

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dunja D. Bijelić

**UTICAJ FRAGMENTA TENASCINA-C NA
MORFOLOŠKA I FUNKCIONALNA SVOJSTVA
ASTROCITA I MIKROGLIJE U RANIM
FAZAMA NASTANKA GLIJALNOG OŽILJKA U
MODELIMA MEHANIČKE POVREDE KIČMENE
MOŽDINE I U KULTURI ĆELIJA MIŠA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dunja D. Bijelić

**THE EFFECT OF TENASCIN-C FRAGMENTS
ON MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES OF ASTROCYTES AND
MICROGLIA IN THE EARLY STAGES OF
GLIAL SCAR FORMATION IN THE MURINE
SPINAL CORD AND CELL CULTURE
MECHANICAL INJURY MODELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Igor Jakovčevski, docent, Univerzitet Viten/Herdeke (Universität Witten/Herdecke), Institut za anatomiju i kliničku morfologiju

dr Milena Milošević, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Pavle Andjus, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Sanja Dacić, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Tamara Dakić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Iva Božić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Centru za lasersku mikroskopiju, Institut za fiziologiju i biohemiju „Ivan Đaja“, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. Ova doktorska disertacija je urađena uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru plana i programa i ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada Biološkog fakulteta (451-03-9/2021-14/200178).

Mentorki dr Mileni Milošević sam zahvalna na „obuci za marince“ koja je započela jedan sat nakon intervjua za volontiranje u Centru za lasersku mikroskopiju davne 2012. Zbog nje se radilo kad odgovara ćelijama, a ne nama, što se neretko nimalo nije preklapalo, ali je davalo velike rezultate. Usadila mi je osnove eksperimentalnog rada i razmišljanja, omogućavala da pretvaramo laboratoriju u igraonicu, još češće u radionicu a na kraju i u drugu kuću.

Mentoru dr Igoru Jakovčevskom sam na prvom mestu zahvalna na spasonosnom „usputnom projektu“ za koji je on prepoznao mnogo pre ostalih da će prerasti i u tezu ako ustreba. Duhovito je provlačio velike životne mudrosti dok su se probijali svi rokovi i strpljivo je podsticao da se izgura ovaj ceo poduhvat.

Prof. dr Pavle Andjus mi je na prvom razgovoru za volontiranje rekao da je lepo imati dobre ocene tokom studija, ali da je rad u laboratoriji rudarski rad i da će se tek pokazati da li imam ruke za to. Bio je u pravu. Godinama, mi doktorandi i jesmo živeli kao rudari, slabo izlazeći iz „Đajinih prolaza“ na svetlost dana. Sada, kada ova teza izlazi na svetlo dana, zahvalna sam mu na tome što nas je pustio da „kopamo“ svojim tokovima, što nam je širio vidike i pružao prilike da se oprobamo i u belom svetlu, a posebno što je gajio „naučnu anarhiju“ i dozvoljavao nam da se sukobljavamo u razmišljanjima, bez čega mnogo ideja ne bi ni bilo.

Dr Sanji Dacić sam zahvalna na tome što je uvek bila prijateljsko lice i podrška. Svih ovih godina je bila tu za savet, pomoć, pozajmicu par ml nečega, da se eto samo nešto proba... Zahvalna sam joj i na tome što je svojim savetima poboljšala ovu tezu, što joj nije promaklo ništa od svega onog što je meni promaklo i što ju je posrbila.

Dr Ivi Božić sam prvenstveno zahvalna na svim Noćima istraživača i Festivalima nauke za koje smo osmišljavali zabavne postavke, pravili ih pomoću štapa i kanapa i onda padali s nogu i gubili glasove zbog hiljada posetioca koji su verovali da mi radimo nešto magično i kad mi više nismo verovali ni u šta. Zahvalna sam joj i na svim sugestijama koje su uobličile ovu tezu.

Dr Tamari Dakić sam zahvalna na svim godinama zajedničke rovovske borbe, na trenucima predaha provedenim na hodniku u 15 min pauze između kojekakvih ispiranja, na nesebičnoj razmeni saveta, hemikalija i laboratorija. Zahvalna sam joj i na savetima koji su doprineli konačnom obliku ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem Ljilji Nikolić koja je donela nove ideje i uključila me u njih, Katarini Milićević sa kojom sam mogla da podelim razne muke ali i uspehe naših prvobitnih teza, kao i Danijeli Bataveljić, Ani Jakovljević i Katarini Stevanović na svim razgovorima, savetima i satima nauke i rasonode na galeriji.

Hvala i kolegama Veri, Stefanu, Andreju, Mileni, Darku, Milošu, Jovanu Peđi, Ivi, Tanji, Lani, Suzani, Miloradu, koji su ulepšali sve ove godine druženjem i podrškom, Jasni za sve godine brige o nama, kao i Vojki, Verici, Marini i Sneži na razgovorima, kafama i nesebičnom deljenju „naše kancelarije“ kad ustreba izolacija.

