazano je da DHEA(S) utječe na sintezu i sekreciju dopamina. Međutim, njihov utjecaj može biti stimulacijski ili inhibicijski ovisno o primijenjenoj koncentraciji i regiji mozga koja se proučava. Uglavnom stimulira otpuštanje dopamina u hipotalamusu djelujući supresivno na D2 dopaminski receptor koji inhibira otpuštanje dopamina (Chaki i sur. 1998, Charalampopoulos i sur. 2005). Slični podatci dobiveni su i za metabolizam serotonina, naime DHEA(S) može smanjiti ili povećati koncentraciju serotonina ovisno o pojedinoj regiji mozga (Perez-Neri i sur. 2008).

1.2.4.4. Antioksidativna, protuupalna i antiglukokortikoidna svojstva DHEA(S)

Oksidacijski stres, tj. povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala izaziva oštećenja proteina, DNA i membrana te dovodi do propadanja stanice, ubrzanog starenja i nastanka bolesti. DHEA se pokazala učinkovitom u smanjivanju oksidacije lipida u membranama, kao i koncentracije enzima odgovornog za cijepanje prekursora Aβ proteina (BACE, od eng. *β-site AβPP-cleaving enzyme*) (Bastianetto i sur. 1999). Oligomeri Aβ proteina čine amiloidne plakove, čiji nastanak predstavlja jedan od ključnih koraka u patogenezi Alzheimerove bolesti (Tamagno i sur. 2003).

Protuupalni učinak DHEA(S) očituje se preko inhibicije NFκB transkripcije potaknute proupalnim citokinima poput TNFα i IL-1. Dok glukokortikoidi izravno inhibiraju NFκB signalni put, DHEA(S) to čini smanjujući oksidacijski stres i ROS koji aktiviraju NFκB (Iwasaki i sur. 2004). Istraživanja su utvrdila da DHEA(S) smanjuje neurotoksični utjecaj glukokortikoida, pogotovo kortikosterona i kortizola u uvjetima *in vivo* i *in vitro*, no sam

mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (Karishma i Herbert 2002). Moguće da ide preko inhibicije 11HSTβ tipa 1 enzima koji pretvara kortizon u aktivni kortizol ili kompetitivnim vezivanjem nekih od metabolita DHEA za isti taj enzim (Muller 2006). Shema djelovanja DHEA(S)-a prikazana je na Slici 9.



Slika 9. Mehanizmi djelovanja DHEA(S). → predstavlja stimulacijski, a →| inhibicijski učinak. DHEA(S) djeluje kao antagonist $GABA_A$, te agonist sigma receptora što posljedično aktivira NMDA receptor. Također, DHEA(S) potiče sintezu kateholamina (dopamina i noradrenalina), te inhibira NFκB signalni put potaknut ROS-om. DHEA(S) – dihidroepiandrosteron (sulfat), ROS – reaktivni kisikovi spojevi, TH – tirozin hidroksilaza (preuzeto i modificirano prema Maninger i sur. 2009).

1.2.5. Terapeutski potencijal DHEA(S)

Kao što je već spomenuto koncentracija DHEA(S) u krvi i mozgu progresivno pada s godinama, te time potencijalno utječe na nastanak ili intenzitet bolesti povezanih sa starijom životnom dobi. Za razliku od DHEA(S), razina glukokortikoida obično raste s godinama. Iako glukokortikoidi imaju pozitivan učinak na smanjivanje upalnih reakcija i mobiliziranje zaliha glukoze, te oslobađanje adrenalina kod stresnih situacija, dugoročno, izazivaju brojne negativne posljedice za organizam koje između ostalih uključuju promjene u sastavu elektrolita u tijelu, modulacije endokrinog sustava, a konkretno u SŽS-u uzrokuju smanjivanje gustoće dendrita, inhibiraju regeneraciju neurona i uzrokuju njihovu smrt (Schacke i sur. 2002). Učinci DHEA(S) i glukokortikoida su često antagonistički, a kako se s godinama smanjuje omjer DHEA(S) naspram glukokortikoida, moguće je da patogeneza

različitih bolesti leži upravo u modulaciji ovog omjera protektivnog i relativno toksičnog spoja (Carvalhaes-Neto i sur. 2003).

S obzirom na neurobiološke učinke DHEA(S) koje su opisane u prethodnom poglavlju, ova dva spoja se smatraju potencijalnim terapeuticima za liječenje čitavog niza neurodegenerativnih i neuroloških bolesti. S obzirom na inhibiciju enzima BACE koji sudjeluje u nastanku amiloidnih plakova, DHEA(S) se dosta proučava u kontekstu prevencije i smanjenju simptoma Alzheimerove bolesti (Tamagno i sur. 2003). Iako su zabilježeni pozitivni rezultati kod osoba koje pate od demencije ili gubitka kognitivnih funkcija uzrokovanih stresom, zasad nema dokaza da DHEA(S) uzrokuje povećanje mentalnih sposobnosti i pamćenja kod zdravih osoba (Evans i sur. 2006). Utjecaj DHEA(S) na metabolizam neurotransmitora (pogotovo dopamina) može izazvati smanjivanje simptoma depresije (Schmidt i sur. 2005). te negativnih simptoma shizofrenije poput bezvoljnosti, gubitka interesa, apetita i energije s obzirom da su obično povezane sa sniženom razinom DHEA u mozgu (Strous i sur. 2003). Za nijedan od ovih segmenta nema dovoljno dokaza ili kliničkih ispitivanja koji bi upućivali da je DHEA ili DHEAS uspješna terapija. Stoga su potrebna daljnja istraživanja koja se tiču načina primjene, koncentracije spojeva i vremenskog trajanja primjene da bi se mogli dobiti konkretniji podatci.

Što se moždanog udara tiče, predklinička istraživanja upućuju da DHEA(S) djeluje protektivno na stanice mozga, štiteći ih od različitih neurotoksičnih događaja koji se nalaze u njegovoj podlozi (Kaasik i sur. 2001, Veiga i sur. 2003, Charalampopoulos i sur. 2006). Međutim, iako je pokazano da su niske razine endogenog neurosteroida DHEA(S) povezane s povećanim rizikom od ishemijskog moždanog udara u ljudi (Blum i sur. 2013) relativno mali broj studija istražio je neuroprotektivne učinke terapije DHEA(S) u ishemijskoj ozljedi mozga (Lapchak i sur. 2000, Li i sur. 2001, Li i sur. 2009).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je ispitati predstavljaju li rekombinantni $GABA_A$ receptori dobar model *in vitro* za istraživanje učinaka kratkotrajne i produljene primjene dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS). U tu svrhu u okviru rada napravljena je usporedba djelovanja ovog neurosteroida na embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK 293), netransficirane i stabilno transficirane $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, te je na spomenutim staničnim linijama istraženo protektivno djelovanje DHEAS u modelu deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije *in vitro* (OGDR).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kultura embrionalnih stanica bubrega čovjeka 293

Embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK, od eng. *human embryonic kidney cells*) su fibroblastoidne stanice koje rastu pričvršćene za podlogu u jednom sloju. U genom ovih stanica uneseno je oko 4,5 kilobaze genoma adenovirusa tipa 5, koji kodira za proteine E1A i E1B. Kao posljedica stabilne ekspresije ovih proteina, stanice HEK 293 pokazuju povećanu učestalost transformacije i brzinu rasta stanica te vrijeme udvostručavanja od 48 sati. Morfološki, HEK 293 su adherentne, fibroblastoidne stanice koje rastu u jednom sloju. Transaktivacijom proteina E1A i proteinskim produktima gena E1B povećava se ekspresija pod kontrolom citomegalovirusnog promotora na plazmidima pCIS i pCDM8 (Querido i sur. 1997), pa se ove stanice često koriste za transfekciju.

3.1.2. Kultura stanica HEK 293 stabilno transficiranih rekombinantim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

Plazmidi koji su nosili slijed za podjedinice $GABA_A$ receptora α_1 i β_2 štakora uneseni su u stanice HEK 293, a uspješno transficirane stanice su probrane na temelju rezistencije na neomicin. Pomoću [^{3}H]muscimola odredila se stanična kolonija koja eksprimira obje podjedinice, da bi se kolonija s ekspresijom najvećeg broja veznih mjesta za [^{3}H]muscimol umnožila. Nakon transfekcije plazmidom pCISD22, koji sadrži gen za podjedinicu $GABA_A$ receptora γ_{2s} štakora i mutirani gen za dihidrofolat-reduktazu, transficirane stanice su probrane pomoću metotreksata. Stanična linija s najvećim brojem veznih mjesta za [^{3}H]muscimol i [^{3}H]flumazenil odabrana je za farmakološka istraživanja (Besnard, 1997).

3.1.3. Uzgoj stanica

Za uzgoj i presađivanje stanica korištene su otopine čiji je sastav dan u Tablici 2.

3.1.4. Lijekovi

Volumen od 45 μl dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS) (Sigma), otopljenog u redestiliranoj vodi u 100 puta većoj koncentraciji od konačne (100 μM), dodan je u medij konačnog volumena 4,5 ml. Otopina DHEAS-a i kontrolna otopina profiltrirane su kroz filter s porama promjera 0,45 μm. Konačne koncentracije DHEAS-a u pokusima neuroprotekcije kretale su se od 10 nM - 1 μM, dok su se za pokuse istraživanja tolerancije i ovisnosti koristile visoke koncentracije od 100 μM.

Tablica 2. Sastav otopina korištenih za uzgoj stanica

Potpuni i kompletirani medij	Medij DMEM s visokim udjelom glukoze (4500 mg/L s 10% fetalnim goveđim serumom (inaktiviranim 60 minuta na 56°C), 2 mM L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom, 100 µg/ml streptomicinom; pH 7,4; steriliziran filtriranjem kroz 0,2 µM filter
Medij bez glukoze i seruma	Medij DMEM bez glukoze i fetalnog goveđeg seruma, s 2 mM L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom, 100 µg/ml streptomicinom; pH 7,4; steriliziran filtriranjem kroz 0,2 µM filter
Puferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBSA)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4; pH 7,4
Otopina tripsina za presađivanje stanica	0,05% tripsin, 1 mM EDTA u PBSA
Antibiotici	penicilin (Sigma), streptomicin (Sigma)
Otopina tripanskog modrila (*Trypan blue*)	0,4% tripansko modrilo, 0,81% NaCl, 0,06% K_2HPO_4

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

3.1.5. Izolacija staničnih membrana

Za izolaciju staničnih membrana korištena je puferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBSA) i Tris-citratni pufer (Tablica 3.).

Tablica 3. Sastav otopina koištenih za izolaciju staničnih membrana

Puferirana otopina soli za ispiranje stanica (PBSA)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4; pH 7,4; 37°C i 4°C
Tris-citratni pufer	50 mM Tris, 50 mM limunska kiselina; pH 7,4; 4°C

3.1.6. Određivanje proteina

Za određivanje proteina korištene su sljedeće otopine: 2% Na_2CO_3 u 0,1 N NaOH, 1% $CuSO_4$ x 5 H_2O, 2% K-Na tartarat, 50% Folin-Ciocalteu reagens i temeljna otopina goveđeg serumskog albumina 5 mg/ml u 0,1 N HCl.

3.1.7. Vezanje radioaktivno obilježenog liganda

Za vezivanje radioaktivno obilježenog liganda korišteni su radioaktivno obilježeni spojevi: [^{3}H]TBOB (Amersham, specifična aktivnost 20 Ci/mmol), [^{3}H]flunitrazepam

(Amersham, specifična aktivnost 87 Ci/mmol) i [^{3}H]DHEAS (NEN Research Products, specifična aktivnost 23.5 Ci/mmol) te otopine čiji je sastav dan u Tablici 4.

Tablica 4. Otopine korištene za vezivanje radioaktivno obilježenih liganada

Pufer za inkubaciju [^{3}H]TBOB-a	50 mM Tris, 50 mM limunska kiselina, 200 mM NaCl; pH 7,4 kod 25°C
Pufer za inkubaciju [^{3}H]flunitrazepama	50 mM Tris, 50 mM limunska kiselina, 150 mM NaCl; pH 7,4 kod 4°C
Pufer za inkubaciju[^{3}H]DHEAS-a	50 mM Tris, 50 mM limunska kiselina, 150 mM NaCl; pH 7,4 kod 4°C
Pufer za ispiranje	50 mM Tris, 50 mM limunska kiselina; pH 7,4 kod 4°C
Scintilacijska otopina	0,1 g POPOP, 5 g PPO, 1 l toluen
Brayova otopina	0,2 g POPOP, 60 g naftalena, 4 g PPO, 100 ml metanola, 20 ml etilenglikola, do 1 l dioksana

DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, POPOP - 1,4-di(2-(5-feniloksazolil))benzen, PPO - 2,5-difeniloksazol, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

3.1.8. Kemikalije

bakar-sulfat (Alkaloid), dioksan (Kemika), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Sigma), etilenglikol (Kemika), fetalni goveđi serum (FBS; Sigma), Folin-Ciocalteu fenolni reagens (Sigma), L-glutamin (Sigma), goveđi serumski albumin (Sigma), kalij-hidrogenfosfat (Merck), kalij-klorid (Kemika), kalij-natrij-tartarat (Merck), kloridna kiselina (Kemika), limunska kiselina (Sigma), metanol (Kemika), naftalen (Kemika), natrij-hidrogenkarbonat (Kemika), natrij-hidrogenfosfat (Alkaloid), natrij-hidroksid (Kemika), natrij-karbonat (Kemika), natrij-klorid (Sigma), octena kiselina (Kemika), 1,4-di(2-(5-feniloksazolil))benzen (POPOP; New England Nuclear), 2,5-difeniloksazol (PPO; Calbiochem-Behring Corp.), toluen (Kemika), tripansko modrilo (Sigma), tripsin (Sigma), Tris baza (Sigma)

3.2. Metode

3.2.1. Odmrzavanje stanica

Iz tornja s tekućim dušikom izvađene su ampule sa stanicama i otopljene kratkom inkubacijom u vodenoj kupelji na 37°C. Stanice su zatim stavljene u 5 ml hranjivog medija zagrijanog na 37°C i centrifugirane pet minuta na 1200 rpm. Talog stanica resuspendiran je u novih 5 ml zagrijanog medija, a navedena stanična suspenzija prenesena u Falcon posudu (250 ml) za staničnu kulturu s dodatnih 5 ml medija te inkubirana na 37°C i 5% CO_2.

3.2.2. Održavanje kulture stanica

Stanice su uzgajane u Falcon posudama za staničnu kulturu (250 ml) s 10 ml hranjivog medija na 37°C, 5% CO_2 i relativnoj vlažnosti 95%. Svaka dva do tri dana, medij je zamijenjen s 10 ml svježeg hranjivog medija, nakon dvostrukog ispiranja s 5 ml PBSA.

3.2.3. Presađivanje stanica

Kad su potpuno prekrile podlogu posude za staničnu kulturu, stanice su presađivane. Nakon odsisavanja medija, stanice su ispirane dva puta s 5 ml PBSA da bi se u potpunosti uklonio medij. Za odvajanje stanica od podloge koristila se otopina tripsina, koja je nakon dvominutne inkubacije inhibirana dodatkom 5 ml hranjivog medija. Stanice su resuspendirane pipetom te je u daljnjoj inkubaciji u svakoj Falcon posudi ostavljano 0,5 ml stanične suspenzije na koju je dodano 9,5 ml svježeg hranjivog medija.

3.2.4. Deprivacija glukoze i kisika, te reperfuzija (OGDR)

Hranjivi medij (4,5 ml) koji je sadržavao glukozu i serum odsisan je sa stanica, stanice su isprane dva puta s 5 ml PBSA, te je stanicama dodan novi medij, ali bez glukoze i seruma. Zatim su posude sa stanicama stavljene u posebno dizajniranu nepropusnu modularnu inkubacijsku komoru koja je napunjena s N_2 (Slika 10.) i potom smještene u inkubator na period od 16 sati. Nakon toga odmah je određivan broj živih i mrtvih stanica ili su stanice podvrgnute reperfuziji, odnosno inkubirane sljedećih 24 sata sa hranjivim medijem koji je sadržavao glukozu i serum u inkubatoru na 37°C, 5% CO_2 i relativnoj vlažnosti 95%.

