

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Danijela B. Bataveljić

**NEUROINFLAMATORNI PROCESI  
MOZGA U AMIOTROFIČNOJ  
LATERALNOJ SKLEROZI: STUDIJA NA  
MODELU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Danijela B. Bataveljić

**NEUROINFLAMMATORY PROCESSES  
IN THE AMYOTROPHIC LATERAL  
SCLEROSIS BRAIN: STUDY OF  
hSOD1<sup>G93A</sup> RAT MODEL**

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2012

**Mentor:**

dr Pavle Anđus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

dr Goran Bačić, redovni profesor Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

dr Biljana Božić, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Zorica Stević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Eksperimentalna istraživanja ove doktorske disertacije su urađena u Centru za lasersku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenju za neurofiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, Centru za molekularnu biologiju i neuronauke Univerziteta u Oslu i "Bio Imaging" laboratoriji Univerziteta u Antverpenu.*

*Zahvaljujem se:*

*mentoru, dr Pavlu Anđusu na ukazanom poverenju i pruženim prilikama za stručno usavršavanje*

*dr Goranu Bačiću na stručnoj pomoći i sugestijama u primeni MRI metode*

*dr Biljani Božić i dr Zorici Stević na ukazanoj pomoći i sugestijama*

*dr Jasni Šaponjić na ukazanoj pomoći u pripremi moždanog tkiva za elektronsku mikroskopiju*

*Ljiljani Nikolić na pomoći u izvođenju elektrofizioloških eksperimenata i na neiscrpnoj upornosti i podršci*

*dr Predragu Vujoviću i dr Nebojši Jasniću na pomoći u izvođenju Western blot eksperimenata*

NEUROINFLAMATORNI PROCESI MOZGA U AMIOTROFIČNOJ LATERALNOJ  
SKLEROZI: STUDIJA NA MODELU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA

## REZIME

---

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativno oboljenje koje pogađa motorne neurone u kičmenoj moždini i višim moždanim centrima. Bolest karakteriše vrlo brza progresija i kratak životni vek od pojave simptoma. Predloženo je više mehanizama koji opisuju patogenezu bolesti, ali je uzrok ALS i dalje nepoznat. Cilj ove studije je da okarakteriše promene u višim moždanim centrima u modelu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova i pokuša da dodatno razjasni mehanizme bolesti.

Primenom tehnike magnetno-rezonantnog oslikavanja lokalizovana su neurodegenerativna žarišta u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Istom metodom je *in vivo* praćena infiltracija T-limfocita pomoću posebno dizajniranih antitela obeleženih ultra malim paramagnetnim partikulama gvožđe oksida. Pokazano je da se CD4<sup>+</sup> T-limfociti infiltriraju u tkivo oko moždanih komora, a CD8<sup>+</sup> T-limfociti u moždano stablo hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Praćenje stanja krvno-moždane barijere pomoću Gd-DTPA kontrastnog agensa je ukazalo na njenu narušenost u moždanim regionima gde je uočena infiltracija T-ćelija.

Prisustvo aktivirane mikroglije i reaktivnih astrocita je uočeno u moždanom stablu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Pored toga, reaktivna mikroglija je uočena u moždanom tkivu oko lateralnih komora i hipokampusu. Nastavci aktivirane mikroglije ostvaruju kontakt sa telom neurona što ukazuje na mogućnost njihove interakcije.

Primenom *Western blot* metode je pokazano da je ekspresija akvaporina-4 (AQP4) povećana, a ulaznog kalijumovog ispravljača (Kir4.1) smanjena u moždanom stablu i moždanoj kori hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Imunohistohemija na zamrznutim moždanim presećima je pokazala povećanu AQP4 i smanjenu Kir4.1 imunoreaktivnost u *nc. facialis*, *nc. trigeminus* i motornoj kori hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Kada su ispitivani kortikalni astrociti u kulturi, uočena je povećana AQP4 i smanjena Kir4.1 imunoreaktivnost u ALS. Proučavanje funkcionalnih osobina Kir kanala je ukazalo na smanjenu gustinu struja i smanjenu specifičnu membransku provodljivost u ALS astrocitima u kulturi. Pored toga, blokiranje ovih struja dodavanjem 1 mM CsCl ili 100 μM BaCl<sub>2</sub> u vanćelijski

rastvor je pokazalo da su  $\text{Cs}^+$ -senzitivne odnosno  $\text{Ba}^{2+}$ -senzitivne struje značajno manje u ALS astrocitima.

U ovoj studiji su lokalizovana žarišta neurodegenerativnih i neuroinflamatornih promena u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova, uočeno je oštećenje krvno-moždane barijere, a posebno su istaknute promene u ekspresiji i funkciji astrocitnih proteina koji doprinose stabilnosti krvno-moždane barijere. Dobijeni podaci su pružili dodatna objašnjenja koja doprinose razumevanju mehanizama ALS.

*Ključne reči: amiotrofična lateralna skleroza, neuroinflamacija, krvno-moždana barijera, akvaporin-4, ulazni kalijumski ispravljač*

*Naučna oblast: Neuronauke*

*Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom*

*UDK broj: 612.82 : 616-002.2] : 599.323.4 : [616.8-003.8+616.8-009.11] (043.3)*

NEUROINFLAMMATORY PROCESSES IN THE AMYOTROPHIC LATERAL  
SCLEROSIS BRAIN: STUDY OF hSOD1<sup>G93A</sup> RAT MODEL

## ABSTRACT

---

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder affecting lower and upper motor neurons. The disease shows fast progression and short lifetime following the disease onset. Several mechanisms contributing to ALS pathogenesis have been proposed, but the cause of disease remains unclear. The aim of this study was to characterize changes in the upper CNS regions of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat model and to try to clarify disease mechanisms.

Foci of neurodegeneration and neuroinflammation were localized in the brain of hSOD1<sup>G93A</sup> rat using magnetic resonance imaging. The same method was applied for *in vivo* monitoring of T-lymphocytes infiltration using specifically designed antibodies conjugated with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles. It was shown that CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes were infiltrated into the brain tissue around lateral ventricles while CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes were infiltrated into the brainstem of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat. Using Gd-DTPA contrast, it has been shown that the blood-brain barrier was compromised in the brain regions invaded with T-cells.

Activated microglia and reactive astrocytes were observed in the brainstem of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat. In addition, reactive microglia was shown in the brain tissue around lateral ventricles and in the hippocampus. Processes of activated microglia were in contact with neuronal somata indicating possible interaction.

Western blot results showed increased aquaporin-4 (AQP4) and reduced inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1) expression in the brainstem and cortex of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat. Immunohistochemistry on the frozen brain slices showed increased AQP4 and decreased Ki4.1 immunoreactivity in the *nc. facialis*, *nc. trigeminus* and motor cortex of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat. Increased AQP4 and decreased Kir4.1 immunoreactivity were retained in cortical ALS astrocytes in culture. Examination of the functional properties of Kir channels revealed a decreased current density and diminished specific membrane conductance in ALS astrocytes in culture.

Addition of 1 mM CsCl or 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub> to the extracellular solution revealed significantly lower Cs<sup>+</sup>-sensitive and Ba<sup>2+</sup>-sensitive Kir currents in ALS.

In this study we localized and characterized neurodegenerative and neuroinflammatory changes in the brain of hSOD1<sup>G93A</sup> rat, confirmed the blood-brain barrier compromise and observed changes in the astrocytic proteins involved in the maintenance of the blood-brain barrier. Obtained data may contribute to further understanding of the mechanisms underlying ALS pathology.

*Key words: amyotrophic lateral sclerosis, neuroinflammation, blood-brain barrier, aquaporin-4, inwardly rectifying potassium channel*

*Scientific field: Neuroscience*

*Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics*

*UDC number: 612.82 : 616-002.2] : 599.323.4 : [616.8-003.8+616.8-009.11] (043.3)*



# SADRŽAJ

## **REZIME**

---

## **ABSTRACT**

---

<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA</b>	<b>1</b>
Genetički faktori	1
Mehanizmi ALS	3
<i>Oksidativni stres</i>	3
<i>Ekscitotoksičnost</i>	4
<i>Mehanizmi nezavisni od tipa ćelija</i>	7
<b>IMUNSKI ODGOVOR</b>	<b>8</b>
<b>INFLAMACIJA</b>	<b>9</b>
<b>NEUROINFLAMACIJA</b>	<b>11</b>
Uloga mikroglije u neuroinflamaciji	11
Uloga astrocita u neuroinflamaciji	12
Uloga T-ćelija u neuroinflamaciji	13
<b>NEUROINFLAMACIJA I ALS</b>	<b>15</b>
Uloga astrocita u ALS	15
Uloga mikroglije u ALS	16
Uloga T-ćelija u ALS	17
<b>KRVNO-MOŽDANA BARIJERA I NEUROINFLAMACIJA</b>	<b>18</b>
<b>ULOGA ASTROCITA U REGULACIJI AKTIVNOSTI NEURONA</b>	<b>22</b>
Struktura i funkcija AQP4	23
Struktura i funkcija Kir4.1	26
Interakcija AQP4 i Kir4.1	27

<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>29</b>
<b>MATERIJALI I METODE</b>	<b>31</b>
EKSPERIMENTALNI MODEL ALS	31
STANDARDNA PCR METODA ZA GENOTIPIZACIJU PACOVA	33
MRI SNIMANJE PACOVA	34
WESTERN BLOT	36
Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva	36
Određivanje koncentracije proteina	37
Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	37
Prenos proteina sa gela na membranu	39
Imunodetekcija proteina	39
IMUNOFLUORESCENCIJA	40
Priprema moždanog tkiva	40
Fluorescentno obeležavanje moždanih preseka	41
Imunocitohemija	43
Konfokalna mikroskopija	43
OBELEŽAVANJE MOŽDANIH PRESEKA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU	44
Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju	44
Obeležavanje preseka antitelima sa partikulama zlata	45
TEHNIKA NAMETNUTE VOLTAŽE NA DELIĆU MEMBRANE	45
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	47
<b>REZULTATI</b>	<b>48</b>
GENOTIPIZACIJA EKSPERIMENTALNIH PACOVA	48
NEURODEGENERATIVNE LEZIJE U MOZGU ALS PACOVA UOČENE MRI METODOM	48
OŠTEĆENJE HEB U MOZGU ALS PACOVA	51
INFILTRACIJA CD4 <sup>+</sup> I CD8 <sup>+</sup> T LIMFOCITA U MOŽDANO TKIVO ALS PACOVA	51
AKTIVIRANA MIKROGLIJA U MOZGU ALS PACOVA	53

EKSPRESIJA I DISTRIBUCIJA AQP4 U MOZGU ALS PACOVA	55
EKSPRESIJA KIR4.1 U MOZGU ALS PACOVA	60
EKSPRESIJA AQP4 I KIR4.1 U ALS KORTIKALNIM ASTROCITIMA U KULTURI	63
KARAKTERIZACIJA KIR STRUJA U KORTIKALNIM ASTROCITIMA U KULTURI	64
<b><u>DISKUSIJA</u></b>	<b>70</b>
NEURODEGENERATIVNA ŽARIŠTA U MOZGU hSOD1 <sup>G93A</sup> PACOVA	70
NEUROINFLAMATORNA ŽARIŠTA U MOZGU hSOD1 <sup>G93A</sup> PACOVA	71
OŠTEĆENJE KRVNO-MOŽDANE BARIJERE U ALS	72
AKTIVACIJA MIKROGLIJE I ASTROCITA U MOZGU hSOD1 <sup>G93A</sup> PACOVA	73
PROMENA U EKSPRESIJI I DISTRIBUCIJI AQP4 U MOZGU hSOD1 <sup>G93A</sup> PACOVA	74
PROMENA U EKSPRESIJI KIR4.1 U MOZGU hSOD1 <sup>G93A</sup> PACOVA	76
FUNKCIONALNA SVOJSTVA KIR KANALA U ALS ASTROCITIMA	77
FUNKCIONALNA INTERAKCIJA AQP4 I KIR4.1	78
INTERAKCIJA AQP4 I KIR4.1 SA GLUTAMATNIM TRANSPORTEROM	78
PRETPOSTAVLJENI MEHANIZMI NASTANKA ALS	80
ZNAČAJ RADA ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA	81
<b><u>ZAKLJUČCI</u></b>	<b>83</b>
<b><u>LITERATURA</u></b>	<b>85</b>
<b><u>BIOGRAFIJA</u></b>	<b>118</b>

# UVOD

---

## AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest koju karakterišu gubitak funkcije i smrt motornih neurona. Bolest je prvi opisao francuski neurobiolog i lekar *Jean-Martin Charcot* (Charcot and Joffroy, 1869). Učestalost pojave bolesti u Evropi je 2,16 obolelih osoba na 100000 ljudi pri čemu je veća verovatnoća oboljevanja muškaraca od žena (Logroscino et al., 2010). Na svetskom nivou, broj obolelih osoba je 2,5 na 100000 ljudi godišnje (Cozzolino and Carri, 2012). Postoje dva oblika bolesti. Najučestalija forma ALS je sporadična (sALS) koja se javlja u 90-95% slučajeva i ne uključuje genetičku komponentu. Preostalih 5-10% slučajeva se karakteriše dominantnim nasleđivanjem bolesti koja se tako naziva familijalna (fALS). Približno 20% fALS je vezano za dominantno autozomalno nasleđivanje mutantne forme Cu/Zn superoksid dismutaze 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993).

Obe forme bolesti se karakterišu progresivnim slabljenjem i atrofijom mišića koji su posledica degeneracije i smrti gornjih i donjih motornih neurona u mozgu i kičmenoj moždini. Bolest je često praćena gubitkom težine i otežanim funkcijama govora, žvakanja i gutanja. Narušavanje funkcije respiratornih mišića ima smrtonosan ishod za pacijenta. Oko 50% pacijenata umire tokom 30 meseci od pojave simptoma, dok 20% živi 5-10 godina od pojave simptoma (Talbot, 2009).

Iako je ALS intenzivno istraživana bolest, uzrok smrti motornih neurona je i dalje nepoznat. Otkriće mutiranih formi različitih proteina u ALS je ukazalo na značaj genetičke komponente u pojavi simptoma bolesti. Postoji veliki broj predloženih mehanizama koji su uključeni u progresiju bolesti među kojima su najintenzivnije ispitavani: oksidativni stres, ekscitotoksičnost i mehanizmi nezavisni od tipa ćelija. Šematski prikaz pretpostavljenih mehanizama koji vode ALS je predstavljen na **Slici 1**.

### Genetički faktori

Mutirane forme SOD1 (mSOD1) su najčešće zastupljene u naslednom obliku ALS i čine 20% fALS i 2% sALS slučajeva. Rosen et al. (1993) je prvi identifikovao

mutacije u genu za SOD1 kod ALS pacijenata, a do danas je identifikovano oko 150 različitih mutacija (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>). U najvećem broju slučajeva mutacije su tačkaste i dominantno se nasleđuju. Jedini izuzetak je mutacija zamene aspartata alaninom na poziciji 90 (D90A) koja se nasleđuje recesivno (Andersen et al., 1995, 1996). Ispitivanja su pokazala da iako je prisutna mutacija u genu za SOD1, aktivnost enzima je očuvana, a često i povećana u ALS (Borchelt et al., 1994; Gurney et al., 1994). Pored toga, početak i progresija bolesti nisu zavisili od stepena aktivnosti SOD1 (Bowling et al., 1995; Cleveland et al., 1995). Uklanjanje gena za SOD1 nije dovelo do pojave simptoma bolesti kod miševa što je ukazalo da štetna svojstva mSOD1 nisu posledica gubitka izvorne antioksidativne funkcije enzima, već da enzim dobija novu, toksičnu funkciju (Reaume et al., 1996).

Nedavno su identifikovane mutacije u TARDBP genu koji kodira TAR-DNK vezujući protein TDP-43 (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008) i FUS genu koji kodira protein za obradu RNK (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009) i obe vode simptomima ALS. Mutacije u TARDBP se pojavljuju u 5-10%, dok mutacije u FUS genu su zastupljene u 5% slučajeva fALS.

Otkrića mutacija koje vode ALS su doprinela generisanju velikog broja transgenih linija eksperimentalnih životinja koje pokazuju simptome slične ALS i od velikog su značaja za ispitivanje patoloških mehanizama ove bolesti. Prvi ALS model miša je nosio mutaciju zamene glicina alaninom na poziciji 93 (G93A) u SOD1 što je dovelo do odumiranja motornih neurona (Gurney et al., 1994). Najviše su ispitivani miševi i pacovi koji ekspimiraju mutirane forme ljudske SOD1 (hSOD1) i pokazuju progresivnu degeneraciju motornih neurona (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002; Nagai et al., 2001). Transgeni miševi i pacovi koji prekomerno ekspimiraju mSOD1 pokazuju simptome ALS, dok oni koji prekomerno ekspimiraju SOD1 divljeg soja ne pokazuju simptome bolesti. Kod životinjskih modela gen za mSOD1 mora biti prisutan u velikom broju kopija, a stepen njegove ekspresije mora dostići kritičnu vrednost kada enzim ispoljava svoju toksičnu funkciju i dovodi do odumiranja motornih neurona (Dal Canto and Gurney, 1997).

Na mišjim modelima ALS uočeno je prisustvo citoplazmatičnih inkluzija u motornim neuronima i okolnim astrocitima što je vodilo pretpostavci o toksičnom efektu ovih inkluzija (Bruijn et al., 1998). Karakteristika proteinskih agregacija u ALS

jeste njihovo prisustvo u oštećenim regionima centralnog nervnog sistema (CNS) i izražena imunoreaktivnost na ubikvitin kako u modelima miša i pacova (Bruijn et al., 1998; Howland et al., 2002) tako i u tkivu sALS i fALS pacijenata (Leigh et al., 1991; Mather et al., 1993). U različitim životinjskim modelima ALS koji eksprimiraju mSOD1, proteinske agregacije pokazuju imunoreaktivnost i na SOD1 antitelo (Bruijn et al., 1998; Howland et al., 2002). Ispitivanja TDP-43 modela ALS su pokazala da su proteinske agregacije pozitivne na TDP-43 (Neumann et al., 2006). Proteinske agregacije u ALS se uočavaju pre kliničke slike simptoma bolesti, često predstavljaju prvi znak bolesti i njihova količina raste sa progresijom bolesti.

## **Mehanizmi ALS**

### **Oksidativni stres**

Mozak odlikuje najveća produkcija slobodnih radikala u organizmu. Superoksid dismutaza 1 je citosolni enzim koji katalizuje pretvaranje superoksidnog radikala, koji je toksični sporedni proizvod mitohondrijalne oksidativne fosforilacije, u kiseonik i vodonik peroksid. Vodonik peroksid biva dalje pretvoren u vodu posredstvom glutathion peroksidaze, ili u hidroksilni radikal posredstvom katalaze u Fentonovoj reakciji (Fenton, 1894). Poznato je da mutacije u genu za SOD1 vode simptomima ALS. Smatra se da je osnovna uloga enzima očuvana, ali da dobija i dodatnu toksičnu funkciju (Reaume et al., 1996). Da bi se utvrdio uzrok neurodegeneracije u ALS, veliki deo istraživanja je usmeren ka izučavanju mehanizama koji bi opisali akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*; ROS) i njima izazvana oštećenja membranskih proteina i lipida.

Studije na *post mortem* tkivu ALS pacijenata su utvrdile porast markera oksidativnog stresa (Baillet et al., 2010; Pedersen et al., 1998). Povećan nivo oštećenja lipida, proteina i DNK u motornoj kori je uočen kod fALS i sALS pacijenata (Ferrante et al., 1997). Uočene promene na pacijentima su potvrđene i na intenzivno ispitivanim životinjskim modelima ALS. Eksperimenti na ALS modelu miša su pokazali da je povećanje lipidne peroksidacije posebno izraženo u mozgu, ali je uočljivo i u skeletnim mišićima i jetri (Miana-Mena et al., 2011). Nivo oksidativnog oštećenja proteina je bio

višestruko povećan u kičmenoj moždini simptomatičnog ALS miša u poređenju sa kontrolnim miševima odgovarajućeg uzrasta (Andrus et al., 1998). Na istom transgenom modelu je pokazana povećana produkcija hidroksilnog i kiseoničnog radikala (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1998). Treba istaći da je nivo uočenih promena u produkciji markera oksidativnog stresa rastao sa progresijom bolesti (Hall et al., 1998a). Mitohondrije imaju značajnu ulogu u ćelijskom oksidativnom metabolizmu i smatraju se glavnim izvorom slobodnih radikala. Prvi put su morfološke promene na nivou mitohondrija uočene kod ALS pacijenata u skeletnim mišićima (Afifi et al., 1966). Utvrđeno je da je oštećenje mitohondrija rani znak bolesti koji prethodi gubitku motornih neurona (Kong and Xu, 1998). Narušavanje procesa oksidativne fosforilacije i funkcije elektronskog transportnog lanca je uočeno u mitohondrijama transgenog miša koji pokazuje simptome ALS (Jung et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002). Pored toga, uočeno je oticanje mitohondrija usled povećane propustljivosti za male molekule i vodu (Lemasters et al., 1998). Moguća posledica ovih oštećenja jeste oslobađanje citohroma C iz mitohondrijalnog međućelijskog prostora u citoplazmu neurona (Buki et al., 2000) što može voditi aktivacija kaspaza i apoptozi (Liu et al., 1996).

### **Ekscitotoksičnost**

Glutamat je ekscitatorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu. Približno 20% ukupnog glutamata se skladišti u presinaptičkim nervnim završecima (Heath and Shaw, 2002). Pri neurotransmisiji, glutamat se oslobađa iz presinaptičkih nervnih završetaka, difunduje kroz sinaptičku pukotinu do glutamatnih receptora na postsinaptičkoj membrani koji mogu biti: jonotropni: N-metil-D-aspartat (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionične kiseline (AMPA) i kainatni i 2) metabotropni: mGluRx (Heath and Shaw, 2002). Glutamat se uklanja iz sinaptičke pukotine  $\text{Na}^+$ -zavisnim glutamatnim transporterom koji se naziva transporter ekscitatornih amino kiselina-2 (EAAT2) kod ljudi, odnosno glutamatni transporter-1 (GLT-1) kod glodara. Preuzimanje viška glutamata je praćeno ulaskom tri jona  $\text{Na}^+$ , a izlaskom jednog jona  $\text{K}^+$  (Barbour et al., 1988). Ovi transporteri su prisutni na astrocitnim stopalima, okružuju sinapse motornih neurona (Foran and Trotti, 2009) i

zaduženi su za uklanjanje do 94% glutamata iz sinaptičke pukotine (Tanaka et al., 1997).

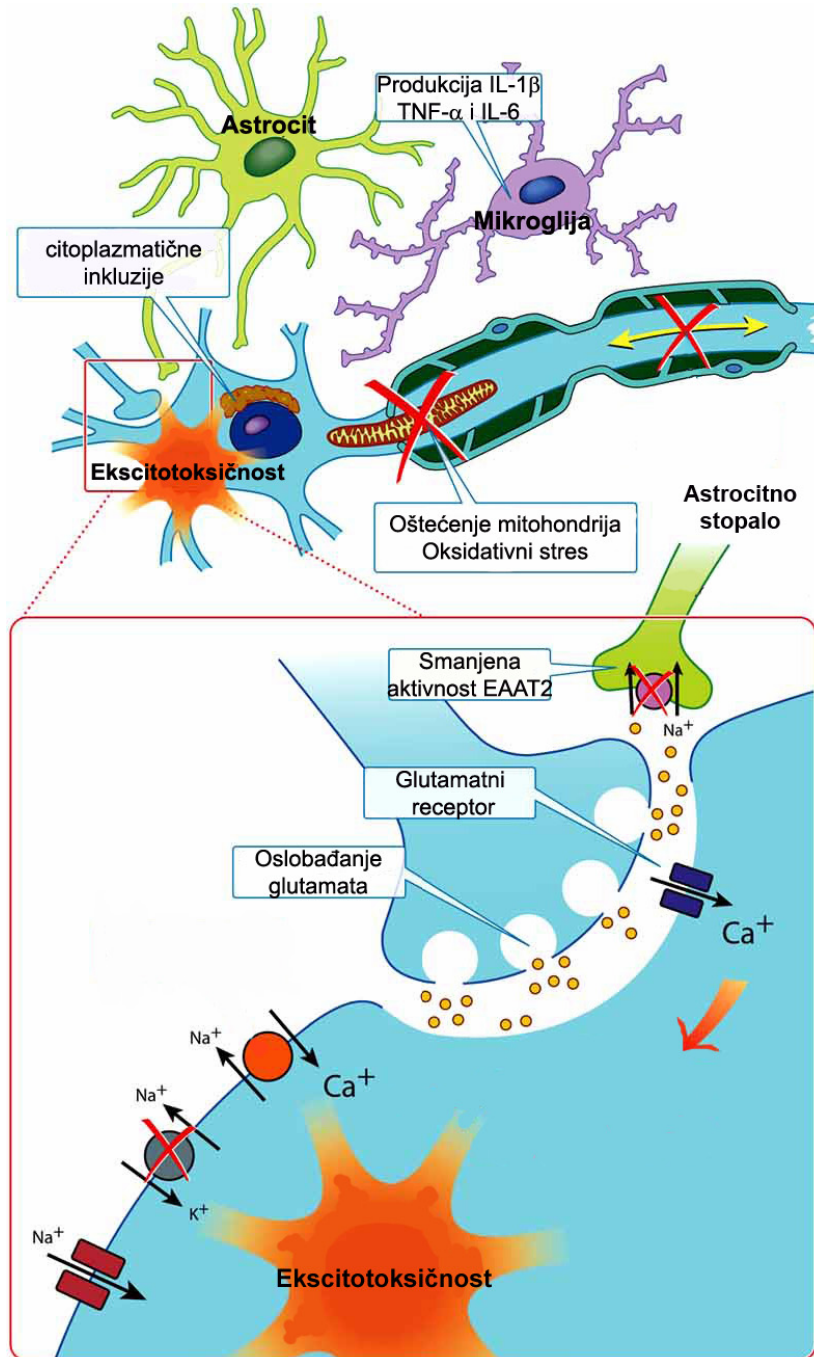
Glutamatna ekscitotoksičnost nastaje ukoliko izostane efikasno uklanjanje glutamata iz sinaptičke pukotine što vodi prekomernoj aktivaciji glutamatnih receptora, povećanom ulasku  $\text{Ca}^{2+}$  u motorne neurone i ćelijskoj smrti kao krajnjem ishodu (**Slika 1**). Glutatom izazvana ekscitotoksičnost može voditi nastajanju slobonih radikala i na taj način uzrokovati neurodegeneraciju (Maher and Davis, 1996). U prilog poremećenom glutamatnom metabolizmu su išla otkrića povećanog nivoa ekstraćelijskog glutamata u cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) ALS pacijenata (Rothstein et al., 1990, 1991). Pored toga, uočeno je da porast nivoa glutamata prati početak i progresiju bolesti (Spreux-Varoquaux et al., 2002). Ispitivanje sinaptozoma iz *post mortem* kičmene moždine i motornog korteksa ALS pacijenata je pokazalo smanjenje glutamatnog transporta (Rothstein et al., 1992). Gubitak EAAT2/GLT-1 transportera može voditi povećanju glutamata do ekscitotoksičnog nivoa i ubrzati progresiju bolesti (Guo et al., 2003; Rothstein et al., 2005). Naime, Rothstein et al. (1995) je pokazao smanjen nivo EAAT2 u kičmenoj moždini i motornom korteksu ALS pacijenata. Redukovan nivo GLT-1 je uočen u  $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$  modelu miša (Bendotti et al., 2001) i pacova (Howland et al., 2002). Međutim, ispitivanje genske ekspresije glutamatnog transportera je pokazalo nepromenjen nivo informacione RNK (Bristol and Rothstein, 1996). Pretpostavlja se da je gubitak proteina EAAT2/GLT-1 posledica pogrešnog iskrajanja RNK (Lin et al., 1998).

Jedini do sada priznati lek u terapiji ALS je riluzol. Pokazano je da riluzol usporava progresiju bolesti i sprečava neurodegeneraciju (Estevez et al., 1995; Koh et al., 1999), ali mehanizam njegovog delovanja nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da riluzol moduliše ekscitatornu neurotransmisiju delujući kao antagonist glutamatnih receptora (Debono et al., 1993; Lamanauskas et al., 2008) ili smanjujući koncentraciju glutamata u sinaptičkoj pukotini tako što povećava afinitet GLT-1 transportera za glutamat (Fumagalli et al., 2008).

Još jedan od mehanizama koji doprinose ekscitotoksičnosti u ALS uključuje GluR2 subjedinicu AMPA receptora koja reguliše propustljivost ovog receptora za  $\text{Ca}^{2+}$ . Poznato je da zdravi astrociti regulišu ekspresiju GluR2 subjedinice AMPA receptora u motornim neuronima. Istraživanja su pokazala da ukoliko astrociti



ekspimiraju mSOD1, GluR2 subjedinica gubi svoje regulatorno svojstvo što vodi nekontrolisanom prolasku  $\text{Ca}^{2+}$  i povećanoj ekscitotoksičnosti za motorne neurone (Van Damme et al., 2007).



**Slika 1.** Pretpostavljeni mahanizmi koji vode patogenezi ALS. Kao mogući uzrok ALS razmatraju se prisustvo citoplazmatičnih inkluzija, oštećenje mitohondrija, oksidativni stres, oštećen aksonalni transport, aktivacija astrocita i mikroglije koji oslobađaju različite inflamatorne faktore i ekscitotoksičnost. Usled smanjene aktivnosti glutamatnog transportera EAAT2 dolazi do nagomilavanja glutamata u sinaptičkoj pukotini, prekomerne aktivacije glutamatnih receptora i ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliju što aktivira mehanizme ćelijske smrti. Modifikovano iz Cheah et al. (2010).

## **Mehanizmi nezavisni od tipa ćelija**

Jedan od pretpostavljenih mehanizama ALS podrazumeva ćelijski zavisne mehanizme, odnosno da se toksičnost ispoljava isključivo na nivou motornih neurona. Prvi pokušaji da se mSOD1 eksprimira samo u motornim neuronima nisu doveli do pojave simptoma bolesti (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). Kasnija studija je pokazala da je ekspresija mSOD1 u neuronima dovoljna da dovede do pojave simptoma ALS (Jaarsma et al., 2008). Međutim, ove životinje su pokazivale simptome u kasnom uzrastu, progresija bolesti je bila znatno usporena i nisu dostizale potpunu paralizu ekstremiteta. Proučavanje himeričnih miševa je pokazalo da ukoliko ne-neuronalne ćelije divljeg soja okružuju motorne neurone koji ekspimiraju mSOD1, životni vek obolelih miševa će biti produžen (Clement et al., 2003). Kasnija ispitivanja na himeričnim miševima koji ekspimiraju mSOD1 u motornim neuronima i oligodendrocitima je pokazala da prisustvo ne-neuronalnih ćelija divljeg soja odlaže i početak bolesti (Yamanaka et al., 2008b). Ova istraživanja su istakla značaj ne-neuronalnih ćelija kako u otpočinjanju, tako i u progresiji bolesti. Dalja ispitivanja su imala za cilj da razjasne koji tip ćelija doprinosi oštećenju motornih neurona.

Ekspresija mSOD1 u mikroglijalnim ćelijama nije dovela do pojave simptoma bolesti kod miševa (Beers et al., 2006). U istoj studiji je pokazano da ukoliko se mikroglija koja eksprimira mSOD1 zameni mikroglijom divljeg soja u miševima koji razvijaju simptome ALS, početak bolesti nije promenjen, ali je usporena progresija bolesti. Pored toga, smanjenje nivoa mSOD1 u mikrogliji nije uticalo na ranu fazu bolesti, ali je znatno usporavalo kasnije faze bolesti (Boillee et al., 2006).

Miševi koji ekspimiraju mSOD1 u astrocitima nisu pokazivali simptome bolesti, a motorni neuroni i mikroglija su imali normalnu morfologiju (Gong et al., 2000). Međutim, skorija istraživanja su pokazala da ukoliko se količina mSOD1 u astrocitima smanji, progresija bolesti će biti usporena i produžen životni vek ALS miševa (Yamanaka et al., 2008a). Takođe, u ovim eksperimentima je uočeno da smanjena ekspresija mSOD1 u astrocitima odlaže aktivaciju mikroglije što ukazuje na funkcionalnu vezu između astrocita koji ekspimiraju mSOD1 i mikroglije. Jedna od pretpostavki jeste da astrociti oslobađaju mSOD1 koja ima toksični efekat i aktivira mikrogliju (Urushitani et al., 2006).

## IMUNSKI ODGOVOR

Imunski sistem predstavlja skup tkiva, ćelija i molekula koji posreduju u otpornosti organizma na infekciju. Koordinisana reakcija ovih ćelija i molekula na infektivne mikroorganizme naziva se imunski odgovor. Razlikuju se dva osnovna mehanizma odbrane od infekcija: urođena i stečena imunost. Mehanizmi urođene imunosti obezbeđuju inicijalnu odbranu od infekcije eliminacijom mikroorganizama. Međutim, mnogi mikroorganizmi su evoluirali tako da mogu da se odupru urođenoj imunosti. Odbrana protiv takvih infektivnih agenasa je zadatak stečene imunosti. Stečena imunost se razvija kasnije i posredovana je limfocitima i njihovim produktima. Postoje dva oblika stečene imunosti: humoralna i celularna imunost koje obezbeđuju odbranu od vanćelijskih odnosno unutarćelijskih mikroorganizama. Humoralni imunski odgovor je posredovan proteinima koji se nazivaju antitela a stvaraju ih ćelije koje se nazivaju B-limfociti. Uloga antitela jeste da prepoznaju antigene vanćelijskih mikroorganizama (u krvi ili na površini sluznica) i da blokiranjem ovih mikroorganizama spreče pojavu infekcije. Međutim, antitela nemaju pristup mikroorganizmima koja se nalaze unutar inficiranih ćelija. Odbrana protiv ovih unutarćelijskih agenasa se naziva celularna imunost i posredovana je ćelijama koje se nazivaju T-limfociti. Oni prepoznaju antigene unutarćelijskih mikroorganizama i ubijaju inficirane ćelije ili aktiviraju makrofage da uklone fagocitirane mikroorganizme.

U ćelije imunskog sistema spadaju limfociti, ćelije koje prezentuju antigene mikroorganizama (eng. *antigen-presenting cells*, APC) i efektorske ćelije koje eliminišu mikroorganizme.

Limfociti na svojoj površini ekspimiraju receptore koji specifično prepoznaju antigene koje proizvode mikroorganizmi. Pored toga, limfocite karakteriše prisustvo površinskih CD proteina (eng. *cluster of differentiation*, CD). Među T-limfocitima razlikujemo pomoćničke ( $CD4^+$ ) i citotoksične ( $CD8^+$ ) T-ćelije. Pomoćničke T-ćelije pomažu B-limfocitima da proizvode antitela i fagocitima da unište ingestirane mikroorganizme. Posebna klasa  $CD4^+$  T-ćelija su regulatorni T-limfociti koji imaju funkciju da spreče ili ograniče imunski odgovor. Citotoksični T-limfociti (CTL) ubijaju ćelije u kojima se nalaze unutarćelijski mikroorganizmi. Treći tip T-limfocita su urođenoubilačke ćelije (eng. *natural killer*, NK) koje su komponenta urođene imunosti i brzo napadaju i ubijaju inficirane ćelije.

Specijalizovane ćelije koje preuzimaju antigene mikroorganizama i prikazuju ih T-limfocitima poznate su kao antigen-prezentujuće ćelije. Peptidni antigeni APC ćelija su vezani za molekule specijalizovane za prikazivanje peptida, produkte glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex*, MHC). Razlikuju se MHC molekuli I i II klase. MHC molekuli I klase nalaze se na svim ćelijama sa jedrom, dok su molekuli II klase eksprimirani na dendritskim ćelijama, makrofagima i B-limfocitima. MHC molekule II klase prepoznaje CD4 zbog čega su CD4<sup>+</sup> pomoćničke T-ćelije specifične za vanćelijske proteine udružene sa MHC molekulima II klase. MHC molekule I klase prepoznaje CD8 zbog čega su CD8<sup>+</sup> citotoksični T-limfociti specifični za citoplazmatske proteine udružene sa MHC molekulima I klase.