Posebnu zahvalnost dugujem Anji Santrač na podstreku da se donesu teške i neophodne odluke, Marjani Brkić kao nepresušnom izvoru inspiracije i hrabrosti da se uvek isproba nešto novo, Mariji Adžić na svim godinama zajedničkog rasta, rada, podrške i nesebične pomoći u svemu.

Ako se na muci poznaju junaci, onda su to Mira Stijović i Sanja Kujundžić koje su uvek bile tu na pravi način i nadasve Mina Perić sa kojom sam podelila čašu meda i čašu žuči i bez čijeg prijateljstva i pomoći ove teze blagovremeno ne bi ni bilo.

Na kraju zahvaljujem se svojoj porodici što su tokom svih ovih godina pružali podršku i omogućili da se završi ovo hodočašće.

Uticaj fragmenata tenascina-C na morfološka i funkcionalna svojstva astrocita i mikroglije u ranim fazama nastanka glijalnog ožiljka u modelima mehaničke povrede kičmene moždine i u kulturi ćelija miša

Sažetak

Vanćelijski glikoprotein tenascin-C nakon traumatske povrede CNS oslobađaju astrociti. Usled multimodularne ekspresije koja je prostorno i vremenski visoko regulisana, kao i brojnih vezivnih partnera među drugim komponentama ECM i ćelijskim receptorima, TnC ostvaruje brojne efekte, a neki od njih su i oprečni brojne pa i oprečne efekte. Cilj ove disertacije je bio da pojasni uloge njegovih različitih fragmenata na morfološka i funkcionalna svojstva astrocita i mikroglije u ranim fazama nakon traumatske povrede CNS. U nedostatku TnC, mikroglijalne ćelije značajno više ulaze u region povrede i proliferišu, dok se astrociti koncentrišu u graničnom regionu povrede i pomažu njeno brže zatvaranje. Dodavanje TnC fragmenta FnD drastično smanjuje proliferaciju mikroglije u regionu povrede. FnD smanjuje i gustinu mikroglije delom na račun smanjene proliferacije, a potencijalno i na račun smanjene migracije i kontaktne inhibicije koja se javlja između uvećanih FnD-tretiranih mikroglijalnih ćelija. S druge strane, FnD ne utiče na proliferaciju astrocita u regionu povrede, ali smanjuje njihovu proliferaciju u graničnom regionu, dok intenzivno promovise migraciju astrocita u region povrede u mešovitoj kulturi u 48h. Morfologija FnD tretirane mikroglije podseća na proinflamatorni fenotip, a u prilog tome govori i povećana ekspresija iNOS. Povećana ekspresija i sekrecija TNF- α i IL-1 β nakon FnD tretmana ukazuju na opšti razvoj inflamacije. Tretman FnD takođe dovodi i do povećane ekspresije prekursorske forme β 1 integrina i pojave monomernih traka P2Y12R, što dodatno govori u prilog uloge TnC u promenama morfologije i pokretljivosti ćelija. Sveukupno rezultati ove studije ukazuju na kompleksnu i raznovrsnu ulogu TnC, a posebno FnD u tekućoj inflamaciji nakon povrede kao i prostornoj i vremenskoj organizaciji regiona povrede.

Ključne reči: tenascin-C, fibronektin tip III-nalik ponovak D, glijalni ožiljak, astrociti, mikroglija, kičmena moždina, neuroinflamacija, ćelijske kulture

Naučna oblast: Biološke nauke

Uža naučna oblast: Neurobiologija

The effects of tenascin-C fragments on morphological and functional properties of astrocytes and microglia in the early stages of glial scar formation in the murine spinal cord and cell culture mechanical injury models

Abstract

Extracellular glycoprotein TnC is secreted by astrocytes after traumatic CNS injury. Due to its multimodular expression that is spatially and temporally highly regulated, as well as numerous binding partners such as ECM components and cell receptors, TnC achieves various and even opposing effects. The aim of this dissertation was to clarify the roles of its different fragments on the morphological and functional properties of astrocytes and microglia in the early stages after traumatic CNS injury. In the absence of TnC, microglial cells increasingly enter the wound region and proliferate, while astrocytes concentrate in the border region of the wound and promote its faster closure. Addition of the TnC fragment FnD reduces the proliferation of microglia in the injury region. FnD also reduces the density of microglia partly at the expense of reduced proliferation, and potentially also at the expense of reduced migration and contact inhibition that occurs between enlarged FnD-treated microglial cells. On the other hand, FnD does not affect the proliferation of astrocytes in the injury region, but reduces their proliferation in the border region, while intensively promoting the migration of astrocytes to the injury region in mixed culture at 48h. The morphology of FnD-treated microglia resembles a pro-inflammatory phenotype, and this is supported by the increased expression of iNOS. Increased expression and secretion of TNF- α and IL-1 β after FnD treatment indicate a general onset of inflammation. FnD treatment also leads to increased expression of the precursor form of β 1 integrin and the appearance of P2Y₁₂R monomer bands, which further supports the role of TnC in changes in cell morphology and motility. Overall, the results of this study indicate a complex and diverse role of TnC, and especially FnD, in the ongoing inflammation after injury and the spatiotemporal organization of the injury region.