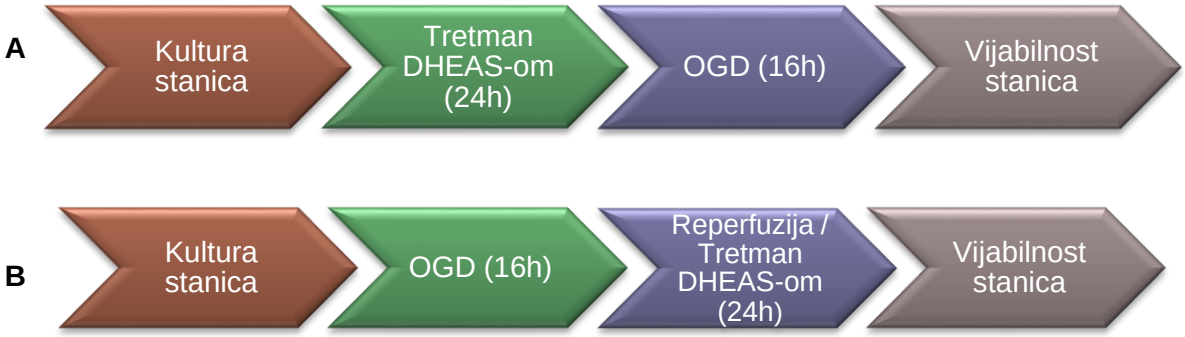


Slika 10. Posebno dizajnirana nepropusna modularna inkubacijska komora

3.2.5. Primjena lijekova

U istraživanjima dugotrajne primjene, DHEAS je dodan u stanični medij u konačnoj koncentraciji od 100 μM, a bio je prisutan u kulturi stanica kroz 48 sati. U istraživanjima potencijalnog neuroprotektivnog djelovanja, stanice su tretirane DHEAS-om u konačnim koncentracijama od 10 nm do 1 μM u trajanju od 24 sata prije (predtretman) ili nakon

(reperfuzija i posttretman) deprivacije glukoze i kisika. Kao kontrola korištena je redestilirana voda (Slika 11.).



Slika 11. Tijek istraživanja neuroprotektivnog djelovanja DHEAS-a na stanicama HEK 293; model predtretmana DHEAS-om (A) i model posttretmana DHEAS-om (B). DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, OGD – deprivacija kisika i glukoze

3.2.6. Brojanje stanica

Broj presađivanih stanica i promjena broja stanica nastala kao posljedica deprivacije glukoze i kisika, te tretmana DHEAS-om određivan je bojanjem tripanskim modrilom. Nakon odsisavanja medija i dvostrukog ispiranja s 2 ml PBSA zagrijanog na 37°C, stanice su tripsinizirane i resuspendirane u 1 ml medija. Odsisani medij, PBSA i suspenzija stanica centrifugirani su pet minuta na 1200 g pri 4°C, a dobiveni talog stanica resuspendiran u 2 ml medija. Pomiješano je 40 μl suspenzije stanica, 60 μl DMEM-a i 100 μl tripanskog modrila te promatrano u Bürker-Türkerovoj mrežici pod srednjim povećanjem svjetlosnog mikroskopa. Tripansko modrilo prodire u mrtve stanice koje su izgubile cjelovitost membrane, dok žive stanice aktivno izbacuju boju i ostaju neobojane. U 4*16 polja brojane su i žive i mrtve stanice, a broj stanica u mililitru dobiven je prema formuli:

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

$$stanična\ vijabilnost = broj\ vijabilnih\ (neobojenih)\ \ stanica/\ ukupan\ broj\ stanica$$

3.2.7. Izolacija membrana

Odsisan je medij sa stanica, stanice su isprane dva puta s PBSA zagrijanom na 37°C, postrugane plastičnim štapićem i ponovno isprane s PBSA ohlađenom na 4°C. Talog dobiven centrifugiranjem stanica 12 minuta na 12 000 g pri 4°C homogeniziran je u 50 mM Tris-citratnom puferu u automatskom homogenizatoru (Tehtnica Železniki, UM405) pomicanjem teflonskog tučka gore-dolje 10 puta pri broju okretaja od 1250 rpm. Homogenat

je centrifugiran 20 minuta na 200 000 g pri 4°C i zatim ručno homogeniziran u hladnom Tris-citratnom puferu. Postupak centrifugiranja i ručne homogenizacije ponovljen je tri puta nakon čega je suspenzija membrana čuvana na -20°C. Na dan korištenja membrana, suspenzija je odmrznuta i centrifugirana 20 minuta na 200 000 g pri 4°C i ručno resuspendirana u hladnom Tris-citratnom puferu (Fuchs i sur. 1995).

3.2.8. Određivanje koncentracije proteina

Metoda određivanja koncentracije proteina temelji se na djelovanju bakrenog reagensa s amidnim vezama proteina u alkalnoj otopini, i reakciji Folin-Ciocalteuovog reagensa s fenolima, koja otopini daje plavu boju. Određivana je koncentracija proteina u 10 µl suspenzije staničnih membrana u 50 mM Tris-citratnom puferu, dok su triplikati razrjeđenja albumina u 10 µl seruma goveda u 50 mM Tris-citratnom puferu (25; 12,5; 6,25 µg/µl) korišteni kao standardi, a 10 µl 50 mM Tris-citrata kao slijepa proba. U uzorke, standarde i slijepu probu stavljeno je 2 ml primarne otopine (2% Na_2CO_3, 1% $CuSO_4$ i 2% K-Na tartarat u omjeru 10 : 0,1 : 0,1), a po završetku desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, dodano je 0,2 ml mješavine Folin-Ciocalteuovog reagensa i vode u omjeru 1 : 1. Poslije trideset minuta mjerena je optička gustoća uzorka na spektrofotometru (CAMSPEC M330; na valnoj duljini λ = 700 nm) koja je umanjena za vrijednost 10 µl 50 mM Tris-citratnog pufera (Lowry i sur. 1951). Koncentracija proteina u suspenziji staničnih membrana dobivena je pomoću formule:

$$\gamma_u = \frac{OD_u * \gamma_s}{OD_s}$$

gdje je: γ_u– optička gustoća standarda

γ_s – optička gustoća uzorka

OD_u– masena koncentracija uzorka (µg / 10 µl)

OD_s – masena koncentracija proteina u standardu (25 µg / 10 µl)

3.2.9. Metoda vezanja radioaktivno obilježenog liganda za receptore

Teorijske osnove

Vezanje obilježenog liganda za receptor slijedi zakon o djelovanju masa:

$$\text{receptor} + \text{ligand} \underset{K_{off}}{\overset{K_{on}}{\rightleftharpoons}} \text{receptor} - \text{ligand}$$

U stanju ravnoteže kompleks ligand-receptor razgrađuje se jednakom brzinom kojom se i stvara:

$$[ligand] * [receptor] * k_{on} = [ligand - receptor] * k_{off}$$

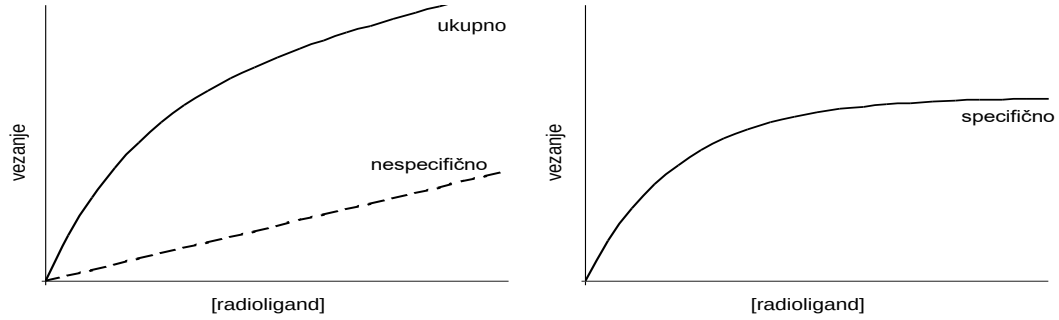
gdje je: [ligand] - koncentracija slobodnog liganda
[receptor] - koncentracija nezauzetih receptorskih mjesta
[ligand-receptor] - koncentracija kompleksa ligand-receptor
k_{on} - konstanta brzine asocijacije ($M^{-1}min^{-1}$)
k_{off} - konstanta brzine disocijacije (min^{-1})

iz čega proizlazi konstanta disocijacije:

$$\frac{[ligand] * [receptor]}{[ligand - receptor]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d$$

Konstanta disocijacije (K_d) odgovara onoj koncentraciji radioliganda koja u stanju ravnoteže zauzima 50% svih receptorskih mjesta i mjera je afiniteta receptora za obilježeni ligand. Naime, što je vrijednost K_d manja, receptor ima veći afinitet za obilježeni ligand i obrnuto. Interakcije između liganda i receptora pokazuju također i svojstvo zasićenja, odnosno postoji točno određen maksimalan broj specifičnih receptorskih mjesta (B_{max}) izražen po miligramu proteina. Vrijednosti K_d i B_{max} određuju se pokusima zasićenja (saturacije) koji se eksperimentalno mogu izvesti na dva načina: povećavanjem koncentracija radioaktivno obilježenog liganda do zasićenja u tzv. ekperimentu s radioaktivnim tvarima (''HOT'') ili dodavanjem rastućih koncentracija neobilježenog liganda određenoj koncentraciji radioaktivnog liganda do zasićenja u tzv. eksperimentu bez radioaktiviteta (''COLD''). Tako nastale rastuće koncentracije radioaktivnog liganda imaju sve manje specifične aktivnosti.

Pokusima zasićenja određujemo specifično vezanje obilježenog liganda za receptor. Ono predstavlja razliku između ukupnog i nespecifičnog vezanja (Slika 12.). Nespecifično vezanje koje nastaje uslijed nedovoljno ispranog nevezanog radioliganda, te vezanja na nereceptorska mjesta poput stijenki epruveta ili filter papira, određuje se dodatkom određenog neobilježenog lijeka u koncentraciji dovoljnoj da potpuno istisne obilježeni ligand sa zajedničkog veznog mjesta na receptoru. Kada su svi receptori zauzeti neobilježenim lijekom, radioligand se veže samo nespecifično.



Slika 12. Razlika između ukupnog i nespecifičnog vezanja predstavlja specifično vezanje

Specifično vezanje može se opisati jednadžbom:

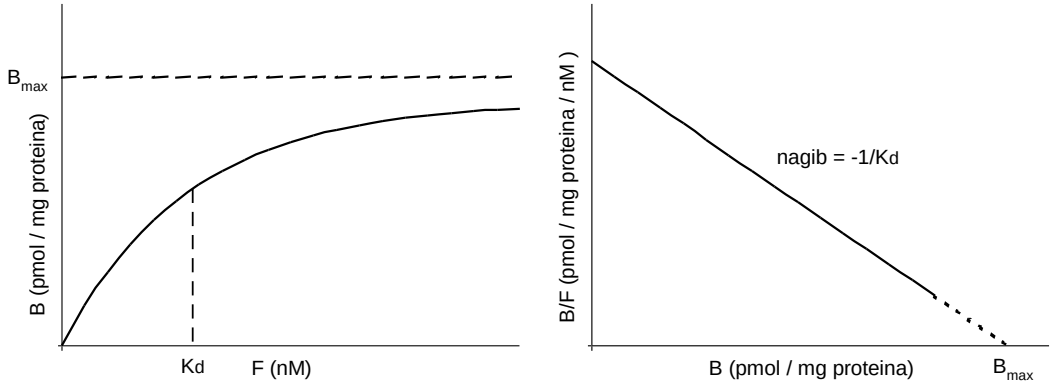
$$[ligand - receptor] = \frac{B_{max} * [ligand]}{K_d + [ligand]}$$

Iz navedene jednadžbe matematičkim transformacijama može se izvesti Scatchardova jednadžba:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max} - B}{K_d}$$

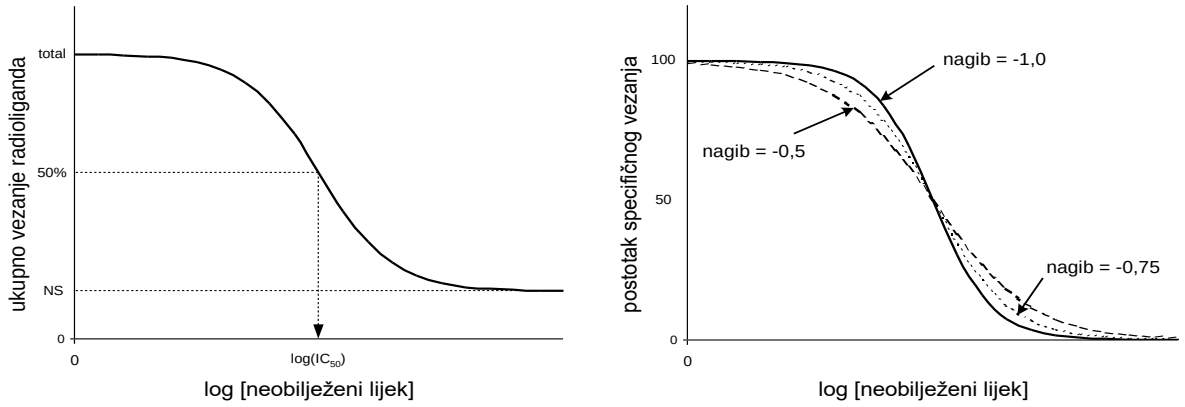
gdje je: B - koncentracija vezanog liganda ("*bound*") odnosno koncentracija kompleksa ligand-receptor [ligand-receptor]
F - koncentracija slobodnog liganda ("*free*") odnosno [ligand]

Ako se na apscisu unesu vrijednosti vezanog liganda (B), a na ordinatu omjer vezanog i slobodnog liganda (B/F), transformacijom podatka u linearni oblik ovom jednadžbom dobija se pravac. Vrijednost B_{max} može se očitati iz sjecišta pravca s x-osi, dok K_d odgovara negativnoj recipročnoj vrijednosti nagiba pravca (Slika 13.).



Slika 13. Transformacijom podataka vezanja u linearni oblik nastaje Scahtchardov dijagram

Vezanje neobilježenog lijeka za receptor na kojeg je prethodno vezan radioligand također slijedi zakon o djelovanju masa. U stanju ravnoteže, koncentracija neobilježenog lijeka koja je potrebna za istiskivanje 50% specifičnog vezanja radioaktivnog liganda označava se s IC_{50} i predstavlja afinitet ispitivanog lijeka za receptor. Vrijednost IC_{50} određuje se pokusima istiskivanja (inhibicije) u kojima se mjeri vezanje samo jedne koncentracije obilježenog liganda u prisutnosti različitih koncentracija neobilježenog lijeka ("DRUG"). Nagib krivulje vezanja može se kvantificirati (faktor *slope*, često nazvan i Hillov koeficijent). Ako je nagib krivulje značajno različit od 1,0, vezanje ne prati zakon o djelovanju masa sa jednim veznim mjestom (Slika 14.).



Slika 14. Određivanje vrijednosti IC_{50} i nagiba krivulje u pokusima istiskivanja. IC_{50} – koncentracija neobilježenog lijeka koja je potrebna za istiskivanje 50% specičnog vezanja radioaktivno obilježenog liganda

Za analizu podataka dobivenih mjerenjem radioaktivnog raspada uzoraka na β–scinitilacijskom brojilu, izraženih kao broj raspada u minuti (dpm, od eng. *disintegration per minute*), korišten je program EBDA (*Eqilibrium Binding Data Analysis*). Za analizu rezultata iz pokusa zasićenja korišten je potprogram COLD, u koji se unose srednje vrijednosti ukupnog vezivanja radioaktivno označenog liganda, samog i u prisutnosti određenih koncentracija neobilježenog liganda, zatim vrijednosti nespecifičnog vezanja, te srednja vrijednost vanjskog standarda. Iz podataka o datumu izvođenja pokusa, vrsti radioliganda, njegovom datumu proizvodnje i specifičnoj aktivnosti, te o inkubacijskom volumenu, program korigira specifičnu aktivnost radioliganda. Iz svih unesenih parametara potprogram COLD za svaku koncentraciju izračunava specifično vezanje (B), koncentraciju slobodnog liganda (F) i vrijednost B/F, te metodom linearne regresije interpolira pravac pomoću kojeg određuje vrijednosti konstante disocijacije (Kd), maksimalnog broja veznih mjesta (B_{max}) i nagiba pravca (Hillov koeficijent) (McPherson i sur. 1983).