Efektorske ćelije stvaraju molekule koji eliminišu antigen. Efektorske CD4<sup>+</sup> T-ćelije stvaraju proteine koji se nazivaju citokini, koji aktiviraju B-ćelije i makrofage. Efektorske CD8<sup>+</sup> T-ćelije imaju razvijenu mašineriju za ubijanje inficiranih ćelija. Citokini predstavljaju grupu proteina koji deluju kao medijatori imunskog odgovora i zapaljenja. Citokini obično deluju na ćeliju koja ih je proizvela ili na susedne ćelije. Razlikuju se tri klase efektorskih pomoćničkih T-ćelija: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 i T<sub>H</sub>17. T<sub>H</sub>1 ćelije stimulišu unošenje i ubijanje mikroorganizama od strane fagocita što predstavlja ključnu komponentu celularne imunosti. Najvažniji citokin koji proizvode T<sub>H</sub>1 ćelije je interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  je snažan aktivator makrofaga, a stimuliše i ekspresiju MHC molekula II klase. T<sub>H</sub>2 ćelije stimulišu imunski odgovor posredovan eozinofilima, a ne fagocitima. One proizvode sledeće interleukine: IL-4, IL-5 i IL-13. T<sub>H</sub>17 ćelije sekretuju citokine IL-17 i IL-22 i ključni su medijatori zapaljenja u mnogim imunološkim reakcijama.

## INFLAMACIJA

Inflamatorni odgovor se aktivira ukoliko je tkivo oštećeno usled prisustva mikroorganizma, virusa, parazita, povrede tkiva ili hemijskog jedinjenja i podrazumeva regrutovanje ćelija imunskog sistema iz krvi na mesto oštećenja u tkivu. Inflamacija predstavlja zaštitni mehanizam, kojim organizam pokušava da spreči širenje mikroorganizma u druge delove tkiva, da lokalizuje oštećenje tkiva i ukloni ostatke

ćelija i na taj način oporavi oštećeni region. Oblik, težina i tok inflamatornog procesa zavise od vrste i stepena infekcije, vrste tkiva i opšteg stanja organizma. Inflamacija je praćena nizom promena koje se odigravaju u krvnim sudovima, krvi i u mećućelijskom matriksu. Ćelije koje su oštećene pri povredi ili infekciji oslobađaju hemijske supstance poput histamina, prostaglandina i citokina što dovodi do lokalne dilatacije krvnih sudova i pojaćanog protoka krvi kroz oštećeni region tkiva. Pojaćan protok krvi je odgovoran za pojavu crvenila i toplote karakteristićne za inflamaciju. Pored toga, lokalno povišena temperatura stvara nepogodno okruženje za mikroorganizme. Hemijske supstance koje se oslobađaju na mestu oštećenja, prvenstveno histamin, dovode do slabljenja veza između endotelnih ćelija krvnih sudova što povećava njihovu propustljivost. Na povećavanje vaskularne propustljivosti deluju i neki od proinflamatornih citokina. Oni dovode do slabljenja veza između endotelnih ćelija, što povećava propustljivost krvnih sudova. Proinflamatorni citokini aktiviraju leukocite koji se pojaćanim protokom krvi u velikom broju dopremaju na mesto inflamacije. Leukociti se vezuju za endotel i ameboidnim pokretima napuštaju krvne sudove duž intracelularnih veza. Istovremeno krvni sudovi su propustljivi i za plazmu što dovodi do oticanja oštećenog regiona i nastanka edema. Nagomilane tećnosti vrše mehanićki pritisak na okolne ćelije i nervne završetke što zajedno sa osloboćenim prostaglandinima stvara osećaj bola. Leukociti koji su dospeli na mesto zapaljenskog procesa prepoznaju mikroorganizme i oštećene ćelije i uklanjaju ih fagocitozom. Na taj naćin sprećavaju da se oštećenje proširi i obezbećuju oporavak tkiva.

Najznaćajniji citokini koji ućestvuju u inflamatornom odgovoru su interleukin 1 (IL-1), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 18 (IL-18), hemokini i faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*; TNF). Mada IL-1 mogu da sintetišu limfociti, endotelne ćelije, fibroblasti i keratinociti, najvaćniji izvor IL-1 su aktivirani makrofagi. Stvaranje IL-1 stimulišu raznovrsni faktori, kao što su lipopolisaharid, toksini, TNF. Deluje na T-ćelije, B-ćelije, fibroblaste, NK ćelije, endotelne ćelije. IL-1 aktivira limfocite koji su znaćajni u imunskom odgovoru i jedan je od glavnih proinflamatornih citokina. IL-5 sintetišu T-limfociti i on podstiće citotoksićnu aktivnost T-limfocita. IL-6 je glikoprotein koga najviše sintetišu aktivirani makrofagi. Stimulativno deluje na proliferaciju T- i B-limfocita, diferenciranje B-ćelija i sintezu antitela. TNF je neglikozilovani protein koga oslobađaju makrofagi, T- i B-

limfociti, fibroblasti, neutrofilii. TNF učestvuje u procesu inflamacije, ima citotoksično dejstvo, dovodi do premećaja funkcije organa, a ako je sintetisan u velikoj količini izaziva smrt. TNF aktivira neke od leukocita, povećava ekspresiju mnogih adhezivnih molekula što učvršćuje vezu između leukocita i endotelnih ćelija.

## **NEUROINFLAMACIJA**

Neuroinflamacija predstavlja regulisan ćelijski odgovor na oštećenje u mozgu ili kičmenoj moždini. Osnovne karakteristike neuroinflamacije su infiltracija i akumulacija T-limfocita u regione oštećenja, kao i aktivacija mikroglije i astrocita.

U zdravom CNS imunske ćelije kao i njihovi inflamatorni produkti su vrlo slabo zastupljeni. Međutim, bilo kakav oblik oštećenja u CNS deluje kao stimulus za aktivaciju inflamatornog odgovora. Ćelije imunskog sistema se infiltriraju u CNS i interaguju sa ćelijama CNS što dovodi do aktivacije mikroglije i astrocita. Aktivirana mikroglija i astrociti imaju sposobnost oslobađanja različitih citokina i neurotrofičnih faktora što ih približava osobinama aktiviranih imunskih ćelija. Citokini koje oslobađaju mikroglija i astrociti učestvuju u modulaciji neuroinflamatornog odgovora. Neuroinflamatorni procesi su često praćeni oštećenjem krvno-moždane barijere (med. hemato-encefalna barijera; HEB) što olakšava ulazak ćelija imunskog sistema u CNS. Primarni zadatak neuroinflamatornog odgovora je da regeneriše oštećeno mesto i produži preživljavanje neurona. Međutim, neregulisan inflamatorni odgovor može dovesti do daljeg oštećenja tkiva i izraženijeg odumiranja neurona.

### **Uloga mikroglije u neuroinflamaciji**

Mikroglialne ćelije su makrofagne ćelije centralnog nervnog sistema i smatra se da njihova aktivacija najviše doprinosi neuroinflamatornom odgovoru. U zdravom CNS, mikroglija je prisutna kao mirujuća i karakteriše je zvezdasta morfologija, okruglo telo i dugi, razgranati nastavci kojima dinamično ispituje svoje okruženje. Različiti patogeni, proinflamatorni citokini, ili oštećenja neurona mogu biti signal za aktivaciju mikroglije koja je praćena morfološkim promenama: skraćivanjem i stanjivanjem nastavaka i hipertrofijom ćelijskog tela (Kreutzberg, 1996). Aktivirana mikroglija produkuje

različite supstance koje mogu imati i toksične i protektivne efekte na susedne neurone. M1-aktivirana mikroglia pokazuje proinflamatorni fenotip, odlikuje se produkcijom citokina (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), faktora rasta, povećanim oslobađanjem ROS i azot-oksida (NO) i dobija fagocitarnu ulogu (Kreutzberg, 1996; Zhao et al., 2004; Hanisch and Kettenmann, 2007; Ransohoff and Perry, 2009). Posebno je značajno da M1-mikroglia povećava ekspresiju MHC klase II i postaje antigen-prezentujuća ćelija (Gehrmann et al., 1995). Njene antigene prepoznaju T-ćelije što vodi njihovoj aktivaciji, a mikroglia biva uključena u T-ćelijski odgovor. Drugi tip aktivacije mikroglie je označen kao M2 i odlikuje se povećanim oslobađanjem anti-inflamatornih citokina (IL-4 i IL-10) i neurotrofičnih faktora (BDNF i IGF-1). Ovako aktivirana mikroglia pokazuje neuroprotektivni efekat na preživljavanje neurona (Zhao et al., 2006; Lalancette-Hébert et al., 2007; Simard and Rivest, 2007).

Bitnu ulogu u regulaciji aktivnosti mikroglie imaju i neuroni. Glikoprotein CD200 je eksprimiran na neuronima dok je njegov odgovarajući receptor CD200R eksprimiran na mikrogliji. Ispitivanja na mišu koji nema eksprimiran CD200R su pokazala da i u odsustvu inflamatornog stimulusa, mikroglia pokazuje morfološke karakteristike aktiviranog stanja (Hoek et al., 2000). Još jedan primer funkcionalne veze mikroglie i neurona je ostvaren posredstvom hemokina fraktalkina (CX3CL1) koji se eksprimira na ćelijskoj membrani neurona, dok jedino mikroglia u CNS eksprimira odgovarajući receptor CX3CR1. Ovi eksperimenti su potvrdili značaj ekspresije neuronskog CD200 i CX3CL1 u regulaciji mikroglialne aktivacije. Prepoznavanje odgovarajućih mikroglialnih i neuronskih proteina je signal da mikroglia ostane u neaktivnoj formi, dok eventualna oštećenja neurona dovode do aktivacije mikroglie.

## **Uloga astrocita u neuroinflamaciji**

Astrociti su najbrojniji tip ćelija u CNS i u poslednje dve decenije se intenzivno ispituje njihova uloga u zdravom nervnom sistemu, ali i u različitim oboljenjima. Osnovna podela astrocita je na protoplazmatične (u sivoj masi) i fibrozne (u beloj masi). Obeležavanje intermedijarnog filameta, glialnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), se najčešće koristi za identifikaciju astrocita. Ovako obeleženi astrociti pokazuju malo telo, sa vrlo razgranatim nastavcima koji okružuju sinapse i tela neurona (Wolff, 1968).

Astroцити су у блиској вежи са неуронима и њихова кључна улога је да обезбеде структурну, метабoliчку и трофичку потпору неуронима.

Svaki oblik oštećenja u nervnom sistemu dovodi do brzog odgovora astrocита i prelaska u reaktivnu formu, poznatog kao astroglioza (Eng and Ghirnikar, 1994). Reaktivni astroцити се одликују ćелијском hipertrofijom i povećanom sintezom nekoliko proteina међу којима посебно GFAP i vimentina. Stimulatorni molekuli за активацију astrocита могу бити citokini које ослобађају микроглија и оштећени неурони, затим neurotransmiteri попут glutamata, purini попут ATP, ROS, NO, hipoksija i nedostatak glukoze. Istraživanja су показала да nedostatak reaktivnih astrocита води povećanoj смрти неурона, израженијем уласку inflamatornih ćелија и smanjenom опоравку крвно-моždane баријере (Faulkner et al., 2004). Stoga, smatra се да astroglioza мође имати protektivnu улогу при neuroinflamaciji ограничаванјем шirenja inflamatornih ćелија из оштећених делова у здраве делове CNS (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Myer et al., 2006; Voskuhl et al., 2009). Nasuprot tome, reaktivni astroцити могу имати i штетан efekat на neurone у оштећеном regionu usled prevelike produkcije ROS i inflamatornih citokina (Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010; Swanson et al., 2004). Uočeno је да reaktivni astroцити ослобађају NO који мође оштетити околне neurone i друге ćелијске tipove (Estevez et al., 1998). Pokazano је да LPS активација pacovskih astrocита у kulturi dovodi до povećane produkcije TNF i IL-1 (Lieberman et al., 1989). Povreda astrocита у kulturi dovodi до активације astrocита i ослобађanja IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (Lau and Yu, 2001). Osloбађanje TNF- $\alpha$  од strane reaktivnih astrocита има važnu улогу у inicijaciji inflamacije (Bezzi et al., 2001). Pokazano је да farmakološka inhibicija astroglioze dovodi до smanjene produkcije citokina i smanjenog oštećenja neurona (Chauhan et al., 2008).

### **Uloga T-ćелија u neuroinflamaciji**

Aktivirane T-ćелије су prisutne у zdravom CNS у малом broju (Engelhardt and Ransohoff, 2005) i њихова улога је да врше stalni nadzor ćелија prisutnih у CNS. Pri том, zastupljenost aktiviranih T-limfocita у CNS је znatno niža nego у drugim tkivima. Oštećenje у CNS dovodi до vrlo intenzivne aktivacije T-ćелија i њихove infiltracije у CNS. Smatra се да citokini које ослобађају astroцити privlače T-limfocite на mesto



oštećenja (Ransohoff and Tani, 1998). Ukoliko infiltrirane T-ćelije prepoznaju odgovarajuće prezentovane antigene i MHC akumuliraće se u moždanom tkivu, u suprotnom će biti uklonjene najverovatnije apoptozom (Flügel et al., 2001; Bauer et al., 1998).

Uloga CD4<sup>+</sup> T-ćelija je u aktivaciji i regulaciji aktivnosti drugih ćelija uključenih u imunski odgovor gde spadaju i makrofagi i mikroglia (Kipnis and Schwartz, 2005). Kada CD4<sup>+</sup> T-limfociti dospeju u moždano tkivo njihov fenotip će zavisi od uslova u povređenom mestu. T<sub>H</sub>1 ćelije nastaju u prisustvu IL-12 i karakteriše ih proinflamatorni fenotip. One oslobađaju IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  što vodi M1-aktivaciji mikroglie. Pored toga, ovi citokini dovode do intenzivnijeg regrutovanja leukocita i pojačavaju neuroinflamatorni odgovor. U prisustvu IL-4, CD4<sup>+</sup> T-ćelije postaju T<sub>H</sub>2 ćelije koje stvaraju anti-inflamatorne citokine IL-4, IL-5, IL-13 i IL-21 koji vode nastanku M2-fenotipa mikroglie (Huang et al., 2009) i aktiviraju CD8<sup>+</sup> T-limfocite. T<sub>H</sub>17 ćelije nastaju u prisustvu IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  i IL-1 $\beta$ . Oslobađaju proinflamatorne citokine IL-17, IL-21 i IL-22 koji vode M1-aktivaciji mikroglie. Posebno je značajno njihovo posredovanje u autoimunim oboljenjima. Regulatorne T-ćelije nastaju u prisustvu IL-2 i TGF- $\beta$ . One eksprimiraju CD4 i CD25 i proizvode u velikoj količini IL-10, IL-35 i TGF- $\beta$ , a u manjoj količini IL-2 and IFN- $\gamma$ . One regulišu funkciju T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 ćelija, a mogu da smanje proinflamatorni efekat T<sub>H</sub>17. Mikroglia aktivirana posredstvom T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>17 oslobađa IL-1 i IFN- $\gamma$  koji opet mogu modulirati T-ćelijski odgovor (Magnus et al., 2005).

U zdravom CNS CD8<sup>+</sup> T-limfociti su vrlo slabo zastupljeni (Neumann et al., 2002). Prisustvo mikroorganizma ili oštećenje ćelija u tkivu dovodi do infiltracije ovih limfocita u pogođeni region. Uloga CD8<sup>+</sup> T-limfocita je u direktnom uklanjanju oštećenih ili inficiranih ćelija u mozgu. Njihov površinski T-ćelijski receptor (eng *T-cell receptor*; TCR) prepoznaje peptide koji su vezani za MHC klase I. CD8<sup>+</sup> T-limfociti ekprimiraju na svojoj površini Fas ligand koji prepoznaje Fas receptor na površini ćelije koju treba ukloniti i oslobađaju perforine i granzime (Melzer et al., 2009). Ovo prepoznavanje dovodi do aktivacije kaspaza i završava se apoptozom oštećene ćelije. Perforin dovodi do nastanka pora na ćelijskoj membrani što može rezultirati osmotskim liziranjem ćelija i otvaranjem puta za ulazak oslobođenih granzima (Negrin, 2008). Pored toga, CD8<sup>+</sup> T-ćelije oslobađaju IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  koji su jaki proinflamatorni faktori

i pokazano je da u *in vitro* uslovima mogu dovesti do sinteze MHC molekula na nervnim ćelijama. Sve glijalne ćelije mogu da eksprimiraju MHC klase I na svojoj površini. Od velikog značaja je bilo otkriće da u neuroinflamatornim uslovima neuroni mogu da eksprimiraju MHC klase I (Holmøy, 2008). Pokazano je da tretiranje neurona u kulturi IFN- $\gamma$  može dovesti do eksprimiranja MHC klase I na njihovoj površini (Neumann et al., 1995). Mogućnost eksprimiranja MHC klase I na površini glijalnih ćelija i neurona ih čini potencijalnom metom CD8<sup>+</sup> T-ćelija.

Uloga CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita je najintenzivnije ispitivana na modelima multiple skleroze. Pokazana je zastupljenost oba tipa T-ćelija na mestima lezija, ali su CD8<sup>+</sup> T limfociti prisutni u znatno većoj količini (Booss et al., 1983; Gay et al., 1997). Takođe, CD8<sup>+</sup> T-limfociti su izrazito zastupljeni u regionima koji su u fazi aktivne demijelinizacije (Babbe et al., 2000; Bitsch et al., 2000). Primena specifično dizajniranih antitela koja prepoznaju CD4 odnosno CD8 receptore na modelima multiple skleroze omogućila je *in vivo* praćenje infiltracije i akumulacije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Pirko et al., 2005). Ova antitela se lako detektuju primenom metode magnetno-rezonantnog oslikavanja (eng. *Magnetic Resonance Imaging*; MRI) jer su konjugovana sa ultra malim paramagnetnim partikulama gvožđe oksida.

## NEUROINFLAMACIJA I ALS

### Uloga astrocita u ALS

Ispitivanja ALS pacijenata su pokazala prisustvo reaktivnih astrocita na mestima odumiranja motornih neurona (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994; O'Reilly et al., 1995; Schiffer et al., 1996). Aktivirani astrociti su uočeni i u oštećenim moždanim regionima transgenih životinjskih modela (Bruijn et al., 1997; Hall et al., 1998b; Levine et al., 1999; Howland et al., 2002). Na ALS modelu miša je uočeno da reaktivni astrociti sadrže inkluzije koje su pozitivne na SOD1 i ubikvitin što se smatra ranim obeležjem ALS (Bruijn et al., 1997; Pasinelli et al., 2000). Utvrđeno je da astrociti u kulturi koji eksprimiraju mSOD1 imaju toksični efekat na motorne neurone (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). Smatra se da je toksičnost ovih astrocita posredovana toksičnim faktorom koji je prisutan u kondicionom medijumu (Nagai et al.,

2007). Kao mogući toksični faktori smatraju se faktor rasta nerava (NGF) i proapoptotski medijatori (Barbeito et al., 2004; Raoul et al., 2002), a isključeni su TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  jer ih u istoj količini produkuju i zdravi astrociti i oni koji ekspimiraju mSOD1 (Nagai et al., 2007). Još jedan potencijalni toksični faktor je sama mSOD1 koja pokazuje direktnu neurotoksičnost i aktivira mikrogliju (Urushitani et al., 2006). Međutim, studije na ALS pacijentima su ukazale na povećanu količina TNF- $\alpha$  u serumu (Poloni et al., 2000). Početak bolesti kod hSOD1<sup>G93A</sup> miša karakteriše povišen nivo informacione RNK za TNF- $\alpha$  u kičmenoj moždini (Elliott, 2001). Na istom modelu je utvrđeno da neuroni i astrociti oslobađaju TNF- $\alpha$  i pre pojave simptoma (Kiaei et al., 2006).

## **Uloga mikroglije u ALS**

Istraživanja na ALS pacijentima su pokazala prisustvo aktivirane mikroglije u oštećenim regionima mozga i kičmene moždine (Troost et al., 1990, Kawamata et al., 1992). Primenom PET metode detektovano je prisustvo aktivirane mikroglije u motornoj kori, moždanom stablu, dorzolateralnoj prefrontalnoj kori i talamusu kod ALS pacijenata, pri čemu je stepen mikroglioze rastao sa progresijom bolesti (Turner et al., 2004). Ispitivanja neuroinflamacije na ALS modelu miša su ukazala na prisustvo aktivirane mikroglije (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998b; Levine et al., 1999). Uočene promene su detektovane sa pojavom simptoma i bivale su izraženije sa progresijom bolesti (Alexianu et al., 2001).

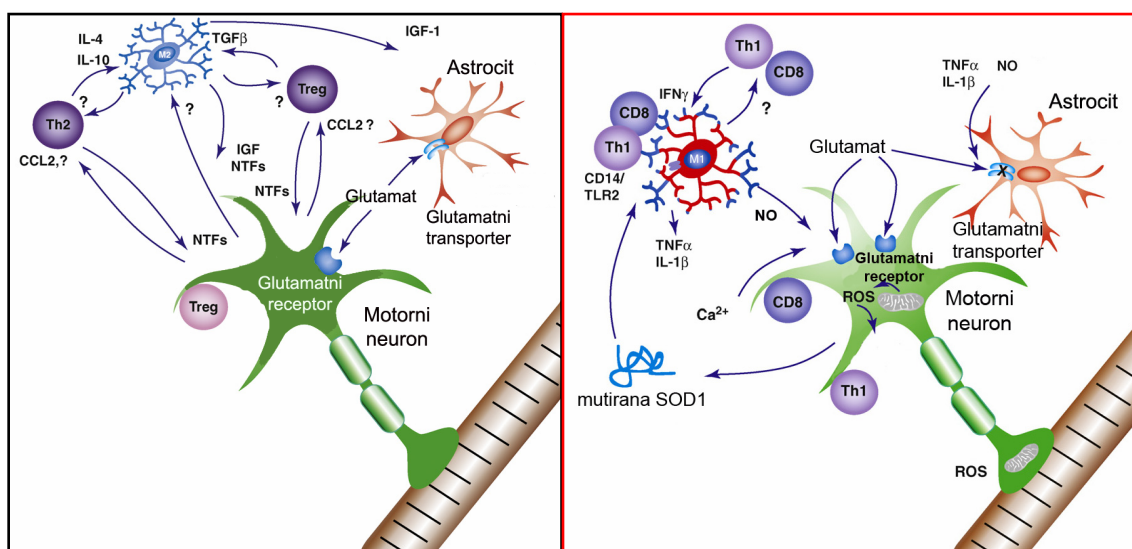
Ukoliko se kokultura mikroglije i neurona tretira lipopolisaharidom (LPS), koji je stimulus za M1 aktivaciju, mikroglija dobija proinflamatorni fenotip uz povećanu produkciju NO i ROS, kao i povećan nivo vanćelijskog glutamata, što zajedno vodi smrti neurona (Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2010). Ispitivanja na modelu miša koji ekspimirira mSOD su pokazala povećan broj aktivirane mikroglije, kako kod simptomatičnih životinja, tako i kod presimptomatičnih (Chiu et al., 2008; Hall et al., 1998b). Mikroglija aktivirana LPS koja ekspimirira mSOD pokazuje pojačanu neurotoksičnost od mikroglije divljeg soja (Xiao et al., 2007). Ukoliko se redukuje ekspresija mSOD u mikrogliji, progresija bolesti se usporava i ove životinje duže žive (Boillee et al., 2006) i stoga je pretpostavljeno da mikroglija doprinosi degeneraciji

motornih neurona. Međutim, blokada proliferacije mikroglije (Gowing et al., 2007) nije uticala na progresiju bolesti u mSOD modelu miša što je vodilo pretpostavci o neuroprotektivnoj ulozi mikroglije u ALS. Ispitivanja na ALS modelu miša koji ne eksprimira mikroglijalni CX3CR1 receptor su pokazala povećan gubitak neurona nakon LPS tretmana (Cardona et al., 2006) i potvrdila pretpostavku o neuroprotektivnoj ulozi fraktalkina i odgovarajućeg receptora. Beers et al. (2011) je utvrdio da mikroglija ima neuroprotektivnu ulogu u početnim fazama bolesti i oslobađa anti-inflamatorne citokine poput IL-4 i IL-10 koji privlače  $T_H2$  i regulatorne T-ćelije, dok u krajnjoj fazi raste nivo proinflamatornih faktora IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , i TNF- $\alpha$  koji privlače  $T_H1$  i  $CD8^+$  T-ćelije. Ova opažanja su navela na pretpostavku da mikroglija u početnim fazama ALS pokazuje M2 fenotip koji podržava preživljavanje neurona, dok sa progresijom bolesti mikroglija dobija M1 fenotip i pokazuje neurotoksični efekat na motorne neurone (**Slika 2**).

## Uloga T-ćelija u ALS

Istraživanja na ALS pacijentima su pokazala prisustvo infiltriranih T-ćelija na mestima gubitka motornih neurona (Engelhardt et al., 1993; Levine et al., 1999; Schiffer et al., 1996). Ispitivanja neuroinflamacije na ALS modelu miša su ukazala na akumulaciju T-limfocita (Alexianu et al., 2001). Povećan broj T-ćelija je uočen u lumbalnom regionu kičmene moždine mSOD miša u presimptomatičnoj fazi bolesti, ali je pokazivao i stalni porast sa progresijom bolesti (Beers et al., 2008; Chiu et al., 2008). Među T-ćelijama su najzastupljenije  $CD4^+$  T-ćelije, dok u krajnjoj fazi bolesti broj  $CD8^+$  T-ćelija naglo raste sve do 40% zastupljenosti (Beers et al., 2008).  $CD8^+$  T-ćelije su uočene u kičmenoj moždini mSOD miša tek u krajnjoj fazi bolesti (Chiu et al., 2008). Jasnija slika o ulozi T-ćelija u ALS je dobijena ukrštanjem mSOD miševa sa sojem koji ne eksprimira funkcionalne T-ćelije (Beers et al., 2008). Ove životinje nisu pokazivale promenu u početku pojave simptoma bolesti, ali je njihov životni vek bio skraćen. U dodatnim eksperimentima, ukršten je mSOD miš sa sojem koji ne eksprimira  $CD4^+$  T-ćelije (Beers et al., 2008). Kod ovih životinja progresija bolesti je ubrzana i povećana je produkcija proinflamatornih i citotoksičnih faktora. Ovi eksperimenti su pokazali da  $CD4^+$  T-ćelije imaju neuroprotektivnu ulogu i modulišu mikroglijalnu aktivaciju ka M2

fenotipu, dok se prisustvo CD8<sup>+</sup> T-ćelije uočava u krajnjoj fazi bolesti i vodi nastajanju M1 fenotipa mikroglije (Beers et al., 2008; **Slika 2**).

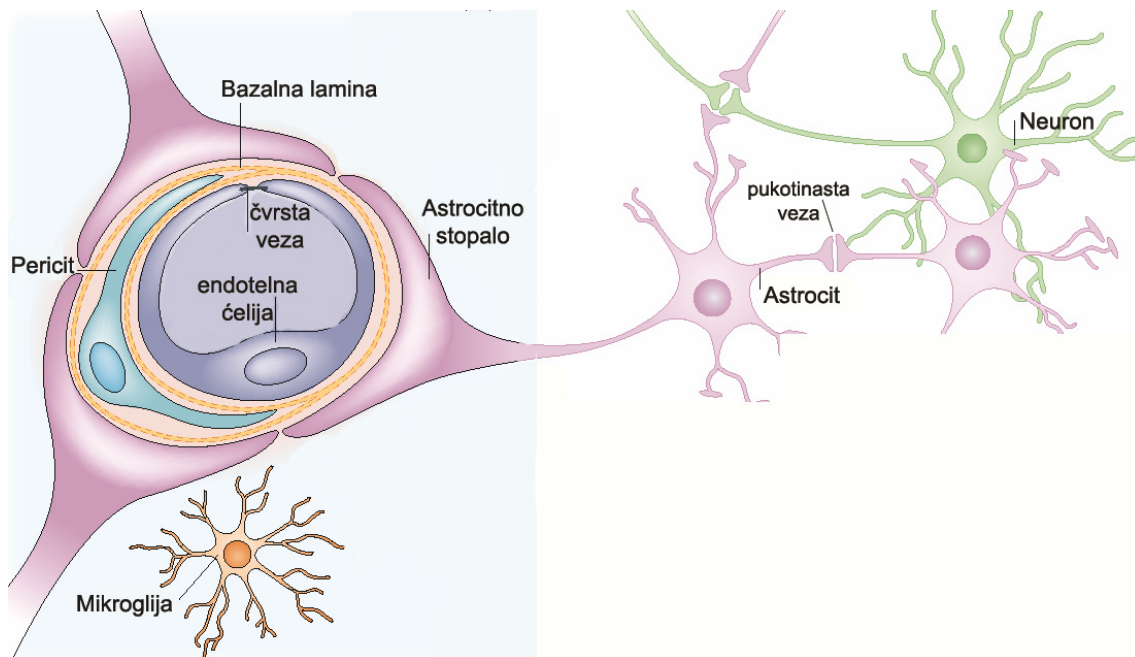


**Slika 2.** Neuroprotektivni (levo) i neurotoksični inflamatorni mehanizmi (desno) u ALS. U početnim fazama ALS, oštećeni neuroni šalju signal za nastajanje M2 fenotipa mikroglije koja oslobađanjem citokina privlači T<sub>H</sub>2 i regulatorne T-ćelije (Treg). M2 mikroglija oslobađa IGF-1 koji stimulira astrocite da preuzimaju glutamat i na taj način pojačava njihovu neuroprotektivnu ulogu. T<sub>H</sub>2 i Treg ćelije oslobađaju neurotrofične faktore koji direktno štite motorne neurone. One takođe oslobađaju IL-4, IL-10 i TGF-β koji potpomažu nastajanje M2 fenotipa mikroglije. Prvi odgovor na povredu neurona je neuroprotektivni, ali sa produženim oštećenjem, odgovor postaje neurotoksičan i ubrzava progresiju ALS. Povećana količina mutirane SOD1 je signal za aktivaciju mikroglije i prelazak iz M2 u neurotoksični M1 fenotip. Mikroglija može prezentovati antigene T<sub>H</sub>1 i CD8<sup>+</sup> T-ćelijama. M1 mikroglija oslobađa TNF-α, IL-1 i NO koji mogu voditi formiranju ROS, a oni oštete glutamatne receptore i vode Ca<sup>2+</sup> citotoksičnosti. Koncentracija glutamata raste zbog smanjenog kapaciteta astrocitnog glutamatnog transportera da preuzima glutamat i vodi mehanizmima glutamatne ekscitotoksičnosti. M1 mikroglija deluje na T<sub>H</sub>1 i CD8<sup>+</sup> T-ćelije koje oslobađanjem IFN-γ favorizuju M1 fenotip i ostvaruju toksični efekat na motorne neurone. Modifikovano iz Appel et al. (2010).

## KRVNO-MOŽDANA BARIJERA I NEUROINFLAMACIJA

Krvno-moždanu barijeru čine endotelne ćelije koje obavijaju krvne sudove u mozgu, zajedno sa bazalnom laminom, pericitima i astrocitnim stopalima (**Slika 3**). Endotelne ćelije su međusobno povezane čvrstim vezama što ograničava prolazak molekula u parenhim mozga (Abbot et al., 2006; Ballabh et al., 2004). Najzastupljeniji transmembranski proteini koji učestvuju u izgradnji čvrstih veza su okcludin, klaudin i zonula okcludens protein 1 (ZO-1). Mali lipofilni molekuli poput kiseonika, ugljendioksida i alkohola mogu slobodno da difunduju kroz lipidnu membranu endotela. Međutim, većina molekula neophodnih za regularno funkcionisanje mozga se

transportuje posebnim membranskim transportnim sistemima. Pored toga, endotelne ćelije sadrže i različite enzime koji podržavaju protektivnu ulogu HEB. Stoga, može se reći da HEB predstavlja skup statičkih i dinamičkih osobina koje omogućavaju endotelu da zaštiti različite regione mozga (Abbott and Romero, 1996).



**Slika 3.** Strukturne ćelijske komponente krvno-moždane barijere. Barijeru formiraju kapilarne endotelne ćelije koje su povezane čvrstim vezama. Obavijene su bazalnom laminom, pericitima i astrocitnim stopalima. Astrociti obezbeđuju blisku vezu sa neuronima, a međusobno su povezani pukotinastim vezama. Na slici je prikazana i mikroglijalna ćelija koja doprinosi stabilnosti HEB. Modifikovano iz Abbott et al. (2006).

HEB ima nekoliko uloga koje treba istaći (Abbott and Romero, 1996; Begley and Brightman, 2003; Abbott, 2005). Jedna od njih jeste da obezbedi mozgu neophodne nutritijente, a sa druge strane da ukloni suvišne produkte. U snabdevanju mozga različitim nutritijentima, posebnu ulogu imaju glukozni prenosači, nosači aminokiselina, kao i transporteri nukleozida i nukleobaza (Begley and Brightman, 2003). HEB ograničava prolazak jona i tečnosti između krvi i mozga pri čemu jonski transporter i kanali obezbeđuju optimalne uslove za funkcionisanje neurona. Treba istaći protektivnu ulogu HEB pri promeni jonskog sastava koji može narušiti sinaptičku signalizaciju (Cserr and Bundgaard, 1984).

Bliska organizacija astrocita i krvnih sudova u mozgu je vodila pretpostavci da astrociti doprinose razvoju i stabilnosti HEB (Oldendorf and Davson, 1967). Podaci

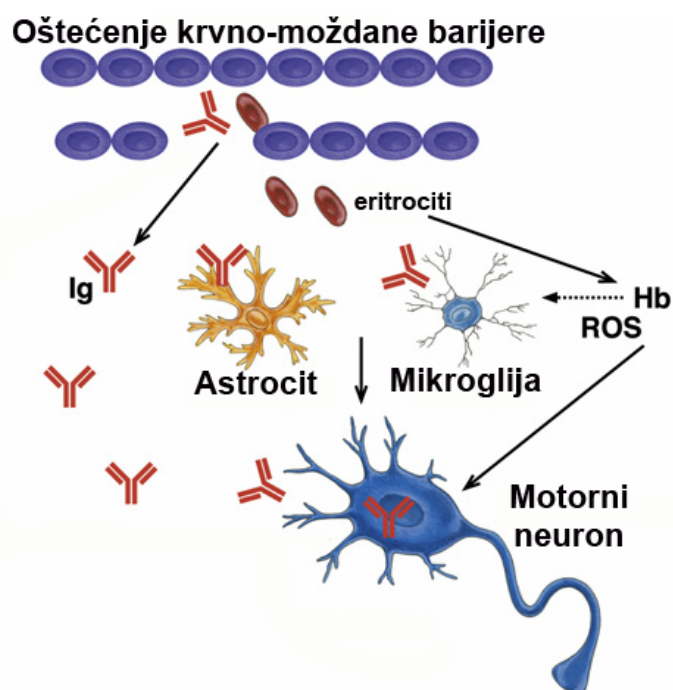
studija na ćelijama u kulturi su ukazali na značaj astrocita u regulaciji mnogih osobina HEB poput uspostavljanja čvrstih veza između endotelnih ćelija (Dehouck et al., 1990; Rubin et al., 1991), zatim ekspresije transportera i njihove polarizovane lokalizacije (McAllister et al., 2001). Astrocitna stopala blisko okružuju zidove krvnih sudova i njihova membrana je bogata kanalima za vodu akvaporin-4 (AQP4), ulaznim ispravljačem kalijumove struje Kir4.1 i glutamatnim transporterom GLT-1/EAAT2. Ovi proteini su uključeni u održavanje homeostaze vode, jona i glutamata u nivou HEB (Ke et al., 2001). Raspoređivanje ovih proteina u membrani astrocitnih stopala je povezano sa ekspresijom agrina koji je proteoglikan bazalne lamine. On učestvuje u povezivanju astrocita i endotelnih ćelija i na taj način doprinosi stabilnosti HEB (Wolburg et al., 2009).

Postoje različiti hemijski agensi koji mogu modulirati permeabilnost HEB (Abbott and Revest, 1991; Abbott, 2000) među kojima su inflamatorni citokini i angiogeni faktori. Neke od ovih agenasa mogu osloboditi astrociti i oni su najčešće pripadnici grupe inflamatornih medijatora. Povećana propustljivost HEB pri neuroinflamaciji (Abbott, 2000) je posledica otvaranja čvrstih veza i doprinosi nastanku edema mozga (Huber et al., 2001). TNF- $\alpha$  može da poveća propustljivost HEB direktnim delovanjem na ćelije endotela (Deli et al., 1995) ili indirektnim delovanjem na IL-1 $\beta$  koga oslobađaju astrociti (Didier et al., 2003). IL-1 $\beta$  smanjuje koncentraciju ili menja lokalizaciju okludina koji je deo čvrstih veza i na taj način povećava propustljivost HEB. Uslovi hipoksije, oksidativni stres i glutamatna toksičnost takođe mogu modulirati propustljivost HEB (Drewes, 1998).