Key words: tenascin-C, fibronectin type III-like domain D, glial scar, astrocytes, microglia, spinal cord, neuroinflammation, cell cultures

Scientific filed: Biological sciences

Narrow scientific field: Neurobiology

Lista skraćenica

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropioniska kiselina
APS – amonijum persulfat
ATP – adenzin trifosfat
BSA – goveđi serum albumin
C1q – komponenta komplemanta 1q
CCL2 – ligand (C-C motiva) hemokina 2
CD45 – komponenta komplemanta 45
cDNK – komplementarna DNK
CNS – centralni nervni sistem
CNTF – cilijarni neurotrofni faktor
CSPG (engl. *chondroitin sulfate proteoglycan*) – hondroitin sulfatni proteoglikan
DAMP (engl. *damage associate molecular patterns*) – molekularni obrasci povezani sa oštećenjima
DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindol
DEPC – Dietil-pirokarbonat
DMEM – Dulbekov modifikovanom Eagle medijum
DMEM+ – medijum za gajenje ćelija
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein
ECM (engl. *extracellular matrix*) – vanćelijski matriks
EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina
EGF – epidermalni faktor rasta
EGFL (engl. *epidermal growth factor-like*) – epidermalnom faktoru rasta nalik ponovci
EGTA – etilen glikol-bis(β -aminoetil etar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina
ELISA – enzimski imunosorbentni esej
FAK – kinaza fokalne adhezije
FBS (engl. *fetal bovine serum*) – fetalni goveđi serum
FCRLS (engl. *Fc receptor-like 5, scavenger receptor*)
FG – globula nalik fibrinogenu
FGF-2 – faktor rasta fibroblasta 2
FnIII – fibronektin tip III-nalik ponovci
FnA – fragment A
FnD – fragment D
FnC – fragment C
Fn6-8 – fragmenti 6-8
Fn(D+A+C) – fragmenti D, A i C
Fn(D+A) – fragmenti D i A
GABA – γ -aminobuterna kiselina
GAG – glikozaminoglikanski lanaci
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein
HCA – hijerarhijska analiza klastera
HRP (engl. *horseradish peroxidase*) – peroksidaza rena
IFN- γ – interferon γ
iNOS – inducibilna azot oksid sintetaza
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
IL-1 β – interleukin 1 β
IL-6 – interleukin 6
INF- γ – interferon γ
LIF – inhibitorni faktor leukemije
L-15 – Lajbovic (Leibovitz) medijum

MAG – glikoprotein vezan za mijelin
MBP – mijelinski bazni protein
MMP – matriksne metaloproteinaze
NF- κ B – jedarni faktor κ B
NG2 – neuron/glijalni antigen 2
NMDA – N-metil-D-aspartat
Omgp – oligodendrocitni mijelinski glikoprotein
OPC (engl. *oligodendrocyte progenitor cells*) – prekursorske ćelije oligodendrocita
OX42 – klon komponente komplekta 11
PBS – fosfatni rastvor
PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimeraze
PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) – faktora rasta trombocita
PFA – paraformaldehid
PLL – poli-L-lizin
PLO – poli-L-ornitin
PLP – proteolipidni protein
RGB (engl. *Red/Green/Blue*)
SDS – natrijum dodecil sulfat
SW (engl. *Scratch wound*) – ogrebotina u sloju ćelija
TA domen (engl. *tenascin assembly domain*) – tenascinski povezujući domen
TBE – Tris-boratni-EDTA pufer
TDB – pufer za digestiju
TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*) – transformišući faktor rasta beta
TLR – Toll-like receptor
TLR4 – Toll-like receptor 4
Tmem119 – transmembranski protein 119
TnC – tenascin C
TNF- α – faktor nekroze tumora alfa
TnR – tenascin R
TnW – tenascin W
TnX – tenascin X
TnY – tenascin Y
TnC^{+/+} – miševi divljeg soja C57BL/6
TnC^{-/-} – tenascin-C deficijentni miševi
RhoA (engl. *Ras homolog gene family, member A*)
RNK – ribonukelinska kiselina
RIPA – pufer za liziranje
TBE – Tris-boratni-EDTA pufer
TBST – Tris pufer soli sa 0,1% Tween-20
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularnim endotelijalni faktor rasta