Za obradu rezultata u programu Graphpad Prism primjenjuje se metoda nelinearne regresije, pri čemu se koristi jednadžba za hiperbolu (model vezivanja radioliganda za jednu populaciju veznih mjesta):

$$Y = B_{max} * X / (K_d + X)$$

gdje je: B_{max} - maksimalno vezivanje

K_d - koncentracija liganda kod koje se postiže polovica maksimalnog vezivanja

Program GraphPad Prism također je korišten za obradu rezultata dobivenih u pokusima stimulacije. Postotak inhibicije odnosno stimulacije vezivanja radioliganda pod utjecajem određenog lijeka izračunat je prema formuli:

$$\frac{specifično\ vezivanje\ u\ prisutnosti\ lijeka}{specifično\ vezivanje\ u\ odsutnosti\ lijeka} * 100$$

Unošenjem vrijednosti specifičnog vezanja (izraženih u %) dobivenih u pokusima stimulacije odnosno inhibicije, te obradom rezultata pomoću jednadžbe za sigmoidalnu krivulju može se izračunati vrijednost maksimalne stimulacije (E_{max}) odnosno maksimalne inhibicije (I_{max}) vezivanja koja je definirana kao apsolutna razlika između vrha i dna krivulje. Iz iste se krivulje izračunava i vrijednosti EC_{50} i IC_{50} (koncentracija lijeka koja daje 50% maksimalne stimulacije odnosno inhibicije vezivanja), te nagib krivulje:

$$y = a + (b - a)/1 + \exp((x - c) * d)$$

gdje je: y - specifično vezivanje (%)

a - najveća vrijednost stimulacije/inhibicije izražena u postocima

b - najmanja vrijednost stimulacije/inhibicije izražena u postocima

x - logaritam koncentracije

c - logaritam EC_{50} odnosno IC_{50}

d- nagib krivulje (Hillov koeficijent)

Ova jednadžba koristi se i kod inhibicijskih krivulja za izračunavanje vrijednosti IC_{50}, ali je u tom slučaju a vrh, a b dno krivulje.

Postotak razdvajanja alosteričkih veznih mjesta na receptoru (*uncoupling*-a) nakon dugotrajne primjene lijekova izračunat je prema formuli:

$$1 - \frac{\%\ max.stimulacije\ vezivanja\ radioliganda\ u\ skupini\ izloženoj\ lijeku}{\%\ max.stimulacije\ vezivanja\ radioliganda\ u\ kontrolnoj\ skupini} * 100$$

3.2.9.1. Vezivanje [^{3}H] t-butilbicikloortobenzoata ([^{3}H]TBOB-a) za GABA$_A$ receptore

Primjenom [^{3}H]TBOB-a kao obilježenog i neobilježenog liganda u pokusima zasićenja, analizirano je vezno mjesto za konvulzive. Stanične membrane u 50 mM Tris-citratnom puferu (pH 7,4; 4°C) s 150 mM NaCI-a za stimulaciju vezanja, inkubirane su s [^{3}H]TBOB-om (8 nM) 90 minuta na 25°C. U pokusima saturacije, rastuće koncentracije (1 - 500 nM), ne-radioaktivnog TBOB-a dodavane su stalnoj koncentraciji [^{3}H]TBOB-a (8 nM). U pokusima inhibicije različite koncentracije GABA-e (10 nM – 100 μM) ili ne-radioaktivnog TBOB-a (1 nM – 1 μM) inkubirane su s [^{3}H]TBOB-om (8 nM). Nespecifično vezanje određeno je u prisutnosti 100 μM pikrotoksina. Ukupni volumen uzorka (u duplikatu) s membranama izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 bio je 0,5 ml, a s membranama izoliranim iz netransficiranih stanica HEK 293 bio je 1 ml. Reakcija je prekinuta filtracijom kroz GF/C Whatman filtere, a svaka epruveta isprana s 3*5 ml hladnog 50 mM Tris-citratnog pufera (pH 7,4), te stavljena u scintilacijske bočice.

3.2.9.2. Vezivanje [^{3}H]flunitrazepama za GABA$_A$ receptore

Svojstva benzodiazepinskog veznog mjesta analizirani su koristeći [^{3}H]flunitrazepam kao obilježeni ligand. Stanične membrane inkubirane su u 50 mM Tris-citratnom puferu (pH 7,4; 4°C) s 150 mM NaCI-a za stimulaciju vezanja, 90 minuta na 4°C, koliko je potrebno za postizanje ravnoteže. U pokusima saturacije korištene su rastuće koncentracije (0,2 – 16 nM) [^{3}H]flunitrazepama ili su rastuće koncentracije ne-radioaktivnog flunitrazepama (0,3 – 100 nM) dodavane stalnoj koncentraciji (1 nM) [^{3}H]flunitrazepama. U pokusima inhibicije koncentracije DHEAS-a u rasponu od 5 μM do 1 mM dodavane su stalnoj koncentraciji (1 nM) [^{3}H]flunitrazepama. U pokusima stimulacije različite koncentracije GABA-e (1 nM - 1 mM) inkubirane su s 1 nM [^{3}H]flunitrazepamom. 100 μM diazepam korišten je za određivanje nespecifičnog vezanja. Ukupni volumen uzorka s membranama izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 bio je 0,5 ml, a s membranama izoliranim iz netransficiranih stanica HEK 293 bio je 1 ml. Reakcija je prekinuta filtracijom kroz GF/C Whatman filtere, a svaka epruveta (u duplikatu) isprana s 3*5 ml hladnog 50 mM Tris-citratnog pufera (pH 7,4), te stavljena u scintilacijske bočice.

3.2.9.3. Vezivanje [^{3}H]DHEAS-a za GABA$_A$ receptore

Svojstva veznih mjesta za neurosteroid DHEAS analizirana su koristeći [^{3}H]DHEAS kao obilježeni ligand. Stanične membrane u 50 mM Tris-citratnom puferu (pH 7,4; 4°C) s 150 mM NaCI-a za stimulaciju vezanja, inkubirane su s 10 nM [^{3}H]DHEAS-om 90 minuta na 25°C. U pokusima saturacije, različite koncentracije ne-radioaktivnog DHEAS-a (10 nM - 500 μM) dodavane su stalnoj koncentraciji (10 nM) [^{3}H]DHEAS-a. Nespecifično vezanje

određeno je u prisutnosti 1 mM DHEAS. Ukupni volumen uzorka s membranama izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 bio je 0,5 ml, a s membranama izoliranim iz netransficiranih stanica HEK 293 bio je 1 ml. Reakcija je prekinuta filtracijom kroz GF/C Whatman filtere, a svaka epruveta isprana s 3*5 ml hladnog 50 mM Tris-citratnog pufera (pH 7,4), te stavljena u scintilacijske bočice.

3.2.10. Mjerenje na β-scintilacijskom brojilu

Filterima koji su se sušili preko noći u scintilacijskim bočicama dodano je 3 ml scintilacijske tekućine. Po završetku inkubacije (40 min) β–scinitilacijskim brojilom (Perkin Elmer, Wallac 1409DSA) mjeren je radioaktivni raspad svakog uzorka u 120 sekundi uz efikasnost od približno 50%. U dvije scintilacijske bočice dodana je koncentracija radioaktivnog liganda korištena u eksperimentu i 1 ml Brayeve otopine, što je služilo za određivanje vanjskog standarda (tj. dodane radioaktivnosti). Njihove izmjerene vrijednosti preračunate su na volumen radioaktivnog liganda koji je korišten u pokusu.

3.2.11. Statistička obrada podataka

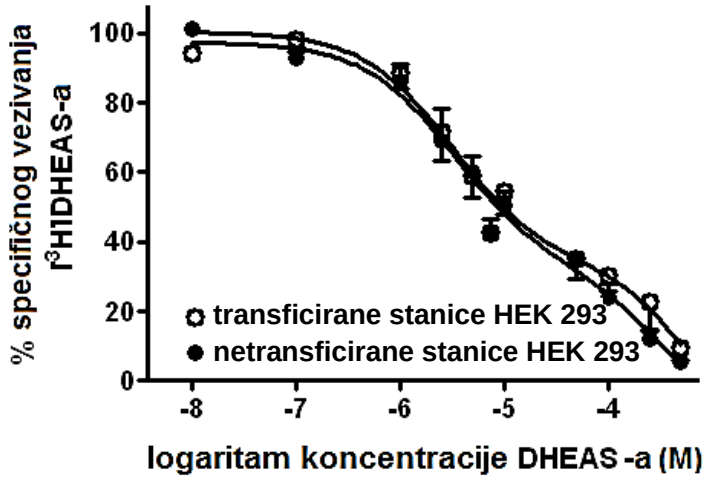
Program GraphPad Prism korišten je za grafički prikaz i statističku obradu rezultata (Matulsky 1995-1996). Razlike između skupina analizirane su Student *t*-testom u slučaju usporedbe dvije skupine ili jednostrukom analizom varijance (ANOVA) i *post-hoc* analizom Newman-Keuls testom kada je uspoređivano više skupina. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku u obliku cijelih brojeva ili u obliku postotka. Analize u kojima je vrijednost $P<0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4. Rezultati

4.1. Vezivanje [3H]DHEAS-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

Za istraživanje specifičnih interakcija neurosteroida DHEAS-a s rekombinantnim $GABA_A$ receptorima najprije su uspoređivani parametri vezivanja [^{3}H]DHEAS-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Kao što je prikazano na Slici 15., dodatak rastućih koncentracija neradioaktivnog DHEAS-a (10 nM – 500 μM) bifazički je inhibirao vezivanje [^{3}H]DHEAS-a na membrane izolirane i iz netransficiranih stanica i iz stanica sa stabilnom ekspresijom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, što je ukazivalo da u stanicama HEK 293 postoje dvije populacije veznih mjesta za ovaj neurosteroid.

Koncentracije DHEAS-a koje istiskuju 50% specifično vezanog [^{3}H]DHEAS-a (IC_{50}), pokazale su da se inhibicijski potencijal DHEAS-a značajno ne razlikuje između stabilno transficiranih ($IC_{50(1)}$ = 3,28 ± 0,23 μM; $IC_{50(2)}$ = 0,52 ± 0,47 mM, n = 5) i netransficiranih stanica HEK 293 ($IC_{50(1)}$ = 3,66 ± 0,15 μM; $IC_{50(2)}$ = 0,41 ± 0,23 mM, n = 5). Scatchardove analize krivulja istiskivanja nisu pokazale značajne razlike u afinitetu (K_d) i broju veznih mjesta (B_{max}) visokog i niskog afiniteta za DHEAS između ovih dviju grupa stanica (Tablica 5.).



Slika 15. DHEAS-om izazvana inhibicija specifičnog vezivanja [^{3}H]DHEAS-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Membrane izolirane iz netransficiranih ili stabilno transficiranih stanica HEK 293 inkubirane su s 10 nM [^{3}H]DHEAS u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog DHEAS-a (10 nM - 500 μM). Točke predstavljaju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa napravljena u duplikatu**.** DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

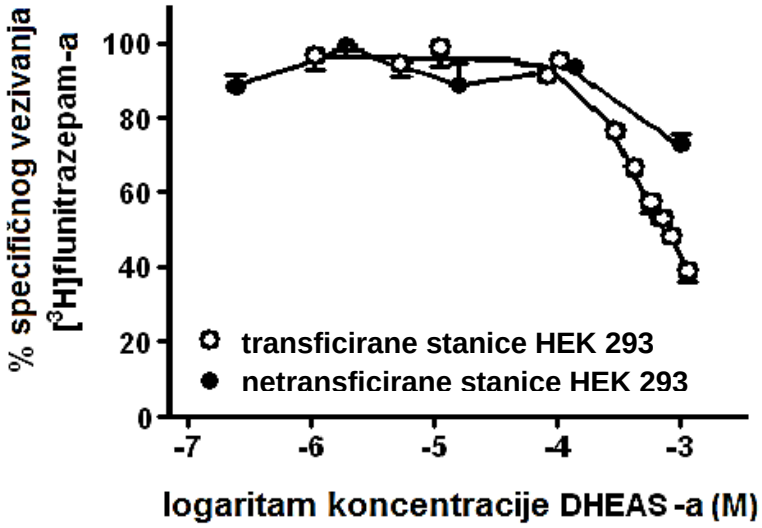
Tablica 5. Parametri vezivanja [^{3}H]DHEAS-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

Stanice HEK 293	$K_{d(1)}$	$B_{max\ (1)}$	$K_{d(2)}$	$B_{max(2)}$
Netransficirane	8,40 ± 0,91	197,89 ± 28,41	82,99 ± 5,92	1,33 ± 0,17
Transficirane	9,35 ± 2,08	201,86 ± 45,96	85,66 ± 18,83	1,46 ± 0,34

Membrane izolirane iz netransficiranih ili stabilno transficiranih stanica HEK 293 inkubirane su s 10 nM [^{3}H]DHEAS u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog DHEAS-a (10 nM - 500 μM). Radioaktivnost vezana za membrane izmjerena je nakon brze filtracije kroz Whatman GF/C filtere. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa napravljena u duplikatu. B_{max} – maksimalan broj veznih mjesta, DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, K_d – konstanta disocijacije

4.2. Učinak DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]flunitrazepama na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

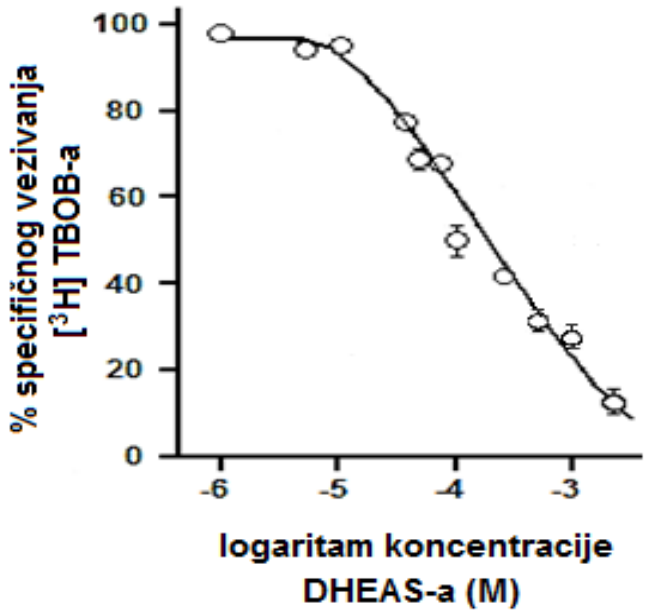
Kako bi se istražile specifične interakcije neurosteroida DHEAS-a sa rekombinantnim $GABA_A$ receptorima analiziran je učinak DHEAS-a na parametre vezivanja [^{3}H]flunitrazepama na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. DHEAS primijenjen u koncentracijama do 500 μM nije bio aktivan u istiskivanju [^{3}H]flunitrazepama vezanog za membrane izolirane iz netransficiranih stanica HEK 293. Međutim, na membranama izoliranim iz stanica HEK 293 stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, DHEAS je inhibirao vezivanje [^{3}H]flunitrazepama, liganda kojim su označena benzodiazepinska vezna mjesta na $GABA_A$ receptoru (Slika 16.). Analizom podataka vezivanja [^{3}H]flunitrazepama na membranama stabilno transficiranih stanica HEK 293 dobiveni su podaci o maksimalnoj DHEAS-om izazvanoj inhibiciji (I_{max} = 59,64 ± 6,1%, n = 5) kao i o 50% maksimalne inhibicije vezivanja [^{3}H]flunitrazepama (IC_{50} = 39,88 ± 0,26 μM, n = 5).