Opisan je veći broj patologija koje su u vezi sa promenjenom funkcijom HEB. Oštećena HEB je uočena kod pacijenata koju boluju od Alchajmerove bolesti (Bowman et al. 2007; Claudio, 1996). Gubitak agrina može voditi oštećenju HEB u Alchajmerovoj bolesti (Berzin et al., 2000). Oštećena HEB se smatra bitnim obeležjem multiple skleroze što olakšava prolazak T-ćelija u tkivo CNS (Minagar et al., 2003; Waubant, 2006; Soon et al., 2007).

Veliki broj istraživanja je ukazao na oštećenost HEB u ALS. Intravenska aplikacija Evansovog plavog u ALS modelu miša je pokazala povećanu propustljivost krvno-moždane barijere u cervikalnom i lumbalnom delu kičmene moždine (Garbuzova-Devis et al., 2007a). U istim regionima, elektronskom mikroskopijom su

uočene promene u strukturnim karakteristikama ćelijama koje učestvuju u formiranju HEB, progresivna degeneracija astrocita i endotelnih ćelija praćene oštećenjem mitohondrija i oticanjem ćelija (Garbuzova-Devis et al., 2007b). Takođe, Zhong et al. (2008) je pokazao u više raličitih ALS modela miševa smanjen nivo proteina koji učestvuju u formiranju čvrstih veza između endotelnih ćelija: ZO-1, okludina i kladina-5 što je ukazalo na oštećenje HEB. U istoj studiji je pokazano da su ove promene prethodile degeneraciji motornih neurona ukazujući na značaj uočenih promena u otpočinjanju simptoma bolesti. Zlokovic (2008) je predložio oštećenje HEB kao ključni događaj u patogenezi ALS. Po ovom modelu oštećena HEB otvara put za ulazak inflamatornih ćelija i faktora u CNS, a zatim vodi produkciji ROS i aktivaciji mikroglije i astrocita (Slika 4). Ovakav sled promena u mozgu bi za posledicu imao gubitak funkcije i smrt motornih neurona.



**Slika 4.** Oštećenje krvno-moždane barijere u ALS (*Zlokovic-Cleveland model*). Oštećenje HEB dovodi do ulaska eritrocita u moždano tkivo što vodi oslobađanju neurotoksičnih produkata hemoglobina (Hb). Slobodni Hb dovodi do produkcije ROS koji ostvaruju direktni toksični efekat na motorne neurone. Oštećenje HEB istovremeno otvara put za ulazak imunoglobulina (Ig) što dovodi do aktivacije astrocita i mikroglije i doprinosi ne-neuronalnoj hipotezi ćelijske smrti. Takođe, Ig mogu imati direktan toksičan efekat na motorne neurone pri interakciji sa antigenima motornih neurona. Modifikovano iz Zlokovic (2008).



## ULOGA ASTROCITA U REGULACIJI AKTIVNOSTI NEURONA

Astrociti su u bliskoj vezi sa neuronima i njihova ključna uloga je da obezbede trofičnu, strukturnu i metaboličku potporu neuronima. Brojni astrocitni nastavci su raspoređeni tako da sa jedne strane okružuju krve sudove, a sa druge tela neurona, aksone i sinapse. Ovakav položaj im omogućava da preuzimaju glukozu iz krvi i dopremaju energetske metabolite do neurona. Pored toga, poznato je da astrociti poseduju rezerve glikogena, posebno u regionima velike sinaptičke gustine (Peters et al., 1991; Phelps, 1972). U uslovima hipoglikemije, astrocitni glikogen se prevodi u laktat i prenosi do susednih neurona koji ga koriste kao dodatni izvor energije (Bouzier-Sore et al., 2002; Brown and Ransom, 2007; Brown et al., 2004; Pellerin et al., 2007, Voutsinos-Porche et al., 2003). Protektivna uloga astrocita se ogleda u posedovanju velike količine antioksidativnih molekula (vitamin E, glutation (GSH), askorbat) koji štite neurone od oksidativnog oštećenja (Dringen et al., 2000; Shih et al., 2003, Vargas and Johnson, 2009). Astrociti zajedno sa pre- i postsinaptičkim neuronima formiraju tripartitivnu sinapsu. Kao deo ove sinapse, astrociti direktno modulišu sinaptičku transmisiju posredstvom hemijskih transmitera koje oslobode poput glutamata i ATP (Fields and Stevens-Graham, 2002; Halassa et al., 2007; Parpura et al., 1994; Perea et al., 2009; Seifert et al., 2006). Glutamat koji oslobode astrociti može povećati frekvenciju inhibitornih i ekscitatornih postsinaptičkih struja (Parri and Crunelli, 2001). Takođe, njegovo dejstvo na NMDA receptore vodi stvaranju male ulazne struje u postsinaptičkom neuronu (Fellin et al., 2004). Pored toga, ovako oslobođeni glutamat deluje i na presinaptičke neurone posredstvom metabotropnog glutamatnog receptora (mGluR) (Fiacco and McCarthy, 2004). ATP je još jedan transmiter koji astrociti oslobađaju pri sinaptičkoj aktivnosti. ATP može delovati direktno, ili posredstvom svog metabolita adenozina, inhibirajući oslobađanje glutamata iz susednih presinaptičkih neurona što smanjuje ekscitatornu sinaptičku transmisiju već aktiviranih sinapsi (Zhang et al., 2003). Astrociti su međusobno povezani pukotinastim vezama (Nagy et al., 1992; Ochalski et al., 1997; Ransom and Kettenmann, 1990) što im obezbeđuje efikasnu međusobnu komunikaciju. Joni i transmiteri koje astrociti preuzimaju se vrlo brzo raspoređuju preko pukotinastih veza. Na membrani astrocita prisutni su  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  kanali koji su odgovorni za nastajanje ulaznih jonskih struja (Nedergaard et al., 2003; Seifert et al., 2006). Međutim, za razliku od neurona, astrociti ne generišu akcione potencijale.

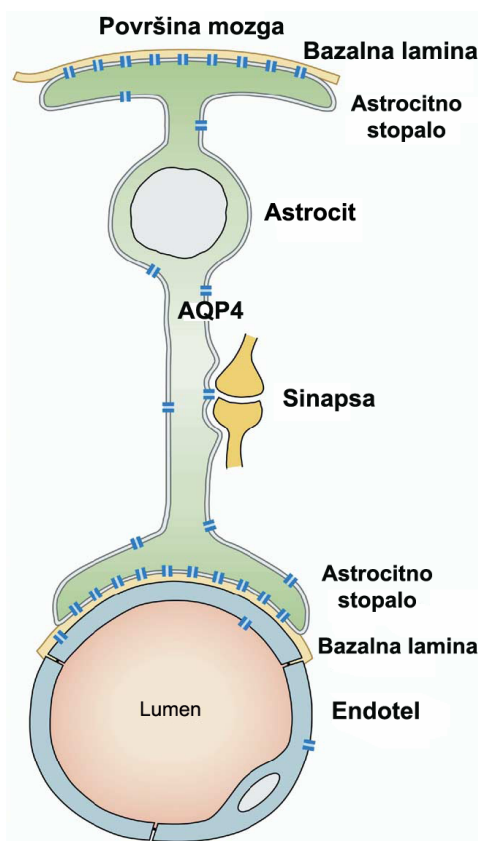
Povećanje koncentracije unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  predstavlja oblik astrocitne ekscitabilnosti (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990). Do povećanja unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  najčešće dolazi oslobađanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa, ili posredstvom transmitera oslobođenih tokom sinaptičke transisije. Ove promene se vrlo brzo prenose na susedne astrocite u vidu  $\text{Ca}^{2+}$  talasa i to posredstvom pukotinastih veza (Zanotti and Charles, 1997), ili oslobađanjem ATP (Arcuino et al., 2002; Guthrie et al., 1999) koji deluje na purinergičke receptore susednih astrocita (Schipke et al., 2002).

Astrocitni nastavci koji obavijaju sinapse imaju ključnu ulogu u brzom uklanjanju neurotransmitera i održavanju jonske i osmotske homeostaze nakon aktivnosti neurona. Na astrocitnim stopalima je eksprimiran EAAT2/GLT-1 koji vrlo efikasno uklanja višak glutamata iz sinaptičke pukotine. Uklanjanje vode i viška  $\text{K}^+$  u odgovoru na sinaptičku aktivnost je posredovano AQP4 odnosno Kir kanalima koji su eksprimirani na astrocitnim stopalima. Pored toga, ovi astrocitni proteini imaju ulogu u održavanju jonske i osmotske homeostaze u nivou krvno-moždane barijere.

## Struktura i funkcija AQP4

Akvaporini predstavljaju familiju transmembranskih proteina specijalizovanih za transport vode (Preston et al., 1992). Akvaporini su homotetramerni transmembranski proteini. Svaki monomer se sastoji od šest domena u vidu  $\alpha$ -heliksa, a karboksilni i amino krajevi su orjentisani ka unutrašnjosti ćelije (Preston et al., 1994; Shi et al., 1994). Kod sisara je poznato 11 članova ove familije proteina (Agre et al., 2002), a u mozgu su prisutni AQP1, AQP4 i AQP9. AQP4 je najprisutniji akvaporin u mozgu (Jung et al., 1994). Molekulska masa AQP4 je 34 kDa. Prisutan je u dve izoforme označene kao M1 i M23 u zavisnosti da li inicijacija počinje od amino kiseline na poziciji 301 odnosno 323 (Jung et al., 1994). AQP4 je najčešće lokalizovan na membranama astrocitnih stopala koje obavijaju krvne sudove i površinu mozga (Nielsen et al., 1997; **Slika 5**). Kvantitativna analiza Milerovih ćelija u retini je pokazala veću zastupljenost AQP4 u membranama stopala u poređenju sa preostalim delovima membrane (Nagelhus et al., 1999). Uočeno je da pored astrocita, ependimske ćelije eksprimiraju AQP4, ali ne i neuroni, oligodendrociti i mikroglia. Pored toga,

istraživanja su pokazala da i endotelne ćelije eksprimiraju nizak nivo AQP4 (Kobayashi et al., 2001; **Slika 5**).

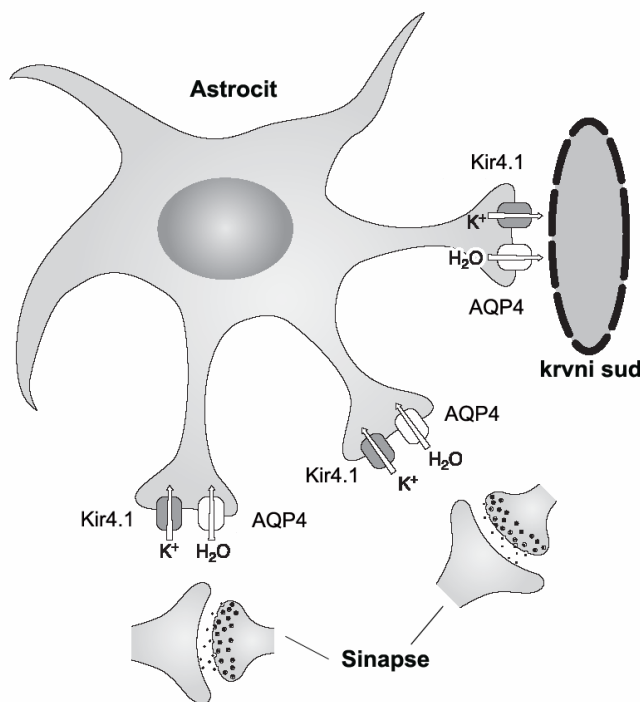


**Slika 5.** Distribucija AQP4 na ćelijskom nivou. Zastupljenost AQP4 je posebno izražena u membranama astrocitnih stopala koja okružuju krvne sudove i površinu mozga. Preostali delovi astrocitne membrane kao i membrane endotelnih ćelija se odlikuju prisustvom AQP4 , ali u vrlo maloj gustini. AQP4 je označen plavim simbolima u ćelijskoj membrani. Modifikovano iz Nagelhus et al. (2004).

Smatra se da je primarna uloga AQP4 transport vode koji je neophodan za održavanje jonske i volumenske homeostaze u sinapsama CNS nakon aktivnosti neurona. Ranije studije su pokazale da pri intenzivnoj aktivnosti neurona dolazi do skupljanja vanćelijskog prostora što je ukazalo na intenzivan transport vode sa mesta sinaptičke aktivacije (Dietzel et al., 1980; Lux et al., 1986; Holthoff and Witte, 2000). Transport vode posredovan AQP4 se dešava u oba smera i nošen je osmotskim gradijentom. Voda preuzeta sa mesta sinaptičke aktivacije se oslobađa u krv ili CSF (**Slika 6**). Prema jednoj studiji AQP4 ima najveći koeficijent propustljivosti za vodu među svim akvaporinima (Yang and Verkman, 1997). Nico et al. (2001) je ukazao na značajnu ulogu AQP4 u razvoju i uspostavljanju funkcije HEB ukazujući na značaj transporta vode u razviću mozga. U istoj studiji je pokazano da tretman LPS dovodi do

oštećenja HEB koje je praćeno oticanjem astrocitnih stopala i gubitkom AQP4. Ispitivanja na mišu koji ne eksprimira AQP4 (AQP4<sup>-/-</sup>) su pokazala otvaranje čvrstih veza, oticanje astrocitnih stopala i povećanu propustljivost HEB (Zhou et al., 2008).

Promene u ekspresiji AQP4 su u vezi sa nekim patološkim stanjima u mozgu. Najviše je ispitana uloga AQP4 u nastajanju edema mozga. U studiji Manley et al. (2000) je uočeno da se edem koji je izazvan hipoosmotskim stresom smanjuje u AQP4<sup>-/-</sup> mišu u poređenju sa mišem divljeg soja. Na istom modelu miša je pokazano smanjenje edema izazvanog meningitisom i produžen životni vek ovih životinja (Papadopoulos and Verkman, 2005). Smanjeno oticanje mozga je uočeno i u  $\alpha$ -sintrofin<sup>-/-</sup> mišu nakon hipoosmotskog stresa (Amiry-Moghaddam et al., 2003, 2004). Ispitivanja na pacovu su pokazala povećanu količinu informacione RNK za AQP4 tri dana nakon izazvane ishemije (Taniguchi et al., 2000). Ribeiro et al. (2006) je pokazao povećanu ekspresiju AQP4 1h i 48h nakon fokalne cerebralne ishemije. U vezi sa ALS, uočena je povećana ekspresija AQP4 u kičmenoj moždini SOD1<sup>G93A</sup> pacova, kao i oticanje astrocitnih stopala (Nicaise et al., 2009a).



**Slika 6.** Uloga Kir4.1 i AQP4. Astrocitna stopala se karakterišu velikom zastupljenošću Kir4.1 i AQP4 na membranama koje okružuju sinapse i krvne sudove. U cilju održavanja jonske homeostaze, astroцитi preuzimaju višak K<sup>+</sup> iz regiona intenzivne neuronalne aktivnosti posredstvom Kir4.1. K<sup>+</sup> se dalje sprovodi u smeru gradijenta koncentracije i oslobađa u krvotok (prostorno puferovanje K<sup>+</sup>). Da bi se istovremeno održala i osmotska homeostaza, preuzimanje viška K<sup>+</sup> iz oblasti sinapse je praćeno preuzimanjem vode posredstvom AQP4 i oslobađanjem u krvotok. Modifikovano iz Hibino et al. (2010).

## Struktura i funkcija Kir4.1

Kir kanale čine dva transmembranska domena povezana ekstraćelijskim delom koji formira poru. Karboksilni i amino kraj su orjentisani ka citoplazmi. Ovakva struktura Kir kanala ne formira funkcionalnu celinu. Zato se ove subjedinice udružuju u homo- i heterotetramerne komplekse koji čine funkcionalni Kir kanal (Glowatzki et al., 1995; Yang et al., 1995). Do danas je kodirano 15 gena za Kir kanale koji su grupisani u sedam familija Kir1.x do Kir7.x.

Ulazne ispravljačke  $K^+$  struje su prvi put registrovane u skeletnim mišićima (Ito et al., 1992). Nasuprot očekivanom detektovanju izlaznih  $K^+$  ispravljačkih struja, uočene su ulazne struje koje su zavisile od elektrohemijskog gradijenta za  $K^+$ . U fiziološkim uslovima, Kir kanali se karakterišu velikom verovatnoćom otvaranja i velikom provodljivošću za  $K^+$  na potencijalima negativnijim od ravnotežnog potencijala za  $K^+$  ( $E_k$ ; Hagiwara and Takahashi, 1974; Miyazaki et al., 1974; Sakmann and Trube, 1984). Ukoliko ćelije ekspimiraju veliku količinu Kir kanala, njihov potencijal mirovanja je blizak  $E_k$ . Kir kanali imaju veliki značaj u održavanju potencijala mirovanja. Provodljivost Kir kanala zavisi od koncentracija vanćelijskog  $K^+$  ( $[K^+]_o$ ). Sa porastom  $[K^+]_o$  provodljivost Kir kanala raste i taj porast je srazmeran korenu iz  $[K^+]_o$  (Hagiwara and Takahashi, 1974; Kubo et al., 1993; Lopatin and Nichols, 1993; Sakmann and Trube, 1984). Ova osobina Kir kanala ukazuje da se oni ponašaju po modelu pore za veći broj jona (Hille and Schwarz, 1978). Kir struje su osetljive na vanćelijske dvovalentne katjone i inhibiraju ih mikromolarne koncentracije  $Cs^+$  and  $Ba^{2+}$  (Newman, 1993; Ransom and Sontheimer, 1995).

Među Kir kanalima u mozgu su najprisutniji Kir4.1 i Kir5.1. Funkcionalan kanal je prisutan kao homotetramer, ali može formirati i heterodimer koga čine Kir4.1 i Kir5.1. Kir4.1 ekspimiraju astrociti i oligodendrociti u CNS (Higashi et al., 2001; Neusch et al., 2006; Olsen et al., 2006; Poopalasundaram et al., 2000; Yamamoto et al., 2008) i Milerove ćelije u retini (Ishii et al., 1997; Kofuji et al., 2002). Higashi et al. (2001) je pokazao da je Kir4.1 ekspimiran na astrocitnim stopalima koja okružuju okružuju sinapse, tela neurona, krvne sudove i površinu mozga. Jedan od najvažnijih zadataka astrocita jeste održavanje jonske i osmotske homeostaze u vanćelijskoj sredini. Astrociti uklanjaju višak  $K^+$  oslobođen pri aktivnosti neurona iz regiona visoke  $[K^+]_o$  u

regione niskom  $[K^+]_o$  što je označeno kao prostorno puferovanje  $K^+$  (Newman, 1984; Orkand et al., 1966). Preuzimanje viška  $K^+$  je praćeno preuzimanjem vode posredstvom AQP4 u cilju održavanja osmotske homeostaze što dovodi do neznatnog oticanja ćelije (Dietzel et al., 1980, 1989). Kako bi višak  $K^+$  narušio normalno funkcionisanje neurona, brzo uklanjanje  $K^+$  od strane astrocita je ključno za regularno funkcionisanje sinapsi. Regulacija koncentracije  $K^+$  je posredovana Kir kanalima eksprimiranim na astrocitnim stopalima (**Slika 5**).

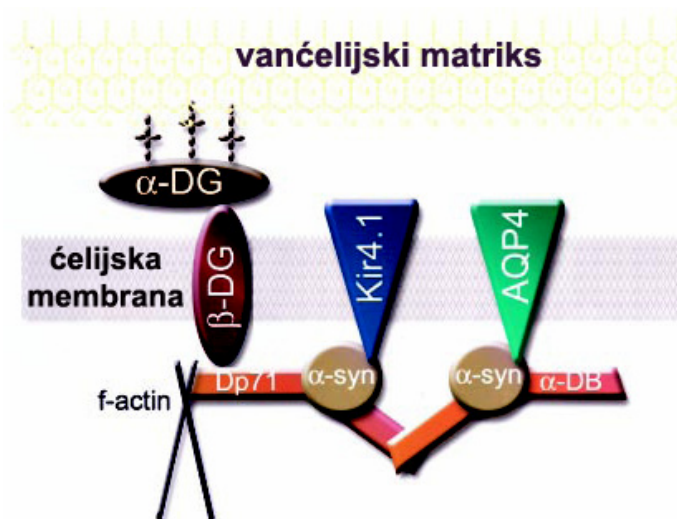
Značaj Kir4.1 u puferovanju  $K^+$  je utvrđen ispitivanjem mutantnih sojeva koji ne eksprimiraju Kir4.1 (Kir4.1<sup>-/-</sup>). Ispitivanja na Kir4.1<sup>-/-</sup> mišu su pokazala povećanje membranskog otpora, smanjenje provodljivosti za  $K^+$  i depolarizaciju membranskog potencijala u Milerovim ćelijama i astrocitima (Kofuji et al., 2000; Djukic et al., 2007). Primena malih interferirajućih RNK (siRNK) koje specifično blokiraju ekspresiju Kir4.1 u kortikalnim pacovskim astrocitima u kulturi je dovela do smanjenja potencijala mirovanja i smanjene sposobnosti za puferovanje  $K^+$  pri porastu  $[K^+]_o$  (Kucheryavykh et al., 2007). Ovi eksperimenti su potvrdili da je Kir4.1 funkcionalno najznačajniji tip Kir kanala u astrocitima.

S obzirom da su neuroni osjetljivi na promene u vanćelijskoj sredini, porast  $[K^+]_o$  može voditi povećanoj ekscitabilnosti neurona i epileptogenezi (D'Ambrosio, 2004). Smanjenje Kir struja je uočeno u različitim modelima epilepsije kao i epileptičnom tkivu čoveka (Bordey et al., 2000, 2001; D'Ambrosio et al., 1999; Schroder et al., 2000). Takođe, Kir struje su značajno redukovane u astrocitima koji okružuju mesta ishemičnog oštećenja (Köller et al., 2000). Pokazano je da Kir4.1 ima značajnu ulogu u kontroli oticanja astrocitnih stopala pri izazivanju edema u kičmenoj moždini miša (Dibaj et al., 2007). Gubitak Kir4.1 je uočen u glijalnim ćelijama kičmene moždine SOD1<sup>G93A</sup> ALS modela miša i bivao je izraženiji sa progresijom bolesti (Kaiser et al., 2006).

### **Interakcija AQP4 i Kir4.1**

Pokazano je da Kir4.1 kanali kolokalizuju sa AQP4 na membrani astrocitnih stopala (Nagelhus et al., 1999; 2004). Dalja istraživanja su bila usmerena u detaljnijem ispitivanju distribucije i interakcije ova dva kanala. Utvrđeno je da je distribucija AQP4

u membrani određena distrofinom i  $\alpha$ -sintrofinom (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Vajda et al., 2000). Ispitivanja na hipokampusu  $\alpha$ -sintrofin<sup>-/-</sup> miša su pokazala značajnu redukciju u ekspresiji AQP4 što je ukazalo na značaj  $\alpha$ -sintrofina u pozicioniranju AQP4 u ćelijskoj membrani (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Studija Connors et al. (2004) je pokazala da se Kir4.1 vezuje za  $\alpha$ -sintrofin koji potom ostvaruje kontakt sa distrofinskim kompleksom. U istoj studiji je predložen model vezivanja AQP4 i Kir4.1 i njihove interakcije posredstvom  $\alpha$ -sintrofina i komponenti distrofinskog kompleksa (Slika 7). Bliska lokalizacija ova dva kanala je ukazala na mogućnost njihove funkcionalne veze. Ispitivanja na  $\alpha$ -sintrofin<sup>-/-</sup> mišu su pokazala da je transport vode neophodan da bi se efikasno uklonio K<sup>+</sup> oslobođen usled aktivnosti neurona (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Eksperimenti na AQP4<sup>-/-</sup> mišu su pokazali da su AQP4 kanali bitni za regulaciju K<sup>+</sup> homeostaze (Strohschein et al., 2011). Nedavna studija je pokazala da je provodljivost vode zavisna od koncentracije vanćelijskog K<sup>+</sup> i to cAMP signalnim putem (Song and Gunnarson, 2012).



**Slika 7.** Model vezivanja AQP4 i Kir4.1. I AQP4 i Kir4.1 se mogu vezivati za molekule  $\alpha$ -sintrofina ( $\alpha$ -syn), a on se može vezati za proteina distrofinske familije, ili za  $\alpha$ -distrobrevin ( $\alpha$ -DB), ili za Dp71. Na ovaj način se AQP4 i Kir4.1 dovode u interakciju. Pored toga, Dp71 može ostvariti vezu sa membranskim distroglikanima (DG) koji posreduju u ostvarivanju veze sa vanćelijskim matriksom. Modifikovano iz Connors et al. (2004).

## CILJ ISTRAŽIVANJA

---

Cilj ovih istraživanja je da se lokalizuju žarišta neurodegenerativnih promena i okarakterišu neuroinflamatorni procesi u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacovskog modela amiotrofične lateralne skleroze, kao i da se ispita ekspresija, distribucija i funkcionalne osobine astrocitnih proteina koji doprinose stabilnosti krvno-moždane barijere.

Iz opisanih ciljeva proizašli su sledeći zadaci istraživanja:

1. Ispitati strukturne karakteristike mozga hSOD1<sup>G93A</sup> pacova kako bi se lokalizovala žarišta neurodegeneracije i utvrdila sličnost sa oštećenim moždanim regionima kod ALS pacijenata.
2. Istražiti infiltraciju T-limfocita u moždano tkivo, prisustvo aktivirane mikroglije i reaktivnih astrocita u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova da bi se utvrdila žarišta neuroinflamatornih procesa. Promene u strukturi različitih tipova nervnih ćelija će ukazati na njihovu ulogu u neurodegenerativnim i neuroinflamatornim promenama.
3. Ispitati stabilnost krvno-moždane barijere u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova kako bi se utvrdilo da li dolazi do njenog oštećenja u ALS. Na taj način će se doći do podataka o značaju krvno-moždane barijere u neuroinflamaciji u ALS.
4. Ispitati ekspresiju i distribuciju astrocitnih transmembranskih proteina akvaporina-4 i ulaznog kalijumovog ispravljača Kir4.1 što će pružiti detaljnije podatke o stabilnosti krvno-moždane barijere u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.
5. Ispitati funkcionalna svojstva ulaznih ispravljačkih kalijumovih kanala u kortikalnim ALS astrocitima u kulturi kako bi se proverila očuvanost homeostaze jona u nivou krvno-moždane barijere.



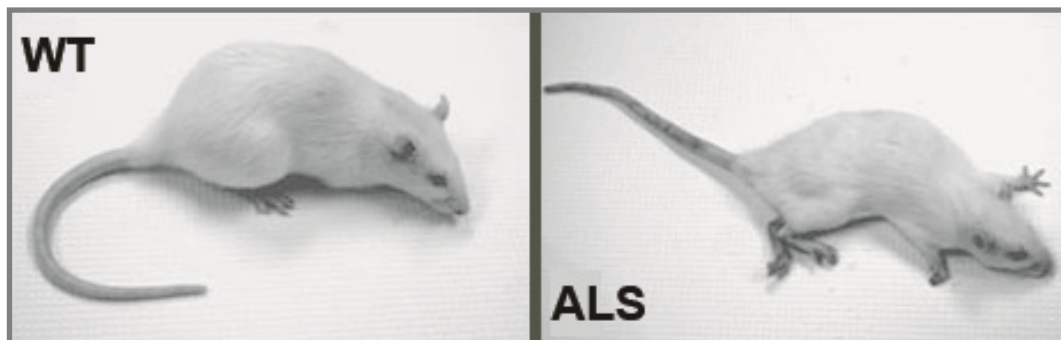
Dobijeni rezultati bi trebalo da pruže nove podatke o neurodegenerativnim i neuroinflamatornim procesima u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova, da razjasne da li je krvno-moždana barijera narušena u ALS i da objasne ulogu astrocitnih transmembranskih proteina koji doprinose stabilnosti krvno-moždane barijere u ALS.

## MATERIJALI I METODE

---

### EKSPERIMENTALNI MODEL ALS

U eksperimentima su korišćeni pacovi soja *Sprague-Dawley*. Kontrolnu grupu su činile životinje divljeg soja (WT). Kao model ALS korišćena je posebno generisana linija transgenih pacova koji nose veliki broj kopija humanog SOD1 gena sa tačkastom mutacijom na poziciji 93 gde je glicin zamenjen alaninom (hSOD1<sup>G93A</sup>; Taconic, Hudson, NY, SAD). Ove životinje pokazuju simptome bolesti motornih neurona i smatraju se pogodnim modelom za ispitivanje ALS. Prvi put je pacovski hSOD1<sup>G93A</sup> model ALS detaljno opisao Howland et al. (2002). Simptomi bolesti se ispoljavaju unilateralno kao otežan hod i slabost zadnjeg ekstremiteta. Nakon nekoliko dana uočavaju se slabost i paraliza drugog zadnjeg ekstremiteta. Progresija bolesti je vrlo brza i već nakon 15-20 dana od pojave simptoma zadnji ekstremiteti su potpuno paralizovani (**Slika 8**). Potom se primećuje slabost prednjih ekstremiteta i otežana mogućnost uzimanja hrane i vode. Krajnja faza bolesti nastupa kada pacov nije u mogućnosti da se uspravi duže od 30 s pri okretanju na bok. Sve faze bolesti su praćene izraženim gubitkom telesne mase.



**Slika 8.** WT pacov (levo) i hSOD1<sup>G93A</sup> pacov koji pokazuje simptome ALS (desno). Oboleli pacov je u krajnjoj fazi bolesti i pokazuje paralizu zadnjih i slabost u prednjim ekstremitetima. Modifikovano iz Howland et al. (2002).

Patološke promene u kičmenoj moždini i moždanom stablu pacovskog modela ALS su vidljive i pre pojave simptoma bolesti. Na ćelijskom nivou su prisutne inkluzije imunorektivne na SOD1 i ubikvitin što se smatra i prvim znakom ALS. Gliozna i gubitak glutamatnog transportera GLT-1 se uočavaju u kičmenoj moždini pre odumiranja

motorih neurona, a sa pojavom simptoma i progresijom bolesti bivaju sve izraženiji ukazujući na značaj glutamata i astrocita u patogenezi bolesti. Ovako generisana pacovska linija se smatra pogodnim eksperimentalnim modelom za ispitivanje ALS, posebno za istraživanje novih terapijskih pristupa.

**Tabela 1. Kriterijumi za procenu početka i progresije ALS**

Parametar	Procena parametra	Vrednost parametra
Pokretljivost u kavezu	normalna	2
	oslabljena	1
	nepokretan	0
Pokretljivost na stolu	normalna	2
	oslabljena	1
	nepokretan	0
Rotacija oko ose repa	Da	1
	Ne	0
Atrofija	nema atrofije	2
	unilateralna	1
	bilateralna	0

Predstavljeni su parametri koji su korišćeni za određivanje stepena pokretljivosti i atrofije mišića ALS pacova. Svakom parametru je dodeljena određena vrednost (0, 1 ili 2). Zbir vrednosti ispitivanih parametara je iznosio 7 za zdravog pacova, dok je odstupanje od ove vrednosti ukazivalo na pojavu simptoma ALS. U eksperimentima su korišćeni pacovi kod kojih je zbir vrednosti ispitivanih parametara iznosio 3 ili 4.

Da bi se održala linija ALS pacova, ukršteni su mužjaci koji nose transgen  $hSOD1^{G93A}$  sa ženkama divljeg soja, ili transgene ženke sa WT mužjacima. Prisustvo transgena kod potomaka je praćeno standardnom metodom polimerazne lančane reakcije (PCR). U eksperimentalne procedure su uključeni pacovi kod kojih je pokazano prisustvo transgena u genomske DNK i praćena je pojava simptoma ALS. Ukrštanjem mužjaka i ženki divljeg soja dobijeno je WT potomstvo kao kontrolna grupa pacova. Kako bi se utvrdili početak i progresija bolesti kod ALS pacova, praćeno je nekoliko parametara: pokretljivost u kavezu, pokretljivost na stolu, test rotacije oko ose repa i stepen atrofije mišića. Svaki od parametara je procenjivan prema kriterijumima datim u **Tabeli 1**. Dodatno je proveravana masa životinja. Svi eksperimenti su izvođeni u skladu

sa standardima za gajenje životinja propisanim od strane Srpskog udruženja za proučavanje laboratorijskih životinja i odobreni su od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### STANDARDNA PCR METODA ZA GENOTIPIZACIJU PACOVA

U cilju utvrđivanja prisustva transgena hSOD1 kod pacova, urađen je PCR na DNK izolovanoj iz tkiva. Od svakog pacova je uzet odsečak repa veličine 0,5-1 cm i stavljen u 0,3 ml pufera za digestiju (TDB) koji sadrži: 50 mM Tris pufera pH 8,0, 50 mM EDTA i 0,5% natrijum dodecil sulfat (SDS). Odsečki su inkubirani u TDB 15 min na +65°C u cilju inaktivacije enzima koji razgrađuju DNK. Zatim je u svaki uzorak dodato 0,2 ml smeše proteinaze K i TDB i to u odnosu 175 µl TDB i 25 µl proteinaze K koncentracije 10 mg/ml. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani tokom noći na +56°C. Digestirani repovi su centrifugirani pri brzini rotacije 14000 x g u trajanju od 5 min. Supernatant je razblažen 20 puta u dejonizovanoj vodi (ddH<sub>2</sub>O) i inkubiran 15 min na +95°C. Svaku PCR smešu su činile sledeće komponente:

12,5 µl PCR Master Mix (smeša nukleotida, MgCl<sub>2</sub> i Taq DNK polimeraze neophodne za otpočinjanje PCR reakcije; Fermentas, Nemačka)

9,5 µl ddH<sub>2</sub>O

1 µl napredujućeg SODi3-f prajmera (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA)

1 µl reverznog SODE4-r prajmera (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA)

1 µl uzorka izolovane DNK

Pored uzoraka koje je trebalo ispitati, pripremani su kontrolni uzorci:

pozitivna kontrola – ALS pacov koji je pokazao simptome i ima hSOD1<sup>G93A</sup> transgen,

negativna kontrola – WT pacov koji nema hSOD1<sup>G93A</sup> transgen,

kontrola PCR reakcije – uzorak ddH<sub>2</sub>O.

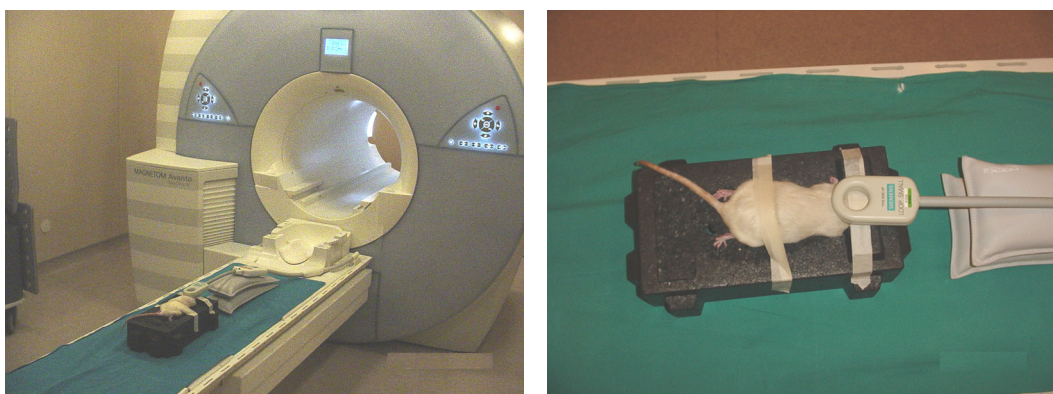
PCR reakcija se odvijala u više ciklusa:

1 ciklus	35 ciklusa	1 ciklus
95°C, 5 min	95°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C, 2 min	72°C, 5 min

Nakon završene PCR reakcije, uzorci su nalivani na 1.7% agarozni gel koji sadrži etidijum bromid i razdvajani horizontalnom elektroforezom na 100 V u trajanju od 20 min. Gel je osvetljen na transiluminatoru i uslikan kamerom.