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Povrede nervnog sistema.....	1
1.1.2 Mehanizmi i patofiziologija povrede.....	1
1.2 Glijalni ožiljak	5
1.2.1 Ćelijske komponente ožiljka	6
1.3 Vanćelijski matriks	10
1.3.1 Tenascin	10
1.3.1.1 Struktura TnC polipeptida.....	11
1.4 Terapeutske strategije	15
2. Ciljevi istraživanja	17
3. Materijal i metode.....	18
3.1 Tabela prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma.....	18
3.2 Eksperimentalne životinje	20
3.2.1 Određivanje genotipa miševa	20
3.3 Primarne kortikalne kulture glijalnih ćelija	21
3.3.1 Kortikalna kultura astrocita	21
3.3.2 Mešovite kortikalne kulture mikroglije i astrocita	21
3.4 Model povrede u primarnim kortikalnim kulturama ćelija glije	22
3.4.1 SW na primarnoj kulturi ćelija glije	22
3.5 Model kompresije povrede kičmene moždine	22
3.6 Tretmani	23
3.6.1 Tretmani u primarnoj kulturi kortikalnih astrocita.....	23
3.6.2 Tretmani u primarnoj mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita.....	23
3.6.3 Tretmani primenjeni u modelu povrede kičmene moždine u TnC ^{+/+} i Tnc ^{-/-} miševima.	23
3.7 Imunofluorescencija	24
3.7.1 Imunofluorescentno obeležavanje primarne kulture kortikalnih astrocita	24
3.7.2 Imunofluorescentno obeležavanje primarne mešovite kulture mikroglije i astrocita	24
3.7.3 Imunohistohemijsko obeležavanje preseka kičmene moždine	24
3.7.3.1 Priprema tkiva transkardijalnom perfuzijom	24
3.7.3.2 Imunohistohemija.....	25
3.8 Mikroskopija i analiza mikrografija	26
3.8.1 Mikroskopsko snimanje i analiza zatvaranja povrede u SW modelu u primarnoj kulturi astrocita.....	26
3.8.2 Analiza proliferacije u primarnoj kulturi astrocita	26

3.8.3 Konfokalna mikroskopija na mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita i tkivnim preseccima	26
3.8.4 Analiza poliferacije i gustine ćelija u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita	26
3.8.5 Analiza morfologije mikroglije u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita	27
3.8.6 Analiza klastera	27
3.8.7 Analiza konfokalnih mikrografija na tkivnim preseccima	28
3.8.8 Stereološka analiza	28
3.8 Western blot	28
3.9.1 Priprema uzoraka za Western blot	28
3.9.2 Western blot protokol	28
3.10 Enzimski imunoesej (ELISA)	29
3.11 Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	30
3.11.1 Izolacija ukupne RNK	30
3.11.2 Reverzna transkripcija	30
3.11.3 Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR).....	30
3.12 Statistička analiza	31
4. Rezultati	32
4.1 Efekat fragmenata TnC na astrocite u SW modelu u kortikalnoj kulturi astrocita	32
4.1.1 Fragmenti TnC usporavaju zatvaranje povrede u kulturi primarnih astrocita.....	32
4.1.2 Fragmenti TnC smanjuju stopu proliferacije astrocita u primarnoj kulturi	34
4.1.3 Ekspresija GFAP je povećana u TnC-/- kulturama primarnih astrocita bez obzira na tretman	36
4.1.4 Fragmenti TnC povećavaju ekspresiju iRNK za citokine TNF- α i IL-1 β u kulturi astrocita	36
4.1.5 TnC utiče na astrocite i mikrogliju/makrofage u regionu povrede u kičmenoj moždini ..	37
4.2 Efekat TnC fragmenta FnD na zatvaranje povrede u mešovitoj kortikalnoj kulturi mikroglije i astrocita	40
4.2.1 Gustina astrocita i mikroglije u mešovitim glijalnim kulturama.....	40
4.2.2 FnD smanjuje gustinu mikroglije u odsustvu TnC i smanjuje stopu proliferacije mikroglije u oba genotipa u regionu povrede.....	41
4.2.3 FnD ne utiče na proliferaciju astrocita, ali podiže njihovu gustinu u regionu povrede 48h nakon SW	43
4.2.4 Površine regiona povrede su bile manje u toku prvih 24h u odsustvu TnC a tretman FnD nije imao efekta	44
4.2.5 Odgovori mešovitim kultura na SW i FnD tretman se raspoređuju u tri klastera prema gustinama i stopama proliferacija astrocita i mikroglije	45
4.2.6 FnD indukuje aktiviranu morfologiju mikroglije u regionu povrede	46
4.2.6.1 FnD tretman dovodi do uvećanja površine mikroglije, a odsustvo TnC ima istu tendenciju.....	48