Slika 16. Inhibicija specifičnog vezivanja [^{3}H]flunitrazepama na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izazvana DHEAS-om. Membrane izolirane iz netransficiranih ili stabilno transficiranih stanica HEK 293 inkubirane su s 1 nM [^{3}H]flunitrazepama u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog DHEAS-a (10 nM - 1 mM). Točke predstavljaju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa napravljena u duplikatu**.** DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

4.3. Učinak DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]TBOB-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

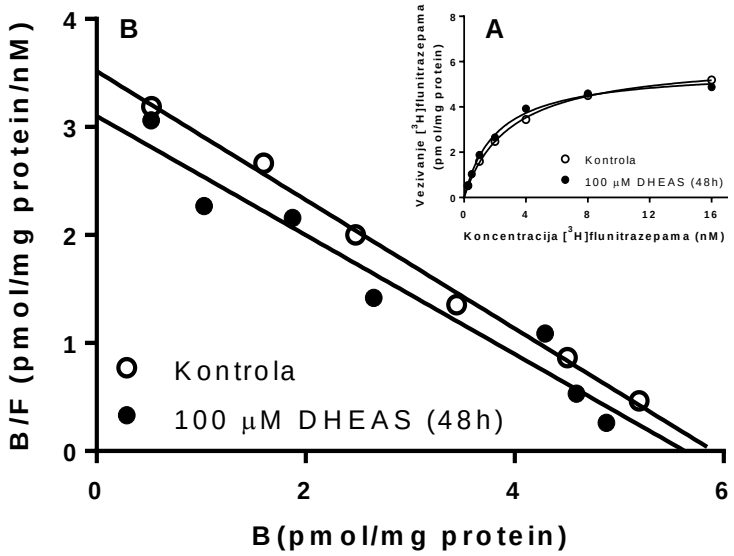
Za istraživanje specifičnih interakcija neurosteroida DHEAS-a sa rekombinantnim $GABA_A$ receptorima analiziran je učinak DHEAS-a na parametre vezivanja [^{3}H]TBOB-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Međutim, nije dobiveno specifično vezivanje [^{3}H]TBOB-a na membranama izoliranim iz netransficiranih stanica HEK 293 u jednakim uvjetima kao i na membranama izoliranim iz stabilno transfeciranim stanicama HEK 293. Na membranama izoliranim iz stanica HEK 293 stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, DHEAS je inhibirao vezivanje [^{3}H]TBOB-a, liganda kojim su označena vezna mjesta za konvulzive na $GABA_A$ receptoru (Slika 17.). Maksimalna inhibicija (I_{max}) specifičnog vezivanja [^{3}H]TBOB-a dobivena s DHEAS-om (2 nM) bila je 91,69 ± 13,90%, dok je 50% maksimalne inhibicije vezivanja (IC_{50}) iznosilo 109,09 ± 7,21 μM.



Slika 17. Inhibicija specifičnog vezivanja [^{3}H]TBOB-a na membrane izolirane iz stanica HEK 293 stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izazvana DHEAS-om, bez i s dodatkom 5 μM GABA-e. Membrane izolirane iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 inkubirane su s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog DHEAS-a (1 μM - 2 mM), s i bez dodatka 5 μM GABA-e. Točke predstavljaju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa napravljena u duplikatu. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

4.4. Učinak produljene primjene DHEAS-a na svojstva benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$

Na stanicama HEK 293 stabilno transfeciranim podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ i tretiranih sa 100 μM DHEAS kroz 48 sati analizirana su svojstva benzodiazepinskog veznog mjesta korištenjem [^{3}H]flunitrazepam kao obilježenog liganda, te uspoređena s kontrolom skupinom tretiranom redestiliranom vodom. Iz pokusa zasićenja Scatchardovom transformacijom podataka (Slika 18.) određene su vrijednosti konstante disocijacije (K_d) i maksimalnog broja veznih mjesta (B_{max}) (Tablica 6.). Kao što je vidiljivo iz Tablice 6. i Slike 19., nakon produljene primjene 100 μM DHEAS-a (48 sati) konstanta disocijacije i maksimalan broj benzodiazepinskih veznih mjesta nisu se značajno promijenili u odnosu na kontrolnu skupinu.

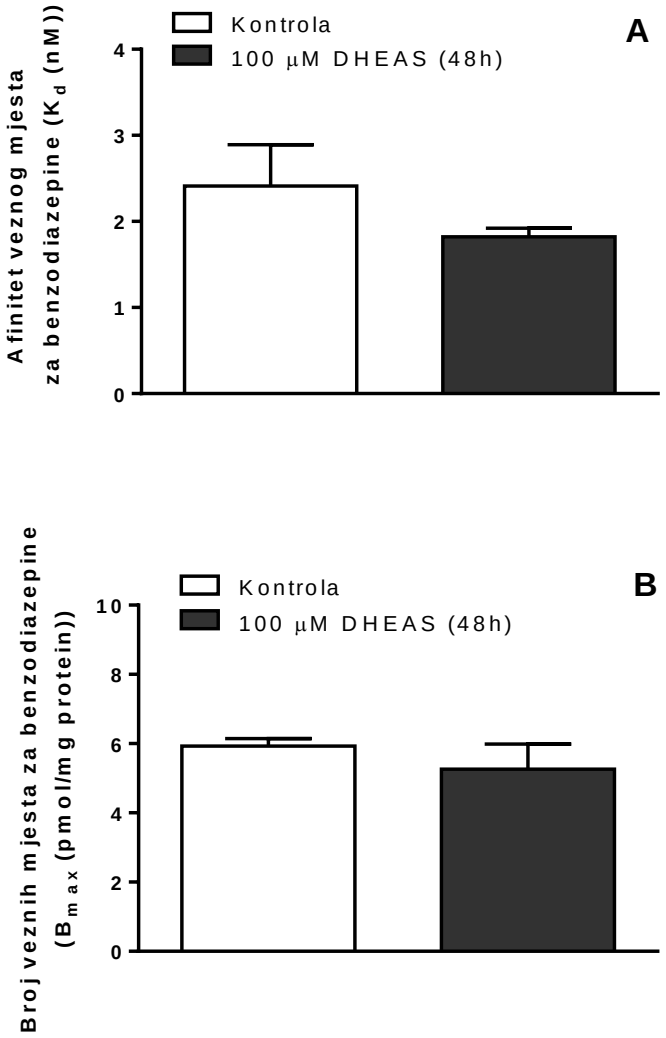


Slika 18. Krivulja zasićenja (A) i Scatchardova analiza (B) vezanja [^{3}H]flunitrazepama za rekombinantne $GABA_A$ receptore $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izolirane iz stabilno transficiranih stanica HEK 293, tretiranih sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane stanične membrane inkubirane su s rastućim koncentracijama [^{3}H]flunitrazepama (0,25 nM - 16 nM). Radioaktivnost vezana za membrane izmjerena je nakon brze filtracije kroz Whatman GF/C filtere. Nespecifično vezanje u prisutnosti 100 μM diazepama oduzeto je od ukupnog, da bi se dobilo specifično vezanje. Slika predstavlja tipičan pokus izveden u duplikatu. B - koncentracija vezanog [^{3}H]flunitrazepama, B/F - omjer koncentracija vezanog i slobodnog [^{3}H]flunitrazepama, DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

Tablica 6. Usporedba svojstava veznog mjesta za benzodiazepine na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 tretiranih sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati

	K_d (nM)	**B_{max} (pmol/mg proteina)**
KONTROLA	2,52 ± 0,63	6,01 ± 0,41
100 μM DHEAS (48h)	1,71 ± 0,26	5,77 ± 0,85

HEK 293 stanice stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s rastućim koncentracijama [^{3}H]flunitrazepama (0,25 - 16 nM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. B_{max} – maksimalan broj veznih mjesta, DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, K_d – konstanta disocijacije

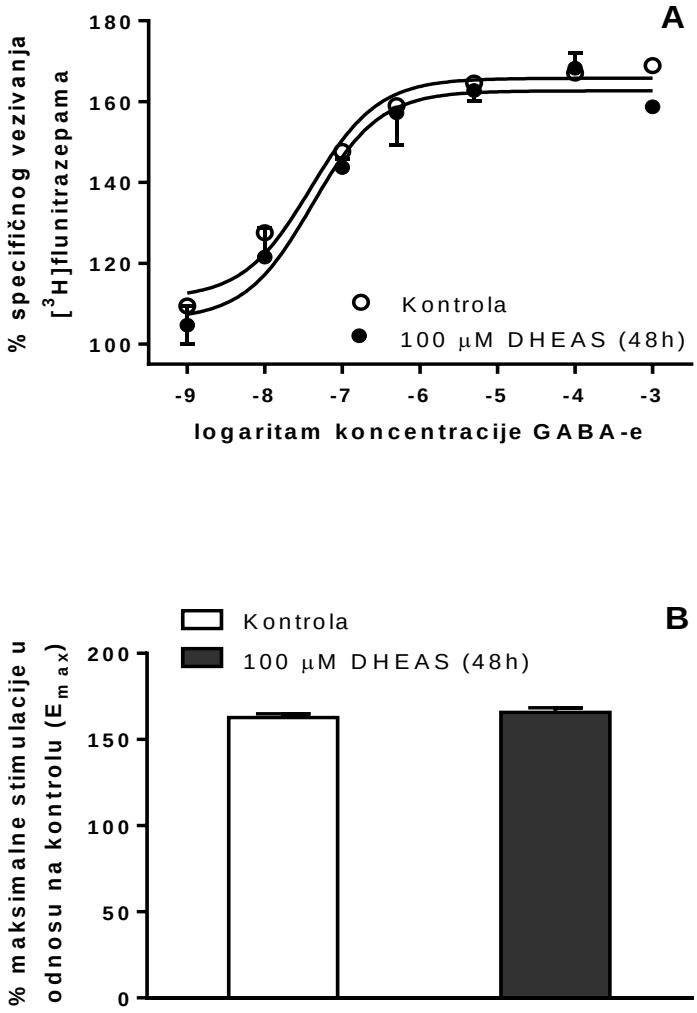


Slika 19. Učinak dugotrajne primjene DHEAS-a na svojstva benzodiazepinskog veznog mjesta na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293. Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS ili kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s rastućim koncentracijama [^{3}H]flunitrazepama (0,25 - 16 nM). Stupići predstavljaju srednje vrijednosti konstante disocijacije (K_d) (A) i maksimalnog broja veznih mjesta (B_{max}) (B) ± standardna pogreška iz 5 neovisnih Scatchardovih analiza. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

Moguće promjene u alosteričkoj povezanosti između benzodiazepinskog veznog mjesta i veznog mjesta za GABA-u, nakon produljene primjene 100 μM DHEAS-a (48 sati), istražene su dodatkom GABA-e (1 nM – 1 mM) u inkubacijski medij s [^{3}H]flunitrazepamom.

Produljeno izlaganje stanica DHEAS-u nije značajno promijenilo vrijednosti koncentracije GABA-e koje izazivaju 50% stimulacije vezivanja [^{3}H]flunitrazepama (EC_{50}), kao ni maksimalan stupanj stimulacije (E_{max}) vezanja benzodiazepina GABA-om, u odnosu

na kontrolu što upućuje da je alosterička povezanost veznih mjesta za GABA-u i onih za benzodiazepine na $GABA_A$ receptoru ostala sačuvana (Slika 20.) (Tablica 7.).



Slika 20. Učinak dugotrajne primjene DHEAS-a na stimulaciju vezanja [^{3}H]flunitrazepama potaknutu molekulom GABA (A) i maksimalna stimulacija vezanja [^{3}H]flunitrazepama (E_{max}) izazvana molekulom GABA (B). Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS ili kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 1 nM [^{3}H]flunitrazepamom u prisutnosti rastućih koncentracija GABA-e (1nM - 1mM). Radioaktivnost vezanu za membrane izmjerena je nakon brze filtracije kroz Whatman GF/C filtere. Nespecifično vezanje u prisutnosti 100 μM diazepama oduzeto je od ukupnog, da bi dobili specifično vezanje. Stupići predstavljaju srednje vrijednosti ± standardnu pogrešku iz 5 neovisnih pokusa. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat

Tablica 7. Stimulacija vezanja [^{3}H]flunitrazepama izazvana molekulom GABA na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$ stabilno transficiranih stanica HEK 293 tretiranih sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati

	EC_{50} (nM)	**E_{max} (%)**
KONTROLA	40,65 ± 2,33	66,9 ± 3,52
100 μM DHEAS (48h)	43,91 ± 1,38	68,37 ± 4,58

Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane sa 1 nM [^{3}H]flunitrazepamom u prisutnosti rastućih koncentracija GABA-e (1 nM – 1 μM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, EC_{50} - koncentracija GABA-e koja izaziva 50% stimulacije vezivanja [^{3}H]flunitrazepama, E_{max} - maksimalan stupanj stimulacije vezivanja [^{3}H]flunitrazepama izazvan molekulom GABA

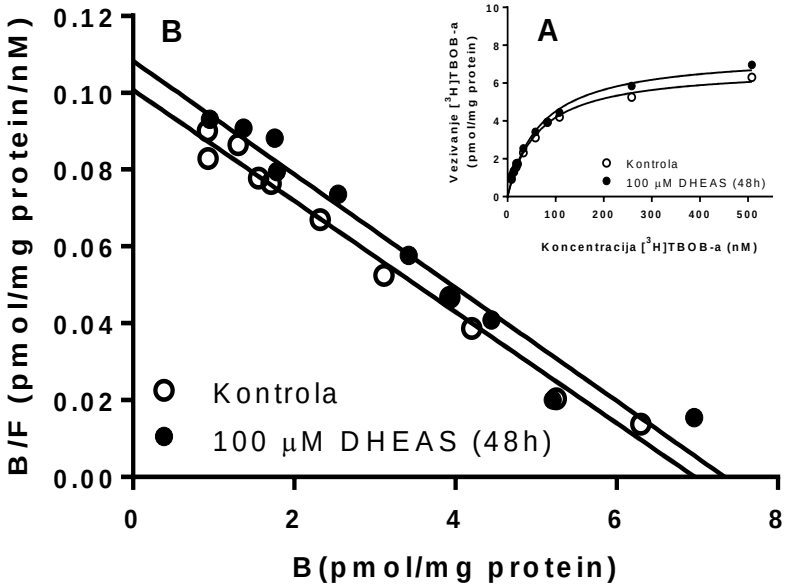
4.5. Učinak produljene primjene DHEAS-a na svojstva veznih mjesta za konvuzive na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$

Na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$ izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293 i tretiranih sa 100 μM DHEAS kroz 48 sati analizirana su svojstva veznog mjesta za konvulzive koristeći [^{3}H]TBOB kao obilježeni ligand, te uspoređena sa odgovarajućom kontrolom. Vrijednosti konstante disocijacije (K_d) i maksimalni broj veznih mjesta (B_{max}) određeni su Scatchardovom transformacijom podataka dobivenih iz pokusa zasićenja (Tablica 8.) (Slika 21.). Nakon produljene primjene 100 μM DHEAS-a (48 sati) K_d i B_{max} za konvulzive nisu se značajno promijenili u odnosu na kontrolu (Slika 22.).