### MRI SNIMANJE PACOVA

Primenom MRI metode su ispitivani ALS pacovi u simptomatičnoj fazi i kontrolne životinje divljeg soja odgovarajućeg uzrasta kako bi se ispitale promene u mozgu nastale sa pojavom bolesti. Pacovi su anestetizirani intramuskularnom injekcijom nembutala u dozi 45 mg/kg ili intraperitonealnom injekcijom rastvora tiletamina (25 mg/ml) i zolazepama (25 mg/ml) u dozi 0.5 mg/kg (komercijalni naziv Zoletil; Virbac, Carros, Francuska). Odsustvo refleksa povlačenja ekstremiteta pri štipanju, kao i odsustvo kornealnog refleksa su ukazivali da je životinja u dubokoj anesteziji.



**Slika 9.** Eksperimentalna postavka za MRI snimanje. Levo: prikaz kliničkog uređaja magneta jačine 1,5 T (Siemens). Desno: položaj pacova i zavojnice tokom MRI snimanja.

Pacovi su postavljeni u ležeći položaj na stomak i dodatno učvršćeni za izdignutu podlogu laboratorijske izrade (**Slika 9**). Površinska zavojnica prečnika 3 cm je smeštana na glavu pacova u cilju snimanja mozga (**Slika 9**). Standardna T1-utežena

(*T1-weighted*; T1W) i T2-utežena (*T2-weighted*; T2W) snimanja pacova su urađena na kliničkom uređaju magneta jačine 1,5 T (*Avanto MRI imager*, Siemens; **Slika 9**).

Primenjene sekvence su opisane sledećim parametrima: vreme ponavljanja (*Repetition Time*; TR) i vreme eha (*Echo Time*; TE). Pri snimanju pacova, primenjena je *spin-echo* sekvenca za dobijanje T2W slika čiji su parametri imali vrednosti (TR/TE): 5800/200 ili 4000/92 ms. Parametri primenjene T1W sekvence imali su vrednosti: TR=400 ms i TE=23 ms. Debljina preseka je bila podešena na 1,5 mm, a dimenzije vokseli su bile 1,5 x 0,2 x 0,3 mm. Kako bi se povećao odnos signala i šuma, broj usrednjavanja pri snimanju je bio 10. Ukupno vreme snimanja uključujući pripremu životinje za snimanje je iznosilo približno 45 min. Nakon snimanja, pacovi su grejani i praćeni do potpunog oporavka.

Da bi se ispitalo stanje HEB kod ALS pacova, korišćen je gadolinijum dietilentriaminpentaacetat (Gd-DTPA) kao kontrastni agens. Gadolinijum skraćuje T1 vreme relaksacije što daje signal pojačanog intenziteta na T1W slikama. Ukoliko je očuvana HEB signal koji potiče od Gd-DTPA se uočava samo u krvnim sudovima, dok prisustvo signala u tkivu ukazuje na oštećenje HEB. Gd-DTPA je apliciran kroz repnu venu u sistemsku cirkulaciju u koncentraciji 0,2 mmol/kg (*Magnevist*, Nemačka). Pacovi su snimani korišćenjem T1W protokola u identičnim uslovima pre i nakon dodavanja Gd-DTPA. Slike dobijene na ovaj način su dodatno obrađivane u programu ImageJ. Za svaki presek je napravljena razlika između slike dobijene pre i nakon dodavanja Gd-DTPA.

U cilju ispitivanja infiltracije inflamatornih ćelija u moždano tkivo, korišćena su posebno proizvedena antitela koja prepoznaju CD4 i CD8 receptore. Ova antitela su obeležena ultra malim paramagnetnim partikulama gvožđe oksida (eng. *ultrasmall superparamagnetic iron oxide*; USPIO; MACS®, Miltenyi Biotec, Nemačka). Prednost ovako dizajniranih antitela je mogućnost njihove detekcije u nanomolarnim koncentracijama primenom MRI metode. Ove partikule skraćuju T2 vreme relaksacije što daje signal smanjenog intenziteta na T2\*W slikama. Antitela obeležena USPIO markerima su aplicirana intravenski u sistemsku cirkulaciju pacova u sledećoj dozi: 200 µl MACS® i 300 µl fiziološkog rastvora. Vreme aplikacije je bilo 20-24 h pre snimanja što je procenjeno kao optimalno vreme za njihovu inkubaciju (Pirko et al., 2004). Životinje su snimane u MRI uređaju čiji je magnet jačine 1,5 T (Siemens) koristeći

gradient-echo T2\*-uteženu sekvencu (T2\*W) sa sledećim parametrima (TR/TE): 100/25 i 100/35 ms. Produžavanje TE u *gradient-echo* T2\*W sekvenci povećava površinu koju prekriva signal niskog intenziteta koji potiče od apliciranih USPIO markera što je i potvrda da su antitela sa paramagnetnim svojstvima infiltrirana u moždano tkivo.

Pacovi u simptomatičnoj fazi bolesti su dodatno ispitivani korišćenjem 7 T MRI uređaja (Pharmascan, Bruker, Nemačka) kako bi se poboljšala rezolucija pri snimanju i potvrdile promene uočene primenom kliničkog uređaja. Pacovi su anestetizirani inhalacijom izofluorenom i dubina anestezije je kontrolisana tokom snimanja. Dodatno su proveravani telesna temperatura i disanje životinje. Primenjene su sledeće sekvence:

- ◆ turbo RARE T2W sekvenca TR/TE=5000/46 ms,
- ◆ RARE T1W sekvenca TR/TE=400/11,7 ms pre i nakon dodavanja Gd-DTPA.

Dodatne karakteristike snimanja su bile debljina preseka koja je iznosila 0,8 mm, dimenzije vokseli 0,12 x 0,12 x 0,8 mm, a broj usrednjavanja po preseku je bio dva.

## WESTERN BLOT

### Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva

Proteini su izolovani iz moždanog tkiva kontrolnih i hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Životinje su dekapitovane, a dalji koraci izolacije mozga su rađeni na ledu, uklonjena je lobanja i brzo je izolovan mozak. Odvojeni su regioni moždanog stabla i moždane kore i zamrznuti na -80°C do dalje upotrebe. Zamrznuti uzorci su homogenizovani u hladnom puferu za liziranje (RIPA) koji sadrži 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0,1% SDS, 0,5% Triton X-100 i dodatno razblažene protezne inhibitore (1 tableta proteaznih inhibitora je rastvarana u 50 ml RIPA pufera; Roche, Mannheim, Nemačka). Moždano stablo je homogenizovano u 1,5 ml, a moždana kora u 4 ml RIPA pufera sa proteaznim inhibitorima. Homogenizovano tkivo je sonifikovano 30 s, inkubirano 15 min na ledu i zatim centrifugirano na 14000 rpm u trajanju od 25 min na +4°C. Za dalju analizu je korišćen supernatant.

## Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana spektrofotometrijskom metodom po Lowry-ju (Lowry et al., 1951). Korišćeni su sledeći rastvori:

Rastvor 1: 20 mg Na-K tartarata u 2 ml 0,5%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Rastvor 2: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 2 g NaOH u 500 ml ddH<sub>2</sub>O

Radni reagens: 1 ml rastvora 1 i 49 ml rastvora 2

Folinov reagens: *Folin-Chicalteau* reagens razblažen vodom u odnosu 1:2

Uzorci prethodno izolovanih proteina su razblaživani 400 puta u ddH<sub>2</sub>O. Od svakog razblaženog uzorka je uzimano 100  $\mu\text{l}$  i dodavano 100  $\mu\text{l}$  2% SDS. Ovako dobijena smeša je snažno promešana, a zatim je u svaki uzorak dodato po 1 ml radnog reagensa. Smeša je snažno promešana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 100  $\mu\text{l}$  Folinovog reagensa u svaki uzorak i snažnog mešanja, uzorci su inkubirani 20 min u mraku. Fenolne grupe aromatičnih aminokiselina u interakciji sa Folinovim reagensom su dovodile do prelaska žute boje rastvora u plavu sa maksimumom apsorpcije na 750 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Švedska). Intenzitet boje je bio proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija proteina u uzorcima je očitavana sa standardne krive koja je konstruisana određivanjem apsorbanace rastvora albumina govečeta (BSA) poznate koncentracije. Nakon određivanja koncentracije proteina, svi uzorci su razblaživani do koncentracije 2 mg/ml.

## Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je metoda za razdvajanje denaturisanih proteina na gelu na osnovu razlika u njihovoj relativnoj molekularnoj masi. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamida i N,N-metilen-bis-akrilamida, a za iniciranje procesa polimerizacije se dodaju amonijum persulfata (APS) i N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED). Polimerizacijom akrilamida nastaju dugački lanci polimera, dok bis-akrilamid formira poprečne veze. Na taj način nastaje mrežasta struktura gela koja se odlikuje određenom veličinom pora. Upravo veličina pora u gelu



određuje kako će biti razdvojeni molekuli koji se nanose na gel. Veličina pora u gelu se reguliše zastupljenošću bis-akrilamida u gelu, što je više prisutan, više će biti poprečnih veza u gelu, a pore će biti manje.

Da bi se razdvojili proteini iz prethodno pripremljenih uzoraka, najpre je nalivan 12% gel za razdvajanje čija je koncentracija određena molekulskom masom ispitivanih proteina (35 i 40 kDa). Reakcija polimerizacije gela se dešavala odmah nakon dodavanja APS i TEMED, pa je bilo neophodno brzo nanošenje gela u kalup. Kada je gel za razdvajanje potpuno polimerizovao, postavljani su češljici i nalivan je 4% gel za koncentrovanje. Komponente gela za razdvajanje i gela za koncentrovanje su prikazane u **Tabeli 2**. Uklanjanjem češljica su oslobađani bunarići za nanošenje uzoraka. Uzorci su razblaživani *Laemml*-SDS puferom koji sadrži 2.5%  $\beta$ -merkaptotanol do koncentracije 1 mg/ml. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 min u vodi koja ključa u cilju potpune denaturacije proteina, zatim su snažno promešani i u jednakim količinama nanošeni u bunariće (15 ili 35  $\mu$ g). Na svaki gel je nanošen proteinski standard koga čine proteini poznatih molekulskih masa radi provere molekulske mase ispitivanog proteina. Gel sa uzorcima je prelivan puferom za elektroforezu koji sadrži 25 mM Tris, 190 mM glicin i 0,1% SDS. Proteini su razdvajani elektroforezom pri naponu od 100 V u trajanju od 45 min, a zatim je voltaža povećavana na 120 V i elektroforeza je trajala dodatnih 90 min (Criterion Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD).

**Tabela 2. Komponente gelova za razdvajanje i koncentrovanje proteina**

12 % GEL ZA RAZDVAJANJE		4% GEL ZA KONCENTROVANJE	
ddH <sub>2</sub> O	3,35 ml	ddH <sub>2</sub> O	3,05 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
30% akrilamid	4 ml	30% akrilamid	0,665 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	10% SDS	50 $\mu$ l
neposredno pre nalivanja dodati		neposredno pre nalivanja dodati	
10% APS	100 $\mu$ l	10% APS	25 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l	TEMED	5 $\mu$ l

Predstavljeni su sastav i koncentracije jedinjenja korišćenih za pripremu gelova za razdvajanje i koncentrovanje proteina.

## **Prenos proteina sa gela na membranu**

Proteini razdvojeni elektroforezom su prenošeni sa gela na poliviniliden difluorid (PVDF; Amersham, Buckinghamshire, Engleska) membranu u uređaju za transfer u vlažnoj atmosferi (Criterion blotter, Bio-Rad). PVDF membrane su aktivirane u metanolu u trajanju od 2 min, isprane u ddH<sub>2</sub>O dok nisu potonule i čuvane u puferu za transfer koji sadrži 0,037% SDS, 20% metanol i 39 mM glicin u 48 mM Tris puferu. Komponente za transfer su čuvane potopljene u puferu za transfer i slojevito su raspoređivane na sledeći način: sunder, filter papir, gel, membrana, filter papir i sunder. Ovako pripremljeni gel i membrana su postavljeni u uređaj za transfer i prelivani puferom za transfer. Gel je postavljan bliže katodi, a membrana bliže anodi. Negativno naelektrisani proteini su se kretali ka anodi i dešavao se prenos proteina sa gela na membranu. Prenos proteina na membranu se dešavao preko noći na +4°C, pri konstantnoj jačini struje od 20 mA po gelu.

## **Imunodetekcija proteina**

Nakon transfera proteina, membrane su isprane u rastvoru TBST pufera (eng. *Tris-Buffered Saline Tween-20*) koji sadrži 150 mM NaCl u 50 mM Tris pH 7.5 i 0.1% *Tween-20*. Membrane su blokirane u 5% rastvoru nemasnog mleka u prahu u TBST 90 min na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa rastvorom primarnog antitela u TBST u trajanju od 90 min na sobnoj temperaturi. U eksperimentima su korišćena sledeća primarna antitela: zečje antitelo protiv AQP4 (razblaženje 1:1000, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Nemačka), zečje antitelo protiv Kir4.1 (razblaženje 1:2000, Alomone Labs, Jerusalem, Izrael) i mišje antitelo protiv  $\beta$ -tubulina (razblaženje 1:1000, AbD Serotec, Dusseldorf, Nemačka) koje je korišćeno kao kontrola. Posle četiri ispiranja po 10 min, membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Korišćena su sledeća sekundarna antitela: kozje antitelo protiv zeca (razblaženje 1:5000, Abcam, Cambridge, Engleska) ili goveđe antitelo protiv miša (razblaženje 1:5000, Santa Cruz, Heidelberg, Nemačka). Membrane su ponovo isprane četiri puta po 10 min, a zatim inkubirane sa rastvorom za detekciju hemiluminiscencije ECL (Amersham). Detekcija se obavljala u

mračnoj komori. Membrana je postavljena između dve providne folije i smeštena u kasetu za detekciju (HyperCassette; Amersham). Preko membrane je stavljen rentgenski film i kasetu je zatvorena. Ekspozicija filma je trajala nekoliko minuta, a zatim je film razvijan u razvijaju i fiksiran (Ilford, Marly, Švajcarska). Razvijeni filmovi su osušeni i skenirani za dalju analizu. Kvantifikacija intenziteta dobijenih traka je urađena u programu ImageJ (National Institute of Health, SAD) korišćenjem funkcije *Gel Analysis*. Eksperimenti su urađeni u triplikatu za region moždanog stabla i u duplikatu za region moždane kore. Relativna gustina intenziteta traka koje odgovaraju ALS pacovima je izražena kao procentualna vrednost relativne gustine intenziteta traka koje odgovaraju WT pacovima a dodeljena im je vrednost 100%.

## **IMUNOFLUORESCENCIJA**

### **Priprema moždanog tkiva**

Postupak pripreme tkiva za imunohistohemijske eksperimente naziva se transkardijalna perfuzija. Prednost ovog načina pripreme tkiva je uklanjanje krvi iz tkiva životinje što kasnije ukida nespecifično vezivanje antitela. Pored toga, potpuno prodiranje fiksativa u tkivo daje očuvanu sliku arhitekture tkiva i ćelijske morfologije.

Rastvori za perfuziju su pravljani u 0,1 M fosfatnom puferu koji sadrži 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  i 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4. Fiziološki rastvor (PBS) je dobijen pravljnjem 147 mM NaCl u deset puta razblaženom 0,1 M fosfatnom puferu.

Sistem za perfuziju su činile dve boce od kojih je jedna ispunjena PBS, a druga 4% paraformaldehidom (PFA) u 0,1 M fosfatnom puferu. Od svake boce su polazile odvodne cevčice koje su posebnim adapterom spojene u glavnu cevku koja se završava kanilom. Adapterom je regulisano koji od rastvora će proticati kroz sistem. Boce su postavljane na određenu visinu u odnosu na radnu površinu kako bi tečnost isticala pod dejstvom gravitacione sile. Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom rastvora tiletamina (25 mg/ml) i zolazepamom (25 mg/ml) u dozi 0.5 mg/kg. Odsustvo refleksa povlačenja ekstremiteta pri štipanju, kao i odsustvo kornealnog refleksa su ukazivali da je životinja u dubokoj anesteziji. Tokom pripreme životinje, sistem za perfuziju je podešen da protiče PBS. Životinja je postavljena leđima na stalak, a

ekstremiteti su pričvršćeni vezivanjem za postolje. Grudni koš je otvaran sečenjem od vrha grudne kosti ka pazušnim jamama uz posebnu pažnju da se ne ošteti srce. Peanom je učvršćen otvoreni grudni koš kako bi srce bilo dostupno. Srce je blago stisnuto prstima kada je jasno uočena tačka na vrhu srca koja najjače pulsira, a predstavlja vrh leve srčane komore. U ovoj tački je uvedena kanila u srce, taman toliko da se peanom obuhvate deo srčanog tkiva i kanila. Usled isticanja PBS kroz kanilu dolazilo je do oticanja desne pretkomore koja se razlikuje po tamnijoj boji od ostatka srčanog tkiva. Presecanjem desne pretkomore je obezbeđeno da rastvor PBS potpuno istisne krv iz cirkulatornog sistema. Prvi znak pravilno izvedene perfuzije je obezbojavanje jetre. Čim je jetra obezbojena, sistem za perfuziju je podešen da ističe 4% PFA. Drugi znak pravilno izvedene perfuzije jeste trzanje ekstremiteta pri prvom prolasku 4% PFA kroz tkivo. Kako bi se obezbedila bolja fiksacija tkiva, kanila je postavljena u aortu. Za životinju telesne mase približno 300 g potrebna je zapremina od 250 ml 4% PFA za fiksaciju tkiva. Kada je celokupna zapremina 4% PFA istekla, životinja je sklonjena sa sistema za perfuziju, dekapitovana je i izolovan je mozak. Ovako fiksiran mozak je čvrst i obezbojen. Mozak je stavljan u 4% PFA preko noći na +4°C u cilju dodatne fiksacije, a zatim u rastvore saharoze rastuće koncentracije 10, 20 i 30%. Uloga saharoze je krioprotekcija tkiva i priprema za zamrzavanje mozga na -80°C. Mozak je zatim isečen na koronalne preseke debljine 30 µm upotrebom kriostata (Leica, Nemačka), a preseci su postavljeni na SuperFrost® mikroskopske pločice (Manzel-Glasser, Nemačka). Pločice sa presecima su čuvane na +4°C do dalje upotrebe.

### **Fluorescentno obeležavanje moždanih preseka**

Preseci su ispirani tri puta po 10 min u PBS u cilju rehidratacije preseka. Nakon toga su dobro isušeni, ali ne potpuno i okruženi hidrofobnom olovkom kako bi se rastvori koji se nanose zadržavali na samom preseku. Na svaki presek je nanošeno 60 µl rastvora pri svakom koraku u protokolu imunooobeležavanja. Kako bi se blokirale preostale slobodne aldehidne grupe nakon fiksacije paraformaldehidom, preseci su inkubirani u 0.1% glicinu u PBS 15 min na sobnoj temperaturi. Blokiranje preseka radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela je postignuto inkubacijom 45 min na sobnoj temperaturi u rastvoru koji sadži 10% kozji serum, 1% BSA i 0.01% Tritn-X 100 u

PBS. Ukoliko su neuroni obeležavani fluorescentnom bojom *NeuroTrace* (1:100; Molecular Probes, SAD), preseci su inkubirani 20 min. U ostalim slučajevima, korišćena su specifična primarna antitela koja su razblaživana u rastvoru koji sadrži 1% kozji serum, 1% BSA u PBS.

Upotrebljena su sledeća primarna antitela:

- Mišje antitelo protiv OX-42 u razblaženju 1:100 (Caltag laboratories, Engleska)
- Mišje antitelo protiv GFAP u razblaženju 1:300 (Invitrogen, SAD)
- Mišje antitelo protiv NeuN antitelo u razblaženju 1:100 (Chemicon, SAD)
- Zečje antitelo protiv AQP4 u razblaženju 1:500 (Sigma Aldrich, Nemačka)
- Zečje antitelo protiv Kir4.1 u razblaženju 1:200 (Alomone Labs, Izrael)

Preseci u rastvoru primarnih antitela su inkubirani preko noći na +4°C. Preseci su ispirani tri puta po 10 min kako bi se uklonilo primarno antitelo koje se nije vezalo. Zatim su nanošena fluorescentno obeležena sekundarna antitela razblažena u PBS i inkubirana 2,5 h u mraku na sobnoj temperaturi. Korišćena su sledeća sekundarna antitela:

- Kozje antitelo protiv miša, *Alexa 555* (razblaženje 1:200; Invitrogen)
- Kozje antitelo protiv zeca, *Alexa 555* (razblaženje 1:200; Invitrogen)
- Kozje antitelo protiv miša, *Alexa 488* (razblaženje 1:200; Invitrogen)
- Kozje antitelo protiv zeca, *Alexa 488* (razblaženje 1:200; Invitrogen)

Nakon toga, preseci su ispirani osam puta po 5 min u PBS kako bi se uklonilo sekundarno antitelo koje se nije vezalo. Zatim su preseci dobro isušeni, nakapan je *Mowiol* (Sigma Aldrich) i prekriveni su pokrovnim staklima. Kada je *Mowiol* očvrsnuo, imunofluorescentno obeleženi preseci su snimani na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu.

## **Imunocitohemija**

Kulture primarnih astrocita su pripremane od cerebralnog korteksa koji je izolovan iz novorođenih pacova starosti 2 dana po već opisanoj proceduri (McCarthy and Vellis, 1980). Astrociti su zasejavani na pokrovna stakla i nakon 48 h je pristupano protokolu imunocitohemije. Čelije su ispirane u PBS da bi se uklonili tragovi medijuma za gajenje, a zatim fiksirane 20 min u 4% PFA. Posle tri ispiranja po 5 min u PBS, astrociti su inkubirani 15 min u 0,1% glicinu, a potom 45 min u blokirajućem rastvoru koji sadrži 10% kozji serum, 1% BSA i 0.1% Triton-X 100 radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela. Sledeća primarna antitela su korišćena za inkubaciju preko noći na +4°C: zečje antitelo protiv AQP4 (1:500, Sigma Aldrich) i zečje antitelo protiv Kir4.1 (1:200, Alomone Labs). Razblaženja primarnih antitela su pripremana u rastvoru koji sadrži 1% kozji serum i 1% BSA. Astrociti su ispirani tri puta po 10 min u cilju uklanjanja nevezanog primarnog antitela pre inkubacije sa fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelom: kozje antitelo protiv zeca *Alexa 488* (1:200, Invitrogen) u trajanju od 2,5 h u mraku na sobnoj temperaturi. Čelije su ispirane pet puta po 5 min i zatim inkubirane 10 min sa 4,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, 1:4000, Molecular Probes, Eugene, SAD) koji obeležava jedra ćelija. Nakon pet ispiranja po 5 min, ćelije su postavljene na mikroskopska stakla preko kapljice *Mowiol* gela. Imunocitohemijski preparati su odlagani na +4°C do snimanja slika na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu.

## **Konfokalna mikroskopija**

Snimanje je obavljeno na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Nemačka). Konfokalni sistem čine uspravni mikroskop Axioskop 2 FS mot, a korišćeni su sledeći objektivi: Plan-Neofluar 20x/0.5, Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil i Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Ekscitacija fluorofora je postignuta laserskom linijom argonskog lasera na 488 nm ili helijum neonskog lasera na 543 nm. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala. Potpuno razdvajanje emisije svetlosti zelenog dela spektra je

postignuto uskopojasnim filterom BP 505-530, a crvenog dela spektra širokopropusnim filterom LP 585.

DAPI signal je sniman propuštanjem svetlosti živine lampe kroz ekscitacioni filter za ovu boju. Emisiona svetlost je prolazila dihroičko ogledalo NF80/20, a zatim širokopropusni filter LP 460. Ovako dobijene slike su preklapane sa konfokalnim slikama dobijenim sa istog vidnog polja.

## **OBELEŽAVANJE MOŽDANIH PRESEKA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU**

### **Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju**

Tkivo za elektronsku mikroskopiju je pripremano transkardijalnom perfuzijom. Životinje su najpre perfundovane rastvorom 2% dekstrana u 0,1 M fosfatnom puferu pri protoku od 40 ml/min, a zatim fiksirane rastvorom 4% paraformaldehida i 0,1% glutaraldehida u 0,1 M fosfatnom puferu pri protoku od 25 ml/min (~ 300 ml). Protok rastvora je regulisan peristaltičkom pumpom. Detaljan opis protokola za transkardijalnu perfuziju je opisan u odeljku **IMUNOFLUORESCENCIJA, Priprema moždanog tkiva**. Nakon perfuzije, životinje su dekapitovane, mozak je izolovan i dodatno fiksiran u 4% PFA preko noći na +4°C. Mozgovi su do dalje upotrebe čuvani u deset puta razblaženom rastvoru 4% PFA u 0.1 M fosfatnom puferu. Moždani regioni od interesa su iseckani na blokove tkiva dimenzija 1 x 1 x 1 mm koji odgovaraju kalupima za tkivo. Uzorci su prebačeni u 4% glukoze i trešeni preko noći na +4°C. Krioprotekcija uzoraka je urađena u rastvorima glicerola rastuće koncentracije 10, 20 i 30% u PBS u trajanju od 30 min za svaku koncentraciju na sobnoj temperaturi. Zatim su uzorci dodatno inkubirani u 30% glicerolu preko noći na +4°C. Uzorci su ukalupljeni metodom postepene zamene temperature zamrzavanja. Zamrzavani su u tečnom propanu (-170°C), a zatim su smeštani u kalupe (AFS; Reichart, Wien, Nemačka) ispunjene 1,5% uranil acetatom rastvorenim u metanolu temperature -90°C u trajanju od 30 h. Nakon toga, temperatura je povišena na svakih 1 h za 4°C sve dok nije dostignuta temperatura od -45°C. Uzorci su ispirani u dehidratisanom metanolu, a potom kalupljeni u *Lowicryl HM20* smoli na -45°C sa porastom odnosa smole i metanola. Polimerizacija se dešavala

na UV svetlu (360 nm) tokom 68 h. Ukalupljeni uzorci su isečeni na ultra tanke preseke debljine 60-80 nm korišćenjem ultramikrotoma (Leica) i postavljeni na mrežice.

### **Obeležavanje preseka antitelima sa partikulama zlata**

Mrežice se postavljaju u posebne držače. Najpre se preseci inkubiraju 10 min u 50 mM glicinu rastvorenom u TBST (sastava 5 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,3% NaCl i 0,01% Triton-X 100). Nakon toga, preseci se inkubiraju 10 min u 2% humanom albuminskom serumu (HSA) rastvorenom u TBST. Razblaženja primarnih antitela su pravljena u 2% HSA u TBST. Korišćena su zečja antitela protiv AQP4 u sledećim razblaženjima 1: 300 (Sigma) i 1:50 (Chemicon). Preseci su inkubirani u rastvoru primarnog antitela preko noći na sobnoj temperaturi u vlažnoj atmosferi. Preseci su dobro isprani u TBST tokom 20 min, a zatim inkubirani u 2% HSA 10 min. Kao sekundarno antitelo je korišćeno kozje antitelo protiv zečjih Ig konjugovano sa partikulama zlata prečnika 15 nm (1:20; Abcam). Razblaženja sekundarnih antitela su pravljena u rastvoru 2% HSA i polietilenglikola (PEG) u TBST i inkubirana su sa presecima 90 min u vlažnoj atmosferi u mraku. Preseci su isprani šest puta u ddH<sub>2</sub>O, a potom inkubirani u 2% uranil acetatu 1,5 min u mraku. Nakon šest ispiranja u ddH<sub>2</sub>O, preseci su inkubirani 1,5 min u 0,3% olovo citratu i isprani sedam puta u ddH<sub>2</sub>O. Preseci su potpuno osušeni pre snimanja na transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips, Nemačka) pri uveličanjima od 11500x, 16500x ili 20500x. Za svrhu kvantifikacije mikrografije su snimane na uveličanju 16500x i u istoj rezoluciji. Ovako dobijene elektronske mikrografije su dalje obrađivane korišćenjem programa ImageJ i urađena je kvantifikacija partikula zlata oko krvnih sudova.

### **TEHNIKA NAMETNUTE VOLTAŽE NA DELIĆU MEMBRANE**

Kulture primarnih astrocита su pripremane od cerebralnog korteksa koji je izolovan iz novorođenih pacova starosti 2 dana (McCarthy and Vellis, 1980). Od trenutka izolacije, ćelije su gajene u kulturi 20-25 dana, a zatim su astrociti zasejavani na pokrovna stakla i nakon 48 h je pristupano eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane. ALS astrociti su dobijeni iz pacova koji su standardnom PCR



metodom pokazivali prisustvo transgena. Uporedo su ispitivani WT astrociti dobijeni istom procedurom pripreme kultura.

Metoda nametnute voltaže na deliću membrane je primenjivana u konfiguraciji „cela ćelija“ (Hamill, 1981). Mikropipete za eksperimente nametnute voltaže na deliću membrane su izvlačene od borosilikatnog stakla sa filamentom spoljašnjeg dijametra 1,5 mm i unutrašnjeg dijametra 0,84 mm (WPI, Berlin, Nemačka) na horizontalnom izvlakaču (Sutter Instruments). Otpor mikropipeta je bio u opsegu 4-7 M $\Omega$  kada su bile ispunjene unutarćelijskim rastvorom sledećeg sastava: 144 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2 (KOH) i osmolariteta 290 mOsm. Astrociti u kulturi su postavljeni na postolje invertovanog mikroskopa Zeiss Axiovert 10. Ukupne struje u ćeliji su merene pomoću pojačavača AM Systems 2400 i odgovarajućeg programa Clampex 7 (Axon Instruments, USA). Podaci su prikupljeni na frkvenciji semplovanja od 10 kHz (Digidata 1200; Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) i filtrirani su na 2 kHz. Kapacitivnost membrane ( $C_m$ ), membranski i serijski otpor su očitavani u programu. Kompenzacija serijskog otpora je podešavana na 80%. Gornja granica za vrednost serijskog otpora je bila 20 M $\Omega$ .

Standardni vanćelijski rastvor (ECS) je bio sledećeg sastava: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7,4 (NaOH) i osmolaritet 300 mOsm. Ukoliko je koncentracija KCl u ECS povećavana na 20 mM ili 40 mM, u istom odnosu je smanjivana koncentracija NaCl. U eksperimentima u kojima su blokirane jonske struje, u rastvor ECS su dodavani 1 mM CsCl ili 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub>. Svi rastvori su uvođeni u komoricu za registrovanje perfuzijom pri regulisanom protoku. Vanćelijski i unutarćelijski rastvori su pripremljeni prema Benfenati et al. (2006). Eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi.

Nakon formiranja gigaomskog kontakta sa membranom astrocita, nametan je osnovni potencijal od -50 mV. Potom su primenjivani protokoli za registraciju jonskih struja u konfiguraciji cela ćelija. Primenom I/V protokola od osnovnog potencijala (-50 mV), nametani su potencijali u rasponu od -150 mV do +70 mV u koracima od 20 mV. Primenom trenutnog I/V protokola struje su aktivirane linearnim voltažnim pulsom od -150 mV do +70 mV (0.33 mV/ms). Strujni zapisi dobijeni primenom oba tipa protokola su analizirani u programu Clampfit (Axon Instruments). Gustine struja su računane deljenjem izmerenih amplituda struja sa  $C_m$ . Specifična membranska provodljivost je

izračunata deljenjem membranske provodljivosti sa  $C_m$ .  $\text{Cs}^+$ - i  $\text{Ba}^{2+}$ -osetljive struje su dobijene oduzimanjem strujnih zapisa nakon blokade od kontrolnih strujnih zapisa. Analizirani su samo oni zapisi u kojima je povećanje  $[\text{K}^+]_o$  dovelo do porasta amplitude struje i/ili u kojima je dodavanje rastvora  $\text{Cs}^+$  or  $\text{Ba}^{2+}$  smanjivalo amplitudu struje. Dodatni kriterijum za analizu strujnih zapisa je bila vrednost potencijala reverzije, koja je bila niža od osnovnog nametnutog potencijala (-50 mV). Astrociti koji su ispunjavali navedene kriterijume smatrani su zreli (Ransom and Sontheimer, 1995).

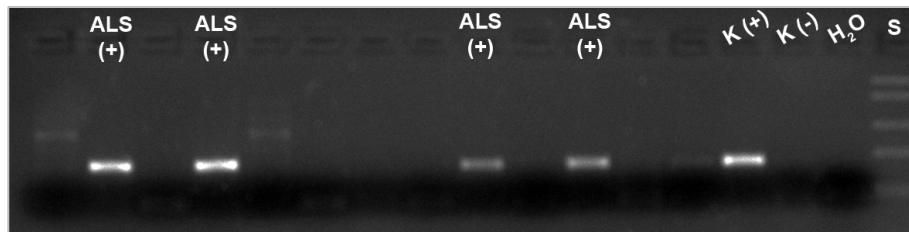
### STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada dobijenih podataka je urađena u programu *SigmaPlot*. Za poređenja je korišćen Studentov *t-test* za zavisne i nezavisne uzorke. Ukoliko podaci nisu imali normalnu raspodelu korišćen je *Wilcoxonov* test za zavisne ili *Mann Whitney* test za nezavisne uzorke. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, a broj ispitanih eksperimentalnih životinja je naglašen u tekstu. Grafički prikaz rezultata je urađen pomoću programa *MS Office*, *Corel Draw Graphics Suite* i *SigmaPlot*.

## REZULTATI

### GENOTIPIZACIJA EKSPERIMENTALNIH PACOVA

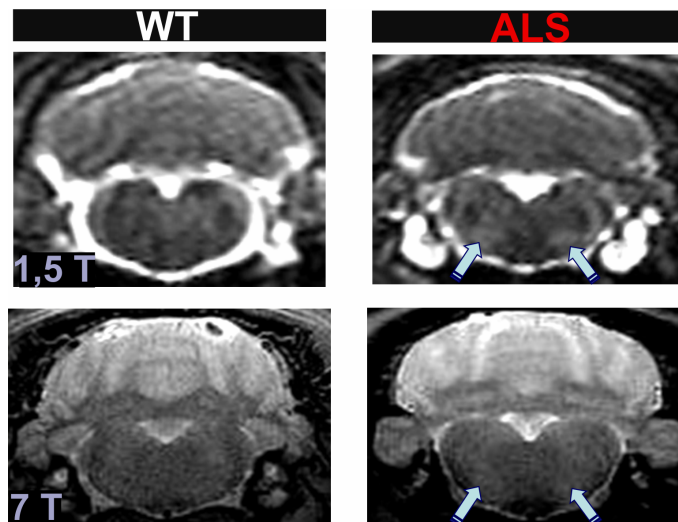
Potomstvo WT i ALS pacova je proveravano polimeraznom lančanom reakcijom. Ukoliko je u genomskoj DNK prisutan humani transgen SOD1<sup>G93A</sup>, na gelu je uočeno prisustvo trake (Slika 10). Kod ovih pacova su procenjivani parametri za utvrđivanje početka i progresije bolesti, a u simptomatičnoj fazi su uključeni u eksperimentalne studije. Odsustvo trake na gelu ukazuje da humani transgen nije prisutan u genomskoj DNK i te životinje nisu eksperimentalno ispitivane.



**Slika 10.** Genotipizacija eksperimentalnih pacova primenom PCR metode. Primer detektovanih traka na gelu usled prisustva humanog transgena SOD1<sup>G93A</sup> u genomskoj DNK ispitivanih pacova. ALS (+) – humani transgen je prisutan u genomskoj DNK ispitivanog pacova; K (+) – pozitivna kontrola reakcije; K (-) – negativna kontrola reakcije; S – standardi poznate dužine DNK fragmenta.

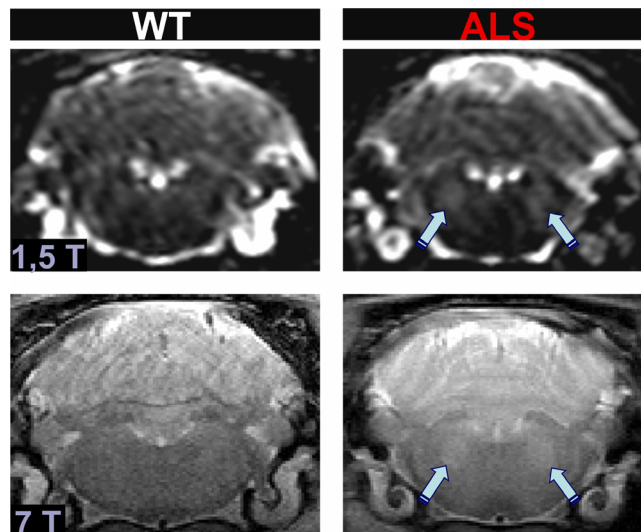
### NEURODEGENERATIVNE LEZIJE U MOZGU ALS PACOVA UOČENE MRI METODOM

Primenom kliničkog MRI uređaja ispitano je osam ALS pacova i dva WT pacova. Slikani su poprečni preseki mozga počev od frontalnog dela velikog mozga ka produženoj moždini. Primenom T2W MRI protokola uočene su oblasti povećanog intenziteta u moždanom stablu svih ispitivanih ALS pacova koje ukazuju na neurodegeneraciju, a koje nisu primećene kod WT pacova (Slika 11 i 12). Posebno izražen pojačan signal je uočen u nivou *nc. facialis* i *nc. ambiguus* (Slika 11) i anteriorno, u nivou *nc. trigeminus* i *nc. pontis* (Slika 12).