4.2.6.2 FnD tretman je poruzrokovao povećanje perimetra mikroglijalnih ćelija	48
4.2.6.3 FnD tretman je povećao indeks hrapavosti ćelija u TnC ^{+/+} kulturama dok su TnC ^{-/-} ćelije inicijalno imale povećan indeks hrapavosti.....	48
4.2.7 FnD tretman dovodi do povećanja nivoa proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β u mešovitoj kulturi	50
4.2.8 FnD tretman podiže nivo ekspresije iNOS u skladu sa proinflamatornim fenotipom ...	51
4.2.9 FnD povećava udeo prekursorke u odnosu na zrelu izoformu β 1 integrina	51
4.2.10 FnD izaziva pojavu specifičnih monomernih P2Y ₁₂ R traka	53
5. Diskusija.....	55
6. Zaključci	61
7. Literatura.....	62
Biografija	78

1. Uvod

1.1 Povrede nervnog sistema

Povrede nervnog sistema se često kategorizuju na osnovu mesta oštećenja kao povrede mozga, kičmene moždine i perifernog nervnog sistema. Povrede mogu biti prema poreklu traumatske, nastale usled akutnog eksternog fizičkog uticaja i netraumatske koje su posledica akutnog ili hroničnog procesa bolesti kao što su tumori, infekcije, autoimunske bolesti i degeneracija (Ahuja et al., 2017). Traumatske povrede kičmene moždine se češće dešavaju kod muškaraca (oko 80%) (Y. Chen et al., 2016) i to najčešće u periodu od 15. do 29. godine života, a nešto manje su učestale kod ljudi posle 50. godine, mada incidenca u ovoj drugoj starosnoj grupi raste kako raste i generalna starost populacije (van den Berg et al., 2010). Teško je proceniti incidencu povreda u čitavom svetu jer za dosta regiona ne postoje pouzdani podaci, ali visoke stope su zabeležene u razvijenim delovima sveta usled visokih stopa kriminala i samopovređivanja (Cripps et al., 2011). Neki podaci ukazuju da se godišnje zabeleži i do 130 000 novih slučajeva (Thuret et al., 2006). Najveći broj traumatskih povreda kičmene moždine nastaje usled saobraćajnih nesreća (oko 40%) (Y. Chen et al., 2016). Na drugom mestu su padovi (oko 30%), potom sportske povrede (10-20%), nasilni čini (oko 15%), medicinski/hirurški zahvati (oko 5%) (Lenehan et al., 2012). Sveukupno, kada je reč o povredama kičmene moždine, najčešće je pogođen cervikalni (oko 60%), potom torakalni (oko 30%) i na kraju lumbosakralni region (oko 10%) (Y. Chen et al., 2016).

Iako konstantno raste stopa preživljavanja nakon povreda generalno, životni vek pacijenata je ipak znatno kraći, a smrtni ishodi su i dalje učestaliji u odnosu na zdrave ljude istih godina. Stopa smrtnosti zavisi od težine povrede kao i od regiona, a najveća je u akutnim fazama tokom perioda hospitalizacije (Krause et al., 1997).

Osim zdravstvenog problema za pojedinca, povrede kičmene moždine predstavljaju, ozbiljan socioekonomski problem, a ogromne sume se izdvajaju i za prevenciju kao i za razvoj efektivnih terapija (Ahuja et al., 2017). U ekonomski razvijenijim regionima troškovi hospitalizacije, rehabilitacije kao i dalji doživotni medicinski troškovi su u rangu desetina miliona dolara (Fehlings & Nguyen, 2010).

1.1.2 Mehanizmi i patofiziologija povrede

Traumatske povrede nervnog tkiva mogu biti fokalne i difuzne, a njihov nastanak podrazumeva dve faze: primarno mehaničko oštećenje koje nastaje u samom trenutku udara i na koje se ne može mnogo uticati i sekundarnu odloženu povredu koja podrazumeva sve naredne procese i koja je podložna terapijskim intervencijama (Werner & Engelhard, 2007).

Biološki odgovori na povredu su podeljeni u tri faze koje prate različite ali delimično vremenski preklapajuće sekvence: akutnu (od prvih par sekundi i minuta pa do 48h), subakutnu (2-14 dana), i hroničnu fazu (više meseci ili godina) (Ahuja et al., 2017; Oyinbo, 2011). Osnovne karakteristike faza povrede su date u Tabeli 1, a grafički prikaz faza je dat na Slici 1.

U toku inicijalne povrede dolazi do mehaničkog strukturnog oštećenja nervnog tkiva u vidu kontuzija, razderotina, kompresije, a u slučaju kičmene moždine čak i potpunog prekida, praćenih direktnim narušavanjem lokalnog metabolizama i protoka krvi (Bramlett & Dietrich, 2004; Dewitt & Prough, 2003). Potom se oštećenje kaskadom procesa širi u vidu sekundarne povrede (Ahuja et al., 2017; Werner & Engelhard, 2007).

U sekundarnoj fazi povrede se prvenstveno razvija stanje nalik ishemiji (Coles et al., 2004) koje često pogoršava ishod, a može dovesti i do vegetativnog stanja ili smrti (Bouma et al., 1992; Inoue et al., 2005). Osim ishemije, može doći i do hiperperfuzije koja finalno dovodi do povećanja pritiska.