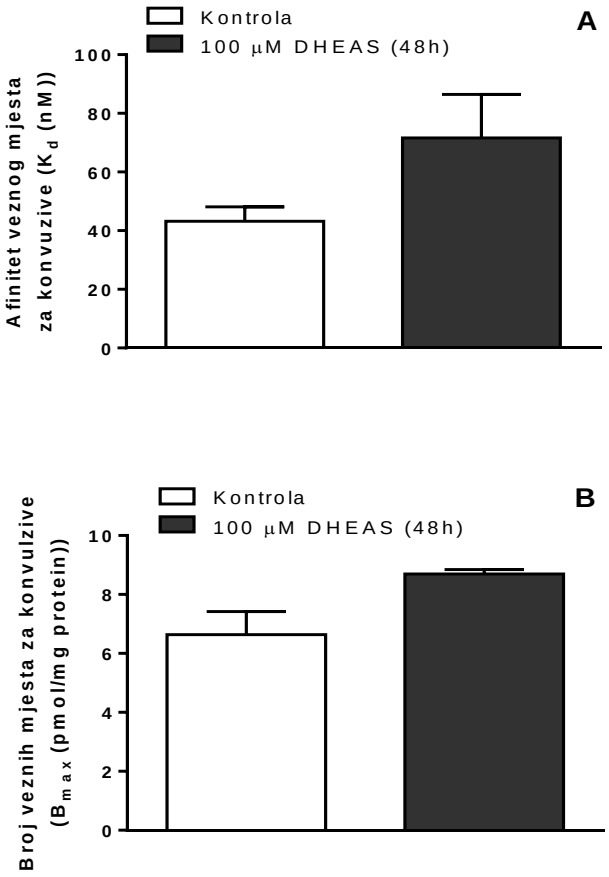
Tablica 8. Usporedba svojstava veznog mjesta za konvulzive na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$ stabilno transficiranih stanica HEK 293 tretiranih sa 100 μM DHEAS ili kontrolnim otapalom kroz 48 sati

	K_d (nM)	**B_{max} (pmol/mg proteina)**
KONTROLA	46,74 ± 5,83	7,02 ± 0,59
100 μM DHEAS (48h)	68,55 ± 15,66	8,89 ± 0,45

Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_{2'}\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS ili kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1 nM – 1 μM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. B_{max} – maksimalni broj veznih mjesta, DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, K_d – konstanta disocijacije, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat



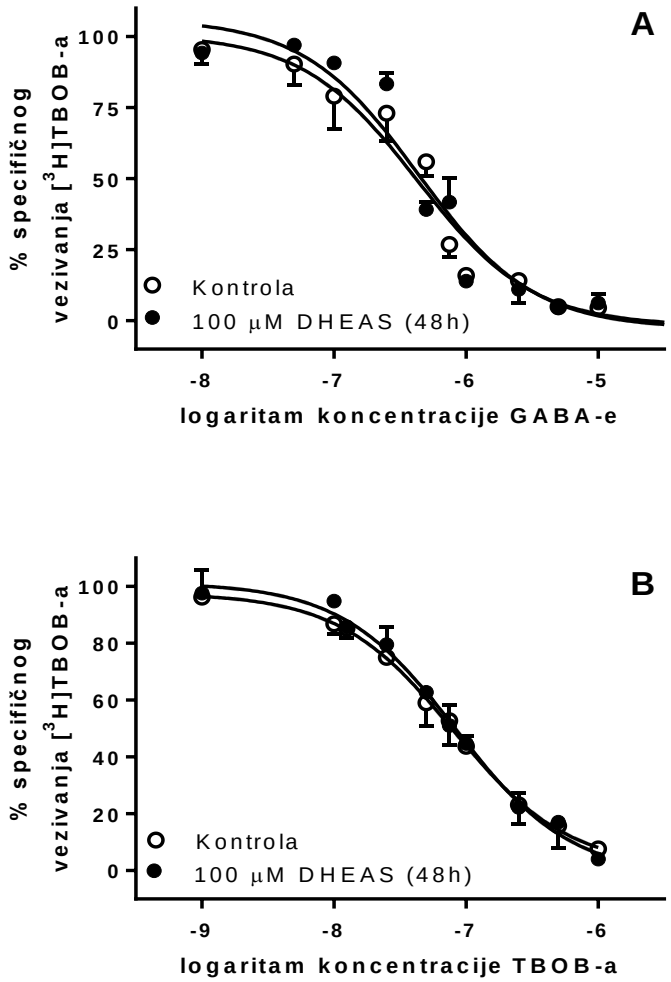
Slika 21. Krivulja zasićenja (A) i Scatchardova analiza (B) vezanja [^{3}H]TBOB-a za rekombinantne $GABA_A$ receptore $\alpha_1\beta_{2\gamma 2s}$ izolirane iz stabilno transficiranih stanica HEK 293, tretiranih sa 100 μM DHEAS, odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane stanične membrane inkubirane su s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1 nm – 1 μM). Radioaktivnost vezana za membrane izmjerena je nakon brze filtracije kroz Whatman GF/C filtere. Nespecifično vezanje u prisutnosti 100 μM pikrotoksina oduzeto je od ukupnog, da bi se dobilo specifično vezanje. Slika predstavlja tipičan pokus izveden u duplikatu. B - koncentracija vezanog [^{3}H]TBOB-a, B/F - omjer koncentracija vezanog i slobodnog [^{3}H]TBOB-a, DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat



Slika 22. Učinak dugotrajne primjene DHEAS-a na svojstva veznog mjesta za konvulzive na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ izoliranim iz stabilno transficiranih stanica HEK 293. Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS ili kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1 nM - 1μM). Stupići predstavljaju srednje vrijednosti konstante disocijacije (K_d) i maksimalnog broja veznih mjesta (B_{max} ± standardna pogreška) iz 5 neovisnih Scatchardovih analiza. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

Moguće promjene u alosteričkoj povezanosti između veznog mjesta za konvulzive i veznog mjesta za GABA-u, nakon produljene primjene 100 μM DHEAS-a (48 sati), istraženi su dodatkom GABA-e (1 nM – 100 μM) u inkubacijski medij s [^{3}H]TBOB-om (Slika 23A.). U kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj DHEAS-om, visoke molekularne koncentracije GABA-e izazvale su gotovo potpunu inhibiciju vezivanja [^{3}H]TBOB-a. Produljeno izlaganje stanica DHEAS-u nije značajno promijenilo vrijednosti koncentracije GABA-e koje izazivaju 50% inhibicije vezivanja [^{3}H]TBOB-a (IC_{50}) u odnosu na kontrolu (Tablica 9.), što upućuje da je alosterička povezanost veznih mjesta za GABA-u i onih za konvulzive na $GABA_A$ receptoru ostala sačuvana.

Neobilježeni TBOB koji se veže na isto vezno mjesto kao i radioaktivni ligand, vrlo je potentan inhibitor vezanja obilježenog liganda. Uspoređen je učinak rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1nM – 1μM) na vezivanje [^{3}H]TBOB za vezno mjesto za konvulzive na $GABA_A$ receptoru u DHEAS-om tretiranoj i kontrolnoj skupini (Slika 23B.).



Slika 23. Inhibicija vezivanja [^{3}H]TBOB-a izazvana molekulom GABA (A) i neobilježenim TBOB-om (B) za rekombinantne $GABA_A$ receptore $\alpha_1\beta_{2\gamma 2s}$ izolirane iz stabilno transficiranih stanica HEK 293, tretiranih sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 8 nM [^{3}H]TBOB, u prisutnosti rastućih koncentracija GABA-e (1 nM – 100 μM) ili neobilježenog TBOB-a (1 nM – 1 μM). Radioaktivnost vezana za membrane izmjerena je nakon brze filtracije kroz Whatman GF/C filtere. Nespecifično vezanje u prisutnosti 100 μM pikrotoksina oduzeto je od ukupnog, da bi se dobilo specifično vezanje. Slika predstavlja srednje vrijednosti ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

Tablica 9. Učinak GABA-e na vezivanje [^{3}H]TBOB-a na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ stabilno transficiranih stanica HEK 293 tretiranih DHEAS-om odnosno kontrolnim otapalom

	IC_{50} (nM)
KONTROLA	433,71 ± 6,61
100 μM DHEAS (48h)	424,24 ± 11,47

Stanice HEK 293 stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1 nM -1 μM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, IC_{50} - koncentracija GABA-e koja izaziva 50% inhibicije vezivanja [^{3}H]TBOB, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

TBOB je bio efikasniji u istiskivanju vezivanja [^{3}H]TBOB-a od GABA-e. Nakon primjene 100 μM DHEAS-a kroz 48 sati, vrijednosti koncentracije koje istiskuju 50% specifično vezanog [^{3}H]TBOB (IC_{50}) nisu se značajno promijenile u odnosu na kontrolu (Tablica 10.).

Tablica 10. Učinak neobilježenog TBOB na vezanje [^{3}H]TBOB za vezno mjesto za konvulzive na rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ stabilno transficiranih stanica HEK 293 tretiranih s DHEAS odnosno kontrolnim otapalom

	IC_{50} (nM)
KONTROLA	79,31 ± 2,92
100 μM DHEAS (48h)	82,40 ± 1,56

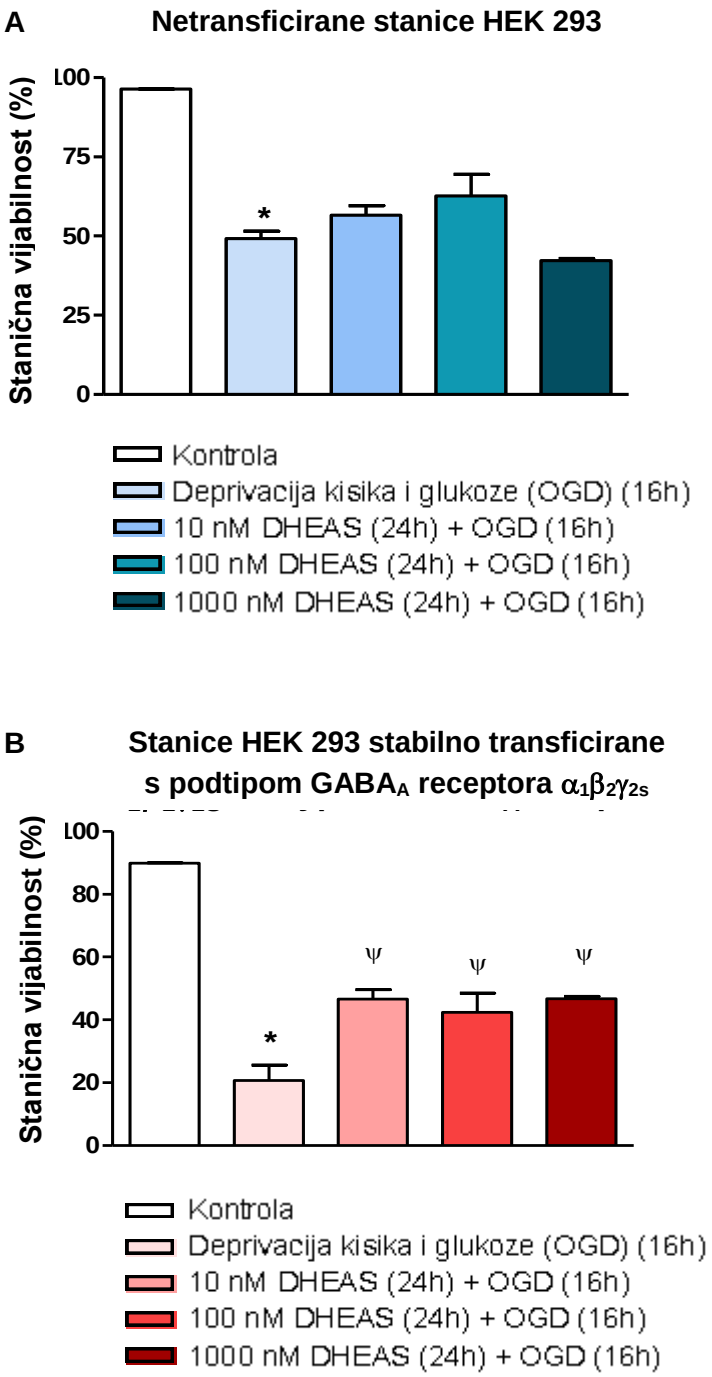
HEK 293 stanice stabilno transficirane podjedinicama $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ tretirane su sa 100 μM DHEAS odnosno kontrolnim otapalom kroz 24 odnosno 48 sati. Izolirane su stanične membrane i inkubirane s 8 nM [^{3}H]TBOB u prisutnosti rastućih koncentracija neobilježenog TBOB-a (1 nM – 1 μM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška iz 5 neovisnih pokusa. DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, IC_{50} - koncentracija TBOB koja izaziva 50% inhibicije vezivanja [^{3}H]TBOB, TBOB – t-butilbicikloortobenzoat

4.6. Protektivno djelovanje DHEAS-a na stanice HEK 293 u modelu deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGDR)

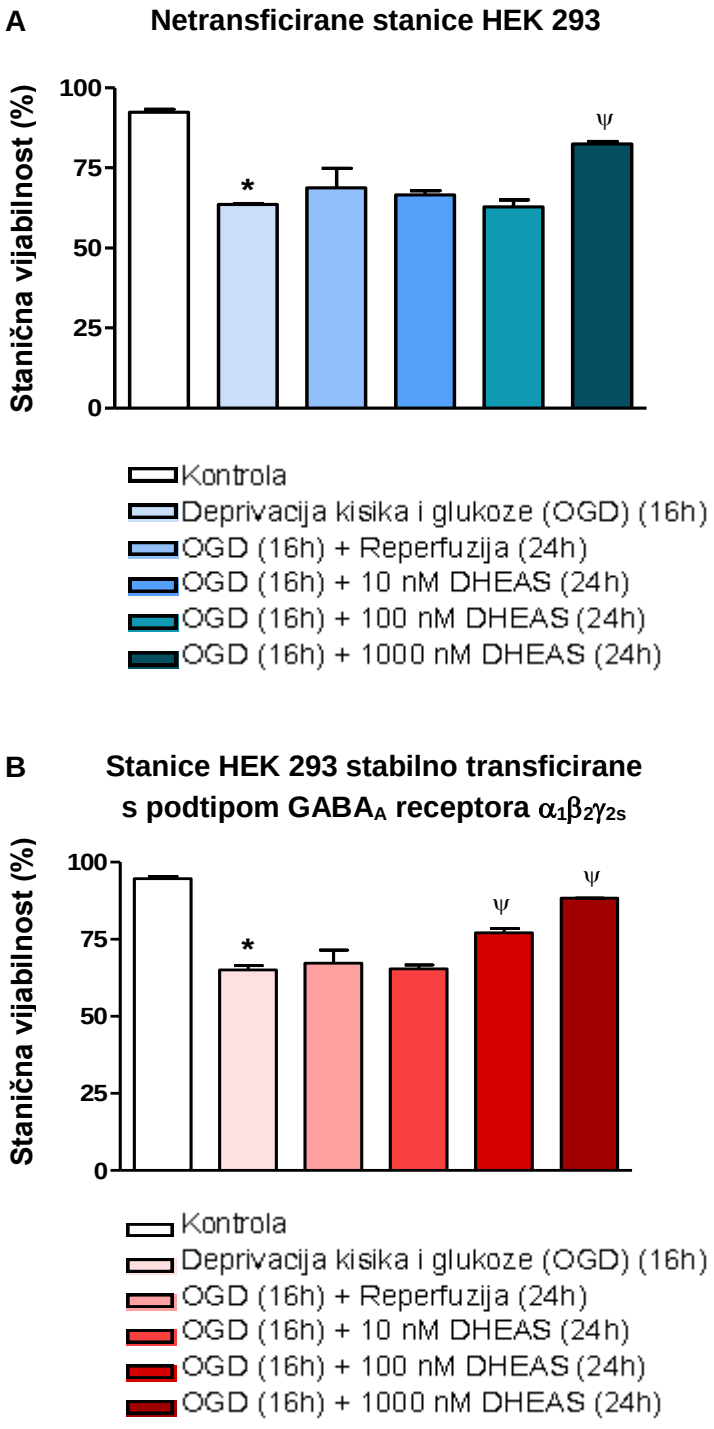
Da bi se istražilo potencijalno protektivno djelovanje DHEAS-a na stanice HEK 293 u modelu deprivacije kisika i glukoze, te reperfuzije (OGDR), uspoređeno je djelovanje različitih koncentracija DHEAS-a na vijabilnost stanica HEK 293, netransficiranih i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, prije i poslije deprivacije kisika i glukoze. Deprivacija kisika i glukoze od 16 sati značajno je smanjila vijabilnost stanica HEK 293, netransficiranih, kao i stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. DHEAS

primijenjen u koncentracijama od 10 nm – 1 μM tijekom 24 sata prije deprivacije kisika i glukoze pokazivao je protektivno djelovanje na stanice HEK 293 stabilno transficirane podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, ali ne i na netransficirane stanice HEK 293 (Slika 24.), što upućuje da se protektivno djelovanje predtretmana DHEAS-a ostvaruje putem $GABA_A$ receptora.

DHEAS primijenjen tijekom 24 sata nakon deprivacije kisika i glukoze, pokazivao je protektivno djelovanje na stanice HEK 293 netransficirane i stabilno transficirane podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ (Slika 25.), Međutim, u slučaju netransficiranih stanica HEK 293, protektivno je djelovala samo najveća koncentracija DHEAS-a od 1 μM, dok su u slučaju HEK 293 stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ protektivno djelovanje imale koncentracije od 100 nm i 1 μM, što ponovno ukazuje da se protektivno djelovanje DHEAS-a ostvaruje barem djelomično putem $GABA_A$ receptora.