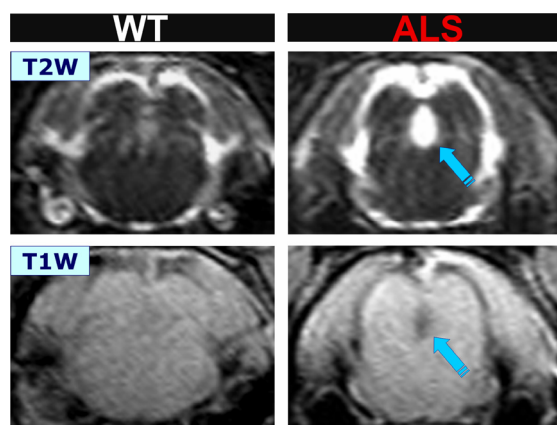
**Slika 11.** Žarišta neurodegeneracije u moždanom stablu ALS pacova. Primena 1,5 T MRI (gore) i 7 T MRI (dole) je dala slike poprečnih moždanih preseka koje ukazuju na prisustvo pojačanog signala u oblasti *nc. facialis* i *nc. ambiguus* (plave strelice) u moždanom stablu simptomatičnih ALS pacova u poređenju sa WT pacovima. Uočen pojačan intenzitet ukazuje na neurodegeneraciju u pomenutim regionima.

Pored toga, žarišta neurodegeneracije uočena primenom kliničkog 1,5 T MRI su potvrđena i na slikama bolje rezolucije dobijenih primenom 7 T MRI (ispitana su dva WT i četiri ALS pacova i u sva četiri uočene su promene; **Slike 11 i 12**).



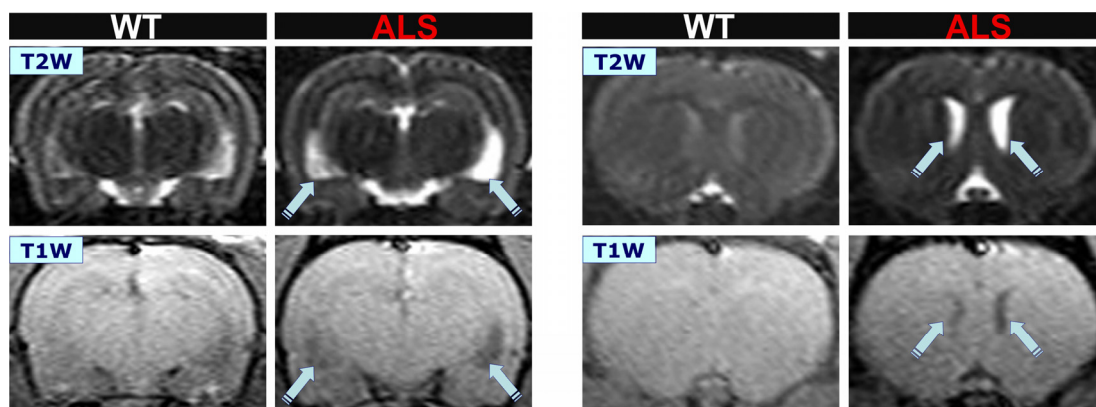
**Slika 12.** Žarišta neurodegeneracije u moždanom stablu ALS pacova. MRI slike poprečnih moždanih preseka su pokazale prisustvo pojačanog signala u *nc. trigeminus* i *nc. pontis* (plave strelice) u moždanom stablu ALS pacova u poređenju sa WT pacovima što ukazuje na neurodegeneraciju u ovim jedrima. Promene su najpre uočene primenom 1,5 T MRI (gore), a potom potvrđene uređajem sa magnetom veće jačine – 7 T MRI (dole).

Pored neurodegenerativnih promena u jedrima moždanog stabla, uočavaju se proširene komore u mozgu ALS pacova (u pet od osam ispitanih pacova). Slike dobijene T2W protokolom prikazuju pojačan intenzitet, dok isti preseci snimljeni T1W protokolom ukazuju na smanjen intenzitet signala u nivou Silvijeveg kanala u mozgu ALS pacova (**Slika 13**). Region pojačanog T2W signala je odgovarao regionu smanjenog T1W signala što je potvrdilo da su komore proširene, a da nije došlo do neurodegeneracije tkiva.



**Slika 13.** Proširenje Silvijeveg kanala u mozgu ALS pacova. T2W slike mozga ukazuju na pojačan intenzitet (gore, strelica), dok T1W slike ukazuju na smanjen intenzitet (dole, strelica) u nivou Silvijeveg kanala ukazujući na njegovo proširenje u mozgu ALS pacova.

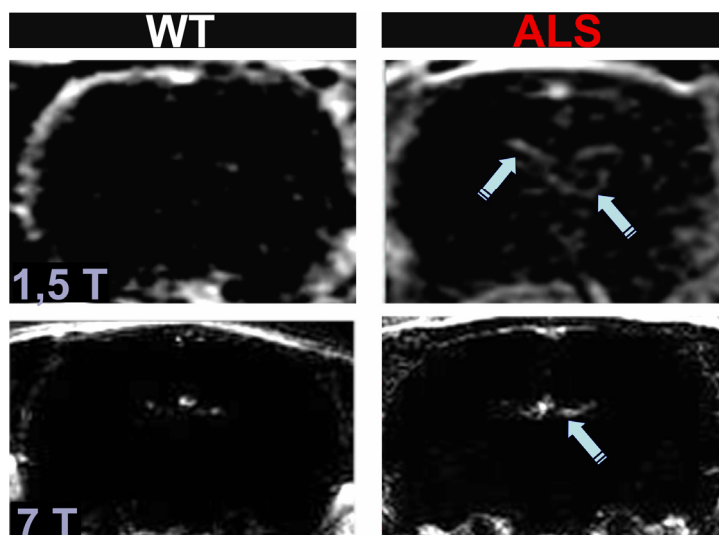
Proširenje lateralnih komora u mozgu ALS pacova (**Slika 14**) je uočeno kao pojačan intenzitet signala na T2W slikama odnosno smanjen na T1W slikama. Uočene promene su u saglasnosti sa uočenim proširenjem komora u SOD1<sup>G93A</sup> mišu (Zang et al., 2004).



**Slika 14.** Proširene lateralne komore u mozgu ALS pacova. Slike dobijene T2W protokolom ukazuju na pojačan intenzitet u nivou lateralnih komora (gore, plave strelice), dok slike istih preseka dobijene T1W protokolom ukazuju na smanjen intenzitet u nivou lateralnih komora (dole, plave strelice).

## OŠTEĆENJE HEB U MOZGU ALS PACOVA

Aplikacija kontrastnog agensa Gd-DTPA je poslužila za ispitivanje stanja krvno-moždane barijere u mozgu ALS pacova. Pacovi su snimani T1W MRI protokolom pre i nakon dodavanja Gd-DTPA, a pri tom su položaj životinje i parametri snimanja ostali identični. Korišćenjem ImageJ programa je napravljena digitalna razlika T1W slika dobijenih pre i nakon dodavanja kontrastnog agensa. Prisustvo pojačanog signala u parenhimu tkiva na ovako dobijenim slikama ukazuje na propuštanje kontrasta kroz oštećenu HEB. Eksperimenti su urađeni primenom 1,5 T (sedam ALS i tri WT pacova) i 7 T MRI (četiri ALS i dva WT pacova) i u oba slučaja je uočeno oštećenje HEB (**Slika 15**).

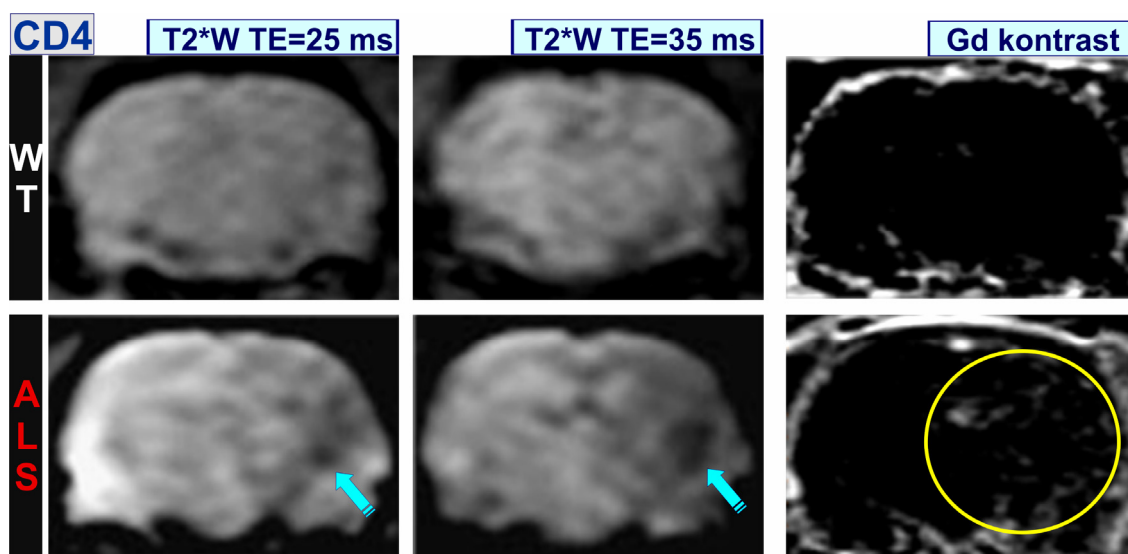


**Slika 15.** Oštećenje krvno-moždane barijere u mozgu ALS pacova. Slike koje predstavljaju razliku T1W slika pre i nakon dodavanja Gd-DTPA pokazuju prisustvo pojačanog signala u mozgu ALS pacova što je indikacija narušene HEB (plave strelice). Stanje HEB je ispitano primenom 1,5 T (gornji red) i 7 T MRI (donji red).

## INFILTRACIJA CD4<sup>+</sup> I CD8<sup>+</sup> T LIMFOCITA U MOŽDANO TKIVO ALS PACOVA

Da bi se ispitali neuroinflamatorni procesi u mozgu ALS pacova praćeni su infiltracijom CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita i stanje HEB primenom MRI metode. Korišćenje posebno dizajniranih antitela (MACS®) koja prepoznaju CD4 i CD8 receptore T-limfocita, a dodatno su obeležena ultra malim paramagnetnim partikulama gvožđe

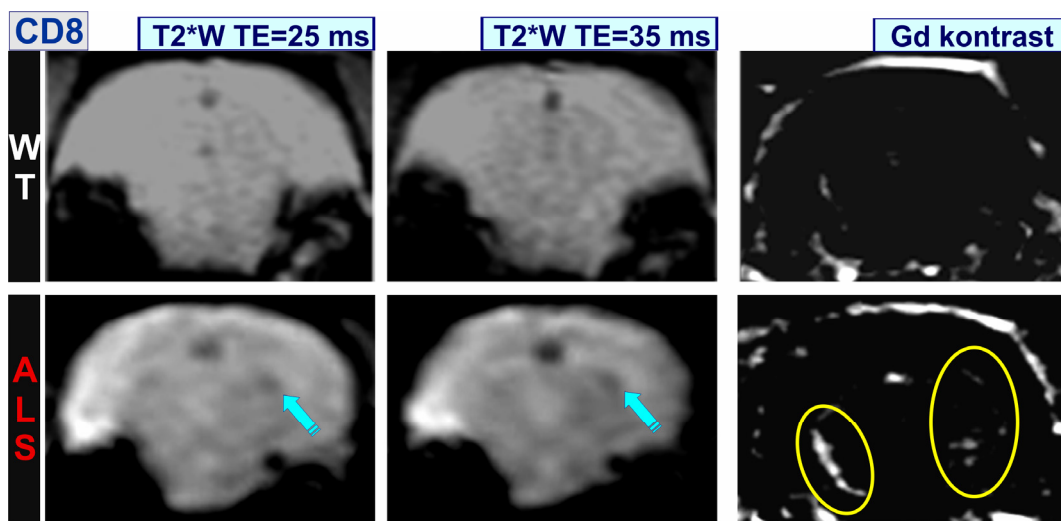
oksida je omogućilo praćenje imunskih ćelija MRI metodom. Ispitano je pet WT pacova, u četiri simptomatična ALS pacova su aplicirani  $CD4^+$  USPIO markeri, a u drugih pet  $CD8^+$  USPIO markeri. Primenom gradijent eho  $T2^*$  sekvence akumulirane USPIO partikule daju signal smanjenog intenziteta, a površina koju pokriva ovaj signal se povećava sa produženjem eho vremena. Ova metoda dozvoljava detekciju male količine akumuliranih USPIO markera u moždanom tkivu. Primenom anti- $CD4$  USPIO partikula uočena je infiltracija  $CD4^+$  T-limfocita u moždano tkivo ALS pacova u blizini lateralnih ventrikula (**Slika 16**) što je u saglasnosti sa nalazima na ALS pacijentima (Frank et al., 1997; Turner et al., 2007). Infiltrirani  $CD4^+$  T-limfociti su uočeni na kontralateralnoj strani u odnosu na atrofirani ekstremitet usled ukrštanja kortikospinalnog trakta. Primenom Gd-DTPA kontrastnog agensa uočeno je oštećenje HEB u moždanim regionima ALS pacova gde je pokazana infiltracija  $CD4^+$  T-limfocita (**Slika 16**).



**Slika 16.** Infiltracija  $CD4^+$  T limfocita u moždano tkivo ALS pacova. Primena anti- $CD4$  antitela obeleženih USPIO partikulama je pokazala prisustvo signala slabog intenziteta u ALS tkivu u blizini lateralnih komora (plave strelice). Površina koju pokriva USPIO signal je povećana sa produženjem TE. Primenom Gd-DTPA kontrasta je uočeno oštećenje HEB u istom regionu mozga ALS pacova (zaokruženo žutom linijom) čime se verovtno otvara put za infiltraciju T-limfocita.

Primena anti- $CD8$  antitela obeleženih USPIO partikulama je pokazala infiltraciju  $CD8^+$  T limfocita u nivou moždanog stabla simptomatičnih ALS pacova (**Slika 17**). Pored toga, uočena je povećana propustljivost HEB u istom regionu što može da olakša infiltraciju inflamatornih ćelija (**Slika 17**). Uočava se da je infiltracija

CD4<sup>+</sup> T limfocita više izražena u poređenju sa CD8<sup>+</sup> T limfocitima što se može dovesti u vezu sa ranijom studijom na ALS miševima (Beers et al., 2008).

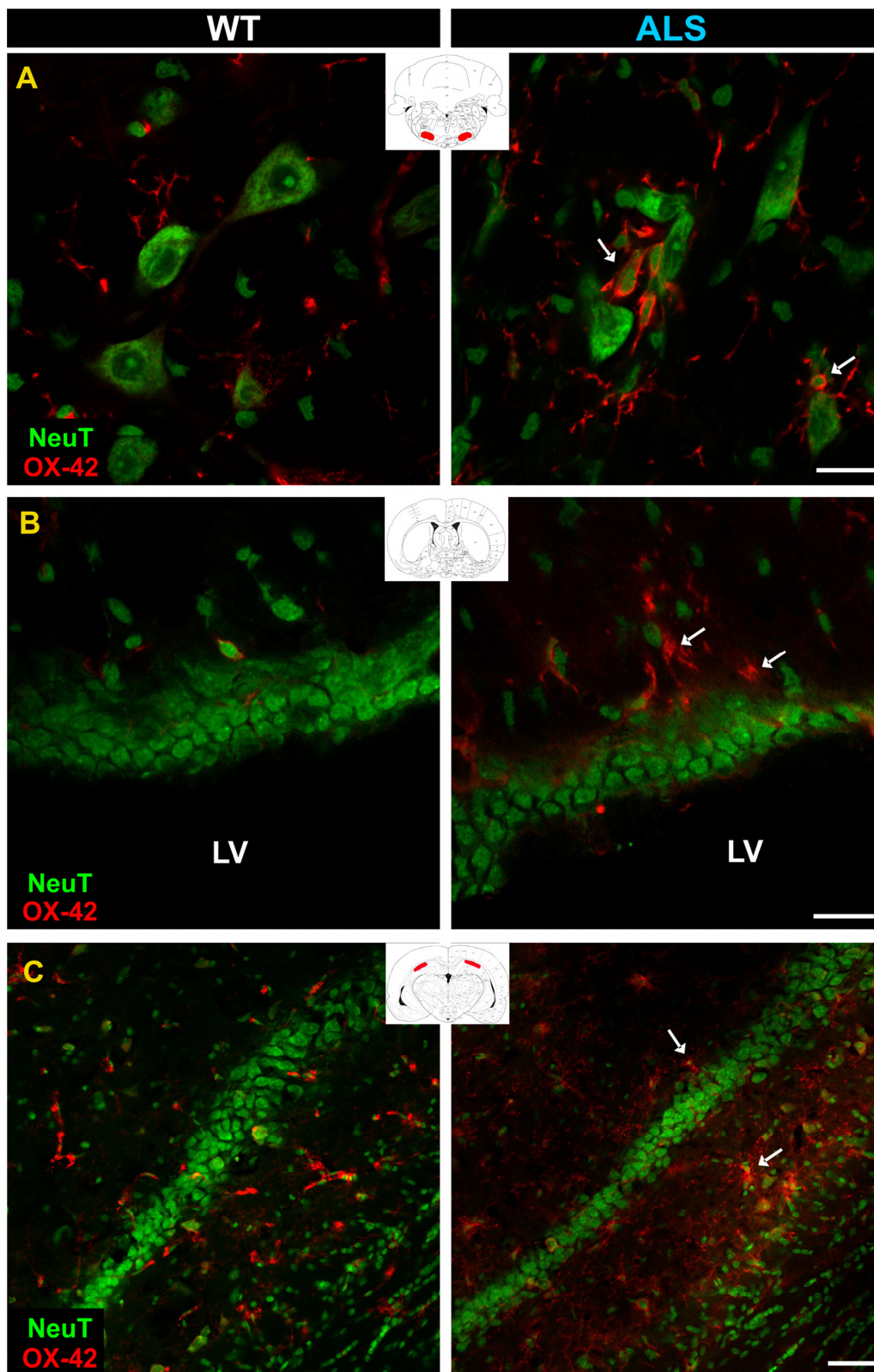


**Slika 17.** Infiltracija CD8<sup>+</sup> T limfocita u moždano tkivo ALS pacova. Primena T2\* protokola je ukazala na prisustvo CD8<sup>+</sup> T limfocita obeleženih USPIO partikulama u regionu moždanog stabla ALS pacova (plave strelice). Površina koju pokriva signal poreklom od USPIO je povećana sa produženjem TE. U istom regionu je uočena i povećana propustljivost HEB za Gd-DTPA (zaokruženo žutim linijama).

### AKTIVIRANA MIKROGLIJA U MOZGU ALS PACOVA

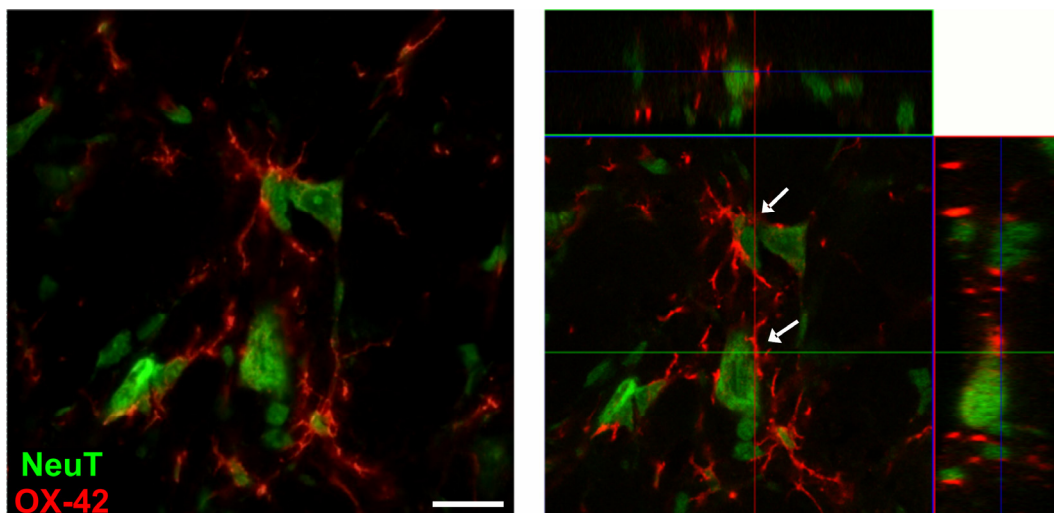
U cilju daljeg ispitivanja neuroinflamacije, metodom imunofluorescencije je proveravano prisustvo aktivirane mikroglije u različitim regionima mozga ALS pacova. Zamrznuti preseki mozгова WT (n=3) i ALS pacova (n=3) su fluorescentno obeleženi antitelom *OX-42* koje je marker aktivirane mikroglije i fluorescentnom bojom *NeuroTrace* koja je marker neurona. Prisustvo aktivirane mikroglije je uočeno u više moždanih regiona ALS pacova. Aktivirana mikroglija je značajno prisutna u moždanom stablu ALS pacova (**Slika 18A**). Prikazani MRI rezultati su pokazali da je ovaj region pogođen u bolesti i ukazali na neurodegeneraciju u više jedara moždanog stabla ALS pacova. Aktivirana mikroglija je uočena i oko lateralnih komora (**Slika 18B**) za koje je MRI metodom pokazano da su proširene kod ALS pacova. Dodatno, aktivirana mikroglija je uočena i u hipokampusu ALS pacova (**Slika 18C**). Moždani regioni u kojima je uočena infiltracija CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita MRI metodom pokazuju i prisustvo aktivirane mikroglije što zajedno daje sliku o neuroinflamatornim procesima u ALS.





**Slika 18.** Aktivacija mikroglije u različitim regionima mozga ALS pacova. Moždani preseći WT i ALS pacova su obeleženi antitelom OX-42 (marker mikroglije, crveno) i fluorescentnom bojom Neurotrace (marker neurona, NeuT, zeleno). Mikroglija je u aktiviranoj formi (strelice) u mozgu simptomatičnih ALS pacova u **A**: moždanom stablu, **B**: oko lateralnih komora (LV) i **C**: u C1 regionu hipokampusa. Kalibracionim oznakama odgovaraju sledeće dužine: A i B – 20  $\mu\text{m}$ , C – 50  $\mu\text{m}$ .

Dodatno je uočeno da su nastavci aktivirane mikroglije raspoređeni blisko telu neurona u moždanom stablu ALS pacova što ukazuje na mogućnost interakcije između mikroglije i neurona (**Slika 19**).

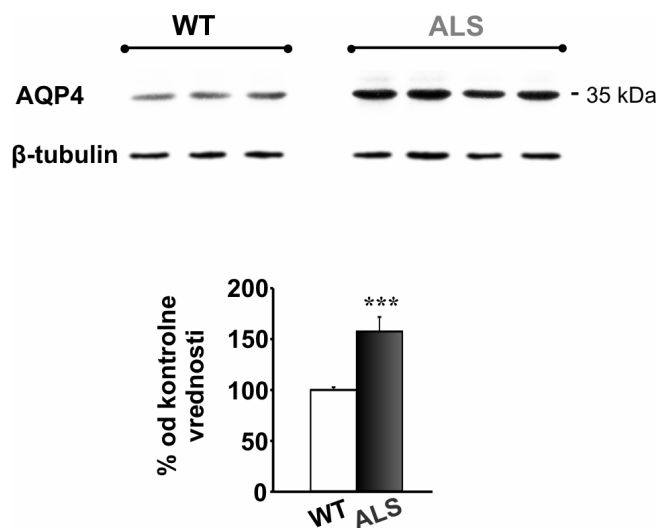


**Slika 19.** Interakcija mikroglije i neurona u moždanom stablu ALS pacova. Levo: nastavci aktivirane mikroglije obeležene anti-OX-42 antitelom (crveno) su raspoređeni blisko telu neurona (zeleno) u moždanom stablu ALS pacova. Desno: z-stek i ortogonalna projekcija 23 optička preseka ukazuje na postojanje direktnog kontakta nastavaka mikroglije i tela neurona ukazujući na mogućnost njihove interakcije (strelice). Kalibraciona oznaka odgovara dužini od 20  $\mu\text{m}$ .

## EKSPRESIJA I DISTRIBUCIJA AQP4 U MOZGU ALS PACOVA

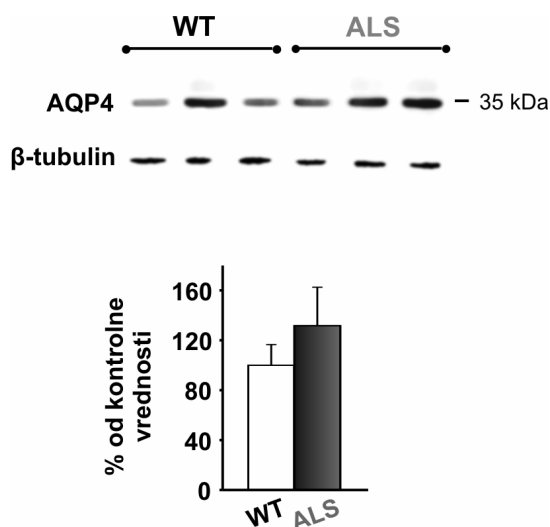
Astrocitna stopala obavijaju endotel krvnih sudova i doprinose formiranju i stabilnosti HEB. Njihova membrana je bogata AQP4 kanalima za vodu koji regulišu homeostazu vode u nivou HEB, a njihova promjenjena ekspresija može narušiti stabilnost HEB. Uočeno oštećenje HEB i proširenje lateralnih komora u mozgu ALS pacova opisano u prethodnim poglavljima su ukazali na moguću promenu u regulaciji protoka vode i stoga na promenu u ekspresiji i funkciji AQP4.

Ekspresija AQP4 proteina ispitivana je u regionima moždanog stabla i moždane kore kod WT i ALS pacova. Primenom *Western blot* metode utvrđeno je prisustvo trake molekulske mase 35 kDa koja odgovara AQP4 proteinu (**Slike 20 i 21**). Kvantifikacija intenziteta dobijenih traka u moždanom stablu je pokazala značajno povećanje ekspresije AQP4 ( $p < 0,001$ ) ALS pacova ( $n=4$ ) u poređenju sa WT pacovima ( $n=3$ ; **Slika 20**).



**Slika 20.** Povećanje ekspresije AQP4 u moždanom stablu ALS pacova. Gore: primer *Western blota* moždanog stabla ALS i WT pacova koji pokazuje prisustvo trake molekulske mase 35 kDa koja odgovara AQP4. Trake koje odgovaraju moždanom stablu ALS pacova pokazuju povećanu imunoreaktivnost na AQP4. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišćen je  $\beta$ -tubulin. Dole: kvantifikacija intenziteta traka je pokazala statistički značajno povećanje ekspresije AQP4 u moždanom stablu ALS pacova (n=4) u poređenju sa WT pacovima (n=3); \*\*\*p<0,001.

Povećana ekspresija AQP4 je uočena i u moždanoj kori ALS pacova (n=3) u odnosu na WT pacove (n=3), ali uočena promena nije bila statistički značajna (**Slika 21**).

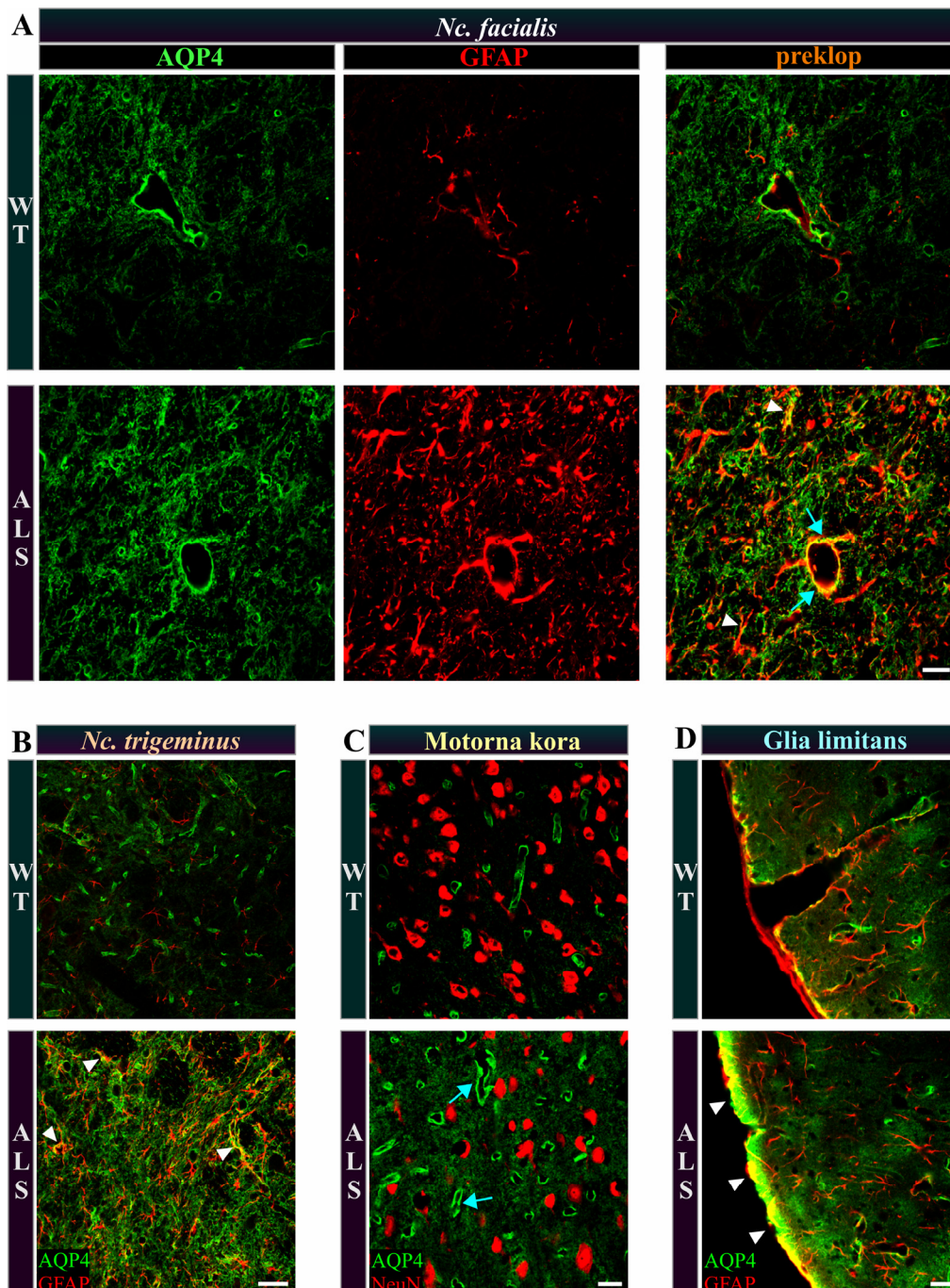


**Slika 21.** Naznaka povećanja ekspresije AQP4 u moždanoj kori ALS pacova. Gore: primeri AQP4 traka (35 kDa) dobijenih *Western blot* metodom. Kao kontrola korišćen je  $\beta$ -tubulin. Dole: kvantifikacija intenziteta traka je ukazala na povećanu ekspresiju AQP4 u moždanoj kori ALS pacova (n=3) u poređenju sa WT pacovima (n=3), ali uočena promena nije statistički značajna.

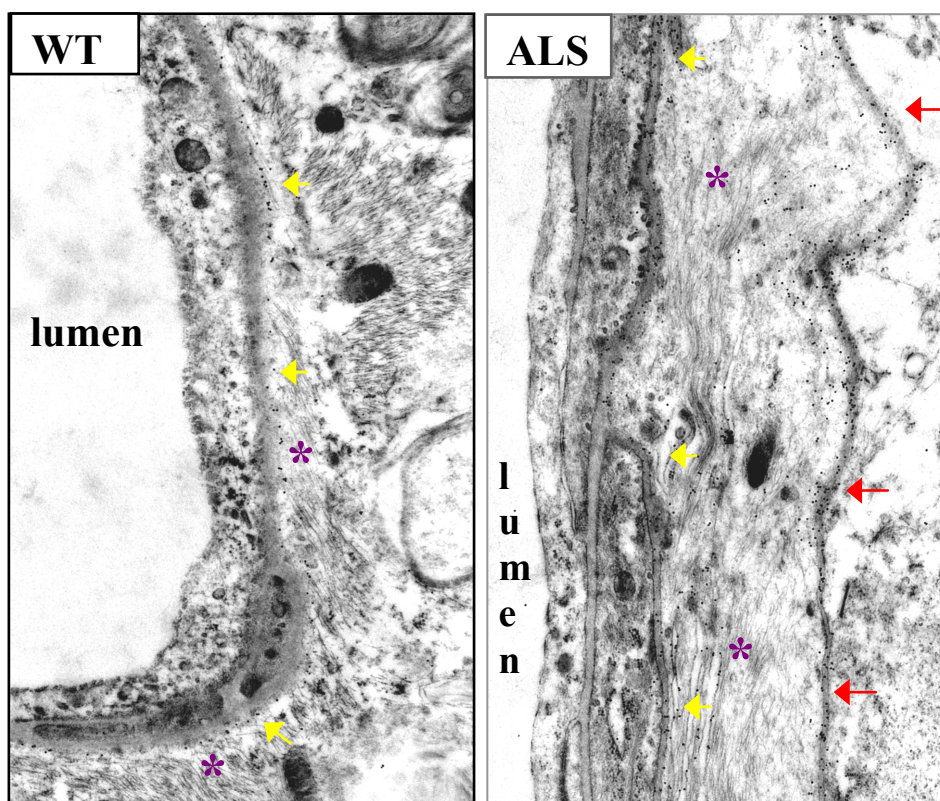
Prisustvo AQP4 je dalje ispitano u *nc. facialis*, *nc. trigeminus*, motornoj kori i u površinskom sloju mozga – *glia limitans* primenom metode imunofluorescencije. Zamrznuti pacovski moždani preseki su dvostruko obeleženi antitelima koja se vezuju za AQP4 i GFAP. Uočeni su porast AQP4 imunoreaktivnosti i izražena astrogliozna u *nc. facialis* (**Slika 22A**) i *nc. trigeminus* ALS pacova (**Slika 22B**). Fluorescentni signali za AQP4 i GFAP pokazuju kolokalizaciju posebno izraženu u astrocitnim stopalima koja okružuju krvne sudove (**Slika 22A,B** i **Slika 23**). Obeležavanje AQP4 u *glia limitans* je ukazalo na povećan intenzitet signala kod ALS pacova (**Slika 22D**). Imunoobeležavanje AQP4 i NeuN u motornoj kori je pokazalo povećanu AQP4 imunoreaktivnost oko krvnih sudova (**Slika 22C**). Pored toga, difuzno raspoređen signal obeleženog AQP4 je uočen u parenhimu motorne kore ALS pacova što je ranije pokazano i za hipokampus u razviću (Hsu et al., 2011; **Slika 22C**).

Elektronska mikroskopija na presecima čiji je AQP4 obeležen antitelima sa nanopartikulama zlata dala je podatke o rasporedu ovog proteina oko krvnih sudova. Distribucija AQP4 proteina je ispitivana u regionima oko lateralnih komora WT i ALS pacova. Elektronska mikroskopija obeleženog AQP4 je ukazala na razliku u njegovoj distribuciji u ALS u poređenju sa WT pacovima. Partikule zlata na presecima WT pacova su raspoređene uz endotel krvnih sudova. Na presecima ALS pacova AQP4 je raspoređen oko endotela krvnih sudova, ali i na membranama astrocitnih stopala koje ne naležu na krvne sudove (**Slika 23**). Promenjena distribucija AQP4 u astrocitnim membranama je često praćena oticanjem astrocitnih stopala.