Oba stanja se procenjuju u odnosu na tkivnu potrošnju kiseonika i predstavljaju neusklađenost između lokalnog protoka krvi i metabolizma (Werner & Engelhard, 2007).

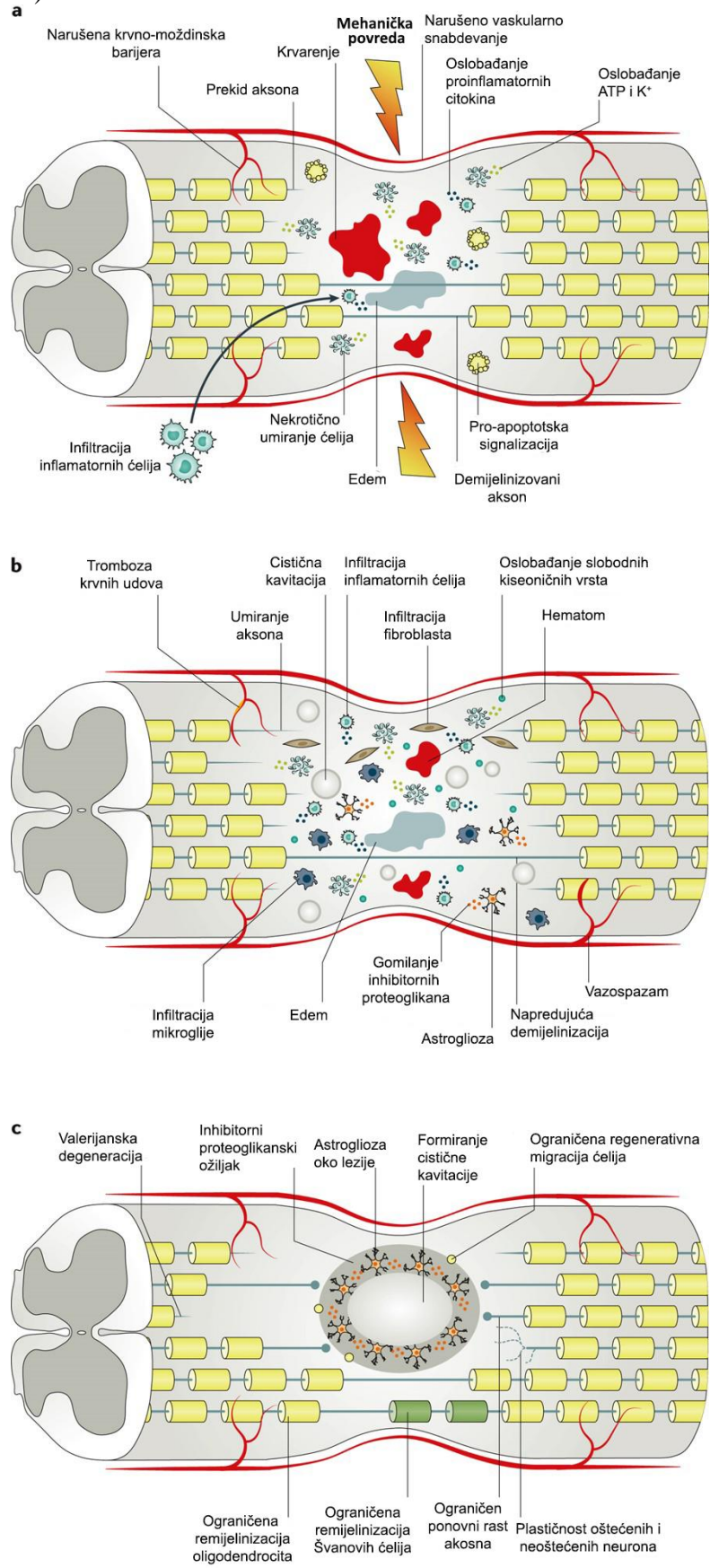
Tabela 1. Glavne karakteristike tri faze povrede kičmene moždine. Svetloplave zone označavaju preklapajuće procese u različitim fazama. Preuzeto i izmenjeno (Oyinbo, 2011).