*Slika 24. Učinak primjene DHEAS-a prije deprivacije kisika i glukoze (OGD) na vijabilnost stanica HEK 293 netransficiranih (A) i stabilno transficiranih podtipom GABA$_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ (B). Nakon predtretmana različitim koncentracijama DHEAS-a (10 -1000 nM) kroz 24 sata, stanice HEK 293 izložene su deprivaciji kisika i glukoze kroz 16 sati. Stanice su zatim obojane tripanskim modrilom i brojane pod invertnim mikroskopom. * P < 0.001 prema kontroli, $^{\Psi}$ P < 0.05 prema netretiranoj skupini izloženoj deprivaciji kisika i glukoze (16 h) (ANOVA i Tukey test). DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, OGD – deprivacija kisika i glukoze*



*Slika 25. Učinak primjene DHEAS-a poslije deprivacije kisika i glukoze (OGD) na vijabilnost netransficiranih stanica HEK 293 (A) i stabilno transficiranih podtipom GABA$_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ (B). Stanice HEK 293 izložene su deprivaciji kisika i glukoze kroz 16 sati nakon čega je slijedila reprefuzija i posttretman različitim koncentracijama DHEAS-a (10 - 1000 nM) kroz 24 sata. Stanice su zatim obojane tripanskim modrilom i brojane pod invertnim mikroskopom. * P < 0.001 prema kontroli, $^{\Psi}$ P < 0.04 prema netretiranoj skupini izloženoj deprivaciji kisika i glukoze (16 h) (ANOVA i Tukey test). DHEAS – dihidroepiandrosteron sulfat, OGD – deprivacija kisika i glukoze*

5. Rasprava

Cilj ovog rada bio je ispitati predstavljaju li rekombinantni $GABA_A$ receptori dobar model *in vitro* za istraživanje učinaka kratkotrajne i produljene primjene dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS). U tu svrhu napravljena je usporedba djelovanja ovog neurosteroida na embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK 293), netransficirane i stabilno transficirane $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, najčešćim podtipom $GABA_A$ receptora u mozgu (McKernan and Whiting 1996).

Da bi se potvrdile specifične interakcije DHEAS-a s $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ eksprimiranim u stanicama HEK 293, najprije su analizirani parametri vezivanja [^{3}H]DHEAS-a i učinci DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]flunitrazepama i [^{3}H]TBOB-a za membrane izolirane iz netransficiranih i stabilno transficiranih stanica HEK 293. Rezultati koji pokazuju da se neurosteroid DHEAS veže za dvije populacije veznih mjesta (višeg i nižeg mikromolarnog afiniteta) u stanicama HEK 293 u skladu su s podacima dobivenim na membranama dobivenim iz mozga štakora (Majewska i sur. 1990, Demirgören i sur. 1991). Iako se pretpostavlja da se dio visokoafinitetnih veznih mjesta za [^{3}H]DHEAS kod stabilno transficiranih stanicama HEK 293 nalazi na $GABA_A$ receptorima, nisu utvrđene značajne razlike u broju veznih mjesta za DHEAS u usporedbi sa netransficiranim stanicama, vjerojatno zbog njihovog vrlo velikog broja u staničnoj liniji HEK 293. Naime, i netransficirane i stabilno transficirane stanice HEK 293 imaju oko 180 pmol/mg proteina visokoafinitetnih veznih mjesta za [^{3}H]DHEAS, dok je broj veznih mjesta za [^{3}H]flunitrazepam i [^{3}H]TBOB u stanicama HEK 293 stabilno transficiranih sa $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ varirao između 6 i 7 pmol/mg proteina. Ovi rezultati u skladu su sa studijama koje su procjenjivale da je broj visokoafinitetnih veznih mjesta za DHEAS u moždanim membranama štakora najmanje 10 puta veći od broja $GABA_A$ receptora utvrđenih u pokusima *in vitro* (Majewska i sur. 1990, Demirgören i sur. 1991). Ova velika zastupljenost veznih mjesta za DHEAS u stanicama HEK 293, koje potječu iz bubrega, nije iznenađujuća s obzirom da je najviše vezivanja [^{3}H]DHEAS-a pokazano upravo u jetri i bubregu štakora (Sousa i Ticku 1997).

Sposobnost vezivanja DHEAS-a za rekombinantne $GABA_A$ receptore i njihova modulacija, ispitana je preko interakcije DHEAS-a s benzodiazepinskim veznim mjestima u stanicama HEK 293. Na prepracijama membrana izoliranih iz stanica koje eksprimiraju rekombinantne $GABA_A$ receptore $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, DHEAS je inhibirao vezivanje [^{3}H]flunitrazepama u rasponu od visokih mikromolarnih do milimolarnih koncentracija. Ovi rezultati u skladu su s pronalascima ranijih studija koje su uključivale nativne $GABA_A$ receptore (Demirgören i

sur. 1991, Sousa i Ticku 1997). Međutim, u netransficiranim stanicama, DHEAS je bio potpuno neaktivan u istiskivanju vezanog [^{3}H]flunitrazepama. Iako su endogeno prisutna vezna mjesta za [^{3}H]flunitrazepam identificirana i okarakterizirana na membranama netransficiranih stanica HEK 293, ekspresija $GABA_A$ receptora u ovim stanicama nije potvrđena u pokusima vezivanja radioliganada (Fuchs i sur. 1995). Kako benzodiazepinska vezna mjesta u stabilno transfeciranim stanicama HEK 293 pokazuju osobine centralnih benzodiazepinskih veznih mjesta (Peričić i sur. 2001), naši rezultati upućuju da u stanicama HEK 293 DHEAS modulira samo ona mjesta koja su dio $GABA_A$ receptorskog kompleksa.

U usporedbi s djelovanjem DHEAS-a na vezivanje [^{3}H]flunitrazepama, ovaj neurosteroid mnogo jače istiskuje [^{3}H]TBOB-a vezanog na membrane izolirane iz stanica HEK 293 koje eksprimiraju $GABA_A$ receptore $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, na kojima je DHEAS također poništio inhibicijski učinak GABA-e na vezivanje [^{3}H]TBOB-a. Međutim, u ovim uvjetima nije detektirano specifično vezivanje [^{3}H]TBOB-a na membrane netransficiranih stanica HEK 293 što upućuje da DHEAS djeluje putem ili blizu veznog mjesta za pikrotoksin/ t–butilbiciklofosforotionat (TBPS) na $GABA_A$ receptorskom kompleksu. Prethodne studije (Sousa i Ticku 1997) pokazale su sličnu inhibiciju potaknutu DHEAS-om vezivanja [^{35}S]TBPS na membrane izolirane iz mozga štakora.

Rezultati dobiveni na stanicama HEK 293 stabilno transfeciranim s $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ u skladu su s podacima koji pokazuju da se DHEAS ponaša kao antagonist $GABA_A$ receptora (Majewska i sur. 1990, Demirgören i sur. 1991, Sousa i Ticku 1997,). Nadalje, rezultati koji potvrđuju specifične interakcije DHEAS-a s rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ stabilno eksprimiranim u stanicama HEK 293 pokazuju da se ovaj model može upotrebljavati u istraživanjima učinaka DHEAS-a na $GABA_A$ receptore. Prethodne studije su već uputile da ove stanice imaju relativno velik broj veznih mjesta $GABA_A$ receptora i mogu služiti kao dobar eksperimentalan model za istraživanje adaptivnih promjena $GABA_A$ receptora nakon izlaganja različitim lijekovima (Peričić i sur. 2003, Švob Štrac i sur. 2008). Iako stanice HEK 293 predstavljaju umjetni sustav bez normalnog neuralnog okoliša, pokazano je da su mnogi proteini koji se tipično nalaze u neuronima također eksprimiraju u staničnoj liniji HEK 293 (Shaw i sur. 2002).

Adaptivne promjene $GABA_A$ receptora nakon produljene primjene DHEAS-a istražene su produljenim tretmanom ovim neurosteroidom na vezivanje [^{3}H]flunitrazepama i [^{3}H]TBOB-a, kao i na njihovu modulaciju s GABA-om. Rezultati koji pokazuju da produljena primjena (48 sati) visoke koncentracije (100 μM) DHEAS-a nije promijenila maksimalan broj i afinitet veznih mjesta za benzodiazepine i konvulzive upućuju da nije došlo do promjene u broju rekombinantnih $GABA_A$ receptora. Ovi podaci također upućuju da se promjene u

sastavu podjedinica $GABA_A$ receptora izazvane DHEAS-om vjerojatno mogu isključiti. Naime, stabilno transficirane stanice HEK 293 eksprimiraju samo podjedinicu α_1, β_2 i γ_{2S}, što isključuje mogućnost zamjene podjedinica.

Produljeno izlaganje DHEAS-u također nije utjecalo na alosteričku povezanost između veznih mjesta $GABA_A$ receptora, odnosno nije promijenilo sposobnost GABA-e da stimulira vezivanje [^{3}H]flunitrazepama tj. da inhibira vezivanje [^{3}H]TBOB-a. Vezivanje [^{3}H]TBOB-a u prisutnosti GABA-e može usko reflektirati funkcionalno stanje $GABA_A$ receptora, s obzirom da [^{3}H]TBOB, kao i [^{35}S] TBPS, označava vezna mjesta povezana s kloridnim kanalićem unutar $GABA_A$ receptorskog kompleksa (Im i Blakeman 1991). Dakle, rezultati ukazuju da nakon produljene primjene DHEAS-a, funkcionalne interakcije veznih mjesta za GABA-u sa veznim mjestima za benzodiazepine i veznim mjestima za konvulzive ostaju sačuvane. Većina studija koja je pokazala da produljena primjena neurosteroida i njihovo ustezanje izazivaju promjene u ekspresiji i funkciji $GABA_A$ receptora, bavila se neurosteroidima koji su potencirali djelovanje GABA-e, tzv. stimulacijskim neurosteroidima (Yu i Ticku 1995, Follesa i sur. 2001, Maguire i Mody 2007, Smith i sur. 2007).

Produljena primjena pozitivnih alosteričkih modulatora $GABA_A$ receptora, kao što su benzodiazepini, alkohol ili neurosteroidi progesteron i alopregnanolon obično izaziva promjene odgovorne za smanjenje broja i/ili funkcije receptora, uključujući smanjenu povezanost ili razdvajanje alosteričkih mjesta $GABA_A$ receptora, što se učestalo povezuje s razvojem tolerancije i ovisnosti (Friedman i sur. 1996, Biggio i sur. 2003, Cagetti i sur. 2003). S druge strane, mnoge studije pokazale su da dugotrajna primjena antagonista $GABA_A$ receptora obično ima različite ili čak suprotne učinke (Miller i sur. 1989, Kulkarni i Ticku 1990, Jazvinšćak Jembrek i sur. 2008). Stoga, primijećeno različito djelovanje dugotrajnog tretmana DHEAS-om na prilagodbu $GABA_A$ receptora nije iznenađujuće, posebice jer se smatra da GABA-inhibicijski steroidi međudjeluju s $GABA_A$ receptorima putem veznih mjesta različitih od veznih mjesta za stimulacijske neuroaktivne steroide (Morrow i sur. 1990, Majewska 1992, Park-Chung i sur. 1999).

S obzirom da su promjene u ekspresiji i funkcionalnoj povezanosti $GABA_A$ receptora vjerojatno povezane sa razvojem tolerancije i ovisnosti nakon dugotrajne primjene liganada $GABA_A$ receptora, naši rezultati upućuju da produljeno izlaganje DHEAS-u neće proizvesti toleranciju i ovisnost. Međutim, kako ekspresija i funkcija rekombinantnih $GABA_A$ receptora u eksperimentalnom modelu stanica HEK 293 možda nije regulirana na jednak način kao što je to u kompleksnijim sustavima *in vivo* koji uključuju endogeno prisutne gene, daljnja istraživanja trebala bi pokazati izaziva li dugotrajno izlaganje intaktnih životinja DHEAS-u promjene u broju ili funkcionalnoj povezanosti veznih mjesta $GABA_A$ receptora.

Iako bi značaj regulacije $GABA_A$ receptora DHEAS-om mogao biti dalekosežan, s obzirom da bi ovakve interakcije mogle biti značajne, posebice tijekom dugotrajne terapije neophodne za primijećene pozitivne učinke DHEAS-a na neuralnu plastičnost, kogniciju i ponašanje (Wolf i Kirschbaum 1999, De Bruin i sur. 2002, Pérez-Neri i sur. 2008, Maninger i sur. 2009), drugi različiti biološki mehanizmi tolerancije i ovisnosti mogli bi također biti potaknuti dugotrajnom primjenom DHEAS-a. Kako bilo, naša hipoteza je u skladu s rezultatima koji pokazuju potencijalnu preventivnu i protektivnu ulogu DHEAS-a u razvoju tolerancije i ovisnosti nakon izlaganja različitim sredstvima ovisnosti uključujući benzodiazepine, alkohol, nikotin, kokain i morfij (Yadid i sur. 2010).

U našem eksperimentu, neuroprotektivna uloga DHEAS-a ispitana je na modelu netransficiranih i transficiranih stanica HEK 293 koje su bile podvrgnute 16-satnoj deprivaciji kisika i glukoze (OGD). Utjecaj DHEAS-a analiziran je mjerenjem vijabilnosti stanica koje su tretirane 10 nm, 100 nm ili 1 μM DHEAS-om 24 sata prije OGD-a (predtretman) ili tijekom reperfuzijskog perioda (posttretman), također u trajanju 24 sata. Primijećen je pozitivan učinak DHEAS-a na preživljavanje stanica nakon ishemije, ali jače izražen kod stanica HEK 293 koje eksprimiraju rekombinantne $GABA_A$ receptore što potvrđuje da jedan od mehanizama protektivnog djelovanja DHEAS-a uključuje $GABA_A$ receptore.

Osim toga, primijećeno je da je DHEAS bio učinkovit u manjim dozama (od 10 nM) kad su stanice bile predtretirane, dok je posttretman DHEAS-om statistički značajno povećao vijabilnost stanica samo u višim dozama (100 nm i 1 μM). Značajno povećanje vijabilnosti stanica i u najmanjim dozama kod predtretmana unatoč velikoj smrtnosti stanica na koje DHEAS nije bio primijenjen, može dovesti do zaključka da predtretman DHEAS-om ima neuroprotektivan učinak i na jače ishemijske ozljede ukoliko se primijeni prije nje, dok ukoliko se primijeni kasnije, pokazuje poboljšanje samo kod blagih ozljeda. Ovi rezultati donekle odgovaraju rezultatima koje su dobili Marx i sur. (2000), gdje se neuroprotektivan utjecaj DHEAS-a primijetio pri koncentraciji od 1 μM, te Kaasik i sur. (2001), gdje se protektivna koncentracija DHEAS-a primijenjena na primarnu kulturu granularnih stanica malog mozga kreće od 100 nm do 10 μM, te je također uzrokovala bolje preživljavanje neurona kod predtretmana. Za razliku od našeg istraživanja, oba eksperimenta koristila su primarne kulture neurona (kortikalnih u prvom slučaju, te granularnih u drugom) koji su osjetljiviji na ishemiju te imaju različitu ekspresiju receptora s kojima DHEAS također može reagirati. Unatoč tome, može se zaključiti da stanice HEK 293 sa stabilnom ekspresijom $GABA_A$ receptora daju donekle slične rezultate onima dobivenim na neuronima što

potvrđuje da predstavljaju dobar model za istraživanje neuroprotektivnog utjecaja DHEAS-a.

Koncentracije DHEAS-a koje pokazuju neuroprotektivan učinak otprilike odgovaraju koncentraciji ovog neurosteroida u krvi mladih ljudi (11 μM kod muškaraca od 20-ak godina) (Orentreich i sur. 1992), što je u skladu sa zaključcima da smanjenje koncentracije DHEAS-a tijekom starenja povećava rizik i težinu posljedica ishemijskog moždanog udara i neurodegenerativnih bolesti. Iako je pokazano da su niske razine endogenog neurosteroida DHEAS-a povezane s povećanim rizikom od ishemijskog moždanog udara u ljudi (Blum i sur. 2013, Jiménez i sur. 2013), relativno mali broj studija istražio je neuroprotektivne učinke terapije DHEAS-om u ishemijskoj ozljedi mozga. Kognitivni i bihevioralni učinci DHEAS-a istraživani su uglavnom kod glodavaca (Lapchak i sur. 2000, Li i sur. 2001, Fiore i sur. 2004, Foeller i sur. 2005, Li i sur. 2009), a kao što je spomenuto, glodavci i ljudi imaju različiti metabolizam i koncentraciju DHEAS-a u krvi (Maninger i sur. 2009), te se stoga zaključci dobiveni na njima moraju intrepretirati i translatirati s oprezom.