Na dobijenim elektronskim mikrografijama je urađena kvantifikacija AQP4 obeleženog antitelima sa nanopartikulama zlata po jedinici dužine krvnog suda i po jedinici površine tkiva. Analizirani su jedan WT i dva ALS pacova i obrađeno je 25 mikrografija po životinji. Količina AQP4 po jedinici dužine nije promenjena kod ALS pacova u odnosu na WT pacove (**Slika 24**). Međutim, broj partikula zlata po jedinici površine je povećan kod ALS pacova u poređenju sa WT pacovima (**Slika 24**). Rezultati ove studije ukazuju da se zastupljenost AQP4 na membranama koje okružuju krvne sudove ne menja u ALS. Međutim, njegova prisutnost u okolnom tkivu je povećana i to prvenstveno na membranama astrocitnih stopala koje ne naležu na endotel krvnog suda.

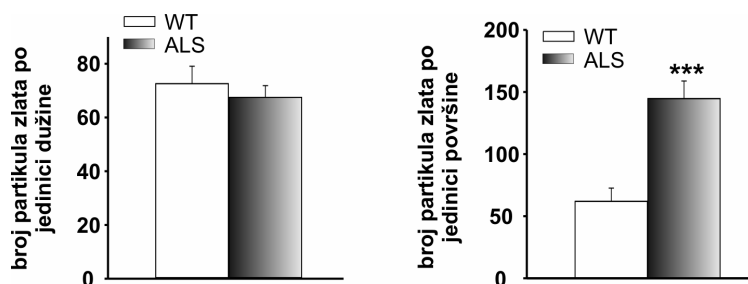


**Slika 22.** Povećana AQP4 imunoreaktivnost u različitim regionima mozga ALS pacova. **A:** Dvostruko obeležavanje AQP4 (zeleno) i GFAP (crveno) u *nc. facialis* je ukazalo na povećanu AQP4 imunoreaktivnost zajedno sa astrogliozom u ALS presecima. Izražen fluorescentni signal za AQP4 kolokalizuje sa signalom za GFAP ukazujući na povećanu ekspresiju AQP4 u astrocitnim nastavcima (bele strelice) posebno oko krvnih sudova (plave strelice). **B:** Povećana AQP4 imunoreaktivnost i kolokalizacija sa GFAP (vrhovi strelica) je uočena u *nc. trigeminus* ALS pacova. **C:** Dvostruko obeležavanje AQP4 (zeleno) i neuronalnog markera NeuN (crveno) u motornoj kori je ukazalo na povećanu ekspresiju AQP4 oko krvnih sudova (plave strelice), ali i intenzivan signal u parenhimu. **D:** Povećana AQP4 imunoreaktivnost je uočena u površinskom sloju mozga – *glia limitans* (vrhovi strelice) ALS pacova u poređenju sa WT. Kalibracionim oznakama odgovaraju sledeće dužine A, C i D – 20  $\mu$ m; B – 50  $\mu$ m.



**Slika 23.** Promenjena distribucija AQP4 oko krvnih sudova u mozgu ALS pacova. Obeležavanje AQP4 antitelima za koja su vezane nanopartikule zlata je pokazalo njegovu linijsku distribuciju uz endotel krvnog suda u mozgu WT pacova (levo; žute strelice). U mozgu ALS pacova, AQP4 je raspoređen uz endotel krvnog suda (žute strelice), ali dolazi i do njegove redistribucije na membrane astrocitnih stopala koje ne naležu na krvni sud (crvene). \* - astrocitno stopalo.

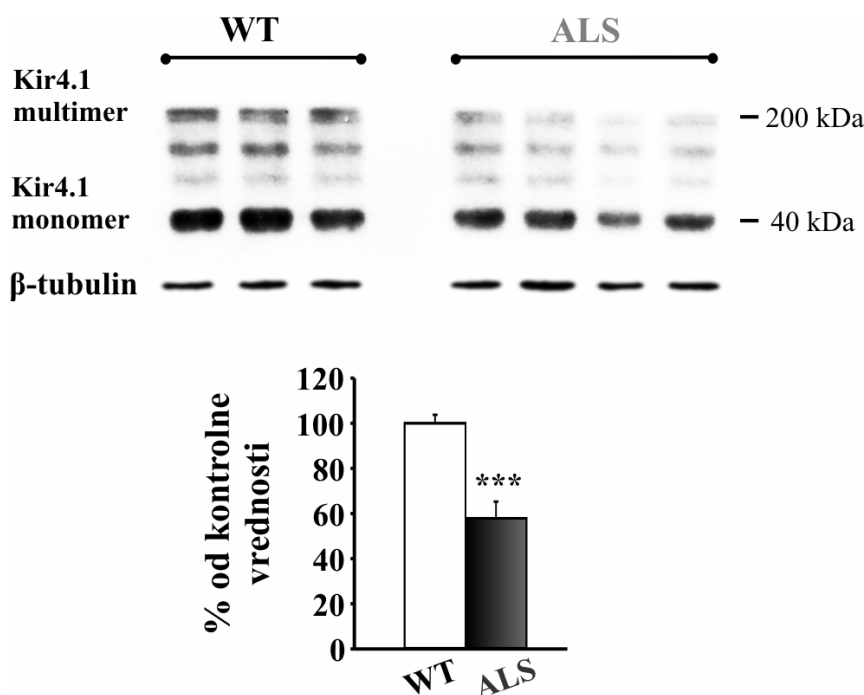
Promenejnja distribucija AQP4 i primećeno oticanje astrocitnih stopala (Nicaise et al., 2009a) ukazuju na poremećaj u održavanu homeostaze vode u mozgu ALS pacova. Ispitivanje dodatnog broja eksperimentalnih životinja bi upotpunilo ovu studiju.



**Slika 24.** Kvantifikacija broja AQP4 obeleženog antitelima sa partikulama zlata po jedinici dužine zida krvnog suda nije pokazala promene između WT i ALS moždanih preseka (grafik levo). Broj partikula zlata po jedinice površine je povećan u moždanim presecima ALS pacova što ukazuje na povećanu ekspresiju AQP4 u tkivu i promenjenu distribuciju. \*\*\* $p < 0,001$

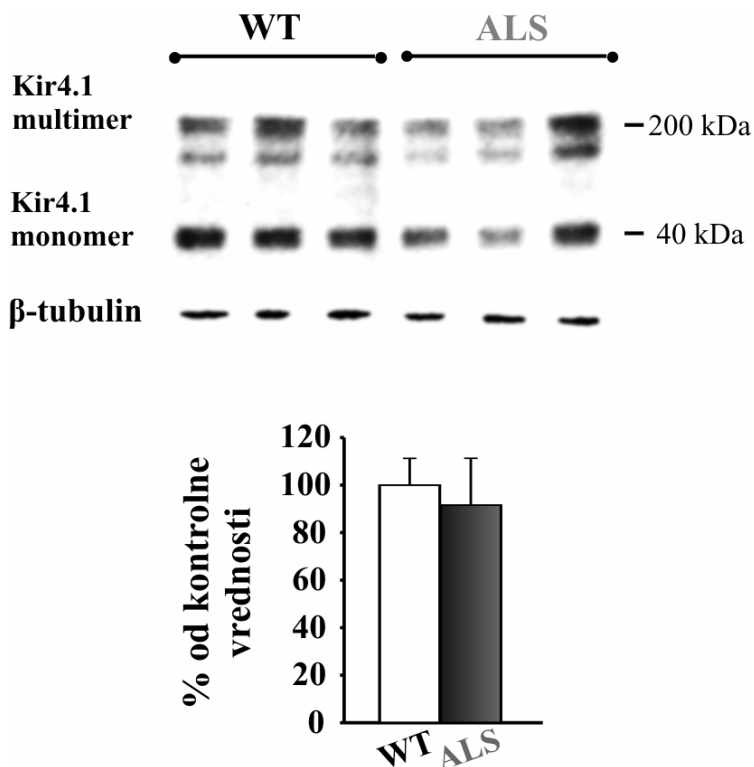
## EKSPRESIJA KIR4.1 U MOZGU ALS PACOVA

Astroцити preuzimaju višak  $K^+$  oslobođenog pri aktivnosti neurona posredstvom Kir kanala eksprimiranih na astroцитnim stopalima i na taj način doprinose održavanju jonske homeostaze. Najprisutniji ulazni kalijumov ispravljač na astroцитnim stopalima je Kir4.1 koji je kolokalizovan sa AQP4. Mnoge studije ukazuju na funkcionalnu vezu ova dva proteina, pa je stoga ispitan Kir4.1 u pacovskom modelu ALS. Ekspresija proteina Kir4.1 je ispitivana Western blot metodom u moždanom stablu i moždanoj kori WT i ALS pacova. Uočeno je prisustvo traka molekulske masa 40 kDa i 200 kDa koje odgovaraju monomeru odnosno multimeru Kir4.1 proteina (Slika 25). Kvantifikacija intenziteta traka koje odgovaraju monomernom obliku proteina je pokazala statistički značajno smanjenje ekspresije Kir4.1 ( $p < 0,001$ ) u moždanom stablu ALS pacova ( $n=4$ ) u poređenju sa WT pacovima ( $n=3$ ; Slika 25).



**Slika 25.** Smanjenje ekspresije Kir4.1 u moždanom stablu ALS pacova. Gore: primer *Western blot* na kome se uočavaju trake molekulske masa 40 kDa i 200 kDa koje odgovaraju monomeru odnosno multimeru proteina Kir4.1. Intenzitet traka ukazuje na smanjenje ekspresije Kir4.1 u moždanom stablu ALS pacova. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišćen je  $\beta$ -tubulin. Dole: kvantifikacija intenziteta traka koje odgovaraju monomeru proteina je pokazala statistički značajno smanjenje ekspresije Kir4.1 u moždanom stablu ALS pacova ( $n=4$ ) u poređenju sa WT pacovima ( $n=3$ ). \*\*\* $p < 0,001$

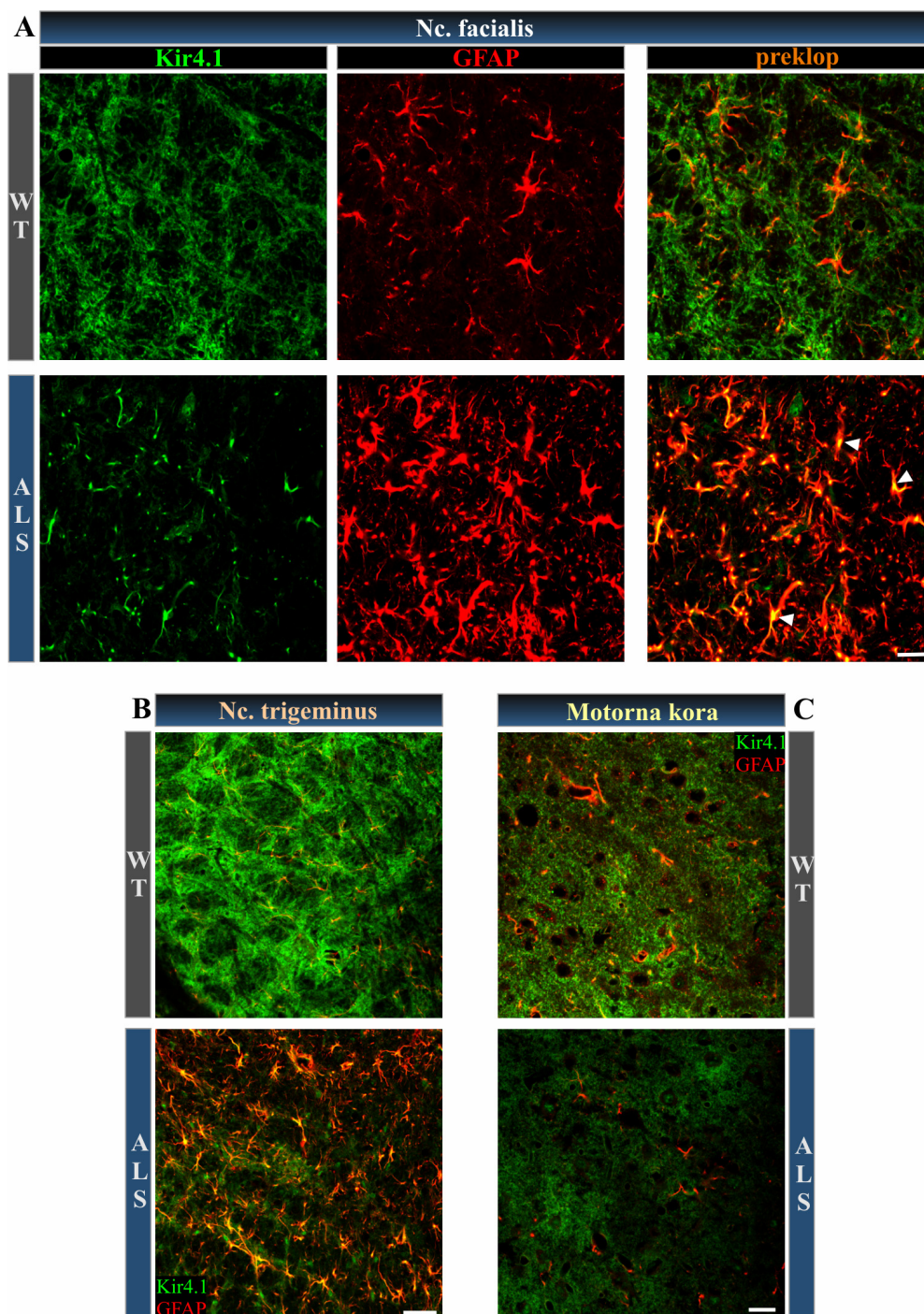
Ispitivanje ekspresije Kir4.1 u moždanoj kori je ukazalo na povećanu ekspresiju kod ALS pacova (n=3) u odnosu na WT pacove (n=3), ali uočena promena nije statistički značajna (Slika 26).



**Slika 26.** Trend smanjenja ekspresije Kir4.1 u moždanoj kori ALS pacova. Gore: primeri Kir4.1 traka molekulske mase 40 kDa (monomer) i 200 kDa (multimer) dobijenih Western blot metodom ukazuju na smanjenje ekspresije proteina Kir4.1 u moždanoj kori ALS pacova. Kao kontrola korišćen je  $\beta$ -tubulin. Dole: kvantifikacija intenziteta traka je ukazala na smanjenu ekspresiju Kir4.1 u moždanoj kori ALS pacova (n=3) u poređenju sa WT pacovima (n=3), ali uočena promena nije statistički značajna.

Dvostruko imunofluorescentno obeležavanje zamrznutih moždanih preseka je pokazalo smanjenje signala za Kir4.1 i izraženu astrogliozu u *nc. facialis* i *nc. trigeminus* kod ALS pacova (Slika 27A, B). Fluorescentno obeleženi Kir4.1 i GFAP kolokalizuju u presecima mozga ALS pacova. Može se pretpostaviti da se gubitak Kir4.1 imunoreaktivnosti jednim delom dešava i u oligodendrocitima koji takođe ekspimiraju ovaj protein. Dodatno je fluorescentno obeležen Kir4.1 u motornoj kori i uočeno je smanjene Kir4.1 imunoreaktivnosti u ovom regionu (Slika 27C).

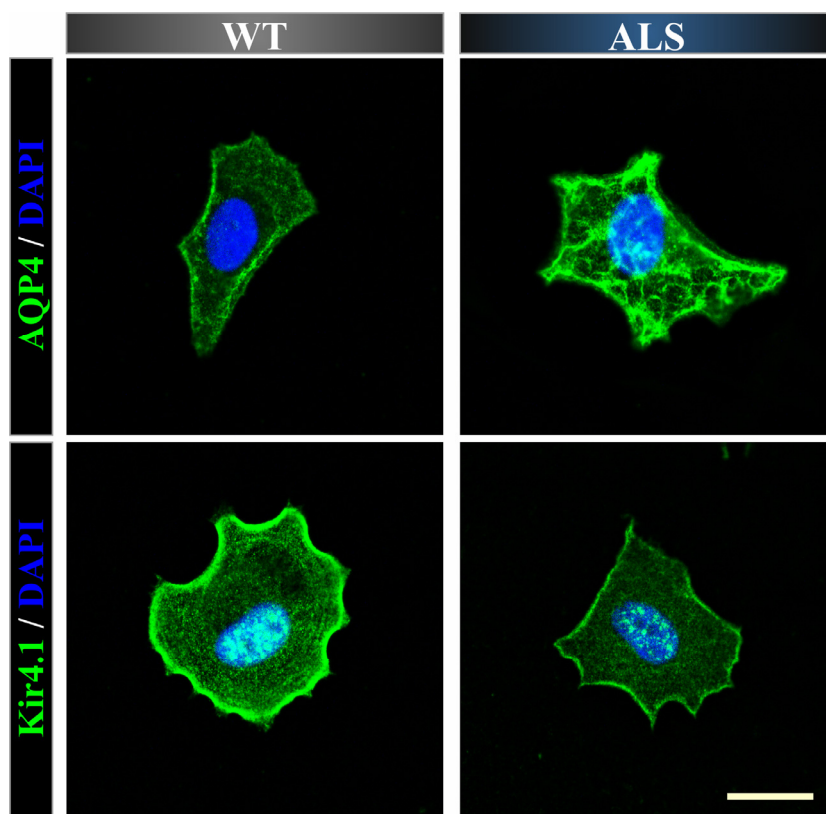




**Slika 27.** Smanjena Kir4.1 imunoreaktivnost u moždanom stablu i moždanoj kori ALS pacova. Poprečni preseki mozga WT i ALS pacova su dvostruko obeleženi antitelima na Kir4.1 (zeleno) i GFAP (crveno). Gubitak Kir4.1 imunoreaktivnosti i izražena astroglioza se uočavaju u **A**: *nc. facialis* i **B**: *nc. trigeminus* ALS pacova. Fluorescentno obeleženi Kir4.1 i GFAP kolokalizuju u ALS presecima (strelice). **C**: Gubitak Kir4.1 imunoreaktivnosti se uočava i u motornoj kori ALS pacova iako je manje izražen nego u moždanom stablu. Kalibracionim oznakama odgovaraju sledeće dužine A i C – 20  $\mu\text{m}$ ; B – 50  $\mu\text{m}$ .

## EKSPRESIJA AQP4 I KIR4.1 U ALS KORTIKALNIM ASTROCITIMA U KULTURI

Promena u ekspresiji AQP4 i Kir4.1 u moždanom tkivu ALS pacova je proverena u astrocitima u kulturi. Kortikalni astrociti u kulturi su fluorescentno obeleženi na AQP4 i Kir4.1. Imunocitohemija je pokazala povećanu AQP4 i smanjenu Kir4.1 imunoreaktivnost u ALS kortikalnim astrocitima u kulturi u poređenju sa WT astrocitima (**Slika 28**) što je u saglasnosti sa promenama uočenim u moždanim preseccima. Kulture astrocita su izolovane iz tri WT i četiri ALS pacova i zasejane na tri pokrovna stakla po životinji i svuda su uočene opisane promene.

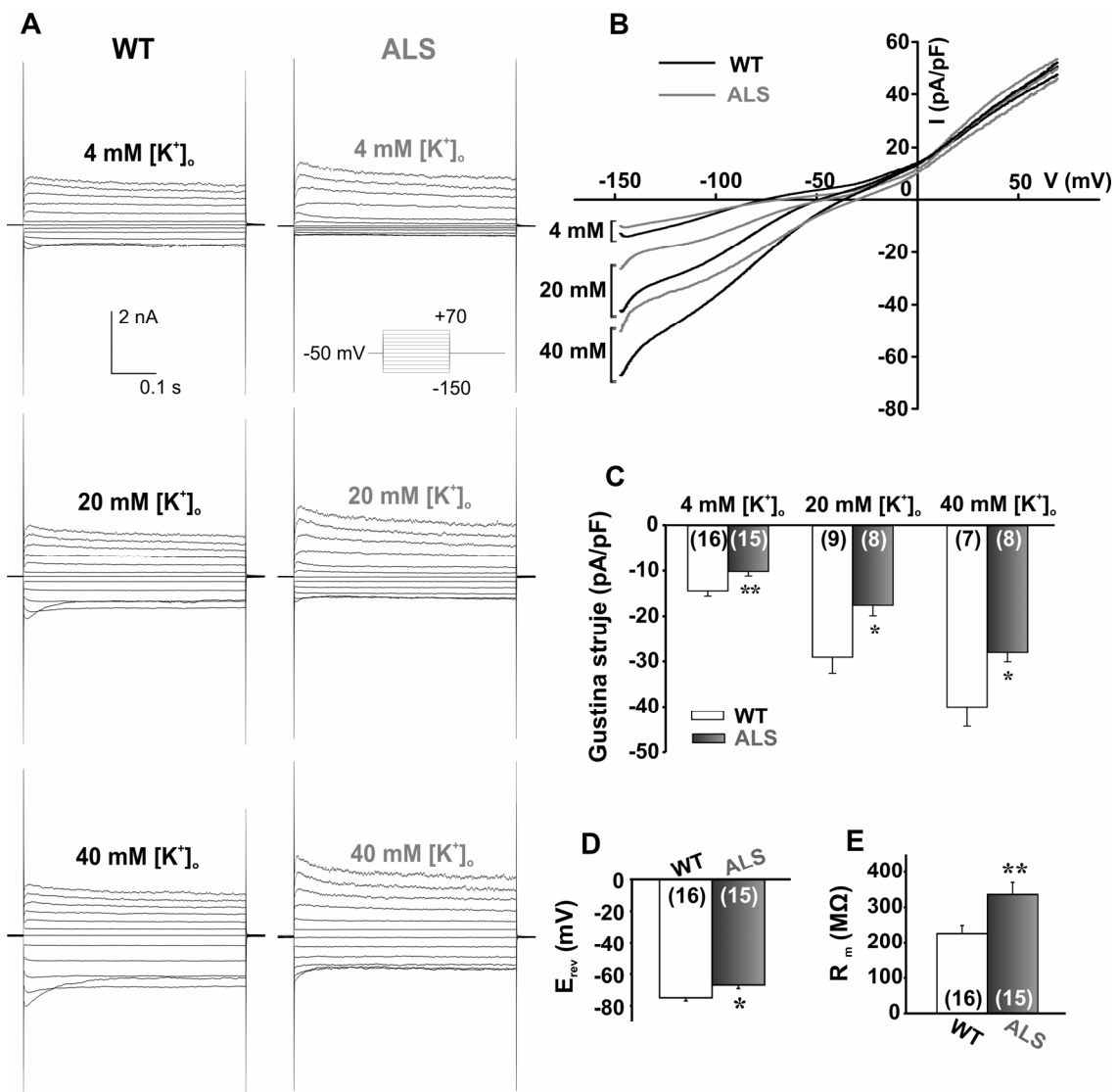


**Slika 28.** Primeri povećanja AQP4 i smanjenja Kir4.1 imunoreaktivnost u pojedinačnim ALS kortikalnim astrocitima u kulturi. Fluorescentno obeleženi AQP4 (zeleno) je pokazao povećanu imunoreaktivnost u ALS astrocitima u kulturi (gornji red). Imunocitohemija je pokazala smanjenu Kir4.1 imunoreaktivnost (zeleno) u ALS kortikalnim astrocitima u kulturi poređenju sa WT astrocitima (donji red). Nukleusi ćelija su obeleženi DAPI bojom (plavo). Kalibraciona oznaka je dužine 20  $\mu\text{m}$ .

## KARAKTERIZACIJA KIR STRUJA U KORTIKALNIM ASTROCITIMA U KULTURI

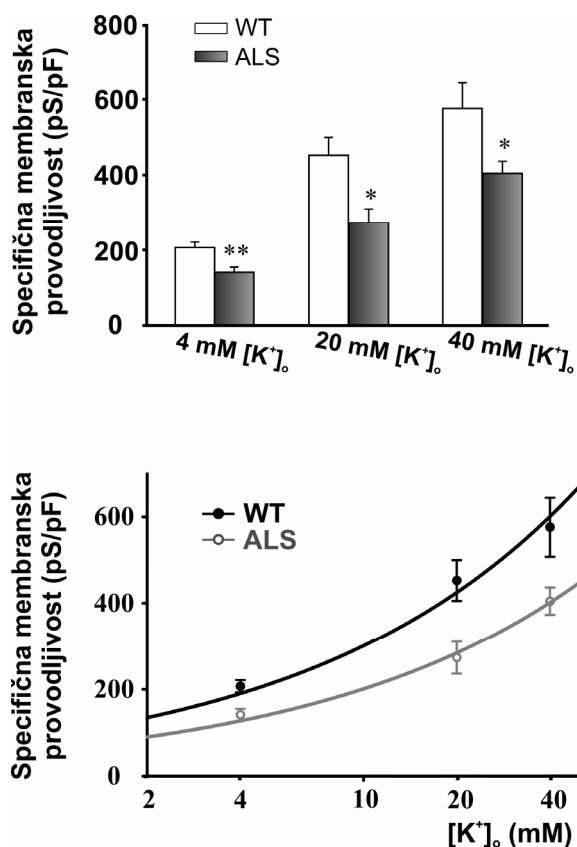
Smanjena ekspresija Kir4.1 u mozgu ALS pacova kao i u ALS astrocitima u kulturi je navela na ispitivanje funkcionalnih osobina Kir kanala. Eksperimenti nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji cela ćelija su urađeni na WT i ALS kortikalnim astrocitima u kulturi kako bi se okarakterisale Kir struje. Birane su ćelije koje imaju poligonalnu morfologiju i koje ne ostvaruju kontakt sa drugim astrocitima kako bi se izbegli električni artefakti posredovani pukotinastim vezama. Već utvrđene osobine Kir struja su njihova osetljivost na porast  $[K^+]_o$  i blokiranje dodavanjem  $Ba^{2+}$  i  $Cs^+$  jona u vanćelijski rastvor. Da bi se ispitala zavisnost Kir struja od koncentracije  $K^+$  u spoljašnjoj sredini (Newman, 1993; Ransom and Sontheimer, 1995), standardni 4 mM  $[K^+]_o$  ekstraćelijski rastvor je zamenjen rastvorom 20 mM ili 40 mM  $[K^+]_o$ . Reprezentativni zapisi struja u WT i ALS astrocitima u različitim  $[K^+]_o$  su prikazani na **Slici 29A**. Kir struje u WT i ALS astrocitima pokazuju karakteristike ulaznog ispravljača i pokazuju rast amplitude sa porastom  $[K^+]_o$  (**Slika 29A, B**). Gustina Kir struja izmerenih na -130 mV je statistički značajno manja u ALS u poređenju sa WT astrocitima u 4, 20 i 40 mM  $[K^+]_o$  (redom  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  i  $p < 0,05$ ; **Slika 29C**). Vrednosti izmerenih gustina Kir struja na -130 mV u 4, 20 i 40 mM  $[K^+]_o$  su iznosile u WT astrocitima:  $-14,5 \pm 1,1$  pA/pF ( $n=16$ ),  $-29,1 \pm 3,5$  pA/pF ( $n=9$ ) i  $-40,0 \pm 4,3$  pA/pF ( $n=7$ ) i u ALS astrocitima:  $-10,2 \pm 1,0$  pA/pF ( $n=15$ ),  $-17,6 \pm 2,3$  pA/pF ( $n=8$ ) i  $-28,1 \pm 2,1$  pA/pF ( $n=8$ ).

Još jedna promena uočena sa porastom  $[K^+]_o$  je pomeraj potencijala reverzije ( $E_{rev}$ ) ka pozitivnim vrednostima (**Slika 29B**). Potencijali reverzije u WT astrocitima su iznosili  $-74,9 \pm 2,0$  mV ( $n=16$ ),  $-49,3 \pm 3,8$  mV ( $n=9$ ) i  $-36,4 \pm 3,0$  mV ( $n=7$ ), a u ALS astrocitima  $-66,9 \pm 2,2$  mV ( $n=15$ ),  $-46,4 \pm 2,1$  mV ( $n=8$ ) i  $-30,9 \pm 2,3$  mV ( $n=8$ ) u 4, odnosno 20 i 40 mM  $[K^+]_o$ . Eksperimentalno određene vrednosti  $E_{rev}$  su bile bliske teoretskim vrednostima ravnotežnog potencijala za  $K^+$  ( $E_k$ ) izračunatim po Nernstovoj jednačini: -91,1, odnosno -50,2 i -32,6 mV. Ovaj podatak ukazuje da su izmerene struje uglavnom nošene jonima  $K^+$ . Kada su upoređeni potencijali reverzije u standardnom 4 mM  $[K^+]_o$ , uočen je statistički značajan porast  $E_{rev}$  ( $p < 0,05$ ) u ALS astrocitima (**Slika 29D**). Promena u  $E_{rev}$  je praćena statistički značajnim porastom ( $p < 0,01$ ) membranskog



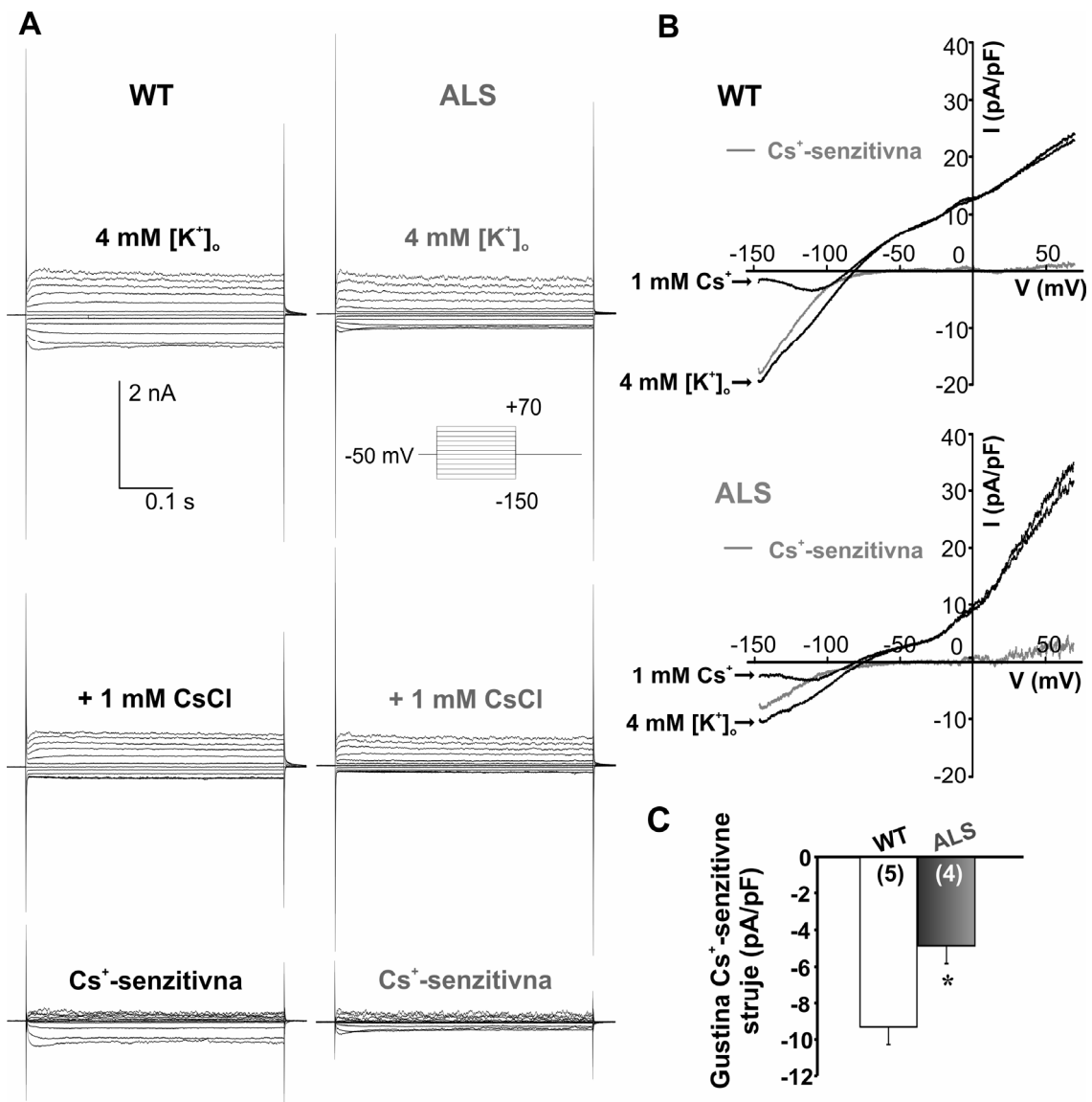
**Slika 29.** Gustina Kir struja dobijenih metodom nametnute voltaže u konfiguraciji „cela ćelija” je manja u ALS astrocitima. **A:** Zapisi struja u konfiguraciji *cela ćelija* u 4, 20 i 40 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dobijeni primenom predstavljenog protokola. Predstavljani zapisi su dobijeni iz WT i ALS astrocita istih membranskih kapacitivnosti ( $C_m=35$  pF). **B:** Srednje vrednosti gustina struja u WT i ALS astrocitima u 4 (n=16 odnosno n=15), 20 (n=9 odnosno n=8) i 40 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (n=7 odnosno n=8). Gustine Kir struja u ALS astrocitima su manje osetljive na porast [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Zapisi struja su pomereni ka pozitivnim potencijalima sa porastom [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. **C:** srednja vrednost gustine struja izmerenih na -130 mV je statistički značajno manja u ALS astrocitima u 4, 20 i 40 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. **D:** Srednja vrednost potencijala reverzije ( $E_{rev}$ ) u standardnom 4 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> rastvoru je značajno povećana u ALS astrocitima. **E:** Srednja vrednost membranskog otpora ( $R_m$ ) u 4 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> je statistički značajno veća u ALS astrocitima. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

otpora ( $R_m$ ;  $226,0 \pm 22,8 \text{ M}\Omega$ ,  $n=16$  u WT i  $335,9 \pm 34,0 \text{ M}\Omega$ ,  $n=15$  u ALS astrocitima; **Slika 29E**). Povećana vrednost  $R_m$  uočena u ALS astrocitima može biti posledica smanjene aktivnosti Kir kanala (Olsen et al., 2007).



**Slika 30.** Smanjenje specifične membranske provodljivosti u ALS astrocitima. Gore: specifična membranska provodljivost je statistički značajno manja u ALS astrocitima u svakoj ispitivanoj  $[K^+]_o$ . Dole: srednje vrednosti specifičnih membranskih provodljivosti u različitim  $[K^+]_o$  su pripadale korenoj funkciji što je odlika provodljivosti Kir kanala. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Pored uočenih razlika u gustini struja, ispitana je i membranska provodljivost WT i ALS astrocita u različitim  $[K^+]_o$ . Membranska provodljivost predstavlja nagib prave koja spaja vrednosti ulaznih struja izmerenih u opsegu voltaže od -110 do -70 mV na I-V dijagramu. Specifična membranska provodljivost je izračunata deljenjem vrednosti membranske provodljivosti odgovarajućim vrednostima  $C_m$  i dobjene su sledeće vrednosti:  $0,21 \pm 0,01 \text{ nS/pF}$  ( $n=16$ ), odnosno  $0,45 \pm 0,05 \text{ nS/pF}$  ( $n=9$ ) i  $0,58 \pm 0,07 \text{ nS/pF}$  ( $n=7$ ) u WT astrocitima i  $0,14 \pm 0,01 \text{ nS/pF}$  ( $n=15$ ), odnosno  $0,27 \pm 0,04 \text{ nS/pF}$  ( $n=8$ ) i  $0,40 \pm 0,03 \text{ nS/pF}$  ( $n=8$ ) u ALS astrocitima u 4 mM, odnosno 20 i 40 mM



**Slika 30.** Gustina Cs<sup>+</sup>-senzitivne Kir struje je smanjena u ALS astrocitima. **A:** Zapisi struja WT i ALS astrocita u 4 mM (prvi red), u prisustvu 1 mM CsCl (srednji red) i odgovarajuća Cs<sup>+</sup>-senzitivna komponenta struje (donji red). **B:** Primeri zapisa gustina struja pre i nakon dodavanja 1 mM CsCl u WT i ALS astrocitima. Odgovarajuće gustine Cs<sup>+</sup>-senzitivnih struja su prikazane linijom sive boje. Zapisi pod A i B su dobijeni sa astrocita približno istog C<sub>m</sub> (~25 pF). **C:** Srednja vrednost gustine Cs<sup>+</sup>-senzitivne struje izmerene na -130 mV je statistički značajno manja u ALS astrocitima (n=4) u odnosu na WT astrocite (n=5; \*p<0,05).