Akutna faza	Sub-akutna faza	Hronična faza
Sistemska hipotenzija i spinalni šok		
Vazospazam	Vazospazam	
Ćelijska smrt usled direktne povrede	Ćelijska smrt usled direktne povrede	
Ishemija	Ishemija	
Edem	Edem	
Narušena homeostaza jona	Narušena homeostaza jona	
Akumulacija neurotransmitera	Glutamatna ekscitotoksičnost	
Narušenost ćelijske membrane	Narušenost ćelijske membrane i njene permeabilnosti	
	Produkcija slobodnih radikala	
	Lipidna peroksidacija	
	Višak azot oksida	
	Blokada provodljivosti	
	Višak noradrenalina	
	Energetski pad i smanjenje ATP	
	Infiltracija imunskih ćelija i oslobađanje citokina	
	Ćelijska smrt usled inflamacije	
	Inhibitorni faktori rasta neurita	
	Kompresija vertebri/nestabilnost kičmenog stuba	
	Demijelinizacija funkcionalnih aksona	Nastavak demijelinizacije
	Apoptoza	Nastavak apoptoze
	Inicijacija centralne kavitacije	Nastavak centralne kavitacije
	Početak astrogljalnog ožiljka	Glijalni ožiljak/formiranje sirinksa
		Promene jonskih kanala i receptora
		Regenerativni procesi, uključujući razrastanje neurita
		Narušenost nervnih mreža
		Siringomielija

Pad metaboličke aktivnosti je usko vezan sa stepenom težine primarne povrede, a opseg u kom se javlja bitno utiče na stepen oporavka (Wu et al., 2004). Nakon traumatskih povreda mozga primećen je porast anaerobnog razlaganja glukoze glikolizom, kako bi se nadomestili nivoi adenozin trifosfata (ATP), neophodni za pokušaj ponovnog uspostavljanja jonskih i neurohemijskih gradijenata (Jalloh et al., 2015). U ovom putu metabolizma glukoze do piruvata nastaje i laktat za koji je dobro poznato da je povišen nakon traumatskih povreda mozga, a visoki nivoi laktata i odnosa laktat/piruvat u povredama su često asocirani i sa lošom prognozom oporavka (Carpenter et al., 2015). Anaerobni metabolizam nije dovoljan da potkrepi metaboličke potrebe tkiva usled čega dolazi do pražnjenja ATP skladišta i posledičnog prestanka rada membranskih ATPaznih pumpi (Ahuja et al., 2017; Jalloh et al., 2015; Werner & Engelhard, 2007). Redukcija metabolizma tokom primarne povrede dovodi do disfunkcije mitohondrija, smanjenja respiratorne stope i produkcije ATP kao i povećanja Ca^{2+} u mitohondrijama (Verweij et al., 2000).

Usled povećane propustljivosti membrana ćelija, brojni joni i proteini prelaze u vanćelijski prostor što sa sobom povlači akumulaciju vode i nastanak edema kojima se pojačava kompresija tkiva i dalje širi povreda (Choo et al., 2007; Unterberg et al., 2004; Werner & Engelhard, 2007). Osim u vanćelijskom prostoru, citotoksični edemi se formiraju i u samim ćelijama, neuronima, astrocitima,

mikrogliji u pokušaju reapsorpcije osmotski aktivnih rastvorenih materija (Stiefel et al., 2005; Unterberg et al., 2004).



Slika 1. Patofiziologija traumatske povrede kičmene moždine. a) Inicijalna mehanička trauma kičmene moždine pokreće kaskadu sekundarne povrede koja je karakterisana akutnom fazom (0-48h posle povrede) i odlikuje je edem, krvarenje, ishemija, infiltracija inflamatornih ćelija, oslobađanje citotoksičnih produkata i ćelijska smrt. Ova sekundarna povreda vodi nekrozi i/ili apoptozu neurona i glijalnih ćelija, kao što su oligodendrociti, koja može voditi demijelinizaciji i gubitku nervnih mreža. b) U subakutnoj fazi (2-14 dana posle povrede), dešava se dalji razvoj ishemije usled razvoja edema, tromboze krvnih sudova i vazospazma. Kontinuirana infiltracija inflamatornih ćelija dovodi do ćelijske smrti, formiraju se cistične mikrokavitacije usled oštećenja ćelija i vanćelijske arhitekture kičmene moždine. Dodatno, astrociti proliferišu i deponuju molekule ECM u region oko lezije. c) U intermedijernoj i hroničnoj fazi (više meseci ili godina), degeneracija aksona se nastavlja i glijalni ožiljak sazreva i postaje potentan inhibitor regeneracije. Cistične kavitacije se spajaju i ograničavaju ponovni rast aksona i migraciju ćelija. Preuzeto i izmenjeno (Ahuja et al., 2017).

Patofiziološka kaskada procesa dovodi finalno do depolarizacije membrane neurona i preteranog lučenja ekscitatornih neurotransmitera kao što su glutamat i aspartat, koji ne bivaju dovoljno efikasno uklonjeni od strane astrocita i aktiviraju N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropioniska kiselina (AMPA) i voltažno zavisne Ca^{2+} i Na^+ kanale (Cheng et al., 2012; Liu et al., 2015; Wang et al., 2014; Werner & Engelhard, 2007).