DHEAS je u krvi prisutan u puno većoj koncentraciji nego DHEA (oko 1000 puta više) zbog svoje bolje topljivosti u hidrofilnom okruženju, te ima jače antagonističko djelovanje na $GABA_A$ receptore što ga čini potencijalno boljim terapeutikom od nesulfatiranog oblika (Majewska 1992). Međutim, u visokim koncentracijama DHEAS može pokazivati neurotoksičan učinak (Wolf i Kirschbaum 1999, Kaasik i sur. 2001). S druge strane, zbog svoje polarnosti, DHEAS teško prolazi krvno-moždanu barijeru, pa se postavlja pitanje kako ga primijeniti da bi se ostvario optimalni rezultat. DHEAS se može na periferiji pretvoriti u DHEA koji lako dolazi do mozga, a u mozgu se potom može ponovno sulfatirati djelovanjem HST (Wolf i Kirschbaum 1999).

Mehanizam kojim DHEAS štiti od ishemijske ozljede potencijalno uključuje nekoliko signalnih puteva i staničnih receptora. Najjači učinak DHEAS ima na $GABA_A$ receptore djelujući kao antagonist, što je pokazano u našem eksperimentu, ali i na NMDA receptore čiji je pozitivni modulator (Marx i sur. 2000). Intuitivno, reklo bi se da će ovaj pozitivan učinak na glutamatni sustav samo pojačati ishemijsku ozljedu, ali eksperimentima je pokazano da je zapravo smanjuje. Naime, DHEAS putem receptora sigma-1 (Baulieu 1998) štiti stanice od pojačanog lučenja i nakupljanja glutamata koji dugoročno aktivira NMDA receptor (Kurata i sur. 2004). Smanjenje inhibicijskog učinka $GABA_A$ receptora i posredno povećanje aktivnosti NMDA receptora mogući je mehanizam povećavanja dugoročne potencijacije odnosno kognitivnih sposobnosti i pamćenja kod ljudi koji boluju od Alzheimerove bolesti (Tamagno i sur. 2003, Kostakis i sur. 2013). Ostali mehanizmi djelovanja ovog neurosteroida uključuju inhibiciju dehidrogenaze glukoza-6-fosfata što

smanjuje koncentraciju NADPH i posljedično NADPH oksidaza koja je jedan od najvećih proizvođača ROS-ova (Young Shin i sur. 2001), te djelovanje na NFκB signalni put ili preko proteina G što potiče ekspresiju anti-apoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2 (Mao i Barger 1998) ili neposredno inhibicijom preko smanjenja ROS-ova što smanjuje upalu (Iwasaki i sur. 2004).

S obzirom da je moždani udar vrlo ozbiljan globalni zdravstveni problem, a prema Državnom zavodu za statistiku i Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo predstavlja prvi uzrok invalidnosti i drugi uzrok smrtnosti u Republici Hrvatskoj, rezultati ovog istraživanja koji pokazuju protektivno djelovanje predtretmana, kao i posttretmana DHEAS-a u ishemijskoj ozljedi, trebali bi biti zanimljivi široj kao i hrvatskoj znanstvenoj javnosti. Za razliku od brojnih animalnih modela moždanog udara, u skladu sa međunarodno prepoznatim "3R pravilom" vezanim za dobrobit životinja u znanstvenim istraživanjima, u ovom istraživanju korišten je model ishemije mozga *in vitro*. Iako se ishemija mozga ne može u potpunosti reproducirati u staničnoj kulturi, smatra se da model deprivacije kisika i glukoze, te nakon toga reperfuzije *in vitro* (OGDR), oponaša ishemijske uvjete i patološka stanja (Mattson i sur. 2000), te predstavlja pogodan način za testiranje potencijalno neuroprotektivnih supstanci (Goldberg i Choi 1993, Ruscher i sur. 2007) na različitim staničnim linijama (Fordel i sur. 2007, Zhang i Wood 2005, Shi i sur. 2006, Malagelada i sur. 2005, Canas i sur. 2006). Na temelju rezultata može se zaključiti da bi se DHEAS mogao koristiti i u preventivne svrhe kao i za liječenje ishemijske ozljede mozga. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu razjašnjavanja točnih mehanizama protektivnog djelovanja ovog neurosteroida. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju složene stanične i molekularne patofiziologije moždanog udara, kao i razvoju novih pristupa u prevenciji i liječenju posljedica ove ozbiljne bolesti.

6. Zaključak

1. Rezultati vezivanja [^{3}H]DHEAS-a na membrane netransificiranih stanica HEK 293 i stabilno transficiranih rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ upućuju da u stanicama HEK 293 postoje dvije populacije veznih mjesta (visokog i niskog afiniteta) za DHEAS, te da nema značajnih razlika u njihovom afinitetu (K_d) i broju veznih mjesta (B_{max}), kao ni u inhibicijskom potencijalu DHEAS-a (IC_{50}), između netransficiranih stanica HEK 293 i stanica HEK 293 stabilno transficiranih $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$.

2. Rastuće koncentracije DHEAS-a inhibirale su vezivanje [^{3}H]flunitrazepama i [^{3}H]TBOB-a (liganada za vezna mjesta za benzodiazepine odnosno konvulzive) na membranama stanica HEK 293 stabilno transficiranih podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, ali ne i na membranama netransficiranih stanica HEK 293, što ukazuje da u stanicama HEK 293 DHEAS modulira samo ona vezna mjesta za benzodiazepine i konvulzive koja su dio $GABA_A$ receptorskog kompleksa.

3. Produljena (48 sati) primjena DHEAS-a (100 μM) nije imala učinak na maksimalan broj (B_{max}) i afinitet (K_d) veznih mjesta za benzodiazepine i konvulzive $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ stabilno eksprimiranih u stanicama HEK 293.

4. Rastuće koncentracije GABA-e stimulirale su vezivanje benzodiazepina, odnosno inhibirale su vezivanje konvulziva, za membrane kontrolnih stanica HEK 293, stabilno transficiranih rekombinantim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, ali i stanica predtretiranih 100 μM DHEAS-om kroz 48 sati, što upućuje na očuvanost funkcionalnih veza između veznih mjesta za GABA-u i za benzodiazepine, odnosno za GABA-u i konvulzive na $GABA_A$ receptorskom kompleksu.

5. DHEAS primijenjen u koncentracijama od 10-1000 nM tijekom 24 sata prije deprivacije kisika i glukoze pokazivao je protektivno djelovanje na stanice HEK 293 stabilno transficirane $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, ali ne i na netransficirane stanice HEK 293, što dovodi do zaključka da se protektivno djelovanje predtretmana DHEAS-om ostvaruje putem $GABA_A$ receptora.

6. DHEAS primijenjen tijekom 24 sata nakon deprivacije kisika i glukoze, odnosno tijekom reperfuzije, pokazivao je protektivno djelovanje u nižim koncentracijama (100 nM) na stanice HEK 293 stabilno transficirane podtipom $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ nego na netransficirane stanice HEK 293 (1000 nM), što ukazuje da se i protektivno djelovanje posttretmana DHEAS-om ostvaruje barem djelomično putem $GABA_A$ receptora.

7. Potvrđene su specifične interakcije DHEAS-a s rekombinantnim $GABA_A$ receptorima $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ stabilno eksprimiranim u stanicama HEK 293, gdje se DHEAS ponaša kao antagonist $GABA_A$ receptora.

8. Pokazano je da produljena primjena 100 μM DHEAS-a tijekom 48 sati ne izaziva adaptivne promjene u ekspresiji i funkcionalnoj povezanosti rekombinantnih $GABA_A$ receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, koje se povezuju sa razvojem tolerancije i ovisnosti, što upućuje da dugotrajno izlaganje DHEAS-u ne izaziva spomenute nuspojave.

9. Primijećeno protektivno djelovanje DHEAS-a na stanice HEK 293, koje su podvrgnute deprivaciji kisika i glukoze u modelu ishemijske ozljede mozga *in vitro*, barem je djelomično ostvareno putem $GABA_A$ receptora.

10. Pokazano je da se rekombinantni $GABA_A$ receptori $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ stabilno eksprimirani u stanicama HEK 293 mogu upotrebljavati kao model *in vitro* u istraživanjima različitih učinaka koje DHEAS ostvaruje putem $GABA_A$ receptora.

7. Literatura

Allen, C. L., Bayraktutan, U. (2009). Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *International Journal of Stroke, 4*(6), 461-470.

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

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Poirier, J., Quirion, R. (1999). Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Molecular Brain Research, 66*(1-2), 35-41.

Baulieu, E. (1998). Neurosteroids: A Novel Function Of The Brain. *Psychoneuroendocrinology, 23*(8), 963-987.

Besnard, F., Even, Y., Itier, V., Granger, P., Partiséti, M., Avenet, P., Depoortere, H., Graham, D. (1997). Development of Stable Cell Lines Expressing Different Subtypes of $GABA_A$ Receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction, 17*(1-3), 99-113.

Biggio, G., Dazzi, L., Biggio, F., Mancuso, L., Talani, G., Busonero, F., Mostallino, M. C., Sanna, E., Follesa, P. (2003). Molecular mechanisms of tolerance to and withdrawal of $GABA_A$ receptor modulators. *European Neuropsychopharmacology, 13*(6), 411–423.

Biggio, G., Concas, A., Follesa, P., Sanna, E., Serra, M. (2007). Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacology Therapeutics, 116*(1), 140-171.

Blum, C. A., Mueller, C., Schuetz, P., Fluri, F., Trummler, M., Mueller, B., Katan, M., Christ-Crain, M. (2013). Prognostic Value of Dehydroepiandrosterone-Sulfate and Other Parameters of Adrenal Function in Acute Ischemic Stroke. *PLoS ONE, 8*(5).

Bowery, N. G., Whiting, P., Wafford, K. (2002). The GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, October (poster).

Braeuninger, S., Kleinschnitz, C. (2009). Rodent models of focal cerebral ischemia: Procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine, 1*(1), 8.

de Bruin, V., Vieira, M., Rocha, M., Viana, G. (2002). Cortisol and dehydroepiandosterone sulfate plasma levels and their relationship to aging, cognitive function, and dementia. *Brain and Cognition, 50*(2), 316-323.

Cagetti, E., Liang, J., Spigelman, I., Olsen, R. W. (2003). Withdrawal from Chronic Intermittent Ethanol Treatment Changes Subunit Composition, Reduces Synaptic Function, and Decreases Behavioral Responses to Positive Allosteric Modulators of $GABA_A$ Receptors. *Molecular Pharmacology, 63*(1), 53-64.

Canas, P. T., Velly, L. J., Labrande, C. N., Guillet, B. A., Sautou-Miranda, V., Masmejean, F. M., Nieoullon, A. L., Gouin, F. M., Bruder, N. J., Pisano, P. S. (2006). Sevoflurane Protects Rat Mixed Cerebrocortical Neuronal-Glial Cell Cultures against Transient Oxygen-Glucose Deprivation. *Anesthesiology, 105*(5), 990-998.

Cardounel, A., Regelson, W., Kalimi, M. (1999). Dehydroepiandrosterone Protects Hippocampal Neurons Against Neurotoxin-Induced Cell Death: Mechanism of Action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 222*(2), 145-149.

Carvalhaes-Neto, N., Huayllas, M. K., Ramos, L. R., Cendoroglo, M. S., Kater, C. E. (2003). Cortisol, DHEAS and aging: Resistance to cortisol suppression in frail institutionalized elderly. *Journal of Endocrinological Investigation, 26*(1), 17-22.

Chaki, S., Okuyama, S., Ogawa, S., Tomisawa, K. (1998). Regulation of NMDA-induced [3H] dopamine release from rat hippocampal slices through sigma-1 binding sites. *Neurochemistry International, 33*(1), 543-548.

Charalampopoulos, I., Tsatsanis, C., Dermitzaki, E., Alexaki, V., Castanas, E., Margioris, A. N., Gravanis, A. (2004). Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(21), 8209-8214.

Charalampopoulos, I., Dermitzaki, E, Vardouli, L., Tsatsanis, C., Stournaras, C., Margioris, A. N., Gravanis, A. (2005). Dehydroepiandrosterone Sulfate and Allopregnanolone Directly Stimulate Catecholamine Production via Induction of Tyrosine Hydroxylase and Secretion by Affecting Actin Polymerization. *Endocrinology, 146*(8), 3309-3318.

Charalampopoulos, I., Alexaki, V., Tsatsanis, C., Minas, V., Dermitzaki, E., Lasaridis, I., Vardouli, L., Stournaras, C., Margioris, A. N., Castanas, E., Gravanis, A. (2006). Neurosteroids as Endogenous Inhibitors of Neuronal Cell Apoptosis in Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1088*(1), 139-152.

Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X., Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Journal of the Neurological Sciences, 189*(1-2), 49-57.

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

Compagnone, N. A., Mellon, S. H. (1998). Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*(8), 4678-4683.

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

Danton, G. H., Dietrich, W. D. (2004). The Search for Neuroprotective Strategies in Stroke. *American Journal of Neuroradiology, 25*(2), 181-194.

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

Demirgören, S., Majewska, M., Spivak, C., London, E. (1991). Receptor binding and electrophysiological effects of Dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the $GABA_A$ receptor. *Neuroscience, 45*(1), 127-135.

Duarte, E. P., Curcio, M., Canzoniero, L. M., Duarte, C. B. (2012). Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors, 30*(4), 242-257.

Dunn, J. F., Wu, Y., Zhao, Z., Srinivasan, S., Natah, S. S. (2012). Training the Brain to Survive Stroke. *PLoS ONE, 7*(9).

Eltzschig, H. K., Collard, C. D. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin, 70*(1), 71-86.

Eltzschig, H. K., Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nature Medicine, 17*(11), 1391-1401.

Erecinska, M., Thoresen, M., Silver, I. A. (2003). Effects of Hypothermia on Energy Metabolism in Mammalian Central Nervous System. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism, 23*(5), 513-530.

Evans, J. G., Malouf, R., Huppert, F. A., Niekerk, J. K. (2006). Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognitive function in healthy elderly people. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

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

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

Follesa, P., Concas, A., Porcu, P., Sanna, E., Serra, M., Mostallino, M. C., Purdy, R. H., Biggio, G. (2001). Role of allopregnanolone in regulation of $GABA_A$ receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Brain Research Reviews, 37*(1-3), 81-90.

Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Schrijvers, D., Moens, L., Dewilde, S. (2007). Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: A step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions. *Gene, 398*(1-2), 114-122.

Friedman, L. K., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1996). γ-Aminobutyric acidA receptor regulation: Heterologous uncoupling of modulatory site interactions induced by chronic steroid, barbiturate, benzodiazepine, or GABA treatment in culture. *Brain Research, 707*(1), 100-109.

Fuchs, K., Zezula, J., Slany, A., Sieghart, W. (1995). Endogenous [^{3}H]flunitrazepam binding in human embryonic kidney cell. *European Journal of Pharmacology: Molecular PharmacologySection*, *289*(1), 87-95.

Georgiadis, D., Schwarz, S., Kollmar, R., Schwab, S. (2001). Endovascular Cooling for Moderate Hypothermia in Patients With Acute Stroke: First Results of a Novel Approach. *Stroke, 32*(11), 2550-2553.

Goldberg, M. P., Choi. D. W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of Neuroscience, 13*(8), 3510-3524.

Gorantla, S., Liu, J., Sneller, H., Dou, H., Holguin, A., Smith, L., Ikezu, T., Volsky, D. J., Poluektova, L., Gendelman, H. E. (2007). Copolymer-1 Induces Adaptive Immune Anti-inflammatory Glial and Neuroprotective Responses in a Murine Model of HIV-1 Encephalitis. *The Journal of Immunology, 179*(7), 4345-4356.

Green, A. R., Shuaib, A. (2006). Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discovery Today, 11*(15-16), 681-693.

Guan, J., Tong, W., Ding, W., Du, S., Xiao, Z., Han, Q., Zhu, Z., Bao, X., Shi, X., Wu, C., Cao, J., Yang, Y., Ma, W., Li, G., Yao, Y., Gao, J., Wei, J., Dai, J., Wang, R. (2012). Neuronal regeneration and protection by collagen-binding BDNF in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Biomaterials, 33*(5), 1386-1395.