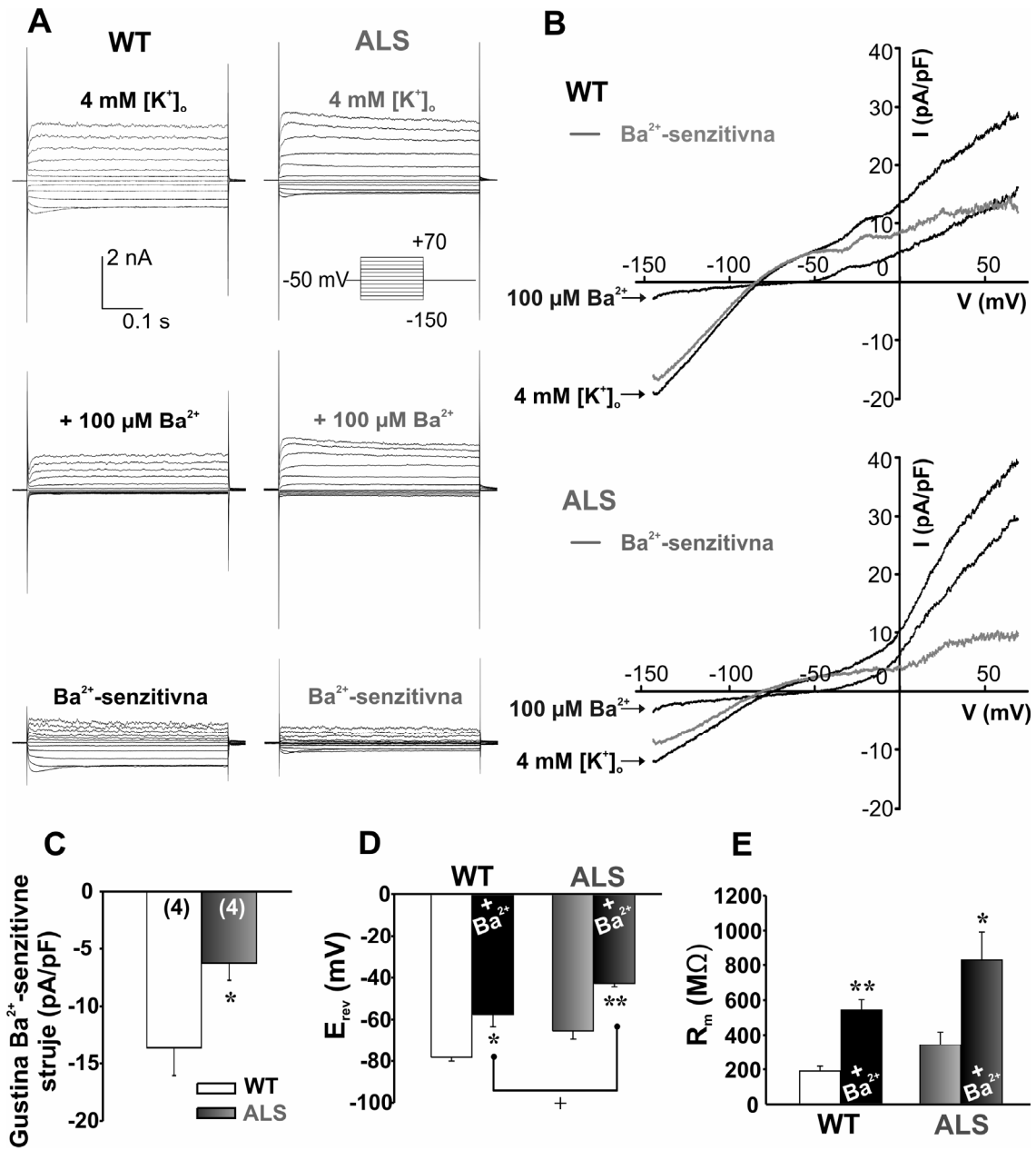
[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Specifična membranska provodljivost je bila statistički značajno manja u ALS astrocitima u svim ispitivanim [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (**Slika 30**) što može biti posledica smanjene ekspresije Kir kanala. Srednje vrednosti specifičnih membranskih provodljivosti u 4, 20

i 40 mM  $[K^+]_o$  su pripadale korenskoj funkciji oblika  $f = a * \sqrt{[K^+]_o}$  što je karakteristika Kir kanala (Hagiwara and Takahashi, 1974; Ransom and Sontheimer, 1995; **Slika 30**).

Dalja karakterizacija Kir struja u WT i ALS astrocitima je postignuta dodavanjem mikromolarnih koncentracija  $Cs^+$  i  $Ba^{2+}$  za koje je utvrđeno da blokiraju Kir struje (Ransom and Sontheimer, 1995). U prisustvu 1 mM CsCl Kir struje su bile smanjene (**Slika 31A, B**). Stepen blokade je bio veći u WT astrocitima ( $53,8 \pm 3,3\%$ ,  $n=5$ ) u poređenju sa ALS astrocitima ( $42,5 \pm 5,2\%$ ,  $n=4$ ). Gustina  $Cs^+$ -senzitivne struje je bila statistički značajno manja ( $p<0,05$ ) u ALS ( $-4,9 \pm 1,0$  pA/pF,  $n=4$ ) u poređenju sa WT astrocitima ( $-9,3 \pm 1,0$  pA/pF,  $n=5$ ; **Slika 31C**). Sa **Slike 31B** se može uočiti da dodavanje  $Cs^+$  ne utiče na amplitudu izlaznih struja ističući specifičnost  $Cs^+$  bloka za ulazne struje.

Još jedna osobina Kir struja je njihova osetljivost na prisustvo  $Ba^{2+}$  jona u vanćelijskom rastvoru (Newman, 1993; Ransom and Sontheimer, 1995). Za razliku od  $Cs^+$ ,  $Ba^{2+}$  je blokirao i ulaznu i izlaznu struju (**Slika 32A, B**). Dodavanje 100  $\mu$ M  $Ba^{2+}$  je blokiralo veći deo Kir struje u WT ( $79,4 \pm 4,3\%$ ,  $n=4$ ) u odnosu na ALS astrocite ( $69,6 \pm 4,1\%$ ,  $n=4$ ). Analiza gustine  $Ba^{2+}$ -senzitivne Kir struje je pokazala statistički značajno smanjenje ( $p<0,05$ ; **Slika 32C**) u ALS astrocitima ( $-6,3 \pm 1,5$  pA/pF;  $n=4$ ) u odnosu na WT astrocite ( $-13,6 \pm 2,4$  pA/pF;  $n=4$ ). Dodavanje jona  $Ba^{2+}$  je dovodilo do statistički značajnog pomeranja  $E_{rev}$  ka pozitivnim vrednostima, sa  $-78,0 \pm 1,9$  mV na  $-57,4 \pm 5,8$  mV u WT ( $p<0,05$ ) i sa  $-62,2 \pm 3,8$  mV na  $-42,6 \pm 1,6$  mV u ALS astrocitima ( $p<0,01$ ; **Slika 32D**). Pored toga, dodavanje 100  $\mu$ M  $Ba^{2+}$  je dovodilo do statistički značajnog povećanja  $R_m$  u WT (sa  $187,0 \pm 28,9$  M $\Omega$  na  $540,0 \pm 59,6$  M $\Omega$ ;  $p<0,01$ ) i ALS astrocitima (sa  $339,3 \pm 74,0$  M $\Omega$  na  $825,0 \pm 164,1$  M $\Omega$ ;  $p<0,05$ ; **Slika 32E**).

Smanjena provodljivost Kir kanala kao i smanjena gustina  $Cs^+$ - i  $Ba^{2+}$ -senzitivnih Kir struja u ALS astrocitima ukazuju na smanjen potencijal astrocita u uklanjanju viška ekstraćelijskog  $K^+$  oslobođenog pri aktivnosti neurona što može uticati na njihovo preživljavanje.



**Slika 32.** Gustina Ba<sup>2+</sup>-senzitivne Kir struje je smanjena u ALS astrocitima. **A:** Zapisi struja WT i ALS astrocita približno iste vrednosti C<sub>m</sub> (~45 pF) u 4 mM (prvi red), u prisustvu 100 μM BaCl<sub>2</sub> (srednji red) i odgovarajuća Ba<sup>2+</sup>-senzitivna komponenta struje (donji red). **B:** Primeri gustine struja pre i nakon dodavanja 100 μM Ba<sup>2+</sup> i odgovarajuće Ba<sup>2+</sup>-senzitivne struje (siva linija) u WT i ALS astrocitima (C<sub>m</sub>~35 pF). **C:** gustina Ba<sup>2+</sup>-senzitivne struje izmerene na -130 mV je statistički značajno manja u ALS astrocitima. **D:** dodavanje Ba<sup>2+</sup> dovodi do statistički značajnog pomeranja E<sub>rev</sub> ka pozitivnim vrednostima potencijala i u WT (n=4) i u ALS astrocitima (n=4). Potencijal reverzije u prisustvu Ba<sup>2+</sup> je statistički značajno veći u ALS astrocitima (+p<0,05). **E:** Dodavanje 100 μM Ba<sup>2+</sup> je dovelo do statistički značajnog povećanja R<sub>m</sub> u oba tipa astrocita (\*\*p<0,01, \*p<0,05).



## DISKUSIJA

---

Amiotrofična lateralna skleroza je neurodegenerativna bolest koju karakteriše odumiranje motornih neurona što vodi progresivnoj paralizi i smrti. Predloženi su mnogi mehanizmi bolesti, ali uzrok ALS ostaje i dalje nepoznat. Cilj ove studije je bio da ukaže na promene u mozgu (za razliku od često ispitivane kičmene moždine) ALS pacova i pokuša da doprinese objašnjenju ćelijskih i molekulskih mehanizama bolesti.

### NEURODEGENERATIVNA ŽARIŠTA U MOZGU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA

Ispitivanje WT i transgenih hSOD1<sup>G93A</sup> pacova primenom MRI metode je ukazalo na postojanje neurodegenerativnih žarišta u moždanom stablu ALS pacova. Pojačan intenzitet signala na T2W slikama dobijenim primenom 1,5 T i 7 T MRI je uočen u *nc. facialis*, *nc. ambiguus*, *nc. trigeminus* i *nc. pontis* simptomatičnih ALS pacova. Pojačani intenziteti signala nisu primećeni kod WT pacova iste starosti. Validnost promena detektovanih primenom kliničkog uređaja jačine 1,5 T je potvrđena slikama veće rezolucije i jasnije uočljivim promenama dobijenim magnetom jačine 7 T. Promene uočene kod ALS pacova su u saglasnosti sa detektovanim regionima neurodegeneracije primenom 4,7 T MRI na SOD1<sup>G93A</sup> modelu miša (Zang et al., 2004; Niessen et al., 2006). Kasnija studija na istom modelu miša je potvrdila neurodegeneraciju u motornim jedrima moždanog stabla primenom histoloških metoda (Ferrucci et al., 2010). Pored toga, MRI rezultati na ALS životinjskim modelima su u saglasnosti sa nalazima MRI studija na pacijentima koje su ukazale na gubitak motornih neurona u moždanom stablu (Cwik et al., 1998; Basak et al., 2002). Štaviše, MRI studija na ALS pacijentima je pokazala smanjen intenzitet T1W signala u korteksu koji ukazuje na gubitak motoneurona i pojačan intenzitet T2W signala u kortikospinalnom putu što ukazuje na njegovo oštećenje (Ellis et al., 2001; Basak et al., 2002; Hecht et al., 2002).

Izrazita promena u mozgu ALS pacova je proširenje lateralnih komora jasno uočeno na T2W i T1W slikama u vidu pojačanog, odnosno smanjenog intenziteta signala. Upravo je preklapanje regiona povećanog, odnosno smanjenog signala dobijenih primenom T2W i T1W protokola potvrda da je pojačan T2W intenzitet

signala posledica proširenja komora, a ne neurodegeneracije okolnog tkiva. Pored toga, primenom 1,5 T MRI je pokazano i proširenje Silvijeovog kanala u mozgu ALS pacova takođe uočeno i u mozgu ALS miša primenom 4,7 T MRI (Zang et al., 2004). Od značaja je istaći da su proširene lateralne komore uočene kod ALS pacijenata primenom MRI metode i pretpostavljeno je da ova promena nastaje kao posledica neurodegeneracije (Frank et al., 1997). Jedan od uzroka proširenja lateralnih komora može biti poremećena homeostaza vode u mozgu ALS pacova za koju je prvenstveno odgovoran AQP4.

Najveći deo istraživanja različitih oboljenja zahteva žrtvovanje velikog broja eksperimentalnih životinja kako bi se opisala bolest u različitim fazama. MRI je neinvazivna metoda koja omogućava *in vivo* praćenje promena u mozgu eksperimentalnih životinja i pacijenata. Podaci različitih MRI studija ukazuju da se ovom metodom može detektovati veći deo neurodegenerativnih promena u CNS kako u mozgu ALS pacijenata tako i u mozgu životinja koje su model ALS, a koje pokazuju sličnu kliničko-patološku sliku. Stoga, MRI kao neinvazivna tehnika ima sve značajniju primenu u dijagnozi ALS. Primenom MRI su uočena mesta atrofije u ljudskom mozgu koja nije bilo moguće detektovati *post mortem* analizom tkiva pacijenata (Ellis et al., 2001). MRI zajedno sa drugim neinvazivnim metodama oslikavanja poput kvantitativnog T2 mapiranja, difuzionog-tenzorskog oslikavanja i magnetno rezonantne spektroskopije može doprineti praćenju patoloških promena u sivoj i beloj masi u ALS. Prednost ove metode jeste i mogućnost *in vivo* praćenja progresije bolesti i neuropatoloških promena u odgovoru na terapiju lekovima.

## NEUROINFLAMATORNA ŽARIŠTA U MOZGU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA

Primena posebno dizajniranih antitela obeleženih ultra malim paramagnetnim partikulama gvožđe oksida je omogućila *in vivo* praćenje inflamatornih procesa u životinjskim modelima različitih bolesti primenom MRI tehnike. U ranijim istraživanjima ovi markeri su primenjivani za ispitivanje inflamatornih procesa u multiploj sklerozi i uočena je njihova akumulacija u mozgu miševa i pacova koji su model za proučavanje multiple skleroze (Floris et al., 2004; Pirko et al., 2004). U našoj studiji USPIO markeri su korišćeni za *in vivo* praćenje neuroinflamatornih procesa u

mozgu ALS pacova primenom 1,5 T MRI. U tu svrhu su korišćena anti-CD4 i anti-CD8 USPIO antitela koja se vezuju za odgovarajuće klase T-limfocita prisutne u krvi eksperimentalnih pacova. Primenom USPIO markera na pacovskom modelu ALS je uočena akumulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita u tkivu oko lateralnih komora, dok su CD8<sup>+</sup> T-limfociti akumulirani u nivou moždanog stabla. Rezultati studije ukazuju na izraženiju infiltraciju inflamatornih ćelija u mozak ALS pacova u blizini lateralnih komora. Ranija istraživanja na ALS mišu su pokazala da je procenat CD4<sup>+</sup> T limfocita povećan već u početnim fazama bolesti, dok porast broja CD8<sup>+</sup> T-limfocita raste u krajnjoj fazi bolesti (Beers et al., 2008). Istraživanja na ALS pacijentima su pokazala prisustvo infiltriranih T-limfocita na mestima gubitka motornih neurona (Engelhardt et al., 1993; Levine et al., 1999; Schiffer et al., 1996). Takođe, u krvi sALS pacijenata je uočen povećan procenat aktiviranih CD4<sup>+</sup> T-limfocita, dok zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita nije bila promenjena u odnosu na zdrave kontrole (Zhang et al., 2005). Specifično dizajnirana magnetno obeležena antitela mogu biti primenjena za ispitivanje svih tipova ćelija u organizmu koje na svojoj površini eksprimiraju specifične antigene. Proučavanje dodatnih tipova imunskih ćelija bi moglo doprineti detaljnijoj slici o neuroinflamaciji u ALS. Partikule koje imaju karakteristike slične USPIO markerima su odobrene za upotrebu na ljudima što otvara mogućnost primene *in vivo* MRI tehnike u praćenu imunskih ćelija u različitim oboljenjima CNS. Vreme potrebno za potpunu biodegradaciju ovih antitela je 7 dana što je još jedna prednost njihove primene u mnogim kliničkim studijama. Ipak, primena ovih antitela ima i izvesna ograničenja. Moguće je da vezivanje ovih antitela utiče na funkcionalnost imunskih ćelija što zahteva dodatna ispitivanja. Dodatno ograničenje je nizak odnos signala i šuma što produžava vreme akvizicije signala.

## OŠTEĆENJE KRVNO-MOŽDANE BARIJERE U ALS

Kod pacova kojima su aplicirani CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> USPIO markeri, primenom MRI metode je praćena i očuvanost krvno-moždane barijere. U tu svrhu, životinjama je intravenozno apliciran Gd-DTPA kontrastni agens. Rezultati su pokazali da je propustljivost HEB povećana u mozgu ALS pacova u poređenju sa WT pacovima. Pretpostavljeno je da narušavanje HEB prethodi infiltraciji T-limfocita u moždano tkivo ALS pacova. Paralelna studija na istom pacovskom modelu ALS je pokazala

propustljivost HEB za Evansovo plavo, smanjenu ekspresiju proteina čvrstih veza kao i prisustvo depozicija imunoglobulina (Nicaise et al., 2009b). Oštećenje krvno-moždane barijere je uočeno u više studija na mišjim modelima ALS. Primenom elektronske mikroskopije pokazane su strukturne promene koje ukazuju na oštećenu HEB na SOD1<sup>G93A</sup> modelu miša (Garbuzova-Davis et al., 2007b). Usledila je studija na više različitih SOD1 transgenih modela miševa na kojima je pokazana smanjena ekspresija proteina koji učestvuju u formiranju čvrstih veza endotelnih ćelija što dovodi do narušavanja krvno-moždane barijere (Zhong et al., 2008). Oštećenje HEB uočeno u mišjim i pacovskim modelima ALS ukazalo je da je ključni događaj u patogenezi ALS narušavanje HEB (Zlokovic, 2008). Po ovom modelu, oštećenje HEB otvara put za infiltraciju inflamatornih ćelija i faktora u moždano tkivo, a potom do aktivacije mikroglije i astrocita što zajedno doprinosi gubitku motornih neurona. Najnovija istraživanja su pokazala da je HEB narušena i kod ALS pacijenata. Ispitivanje kičmene moždine ALS pacijenata elektronskom mikroskopijom je ukazalo na oštećenje endotelnih ćelija i pericita, smanjenu ekspresiju proteina koji formiraju čvrste veze i prisustvo imunoglobulina u tkivu (Garbuzova-Davis et al., 2012). Druga studija na ALS pacijentima primenom imunohistohemijskih metoda je pokazala prisustvo depozita hemoglobina i redukciju pericita u kičmenoj moždini (Winkler et al., 2012). Ovi nalazi mogu objasniti hipotezu o ulozi humoralne imunosti u ALS i efekta imunoglobulina pacijenata (Stenovec et al., 2012).

### **AKTIVACIJA MIKROGLIJE I ASTROCITA U MOZGU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA**

Indikacija inflamatornih procesa dobijena MRI metodom je praćena imunofluorescentnim obeležavanjem mikroglije i astrocita u oštećenim regionima mozga. Ispitivanje preseka moždanog stabla ALS pacova je ukazalo na prisustvo aktivirane mikroglije kao i na izraženu astrogliozu. Klinička slika ne opisuje hipokampus kao mesto neurodegeneracije u ALS, ali je na pacovskom modelu bolesti uočeno prisustvo aktivirane mikroglije u ovom regionu što ukazuje na kompleksnost mehanizama ALS. Pored toga, uočena je aktivacija mikroglije u tkivu oko lateralnih komora za koje je primenom MRI pokazano da su proširene. Ispitivanje ALS modela miša je ukazalo na prisustvo aktivirane mikroglije i reaktivnih astrocita (Bruijn et al.,

1997; Hall et al., 1998b; Levine et al., 1999; Alexianu et al., 2001). Kod ALS pacijenata aktivacija mikroglije je pokazana u više regiona: moždanom stablu, motornoj kori, dorzolateralnoj prefrontalnoj kori i talamusu (Troost et al., 1990, Kawamata et al., 1992; Turner et al., 2004), a reaktivni astrociti su uočeni na mestima gubitka motornih neurona (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994; O'Reilly et al., 1995; Schiffer et al., 1996). Pri tom, prisutnost mikroglije u aktivnoj formi i reaktivnih astrocita je rasla sa progresijom bolesti. Od posebne važnosti je nedavna studija na ALS pacijentima gde je primenom 3 T i 7 T MRI uočeno smanjenje intenziteta T2W signala u motornom korteksu (Kwan et al., 2012). U istoj studiji je pokazano da je ova promena posledica akumuliranog gvožđa u mikroglijalnim ćelijama što ističe značaj ovih ćelija u patologiji ALS. Dvostruko fluorescentno obeležavanje mikroglije i neurona je ukazalo na direktan kontakt nastavaka aktivirane mikroglije i tela neurona u mozgu ALS pacova. Pretpostavljeno je da je ovakva interakcija priprema mikroglije za fagocitozu motornih neurona što je u saglasnosti sa podacima prethodnih studija koji ukazuju da mikroglija koja eksprimira mSOD1 ima izraženiji toksični efekat na motorne neurone (Boillee et al., 2006).

### **PROMENA U EKSPRESIJI I DISTRIBUCIJI AQP4 U MOZGU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA**

Oštećenje HEB pokazano primenom MRI metode zajedno sa prisustvom reaktivnih astrocita u mozgu ALS pacova je usmerilo dalja istraživanja na detaljnije proučavanje funkcije astrocita u bolesti. Poznato je da astrocitna stopala doprinose stabilnosti HEB i to prvenstveno putem održavanja homeostaze vode i jona u nervnom tkivu. Najveći doprinos u održavanju homeostatskih uslova imaju dva proteina, AQP4 i Kir4.1 koji su ekspimirani i kolokalizovani na membrani astrocitnih stopala koja okružuju HEB (Nagelhus et al., 1999, 2004).

Promena u ekspresiji AQP4 je karakteristična za različita neuropatološka stanja poput edema mozga (Manley et al., 2000; Saadoun and Papadopoulos, 2010), povrede kičmene moždine (Nesic et al., 2006) i cerebralne ishemije (Taniguchi et al., 2000). Kada je reč o ALS, uočena je povećana ekspresija AQP4 u kičmenoj moždini pacovskog modela (Nicaise et al., 2009a). U istoj studiji je pokazano oticanje astrocitnih stopala što može biti posledica povećane ekspresije AQP4. Podaci naših istraživanja na

ALS modelu pacova ukazuju da promene u ekspresiji AQP4 postoje i u višim moždanim centrima. Rezultati *Western blot* ispitivanja pokazuju povećanu ekspresiju AQP4 u moždanom stablu i moždanoj kori ALS pacova. Kada su fluorescentno obeleženi AQP4 i astrociti, pokazana je povećana AQP4 imunoreaktivnost u astrocitnim nastavcima koja okružuju krvne sudove u *nc. facialis* i *nc. trigeminus* ALS pacova. Kako i endotelne ćelije eksprimiraju AQP4 (Nagelhus et al., 2004) ne može se isključiti mogućnost da i one doprinose povećanoj AQP4 imunoreaktivnosti oko krvnih sudova. Pored toga, pojačan AQP4 fluorescentni signal je uočen u površinskom sloju mozga - *glia limitans* i u motornom korteksu. Ispitivanje kortikalnih astrocita u kulturi je pokazalo povećanu AQP4 imunoreaktivnost u ALS astrocitima. Uočeno povećanje ekspresije AQP4 može ukazati na poremećaj u transportu vode u moždanom tkivu, a to može uticati na funkciju neurona u ALS. Pored toga, proširenje lateralnih komora uočeno primenom MRI u ALS pacovu može biti posledica povećane ekspresije AQP4 i poremećenog transporta vode u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Ovi rezultati takođe ukazuju da se povećana ekspresija AQP4 uočava zajedno sa oštećenjem krvno-moždane barijere u mozgu ALS pacova, što je u drugim studijama opisano i na modelu miša (Garbuzova-Davis et al., 2007a,b; Zhong et al., 2008). Ispitivanja uloge AQP4 u održavanju stabilnosti HEB su dala vrlo raznolike rezultate. Tako na primer, ukoliko se oštećenje HEB izazove intraparenhimalnom injekcijom LPS, uočeno je povećanje količine informacione RNK za AQP4 u reaktivnim astrocitima (Tomas-Camardiel et al., 2005). Zhou et al. (2008) su proučavali AQP4<sup>-/-</sup> miša i uočili otvaranje čvrstih veza i oticanje astrocitnih stopala. Pored toga, intravenozna aplikacija peroksidaze rena je pokazala povećanu propustljivost HEB kod AQP4<sup>-/-</sup> miša. Ova studija je ukazala da je ekspresiranost AQP4 od ključne važnosti za stabilnost HEB. Nasuprot ovim podacima, druge studije su pokazale da uklanjanje gena za AQP4 ne utiče na stabilnost HEB. Iako su Saadoun et al. (2002) ukazali da je narušavanje HEB u vezi sa povećanom ekspresijom AQP4, kasnija studija istih autora je istakla da se integritet HEB ne menja kod AQP4<sup>-/-</sup> miša (Saadoun et al., 2009). Zapravo, ova studija je pokazala da se ne uočavaju strukturalne promene krvnih sudova, da su očuvane čvrste veze između endotelnih ćelija, da se ne uočava oticanje astrocitnih stopala i da nema promene u propustljivosti HEB za peroksidazu rena. Kasnija studija na drugoj liniji AQP4<sup>-/-</sup> miša je potvrdila da nema promene u strukturi endotelnih ćelija, da su čvrste veze očuvane i da

nisu uočene promene u propustljivosti krvnih sudova ni za peroksidazu rena ni za Evansovo plavo (Eilert-Olsen et al., 2012). Jedno od mogućih objašnjenja odsustva promene u propustljivosti HEB kada AQP4 nije eksprimiran jeste da ćelije to nadoknađuju pojačanom ekspresijom drugih tipova akvaporina, npr. AQP9. Pored toga, protivurečnost podataka može biti posledica analiziranja samostalne uloge AQP4 u održavanju integriteta HEB. Poznato je da je AQP4 kolokalizovan sa Kir4.1 što ukazuje na mogućnost njihove sinergističke uloge u održavanju HEB. Naša studija je u nastavku pretpostavila da oba proteina doprinose oštećenju HEB u ALS. Stoga su detaljnije ispitane osobine Kir4.1 u ALS modelu pacova.

### **PROMENA U EKSPRESIJI KIR4.1 U MOZGU hSOD1<sup>G93A</sup> PACOVA**

Ispitivanje ekspresije Kir4.1 primenom *Western blot* metode je pokazalo gubitak Kir4.1 u moždanom stablu ALS pacova i indikaciju redukovane ekspresije Kir4.1 u motornoj kori ALS pacova. Razlike u stepenu smanjenja ekspresije proteina Kir4.1 u moždanom stablu i motornoj kori ukazuju da ova dva moždana regiona verovatno imaju različite zahteve za održavanje homeostaze K<sup>+</sup>. Ova pretpostavka je u skladu sa pokazanom različitom distribucijom Kir4.1 u astrocitima dorzalnih i ventralnih rogova kičmene moždine što ukazuje na regionalnu specifičnost održavanja homeostaze K<sup>+</sup> (Olsen et al., 2007). Rezultati Western blot analize su upotpunjeni rezultatima imunofluorescencije koji pokazuju da je Kir4.1 imunoreaktivnost smanjena u facijalnom i trigeminalnom jedru moždanog stabla i motornoj kori ALS pacova gde je uočeno da je AQP4 imunoreaktivnost povećana. Uočeno smanjenje ekspresije i imunoreaktivnosti Kir4.1 u mozgu ALS pacova je u saglasnosti sa opisanim gubitkom Kir4.1 u kičmenoj moždini SOD1<sup>G93A</sup> modela miša (Kaiser et al., 2006). Kako se na presecima moždanog stabla ALS pacova uočava kolokalizacija GFAP i Kir4.1, gubitak Kir4.1 imunoreaktivnosti jednim delom može biti i u oligodendrocitima za koje je pokazano da ekspimiraju ovaj protein (Poopalasundaram et al., 2000; Neusch et al., 2001). To otvara mogućnost za detaljnije ispitivanje uloge oligodendrocita u ALS. Kada su kortikalni astrociti u kulturi fluorescentno obeleženi, uočeno je smanjenje Kir4.1 imunoreaktivnosti u ALS astrocitima.

## FUNKCIONALNA SVOJSTVA KIR KANALA U ALS ASTROCITIMA

Da bi se opisala funkcionalna svojstva Kir kanala i okarakterisale njihove struje u WT i ALS astrocitima u kulturi ispitana su njihova već poznata svojstva: osetljivost Kir struja na  $[K^+]_o$  (njihova amplituda raste sa porastom  $[K^+]_o$ ) i blokiranje Kir struja u prisustvu jona  $Cs^+$  ili  $Ba^{2+}$  u vanćelijskom rastvoru (Newman, 1993; Ransom and Sontheimer, 1995). Rezultati eksperimenata su pokazali statistički značajno smanjenje gustine Kir struja kao i specifične membranske provodljivosti u svim primenjenim  $[K^+]_o$  u ALS astrocitima u poređenju sa WT astrocitima. Pored toga, kada su Kir struje blokirane dodavanjem  $Cs^+$  ili  $Ba^{2+}$  u vanćelijski rastvor, odgovarajuća  $Cs^+$ -senzitivna odnosno  $Ba^{2+}$ -senzitivna gustina Kir struje je bila značajno smanjena u ALS astrocitima. Kir struje u ALS astrocitima su bile manje osetljive na povećanje  $[K^+]_o$ , što ukazuje na njihov smanjen potencijal za preuzimanje  $K^+$  iz vanćelijskog prostora što može imati toksični efekat na motorne neurone. Ranija studija je pokazala da kada se ćelijska linija motornih neurona izloži povećanoj  $[K^+]_o$  tokom 120 h, značajno se povećava njihova smrtnost u odnosu na motorne neurone gajene u fiziološkim uslovima (Kaiser et al., 2006).

Rezultati dobijeni elektrofiziološkim merenjima ukazuju na smanjenje ukupnih Kir struja u ALS astrocitima. Ranije studije na Kir4.1<sup>-/-</sup> miševima su pokazale da ukupnim Kir strujama najviše doprinosi Kir4.1 (Kofuji et al., 2000; Neusch et al., 2006; Djukic et al., 2007). Blokiranje ekspresije Kir4.1 korišćenjem specifično dizajniranih interferirajućih RNK u kortikalnim astrocitima u kulturi je ukazalo da upravo Kir4.1 ima ključnu ulogu u kontroli vanćelijskog  $K^+$  (Kucheryavykh et al., 2007). Uzimanjem ovih podataka u obzir, možemo zaključiti da je uočeno smanjenje Kir struja i provodljivosti u ALS astrocitima u saglasnosti sa uočenim smanjenjem Kir4.1 ekspresije i imunoreaktivnosti kako u ALS astrocitima u kulturi, tako i u moždanom tkivu ALS pacova. Pored toga, treba istaći da su rezultati ispitivanja Kir kanala u astrocitima u kulturi dobijenim iz novorođenih pacova koji ne pokazuju simptome bolesti u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na tkivu simptomatičnih ALS pacova što ukazuje na ćelijske osnove u patogenezi ALS.



## FUNKCIONALNA INTERAKCIJA AQP4 I KIR4.1

Ranije studije su pokazale da su AQP4 i Kir4.1 koeksprimirani i kolokalizovani u astrocitnim stopalima (Nagelhus et al., 1999, 2004). Pored toga, ova dva proteina su povezana citoskeletnim proteinima  $\alpha$ -sintrofonom i distrofonom (Connors et al., 2004). Bliska lokalizacija i povezanost astroglijalnih proteina AQP4 i Kir4.1 je ukazala i na mogućnost njihove direktne funkcionalne interakcije. Rezultati eksperimenata na  $\alpha$ -sintrofin<sup>-/-</sup> mišu su pokazali da je transport vode neophodan za efikasno uklanjanje K<sup>+</sup> koji se oslobađa pri neuronalnoj aktivnosti (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Korišćenje K<sup>+</sup>-senzitivnih elektroda u cilju praćenja promena [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> u hipokampusu AQP4<sup>-/-</sup> miša je pokazalo da su AQP4 kanali za vodu neophodni za regulaciju K<sup>+</sup> homeostaze (Strohschein et al., 2011). Nedavna studija je pokazala da povećanje [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dovodi do povećanja propustljivosti astrocita za vodu posredstvom AQP4 što je praćeno i povećanjem unutarćelijskog cAMP (Song and Gunnarson, 2012). Blokiranje Kir kanala u ovim uslovima je ukidalo povećanje transporta vode i ovom studijom je tako istaknuta funkcionalna povezanost Kir i AQP4. Nasuprot opisanim rezultatima, studije na AQP4<sup>-/-</sup> mišu su ukazale na odsustvo funkcionalne interakcije AQP4 i Kir4.1. Promena struje i provodljivosti Kir4.1 kanala nije uočena u akutno izolovanim astrocitima iz mozga AQP4<sup>-/-</sup> miša (Zhang and Verkman, 2002). U istoj studiji je pokazano da se ne menja ni ekspresija Kir4.1 u mozgu ovih miševa. Odsustvo promene potencijala mirovanja i provodljivosti Kir4.1 kanala je pokazano i u akutno izolovanim AQP4<sup>-/-</sup> Milerovim ćelijama (Ruiz-Ederra et al., 2007). Dodatno, odsustvo interakcije između AQP4 i Kir4.1 je pokazano na hipokampalnim presecima nakon povećane bioelektrične aktivnosti izazvane kainatom (Lee et al., 2012). Radi bolje karakterizacije našeg eksperimentalnog modela, dalja istraživanja na hSOD1<sup>G93A</sup> pacovima zahtevaju detaljnije ispitivanje funkcionalne interakcije AQP4 i Kir4.1. Pored toga, ispitivanje citoskeletnih proteina koji povezuju ova dva transmembranska proteina,  $\alpha$ -sintrofina i distrofina, bi dalo detaljnu sliku o povezanosti AQP4 i Kir4.1 u mozgu ALS pacova.

## INTERAKCIJA AQP4 I KIR4.1 SA GLUTAMATNIM TRANSPORTEROM

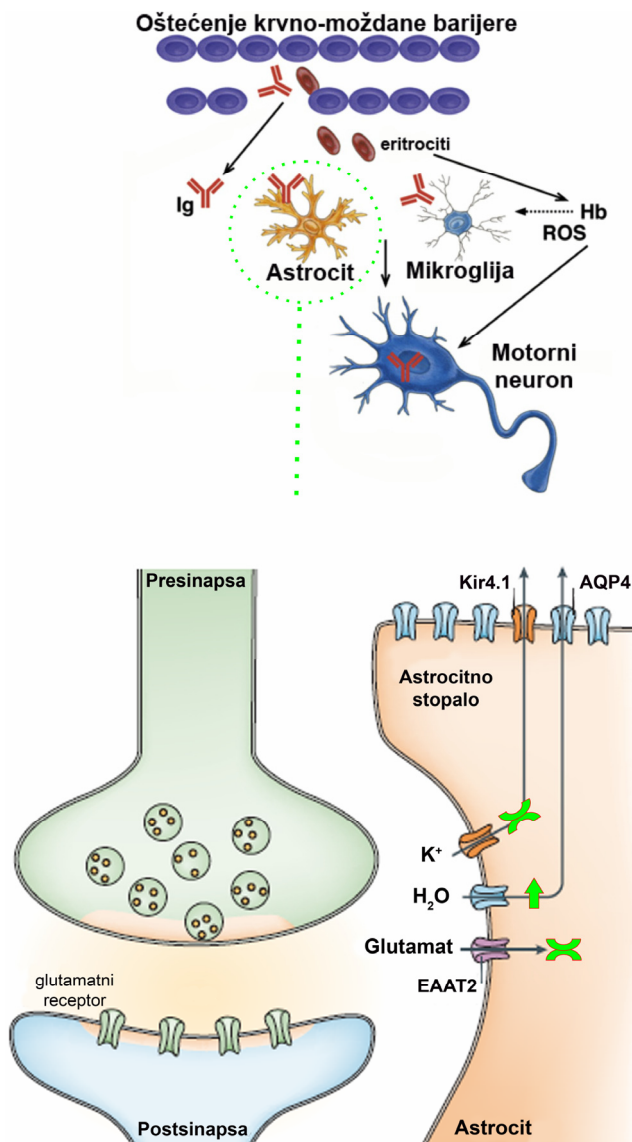
Od posebne važnosti je naglasiti da pored pretpostavljene interakcije AQP4 i Kir4.1, izvesne studije ukazuju na sinergističko funkcionisanje ova dva proteina i

glutamatnog transportera EAAT2/GLT-1. Ispitivanje Kir4.1<sup>-/-</sup> miša je pokazalo smanjen potencijal astrocita za preuzimanje kako K<sup>+</sup> tako i glutamata (Djukic et al., 2007). Blokiranje ekspresije Kir4.1 primenom interferirajućih RNK je dovelo do inhibicije preuzimanja glutamata u kortikalnim astrocitima u kulturi (Kucheryavykh et al., 2007). Podaci ovih studija ukazuju na funkcionalnu vezu između astrocitnog glutamatnog transportera i Kir4.1, i ističu da Kir4.1 nije bitan samo za održavanje K<sup>+</sup> homeostaze, već i za uklanjanje glutamata iz vanćelijske sredine. Istraživanja su pokazala da je AQP4 kolokalizovan sa glutamatnim transporterom GLT-1 (Nielsen et al., 1997). Ispitivanje primarnih astrocita u kulturi izolovanih iz AQP4<sup>-/-</sup> miša je pokazalo smanjenu ekspresiju GLT-1 kao i smanjen kapacitet ovih astrocita za preuzimanje vanćelijskog glutamata (Zeng et al., 2007). Proučavanje astrocita u kulturi je pokazalo da prisustvo glutamata povećava provodljivost za vodu što je posredovano aktivnošću AQP4 (Gunnarson et al., 2008). Isticanje funkcionalne veze GLT-1 transportera i AQP4, kao i GLT-1 i Kir4.1 je od posebne važnosti za patogenezu ALS jer se gubitak glutamatnog transportera EAAT2/GLT-1 smatra glavnim obeležjem bolesti. Ranije studije su pokazale gubitak ovog transportera kod ALS pacijenata (Rothstein et al., 1995). Potom je gubitak GLT-1 potvrđen i na različitim životinjskim modelima ALS (Bendotti et al., 2001; Howland et al., 2002). Zajedno posmatrano, oštećena funkcija astrocita u preuzimanju vanćelijskog glutamata i K<sup>+</sup> kao i narušena regulacija transporta vode mogu uticati na aktivnost neurona i dovesti do postepenog gubitka njihove disfunkcije ekscitotoksičnim mehanizmima.

Najveći deo istraživanja u ALS je usmeren na promene u kičmenoj moždini. Naša studija je pokazala da su viši moždani centri od posebne važnosti za ispitivanje ALS. Žarišta neurodegenerativnih i neuroinflamatornih promena kod ALS pacova su detektovani upravo u višim moždanim centrima. Povećana ekspresija AQP4 i smanjena ekspresija Kir4.1 su uočeni u moždanom stablu i moždanoj kori hSOD1<sup>G93A</sup> pacova, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na kičmenoj moždini (Kaiser et al., 2006; Nicaise et al., 2009a). Promene u ekspresiji AQP4 i Kir4.1 su zadržane i u *in vitro* uslovima, u ALS astrocitima u kulturi. Pored toga, u *in vitro* uslovima su ispitivane funkcionalne osobine Kir kanala i pokazana je njihova smanjena provodljivost u ALS astrocitima.

## PRETPOSTAVLJENI MEHANIZMI NASTANKA ALS

Pretpostavljeni mehanizam nastanka ALS dat je na **Slici 33**.



**Slika 33.** Šematski prikaz uloge HEB i astrocita u patogenezi ALS. Oštećenje krvno-moždane barijere otvara put za ulazak eritrocita i imunoglobulina u tkivo CNS. Hemoglobin (Hb) oslobođen iz eritrocita može imati direktan toksični efekat na motorne neurone ili posredstvom ROS čijoj produkciji doprinosi. Imunoglobulini (Ig) ostvaruju toksični efekat na motorne neurone, a istovremeno dovode do aktivacije mikroglije i astrocita. Astroцити u ALS imaju promjenjenu ekspresiju tri ključna proteina uključena u održavanju homeostaze vode i jona u neposrednom okruženju neurona: povećanje ekspresije kanala za vodu AQP4, smanjenje ekspresije glutamatnog transportera EAAT2 i ulaznog kalijumovog ispravljača Kir4.1. Povećana ekspresija AQP4 dovodi do poremećaja transporta vode, što za posledicu ima oticanje astrocitnih stopala i proširenje komora. Smanjena ekspresija EAAT2 i Kir4.1 dovode do smanjenog preuzimanja glutamata i K<sup>+</sup> što mehanizmima ekscitotoksičnosti dovodi do smrti motornih neurona. Modifikovano iz Amiry-Moghaddam and Ottersen (2003) i Zlokovic (2008).

Studija na hSOD1<sup>G93A</sup> modelu pacova je pružila mogućnost da se pretpostave i dodatno opišu mehanizmi koji doprinose patogenezi ALS. Zlokovic (2008) je pretpostavio da je ključni događaj u patogenezi ALS oštećenje HEB (**Slika 33**). Na ovaj način je otvoren put za ulazak eritrocita i imunoglobulina iz krvi u tkivo CNS. Hemoglobin oslobođen iz eritrocita može imati direktan toksični efekat na motorne neurone, a pored toga dovesti do nastanka ROS koje dodatno promoviraju smrt neurona. Infiltrirani imunoglobulini mogu takođe imati direktan toksični efekat na motorne neurone, ali mogu dovesti i do aktivacije mikroglije i astrocita. Naša studija ističe posebnu važnost reaktivnih astrocita u sledu događaja koji su posledica narušavanja HEB. Tri najznačajnija transmembranska astrocitarne proteina, EAAT2, AQP4 i Kir4.1, imaju promenjenu ekspresiju u ALS (**Slika 33**), a poznato je da je njihovo pravilno funkcionisanje neophodno za regulisanje aktivnosti neurona. Povećana ekspresija AQP4 dovodi do poremećaja u transportu vode i oticanja astrocitarne stopala što narušava homeostazu u mikrosredini motornih neurona. Smanjena ekspresija EAAT2 dovodi do povećanja koncentracije vanćelijskog glutamata, dok smanjena ekspresija Kir4.1 dovodi do smanjenog preuzimanja K<sup>+</sup> iz neuronalnog okruženja što zajedno inicira mehanizme ekscitotoksičnosti koji vode narušavanju funkcije motornih neurona, a potom i njihovoj smrti.

### ZNAČAJ RADA ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja ovog rada su ukazali na žarišta neurodegenerativnih i neuroinflamatornih promena u mozgu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova. Utvrđeno je oštećenje krvno-moždane barijere i uočena je promena u ekspresiji i funkcionalnim osobinama astrocitarne proteina AQP4 i Kir4.1 koji doprinose stabilnosti krvno-moždane barijere. Dobijeni rezultati su pružili dodatna objašnjenja o patogenezi ALS i otvorili mogućnost da se pretpostave mehanizmi koji vode smrti motornih neurona.

Rezultati ove studije otvaraju široko polje za dalja istraživanja. Ispitivanje presimptomatičnih životinja bi detaljnije opisalo početak i progresiju neurodegenerativnih i neuroinflamatornih promena u bolesti. Proučavanje infiltracije specifičnih tipova imunskih ćelija bi detaljnije opisalo neuroinflamatorne procese. Ispitivanje ekspresije citoskeletnih proteina koji povezuju AQP4 i Kir4.1 bi opisalo interakciju ova dva astrocitarne proteina u ALS pacovskom modelu. Proučavanje

ekspresije i funkcije Kir4.1 u oligodendrocitima bi objasnilo značaj ovih glijalnih ćelija u ALS. Od posebne važnosti je ispitati primenu potencijalnih lekova na hSOD1<sup>G93A</sup> pacovu što je od značaja za terapiju bolesti.

## ZAKLJUČCI

---

### Zaključci o promenama u mozgu ALS pacova uočenim MRI metodom:

1. Neurodegenerativne promene u *nc. facialis*, *nc. ambiguus*, *nc. trigeminus* i *nc. pontis* moždanog stabla hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.
2. Proširene komore i Silvijev kanal u mozgu ALS pacova.

### Zaključci o neuroinflamatornim procesima u mozgu ALS pacova:

1. Infiltracija CD4<sup>+</sup> T-limfocita u moždano tkivo oko lateralnih komora simptomatičnih hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.
2. Infiltracija CD8<sup>+</sup> T-limfocita u moždano stablo simptomatičnih ALS pacova.
3. Povećana propustljivost krvno-moždane barijere u mozgu simptomatičnih hSOD1<sup>G93A</sup> pacova, prvenstveno u regionima gde je uočena infiltracija T-limfocita.
4. Prisustvo aktivirane mikroglije i reaktivnih astrocita u moždanom stablu simptomatičnih ALS pacova.
5. Prisustvo aktivirane mikroglije u tkivu oko lateralnih komora i u hipokampusu hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.
6. Interakcija nastavaka aktivirane mikroglije i tela neurona u mozgu ALS pacova.

### Zaključci o promeni ekspresije astrocitnih proteina AQP4 i Kir4.1 u mozgu ALS pacova:

1. Značajno povećanje ekspresije AQP4 u moždanom stablu i trend povećanja u moždanoj kori ALS pacova.
2. Povećanje AQP4 imunoreaktivnost u *nc. facialis* i *nc. trigeminus*, motornoj kori i na površini mozga (*glia limitans*) simptomatičnih hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.

3. Promena u distribuciji AQP4 obeleženog partikulama zlata u mozgu ALS pacova.
4. Značajno smanjenje ekspresije Kir4.1 u moždanom stablu i trend smanjenja u moždanoj kori ALS pacova.
5. Smanjenje Kir4.1 imunoreaktivnosti u *nc. facialis* i *nc. trigeminus* moždanog stabla i motornoj kori simptomatičnih hSOD1<sup>G93A</sup> pacova.
6. Povećana AQP4 imunoreaktivnost i smanjena Kir4.1 imunoreaktivnost u kortikalnim ALS astrocitima u kulturi.

Zaključci o promeni Kir struja u ALS astrocitima u kulturi:

1. Značajno smanjenje gustine i specifične membranske provodljivosti Kir struja u ALS astrocitima u kulturi
2. Membranski otpor i potencijal reverzije su značajno povećani u ALS astrocitima
3. Gustina Cs<sup>+</sup>-senzitivnih Kir struja je značajno manja u ALS astrocitima
4. Gustina Ba<sup>2+</sup>-senzitivnih Kir struja je značajno manja u ALS astrocitima

## LITERATURA

---

- Abbott NJ, Revest PA. 1991. Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 3:39-72.
- Abbott NJ, Romero IA. 1996. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today* 2:106-113.
- Abbott NJ. 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood–brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20:131–147.
- Abbott NJ. 2005. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol* 25:5-23.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J, MacKay B. 1966. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 16:475-481.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542:3-16.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282–1289.
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP. 2003. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13615-13620.
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4:991-1001.



- Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP. 2004. Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J* 18:542-544.
- Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet* 10:61-66.
- Andersen PM, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B, Marklund SL. 1996. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 119:1153-1172.
- Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. 1998. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71:2041-2048.
- Appel SH, Beers DR, Henkel JS. 2010. T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening?" *Trends in Immunology* 31:7-17.
- Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M. 2002. Intercellular calcium signaling mediated by pointsource burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9840-9845.
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404.

- Baillet A, Chantepedrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. 2010. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res* 35:1530-1537.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS. 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:263-274.
- Barbour B, Brew H, Attwell D. 1988. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335:433-435.
- Basak M, Erturk M, Oflazoğlu B, Ozel A, Yıldız GB, Forta H. Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002 May;105(5):395-399.
- Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, Wekerle H, Lassmann H. 1998. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153:715-724.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. 2006. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16021-16026.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. 2008. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:15558-15563.
- Beers DR, Zhao W, Liao B et al. 2011. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 25:1025-1035.

- Begley DJ, Brightman MW. 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* 61:39-78.
- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Rattray M, Mennini T. 2001. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* 79:737-746.
- Benfenati V, Caprini M, Nobile M, Rapisarda C, Feroni S. 2006. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 98:430-445.
- Berzin TM, Zipser BD, Raffi MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa EG. 2000. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:349-355.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123:1174-1183.
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. 1998. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71:1321-1324.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392.
- Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 62:219-232.

- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH Jr, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8292-8296.
- Bordey A, Hablitz JJ, Sontheimer H. 2000. Reactive astrocytes show enhanced inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in situ. *Neuroreport* 11:3151-3155.
- Bordey A, Lyons SA, Hablitz JJ, Sontheimer H. 2001. Electrophysiological characteristics of reactive astrocytes in experimental cortical dysplasia. *J Neurophysiol* 85:1719-1731.
- Bouzier-Sore AK, Merle M, Magistretti PJ, Pellerin L. 2002. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol Paris* 96:273-282.
- Bowling AC, Barkowski EE, McKenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, Brown RH Jr. 1995. Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 64:2366-2369.
- Bowman GL, Kaye JA, Moore M, Waichunas D, Carlson NE, Quinn JF. 2007. Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology*. 68:1809-1814.
- Bristol LA, Rothstein JD. 1996. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann Neurol* 39:676-79.
- Brown AM, Baltan Tekkok S, Ransom BR. 2004. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int* 45:529-536.
- Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18 :327-338.

- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*. 281:1851-1854.
- Buki A, Okonkwo DO, Wang KKW, Povlishock JT. 2000. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 20:2825-2834.
- Bush TG NP, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297–308.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME et al. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience* 9:917–924.
- Charcot JM, Joffroy A. 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Path* 2:744–754.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983–992.
- Chauhan VS, Sterka DG Jr, Gray DL, Bost KL, Marriott I. 2008. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 180:8241–8249.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. 2010. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem* 17:1942-1959.
- Chiu IM, Chen A, Zheng Y et al. 2008. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17913–17918.

- Claudio L. 1996. Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol* 91:6-14.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.
- Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH Jr. 1995. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* 378:342-343.
- Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. 2004. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 279:28387-28392.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: longrange glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Cozzolino M, Carri MT. 2012. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol* 97:54-66.
- Cserr HF, Bundgaard M. 1984. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol* 246:R277-288.
- Cwik VA, Hanstock CC, Allen PS, Martin WR. 1998. Estimation of brainstem neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis with in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 50:72-77.
- Dal Canto MC, Gurney ME. 1997. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 93:537-550.

- D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D. 1999. Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci*. 19:8152-8162.
- D'Ambrosio R. 2004. The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis. *Pharmacol Ther* 103:95-108.
- Debono MW, Le Guern J, Canton T, Doble A, Pradier L. 1993. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *Eur J Pharmacol* 235: 283-289.
- Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54:1798-1801.
- Deli MA, Descamps L, Dehouck MP, Cecchelli R, Joó F, Abrahám CS, Torpier G. 1995. Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res* 41:717-726.
- Dibaj P, Kaiser M, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Neusch C. 2007. Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem* 103:2620-2628.
- Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. 2003. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86:246-254.
- Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. 1980. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 40:432-439.

- Dietzel I, Heinemann U, Lux HD. 1989. Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 2:25-44.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.
- Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 27:11354-11365.
- Drewes LR. in *Introduction to the Blood–Brain Barrier — Methodology, Biology and Pathology* (ed. Pardridge, W. M.) 165–174 (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1998).
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912–4916.
- Eilert-Olsen M, Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Enger R, Gundersen GA, Hoddevik EH, Petersen PH, Haug FM, Skare Ø, Adams ME, Froehner SC, Burkhardt JM, Thoren AE, Nagelhus EA. 2012. Deletion of aquaporin-4 changes the perivascular glial protein scaffold without disrupting the brain endothelial barrier. *Glia* 60:432-440.
- Elliott JL. 2001. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 95:172-178.
- Ellis CM, Suckling J, Amaro E Jr, Bullmore ET, Simmons A, Williams SC, Leigh PN. 2001. Volumetric analysis reveals corticospinal tract degeneration and extramotor involvement in ALS. *Neurology* 57:1571-1578.
- Eng LF, Ghimikar RS. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237.



- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH. 1993. Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30–36.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 26:485–495.
- Estevez AG, Stutzmann JM, Barbeito L. 1995. Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *Eur J Pharmacol* 280:47-53.
- Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS. 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* 18:923–931.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143–2155.
- Fenton HJH. 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* 65:899-910.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729–743.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH Jr, Beal MF. 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69:2064-2074.
- Ferrucci M, Spalloni A, Bartalucci A, Cantafora E, Fulceri F, Nutini M, Longone P, Paparelli A, Fornai F. 2010. A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol Dis* 37:370-383.

- Fiacco TA, McCarthy KD. 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722–732.
- Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556–562.
- Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, Döpp E, van der Pol SM, Schadee-Eestermans IL, Nicolay K, Dijkstra CD, de Vries HE. 2004. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 127:616-627.
- Flügel A, Matsumuro K, Neumann H, Klinkert WE, Birnbacher R, Lassmann H, Otten U, Wekerle H. 2001. Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* 31:11-22.
- Foran E, Trotti D. 2009. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 11:1587-1602.
- Frank B, Haas J, Heinze HJ, Stark E, Münte TF. 1997. Relation of neuropsychological and magnetic resonance findings in amyotrophic lateral sclerosis: evidence for subgroups. *Clin Neurol Neurosurg* 99:79-86.
- Fumagalli E, Funicello M, Rauen T, Gobbi M, Mennini T. 2008. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur J Pharmacol*, 578:171-176.
- Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H, Sanberg PR. 2007a. Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One*. 2:e1205.
- Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, Kolomey I, Nicoisa SV, Sanberg PR. 2007b. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* 1157:126-137.

- Garbuzova-Davis S, Hernandez-Ontiveros DG, Rodrigues MC, Haller E, Frisina-Deyo A, Mirtyl S, Sallot S, Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. 2012. Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res* 1469C:114-128.
- Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM. 1997. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120:1461-1483.
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-287.
- Glowatzki E, Fakler G, Brändle U, Rexhausen U, Zenner HP, Ruppersberg JP, Fakler B. 1995. Subunit-dependent assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Proc Biol Sci* 261:251-261.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. 2000. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20:660-665.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, Van Den Bosch L, Billiau AD, Robberecht W, Julien JP. 2008. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28:10234-10244.
- Gunnarson E, Zelenina M, Axehult G, Song Y, Bondar A, Kreiger P, Brismar H, Zelenin S, Aperia A. 2008. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* 56:587-596.
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 12:2519-2532.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. 1994.

- Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520–528.
- Hagiwara S, Takahashi K. 1974. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J Membr Biol* 18:61-80.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: Roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54–63
- Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Fleck TJ, Gurney ME. 1998a. Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J Neurosci Res* 53:66-77.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. 1998b. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23:249–256.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sackmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387–1394.
- Heath PR, Shaw PJ. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26:438-458.
- Hecht MJ, Fellner F, Fellner C, Hilz MJ, Neundörfer B, Heuss D. 2002. Hyperintense and hypointense MRI signals of the precentral gyrus and corticospinal tract in ALS: a follow-up examination including FLAIR images. *J Neurol Sci* 199:59-65.

- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291-366.
- Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessel in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C922-931.
- Hille B, Schwarz W. 1978. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* 72:409-442.
- Hoek RH, Ruuls SR, Murphy CA et al. 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768–1771.
- Holmøy T. 2008. T cells in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology* 15:360–366.
- Holthoff K, Witte OW. 2000. Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia* 29:288-292.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609.
- Hsu MS, Seldin M, Lee DJ, Seifert G, Steinhäuser C, Binder DK. 2011. Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 178:21-32.
- Huang X, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. 2009. CD4+ T cells in the pathobiology of neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol* 211:3–15.
- Huber J D, Egleton RD, Davis TP. 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends Neurosci* 24:719–725.

- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17:7725-7735.
- Ito H, Tung RT, Sugimoto T, Kobayashi I, Takahashi K, Katada T, Ui M, Kurachi Y. 1992. On the mechanism of G protein beta gamma subunit activation of the muscarinic K<sup>+</sup> channel in guinea pig atrial cell membrane. Comparison with the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 99:961-983.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. 2008. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28:2075-2088.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83:535-545.
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:13052-13056.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40:572-574.
- Kaiser M, Maletzki I, Hülsmann S, Holtmann B, Schulz-Schaeffer W, Kirchhoff F, Bähr M, Neusch C. 2006. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 99:900-912.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691-707.

- Ke C, Poon WS, Ng HK, Pang JC, Chan Y. 2001. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett.* 301:21-24.
- Kiaei M, Petri S, Kipiani K, Gardian G, Choi DK, Chen J, Calingasan NY, Schafer P, Muller GW, Stewart C, Hensley K, Beal MF. 2006. Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 26:2467-2473.
- Kipnis J, Schwartz M. 2005. Controlled autoimmunity in CNS maintenance and repair: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T-cells at the crossroads of health and disease. *NeuroMolecular Medicine* 7:197–206.
- Kobayashi H, Minami S, Itoh S, Shiraishi S, Yokoo H, Yanagita T, Uezono Y, Mohri M, Wada A. 2001. Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neurosci Lett.* 297:163-166.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20:5733-5740.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veg RW, Bringmann A, Reichenbach A. 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial buffering. *Glia* 39:292-303.
- Koh JY, Kim DK, Hwang JY, Kim YH, Seo JH. 1999. Antioxidative and proapoptotic effects of riluzole on cultured cortical neurons. *J Neurochem* 72: 716-723.
- Köller H, Schroeter M, Jander S, Stoll G, Siebler M. 2000. Time course of inwardly rectifying K(+) current reduction in glial cells surrounding ischemic brain lesions. *Brain Res* 872:194-198.
- Kong J, Xu Z. 1998. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18:3241-3250.

- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19:312–318.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127-133.
- Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG, Maldonado HM, Baksi K, Reichenbach A, Skatchkov SN, Eaton MJ. 2007. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55:274-281.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. 1991. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:263-277.
- Kwan JY, Jeong SY, Van Gelderen P, Deng HX, Quezado MM, Danielian LE, Butman JA, Chen L, Bayat E, Russell J, Siddique T, Duyn JH, Rouault TA, Floeter MK. 2012. Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: correlating 7 Tesla MRI and pathology. *PLoS One* 7:e35241.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-1208.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27:2596–2605.
- Lamanauskas N, Nistri A. 2008. Riluzole blocks persistent Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* 27: 2501-2514.



- Lau LT, Yu AC. 2001. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J Neurotrauma* 18:351-359.
- Lee DJ, Hsu MS, Seldin MM, Arellano JL, Binder DK. 2012. Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. *Exp Neurol* 235:246-255.
- Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, Gallo JM, Weller RO, Anderton BH. 1991. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 114:775-788.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366:177-196.
- Levine JB, Kong JM, Nadler M, Xu ZS. 1999. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28:215-224.
- Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML. 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6348-6352.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. 2002. *J Neurosci* 22:4825-4832.

- Liu R, Althaus JS, Ellerbrock BR, Becker DA, Gurney ME. 1998. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 44:763-770.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E; EURALS. 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:385-390.
- Lopatin AN, Nichols CG. 1996. [K<sup>+</sup>] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophys J* 71:682-694.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lux HD, Heinemann U, Dietzel I. 1986. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv Neurol* 44:619-639.
- Magnus T, Schreiner B, Korn T et al. 2005. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: Implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *Journal of Neuroscience* 25:2537-2546.
- Maher P, Davis JB. 1996. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci* 16:6394-6401.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. 2000. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159-163.
- Mather K, Martin JE, Swash M, Vowles G, Brown A, Leigh PN. 1993. Histochemical and immunocytochemical study of ubiquitinated neuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:141-145.

- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G. 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277:29626-29633.
- McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA, Janigro D. 2001. Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res* 904:20-30.
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- Melzer N, Meuth SG, Wiendl H. 2009. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *The FASEB Journal* 23:3659–3673.
- Miana-Mena FJ, González-Mingot C, Larrodé P, Muñoz MJ, Oliván S, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Osta R, García JJ. 2011. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258:762-769.
- Minagar A, Alexander JS. 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 9:540-549.
- Miyazaki SI, Takahashi K, Tsuda K, Yoshii M. 1974. Analysis of non-linearity observed in the current-voltage relation of the tunicate embryo. *J Physiol* 238:55-77.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129:2761–2772.
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 21:9246-9254.

- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615-622.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26:47-54.
- Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1. *Neuroscience* 129:905-913.
- Nagy JI, Yamamoto T, Sawchuk MA, Nance DM, Hertzberg EL. 1992. Quantitative immunohistochemical and biochemical correlates of connexin43 localization in rat brain. *Glia* 5:1–9.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD. 1994. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38:336-347.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523–530.
- Negrin RS. 2008. Immunobiology of transplantation, in *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Soiffer RJ, Ed., pp. 39–53, Humana Press, Boston, Mass, USA.
- Nesic O, Lee J, Ye Z, Unabia GC, Rafati D, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR. 2006. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience* 143:779-792.
- Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H. 1995. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269:549-552.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in Neurosciences* 25:313–319.

- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. 2001. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21:5429-5438.
- Neusch C, Papadopoulos N, Muller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Bahr M, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S. 2006. Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K<sup>+</sup> buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K<sup>+</sup> regulation. *J Neurophysiol* 95:1843-1852.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science* 225:1174-1175.
- Newman EA. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13:3333-3345.
- Niessen HG, Angenstein F, Sander K, Kunz WS, Teuchert M, Ludolph AC, Heinze HJ, Scheich H, Vielhaber S. 2006. In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Exp Neurol* 201:293-300.
- Nicaise C, Soyfoo MS, Authelet M, De Decker R, Bataveljic D, Delporte C, Pochet R. 2009a. Aquaporin-4 overexpression in rat ALS model. *Anat Rec* 292:207-213.
- Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, De Decker R, Authelet M, Boom A, Pochet R. 2009b. Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Res* 1301:152-162.

- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Quondamatteo F, Herken R, Errede M, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. 2001. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 114:1297-1307.
- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17:171-180.
- Ochalski PA, Frankenstein UN, Hertzberg EL, Nagy JI. 1997. Connexin-43 in rat spinal cord: Localization in astrocytes and identification of heterotypic astro-oligodendrocytic gap junctions. *Neuroscience* 76:931-945.
- Oldendorf WH, Davson H. 1967. Brain extracellular space and the sink action of cerebrospinal fluid. *Trans Am Neurol Assoc* 92:123-127.
- Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H. 2006. Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53:516-528.
- Olsen ML, Campbell SL, Sontheimer H. 2007. Differential distribution of Kir4.1 in spinal cord astrocytes suggests regional differences in K<sup>+</sup> homeostasis. *J Neurophysiol* 98:786-793.
- O'Reilly SA, Roedica J, Nagy D, Hallewell RA, Alderson K, Marklund SL, Kuby J, Kushner PD. 1995. Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 131:203-210.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibian. *J Neurophysiol* 29:788-806.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. 2005. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 280:13906-13912.

- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744–747.
- Parri HR, Crunelli V. 2001. Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ. *Neuroreport* 12:3897–3900.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, Cleveland DW. 2000. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13901-13906.
- Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG, Kasarskis E, Mattson MP. 1998. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* 44:819-824.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251–1262.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:t421–t431.
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1991. *The fine structure of the nervous system*, Third edn. Oxford University Press, New York.
- Phelps CH. 1972. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res* 39:225–234.
- Pirko I, Johnson A, Ciric B, Gamez J, Macura SI, Pease LR, Rodriguez M. 2004. In vivo magnetic resonance imaging of immune cells in the central nervous system with superparamagnetic antibodies. *FASEB J* 18:179-182.
- Pirko I, Fricke ST, Johnson AJ, Rodriguez M, Macura SI. 2005. Magnetic resonance imaging, microscopy, and spectroscopy of the central nervous system in experimental animals. *NeuroRx* 2:250-264.

- Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, Mora G, Camana C, Mazzini L, Bachetti T. 2000. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 287:211-214.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP. 2000. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30:362-372.
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-3374.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387.
- Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. 1994. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J Biol Chem* 269:1668-1673.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Ransohoff RM, Tani M. 1998. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci* 21:154-159.
- Ransom BR, Kettenmann H. 1990. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia* 3:258-266.
- Ransom CB, Sonheimer H. 1995. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 73:333-346.
- Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway



- downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. 35:1067-1083.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.
- Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. 2006. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 83:1231-1240.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr RH. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25.
- Rothstein JD, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath DR, Coyle JT, Drachman DB. 1991. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann Neurol* 30:224-225.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-1468.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.

- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. 2005. Betalactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73–77.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J., Tanner LI, Tamaselli KJ, Bard F. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115:1725-1735.
- Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. 2007. Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Müller cells. *J Biol Chem* 282:21866-21872.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. 2002. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:262-265.
- Saadoun S, Tait MJ, Reza A, Davies DC, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC. 2009. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience* 161:764-772.
- Saadoun S, Papadopoulos MC. 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168:1036-1046.
- Sakmann B, Trube G. 1984. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 347:641-657.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. 1996. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139(Suppl):27–33.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. 2002. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16:255-257.

- Schroder W, Hinterkeuser S, Seifert G, Schramm J, Jabs R, Wilkin GP, Steinhauser C. 2000. Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 41 Suppl 6:S181-184.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194–206.
- Shi LB, Skach WR, Verkman AS. 1994. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers. *J Biol Chem* 269:10417-10422.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394–3406.
- Simard AR, Rivest S. 2007. Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 504:716–729.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Neuropathol Jan* 119:7-35.
- Song Y, Gunnarson E. 2012. Potassium Dependent Regulation of Astrocyte Water Permeability Is Mediated by cAMP Signaling. *PLoS One* 7:e34936.
- Soon D, Tozer DJ, Altmann DR, Tofts PS, Miller DH. 2007. Quantification of subtle blood-brain barrier disruption in non-enhancing lesions in multiple sclerosis: a study of disease and lesion subtypes. *Mult Scler* 13:884-894.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V. 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid

- in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* 193:73-78.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668-1672.
- Stenovec M, Milošević M, Petrušić V, Potokar M, Stević Z, Prebil M, Kreft M, Trkov S, Andjus PR, Zorec R. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins G enhance the mobility of LysoTracker-labelled vesicles in cultured rat astrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 203:457-471.
- Strohschein S, Hüttmann K, Gabriel S, Binder DK, Heinemann U, Steinhäuser C. 2011. Impact of aquaporin-4 channels on K<sup>+</sup> buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *Glia* 59:973-980.
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193–205.
- Talbot K. 2009. Motor neuron disease: the bare essentials. *Pract Neurol* 9:303-309.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T. 2000. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 78:131-137.
- Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J. 2005. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J Neurosci Res* 80:235-246.

- Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JMB. 1990. Immunohistochemical characteristics of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16:401–410.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15:601-609.
- Turner MR, Hammers A, Al-Chalabi A, Shaw CE, Andersen PM, Brooks DJ, Leigh PN. 2007. Cortical involvement in four cases of primary lateral sclerosis using [(11)C]-flumazenil PET. *J Neurol* 254:1033-1036.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. 2006. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9:108-118.
- Vajda Z, Pedersen M, Füchtbauer EM, Wertz K, Stødkilde-Jørgensen H, Sulyok E, Dóczy T, Neely JD, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S. 2002. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13131-13136.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323:1208-1211.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K, Timmerman V, Herijgers P, Callewaert G, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. 2007. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14825-14830.

- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L. 2006. Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem* 97:687-696.
- Vargas MR, Johnson JA. 2009. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev Mol Med* 11:e17.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV. 2009. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 29:11511–11522.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275–286.
- Waubant E. 2006. Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Dis Markers* 22:235-244.
- Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2012 Sep 1. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00401-012-1039-8.
- Wolburg H. in *Blood–Brain Interfaces — from Ontogeny to Artificial Barriers* (eds Dermietzel, R., Spray, D. & Nedergaard, M.) 77–107 (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, in the press).
- Wolff J. 1968. The role of the astroglia in the brain tissue. *Acta Neuropathol (Berl) Suppl* 4:33–39.
- Xiao Q, Zhao W, Beers DR et al. 2007. Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-typemicroglia. *Journal of Neurochemistry* 102:2008–2019.

- Yamamoto Y, Ishikawa R, Omoe K, Yoshikawa N, Yamaguchi-Yamada M, Taniguchi K. 2008. Immunohistochemical distribution of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in the medulla oblongata of the rat. *J Vet Med Sci* 70:265-271.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. 2008a. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS. 2008b. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7594-7599.
- Yang B, Verkman AS. 1997. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1–5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 272:16140–16146.
- Yang J, Jan YN, Jan LY. 1995. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 15:1441-1447.
- Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. 2008. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63:538-542.
- Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC, Cheema SS. 2004. Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:1745-1751.
- Zanotti S, Charles A. 1997. Extracellular calcium sensing by glial cells: Low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem* 69:594–602.

- Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH, Hu G. 2007. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 34:34-39.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.
- Zhang R, Gascon R, Miller RG, Gelinas DF, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A, McGrath MS. 2005. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* 159:215-224.
- Zhang H, Verkman AS. 2008. Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci* 37:1-10.
- Zhao W, Xie W, Le W, Beers DR, He Y, Henkel JS, Simpson EP, Yen AA, Xiao Q, Appel SH. 2004. Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitrite oxide and glutamate-mediated mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:964-977.
- Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH. 2006. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem* 99:1176-1187.
- Zhao W, Beers DR, Henkel JS, et al. 2010. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 58:231-243.
- Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, Stojanovic K, Sagare A, Boillee S, Cleveland DW, Zlokovic BV. 2008. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 11:420-422.
- Zhou J, Kong H, Hua X, Xiao M, Ding J, Hu G. 2008. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* 19:1-5.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.



## BIOGRAFIJA

---

Danijela Bataveljić je rođena 08.01.1983. godine u Kragujevcu, gde je završila osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju. Školske 2001/2002. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija. Studije je završila u julu 2007. godine, sa srednjom ocenom 9,4. Školske 2007/2008. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Tokom kratkih istraživačkih poseta u periodu od 2007-2012 godine radila je u Laboratoriji za histologiju, neuroanatomiju i neuropatologiju Univerziteta u Briselu, Centru za molekularnu biologiju i neuronauke Univerziteta u Oslu i u Laboratoriji za opštu zoologiju i neurobiologiju Univerziteta u Lajpcigu. Od 2010. godine zaposlena je kao istraživač saradnik na Institutu za fiziologiju i biohemiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Član je Društva biofizičara Srbije i Društva za neuronauke Amerike. Autor je i koautor više publikacija. Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

- **Bataveljić D**, Nikolic Lj, Milošević M, Todorovic N, Andjus P. 2012. "Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1G93A rat model". *Glia*. DOI 10.1002/glia.22414.
- **Bataveljić D**, Stamenkovic S, Bacic G, Andjus P.R. 2011. "Imaginig cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Physiol Hung*. 98 (1): 27-31.
- Andjus P.R, **Bataveljić D**, Vanhoutte G, Mitrecic D, Pizzolante F, Djogo N, Nicaise C, Gankam Kengne F, Gangitano C, Michetti F, Van der Linden A, Pochet R, Bacic G. 2009. "In Vivo Morphological Changes in Animal Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Alzheimer's-Like Disease: MRI Approach." *Anatom Rec*. 292: 1882-92.
- **Bataveljić D**, Djogo N, Zupunski Lj, Bajic A, Nicaise C, Pochet R, Bačić G, Andjus P.R. 2009. "Live monitoring of brain damage in the rat model of amyotrophic lateral sclerosis." *Gen Physiol Biophys*. 28: 212-18.
- Nicaise C, Soyfoo M, Authelet M, De Decker R, **Bataveljić D**, Delporte C, Pochet R. 2009. "Aquaporin-4 overexpression in rat ALS model." *Anatom Rec*. 292: 207-13.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Данијела Батавелић

број индекса KB070002

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Неуроинфламаторни процеси мозга у амиотрофичној латералној склерози: студија на моделу hSOD1<sup>G93A</sup> пацова

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 24.09.2012

**Потпис докторанда**

Батавелић Данијела

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора

Данијела Батавељић

Број индекса

КВ070002

Студијски програм

Неуронауке

Наслов рада

Неуроинфламаторни процеси мозга у амиотрофичној латералној склерози:  
студија на моделу hSOD1<sup>G93A</sup> пацова

Ментор

Др Павле Анђус, редовни професор

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани/а

Данијела Батавељић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_ 24.09.2012 \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

Башавенит Ланујена

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

---

Неуроинфламаторни процеси мозга у амиотрофичној латералној склерози:  
студија на моделу hSOD1<sup>G93A</sup> пацова

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 24.09.2012

**Потпис докторанда**

Батавент Јанујена

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.