Guazzo, E., Kirkpatrick, P. J., Goodyer I. M., Shier H. M., Herbert, J. (1996). Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: Relation to blood levels and the effects of age. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 80*(11), 3951-3960.

Hacke, W., Albers, G., Al-Rawi, Y., Bogousslavsky, J., Davalos, A., Eliasziw, M., Fischer, M., Furlan, A., Kaste, M., Lees, K. R., Soehngen, M., Warach, S. (2004). The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): A Phase II MRI-Based 9-Hour Window Acute Stroke Thrombolysis Trial With Intravenous Desmoteplase. *Stroke, 36*(1), 66-73.

Heiss, W., Thiel, A., Grond, M., Graf, R. (1999). Which Targets Are Relevant for Therapy of Acute Ischemic Stroke? *Stroke, 30*(7), 1486-1489.

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

Iadecola, C., Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine, 17*(7), 796-808.

Ibarra, A., Avendaño, H., Cruz, Y. (2007). Copolymer-1 (Cop-1) improves neurological recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience Letters, 425*(2), 110-113.

Im, W. B., Blakeman, D. P. (1991). Correlation between γ-aminobutyric $acid_A$ receptor ligand-induced changes in*t*-butylbicyclophosphoro[^{35}S]thionate binding and $^{36}Cl^-$uptake in rat cerebrocortical membranes. *Molecular Pharmacology, 39*(3), 394–398.

Ishikawa, M. (2004). Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Frontiers in Bioscience, 9*(1-3), 1339-1347.

Iwasaki, Y., Asai, M., Yoshida, M., Nigawara, T., Kambayashi, M., Nakashima, N. (2004). Dehydroepiandrosterone-Sulfate Inhibits Nuclear Factor-κB-Dependent Transcription in Hepatocytes, Possibly through Antioxidant Effect. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, 89*(7), 3449-3454.

Jembrek, M. J., Štrac, D. Š,, Vlainić, J., Peričić, D. (2008). The role of transcriptional and translational mechanisms in flumazenil-induced up-regulation of recombinant $GABA_A$ receptors. *Neuroscience Research, 61*(3), 234-241.

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

Kaasik, A., Safiulina, D., Kalda, A., Zharkovsky, A. (2003). Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 87*(1), 97-103.

Kahles, T., Brandes, R. P. (2012). NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences, 69*(14), 2345-2363.

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

Kidwell, C. S., Warach, S. (2003). Acute Ischemic Cerebrovascular Syndrome: Diagnostic Criteria. *Stroke, 34*(12), 2995-2998.

Knapstein, P., David, A., Wu, C., Archer, D., Flickinger, G., Touchstone, J. (1968). Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids, 11*(6), 885-896.

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

Kulkarni, S. K., Ticku, M. K. (1990). Chronic benzodiazepine antagonist treatment and its withdrawal upregulates components of GABA-benzodiazepine receptor ionophore complex in cerebral cortex of rat. *Brain Research, 519*(1-2), 6-11.

Kurata, K., Takebayashi, M., Morinobu, S. Yamawaki, S. (2004). Beta-Estradiol, Dehydroepiandrosterone, and Dehydroepiandrosterone Sulfate Protect against N-Methyl-D-aspartate-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 311*(1), 237-245.

Labrie, F. (2004). Adrenal Androgens and Intracrinology. *Seminars in Reproductive Medicine, 22*(4), 299-309.

Lanthier, A., Patwardhan, V. (1986). Sex steroids and 5-en-3β-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *Journal of Steroid Biochemistry, 25*(3), 445-449.

Lapchak, P. A., Chapman, D. F., Nunez, S. Y., Zivin, J. A., Hsu, C. Y. (2000). Dehydroepiandrosterone Sulfate Is Neuroprotective in a Reversible Spinal Cord Ischemia Model: Possible Involvement of GABAA Receptors. *Stroke, 31*(8), 1953-1957.

Leonov, Y., Sterz, F., Safar, P., Radovsky, A., Oku, K., Tisherman, S., Stezoski, S. W. (1990). Mild Cerebral Hypothermia during and after Cardiac Arrest Improves Neurologic Outcome in Dogs. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 10*(1), 57-70.

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

Li, Z., Cui, S., Zhang, Z., Zhou, R., Ge, Y., Sokabe, M., Chen, L. (2009). DHEA-neuroprotection and neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 29*(2), 287-296.

Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjövall, J., Baulieu E. E. (2004). Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *The Journal of Lipid Research, 45*(12), 2287-2302.

Lobo, I. A., Harris, R. A. (2008). $GABA_A$ receptors and alcohol. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *90*(1), 90–94.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry, 193*(1), 265–275.

Maguire, J., Mody, I. (2007). Neurosteroid Synthesis-Mediated Regulation of $GABA_A$ Receptors: Relevance to the Ovarian Cycle and Stress. *Journal of Neuroscience, 27*(9), 2155-2162.

Majewska, M. D., Demirgoren, S., Spivak, C. E., London, E. D. (1990). The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the $GABA_A$ receptor. *Brain Research, 526*(1), 143-146.

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

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

Maninger, N., Wolkowitz, O., Reus, V., Epel, E., Mellon, S. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in Neuroendocrinology, 30*(1), 65-91.

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

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

Martin, H. G., Wang, Y. T. (2010). Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. *Cell, 140*(2), 174-176.

Marx, C. E., Jarskog, L., Lauder, J. M., Gilmore, J. H., Lieberman, J. A., Morrow, A. (2000). Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain Research, 871*(1), 104-112.

Mattson, M. P., Duan, W., Pedersen, W. A., Culmsee, C. (2001). Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *6*(1-2), 69-81.

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

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

McKernan, R. M., Whiting, P. J. (1996). Which $GABA_A$ - receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in Neurosciences, 19*(4), 139–143.

McPherson, G., Molenaar, P., Raper, C., Malta, E. (1983). Analysis of dose-response curves and calculation of agonist dissociation constants using a weighted nonlinear curve fitting program. *Journal of Pharmacological Methods, 10*(4), 231-241.

Mestre, H., Cohen-Minian, Y., Zajarias-Fainsod, D., Ibarra, A. (2013). Pharmacological Treatment of Acute Ischemic Stroke. In U. Kishore (Ed.), *Neurodegenerative Diseases*. InTech. Dostupno na http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases/pharmacological-treatment-of-acute-ischemic-stroke.

Miller, L. G., Roy, R. B., Weill, C. L. (1989). Chronic clonazepam administration decreases γ-aminobutryic $acid_A$ receptor function in cultured cortical neurons. *Molecular Pharmacology, 36*(5), 796–802.

Miller, C. S., Grandi, S. M., Shimony, A., Filion, K. B., Eisenberg, M. J. (2012). Meta-Analysis of Efficacy and Safety of New Oral Anticoagulants (Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban) Versus Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation. *The American Journal of Cardiology, 110*(3), 453-460.

Morrow, A., Montpied, P., Lingford-Hughes, A., Paul, S. M. (1990). Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: Effects on $GABA_A$ receptor function and expression in brain. *Alcohol, 7*(3), 237-244.

Muller, C., Hennebert, O., Morfin, R. (2006). The native anti-glucocorticoid paradigm. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 100*(1-3), 95-105.

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

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

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

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

Olsen, R. W., Tobin, A. J. (1990). Molecular biology of $GABA_A$ receptors. *FASEB Journal*, *4*(5), 1469-1480.

Orentreich, N., Brind, J.L., Vogelman, J.H., Andres, R., Baldwin, H. (1992). Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 75*(4), 1002-1004.

Parise, P., Iorio, A., Hauert, J., Agnelli, G. (1995). Streptokinase and rt-PA activate platelets by a different way: Implications on the rethrombosis rate after their administration in myocardial infarction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 125*(2), 212-221.

Park, K. W., Crouse, D., Lee, M., Karnik, S. K., Sorensen, L. K., Murphy, K. J., Kuo, C. J., Li, D. Y. (2004). The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(46), 16210-16215.

Park, S. W., Kim, M., Brown, K. M., D'Agati, V. D., Lee, H. T. (2011). Paneth cell–derived IL-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*, *53*(3), 1662–1675.

Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R. H., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1999). Sulfated and unsulfated steroids modulate γ-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Research, 830*(1), 72-87.

Parker, L., Odell, W. (1980). Control of Adrenal Androgen Secretion. *Endocrine Reviews, 1*(4), 392-410.

Pérez-Neri, I., Montes, S., Ojeda-López, C., Ramírez-Bermúdez, J., Ríos, C. (2008). Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: Mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 32*(5), 1118-1130.

Peričić, D., Jazvinšćak, M., Mirković, K. (2001). [^{3}H] Flunitrazepam binding to recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ $GABA_A$ receptors stably expressed in HEK 293 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 55*(4), 221-228.

Peričić, D., Štrac, D. Š., Jembrek, M. J., Rajčan, I. (2003). Prolonged exposure to γ-aminobutyric acid up-regulates stably expressed recombinant α1β2γ2s $GABA_A$ receptors. *European Journal of Pharmacology, 482*(1-3), 117-125.

Querido, E., Marcellus, R. C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J. G., Ketner, G. Branton, P. E. (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *Journal of Virology*, *71*(5), 3788–3798.

Ridder, D., Schwaninger, M. (2009). NF-κB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience, 158*(3), 995-1006.

Ruscher, K., Rzeczinski, S., Thein, E., Freyer, D., Victorov, I. V., Lam, T. T., Dirnagl, U. (2007). Neuroprotective effects of the beta-carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. *Neuropharmacology, 52*(7), 1488-1495.

Schäcke, H., Döcke, W. D., Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology Therapeutics, 96*(1), 23-43.

Schäbitz, W., Schwab, S., Spranger, M., Hacke, W. (1997). Intraventricular Brain-Derived Neurotrophic Factor Size After Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism, 17*(5), 500-506.

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

Schonemann, M., Muench, M., Tee, M., Miller, W., Mellon, S. (2012). Expression of P450c17 in the Human Fetal Nervous System. *Endocrinology, 153*(5), 2494-2505.

Seliktar, D. (2012). Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. *Science, 336*(6085), 1124-1128.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB Journal, 16*(8), 869–871.

Shen, J.,Qiu, X., Jiang, B., Zhang, D., Xin W., Fung, P. C., Zhao, B. (2003). Nitric oxide and oxygen radicals induced apoptosis via bcl-2 and p53 pathway in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Science in China Series C, 46*(1), 28-39.

Shi, H., Liu, K. J. (2006). Effects of glucose concentration on redox status in rat primary cortical neurons under hypoxia. *Neuroscience Letters, 410*(1), 57-61.

Shimada, M., Yoshinari, K., Tanabe, E., Shimakawa, E., Kobashi, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2001). Identification of ST2A1 as a rat brain neurosteroid sulfotransferase mRNA. *Brain Research, 920*(1-2), 222-225.

Siriussawakul, A., Chen, L. I., Lang, J. D. (2012). Medical Gases: A Novel Strategy for Attenuating Ischemia - Reperfusion Injury in Organ Transplantation? *Journal of Transplantation, 2012*, 819382.

Smith, S. S., Shen, H., Gong, Q. H., Zhou, X. (2007). Neurosteroid regulation of GABAA receptors: Focus on the α4 and δ subunits. *Pharmacology Therapeutics, 116*(1), 58-76.

Sousa, A., Ticku, M. K. (1997). Interactions of the Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Sulfate with the $GABA_A$ Receptor Complex Reveals that it May Act *via* the Picrotoxin Site. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 282*(2), 827-833.

Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology Mammalian Cell Viability, 740*, 1-6.

Stoppini, L., Buchs, P., Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods, 37*(2), 173-182.

Strous, R.D., Maayan, R., Lapidus, R., Stryjer, R., Lustig, M., Kotler, M., Weizman, A. (2003). Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxietysymptoms in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *60*(2), 133–141.

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

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

Štrac, D. Š., Vlainić, J., Jembrek, M. J., Peričić, D. (2008). Differential effects of diazepam treatment and withdrawal on recombinant $GABA_A$ receptor expression and functional coupling. *Brain Research, 1246*, 29-40.

Tamagno, E., Guglielmotto, M., Bardini, P., Santoro, G., Davit, A., Simone, D. D., Dani, O., Tabaton, M. (2003). Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT2 neurons exposed to oxidative stress. *Neurobiology of Disease, 14*(2), 291-301.

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

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke Study Group. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine, 333*(24), 1581-1587.

Tijssen, J. G. (1998). Low-dose and high-dose acetylsalicyclic acid, with and without dipyridamole: A review of clinical trial results. *Neurology, 51*(3 Suppl 3), S15-S16.

Toda, H., Takahashi, J., Iwakami, N., Kimura, T., Hoki, S., Mozumi-Kitamura, K., Ono, S., Hashimoto, N. (2001). Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neuroscience Letters, 316*(1), 9-12.

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

Veiga, S., Garcia-Segura, L. M., Azcoitia, I. (2003). Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *Journal of Neurobiology, 56*(4), 398-406.

Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., Chopp, M. (2004). Treatment of Stroke With Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke, 35*(7), 1732-1737.

Wang, J., Yang, W., Xie, H., Song, Y., Li, Y., Wang, L. (2014). Ischemic stroke and repair: Current trends in research and tissue engineering treatments. *Regenerative Medicine Research, 2*(1), 3.

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

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

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

Venketasubramanian, N., Chan, B. P. L., Chang, H. M., Chua, H. C., Gan, R. N., Hui, F., Lee, W., Ng, I., Sharma, V. K., Singh, R., Teoh, H. L., Wang, E., Chen, C. L. H. (2011). Brain attack: needing resuscitation. *Singapore Medical Journal, 52*(8), 620-630.

Yadid, G., Sudai, E., Maayan, R., Gispan, I., Weizman, A. (2010). The role of dehydroepiandrosterone (DHEA) in drug-seeking behavior. *Neuroscience Biobehavioral Reviews, 35*(2), 303-314.

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

Young Shin, C., Choi, J., Jang, E. S., Ju, C., Kim, W., Kim, H., Choi, C. R., Ko, K. H. (2001). Dehydroepiandrosterone inhibits the death of immunostimulated rat C6 glioma cells deprived of glucose. *Brain Research, 922*(2), 267-275.

Yu, R., Ticku, M. K. (1995). Chronic neurosteroid treatment produces functional heterologous uncoupling at the gamma-aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptor complex in mammalian cortical neurons. *Molecular Pharmacology, 47*(3), 603–610.

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

Yu, F., Morshead, C. M. (2011). Adult Stem Cells and Bioengineering Strategies for the Treatment of Cerebral Ischemic Stroke. *Current Stem Cell Research & Therapy, 6*(3), 190-207.

Zhang, L., Li, B. S., Ma, W., Barker, J. L., Chang, Y. H., Zhao, W., Rubinow, D. R. (2002). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Molecular Brain Research, 98*(1-2), 58-66.

Zhang, D., Wood, C. E. (2005). Neuronal prostaglandin endoperoxide synthase 2 responses to oxygen and glucose deprivation are mediated by mitogen-activated protein kinase ERK1/2. *Brain Research, 1060*(1-2), 100-107.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DHEA_sulfate#section=Top

http://www.benbest.com/nutrceut/DHEA.html

http://www.webmd.com/stroke/ischemic-versus-hemorrhagic-stroke

8. Životopis

Rođena sam 16. siječnja 1992. u Splitu. Osnovnu školu završila sam u Hvaru, a Prirodoslovno-matematičku gimnaziju pohađala sam u Splitu. 2010. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije u Zagrebu gdje sam nastavila i diplomski studij. Tijekom studiranja sudjelovala sam u Noći biologije i prisustvovala 1. Hrvatskom simpoziju biologa u zdravstvu. Diplomski rad sam započela 2015. godine na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob-Štrac.

Vrlo dobro se služim engleskim jezikom u govoru i pisanju, dok talijanski poznajem na srednjoj, a njemački na bazičnoj razini. Kako svako ljeto uključuje komunikaciju s turistima (rad na recepciji, u kazalištu,..), komunikativna sam i imam iskustva u radu s ljudima. U slobodno vrijeme intenzivno se bavim tajlandskim boksom.