Ca^{2+} i Na^+ influks dovodi do kataboličkih unutarćelijskih procesa. Ca^{2+} aktivira lipidne peroksidaze, proteaze, fosfolipaze koje potom povećavaju unutarcelularne koncentracije slobodnih masnih kiselina i slobodnih radikala. Dodatno, aktivacijom kaspaza, translokaza i endonukleaza, nastaju progresivne stukturane promene membrana i jedarne DNK u vidu fragmentacije i inhibicije mehanizamareparacije. Sveukupno ovi događaji dovode do razgradnje membrane ćelija i vaskularnih struktura i finalno do nekroze i apoptoze (Werner & Engelhard, 2007).

Usled povrede krvnih sudova dolazi do masivnog influksa inflamatornih ćelija kao što su makrofagi, neutrofili i limfociti koji se u ovom regionu zadržavaju dugo nakon povrede, potom citokina i vazoaktivnih peptida (LaPlaca et al., 2007; Pineau & Lacroix, 2007).

Nadalje, nekroza neurona i glije usled ishemije, inflamacija i ekscitotoksičnosti, oslobađanje ATP, DNK i kalijuma aktivira mikrogliju. ATP koji se oslobađa iz oštećenih ćelija deluje na purinske receptore i dovodi do hemotakse mikrolije u region povrede (Davalos et al., 2005). Aktivirana mikroglija pored drugih inflamatornih ćelija kao što su aktivirani makrofagi, polimorfonuklearne ćelije i limfociti, se infiltrira u povredu gde ove ćelije propagiraju inflamatorni odgovor i doprinose daljem razvoju apoptoze neurona i oligodendrocita (Hausmann, 2003). Fagocitarne inflamatorne ćelije raščišćavaju mijelinski debris, ali istovremeno doprinose daljem širenju povrede oslobađanjem citotoksičnih sporednih produkata kao što su slobodni radikali (O_2^- , vodonik-peroksid i peroksinitrit) (Dizdaroglu et al., 2002). Reaktivne kiseonične vrste izazivaju lipidnu peroksidaciju, oksidativna oštećenja DNK i oksidaciju proteina, što dalje dovodi do nekroze i apoptoze (Ahuja et al., 2017).

Različiti molekuli poreklom od produkata mijelinske razgradnje su toksični i inhibitorni za oporavak neurona. Među njima su Nogo A, glikoprotein vezan za mijelin (engl. *myelin-associated glycoprotein*, MAG) i oligodendrocitni mijelinski glikoprotein (Omgp). Nogo A je potentni inhibitor neuralne plastičnosti i regeneracije jer sprečava aksona da premoste region povrede (Schwab & Strittmatter, 2014). Porast ekspresije hondroitin sulfat proteoglikana (engl. *chondroitin sulfate proteoglycan*, CSPG) od strane reaktivne glije takođe smanjuje plastičnost (Bradbury & Burnside, 2019).

Kako akutni inflamatorni odgovor jenjava, javljaju se pokušaji remijelinizacije, vaskularne reorganizacije, remodelovanje vanćelijskog matriksa (ECM) i neuralnih mreža (Kwon et al., 2004).

U regionima u kojima je došlo do smrti velikog broja ćelija nastaju cistične šupljine odnosno kavitacije ispunjene vanćelijskom tečnošću, filamentima vezivnog tkiva i makrofagima koje uglavnom inhibiraju izrastanje aksona i migraciju ćelija (C. Zhang et al., 2015). Progresivna cistična šupljina nastaje u danima i nedeljama nakon povrede i biva inkapsulirana ožiljnim tkivom dostižući često i nekoliko puta veće dimenzije nego što je inicijalna lezija (Fehlings & Nguyen, 2010; Rossignol et al., 2007).

1.2 Glijalni ožiljak

Iako se uvek govori o glijalnom ožiljku, u tom procesu učestvuje mnogo ćelijskih i vanćelijskih komponenti. Ožiljačno tkivo se u povredi formira u cilju ograničavanja regiona povrede, pokušaja ponovnog uspostavljanja homeostaze kao i pređašnjih funkcija, što se u slučaju većine tkiva i organa u određenom stepenu i postiže, osim u nervnom sistemu koga nakon povrede odlikuju uglavnom hronični patološki procesi (Wells & Watt, 2018). Ovo posebno važi za kičmenu moždinu, koju odlikuje najmanja efikasnost u reparaciji i najveće patološke promene, zbog fenotipskih razlika uključenih ćelijskih tipova, povećane ekspresije inflamatornih citokina, leukocita koji ubrzavaju i šire povredu, veće astroglioze i razlika u ECM (Bradbury & Burnside, 2019; B. Zhang & Gensel, 2014).

Regioni povrede su vrlo heterogeni i može se govoriti bar o tri odeljka: stromalno jezro povrede, astrocitni ožiljni sloj u graničnom regionu i preostalo reaktivno neoštećeno nervno tkivo (O'Shea et al., 2017). Ćelijski i vanćelijski sastav ožiljka u povredi kičmene moždine je prikazan na Slici 2.

Jezgro povrede

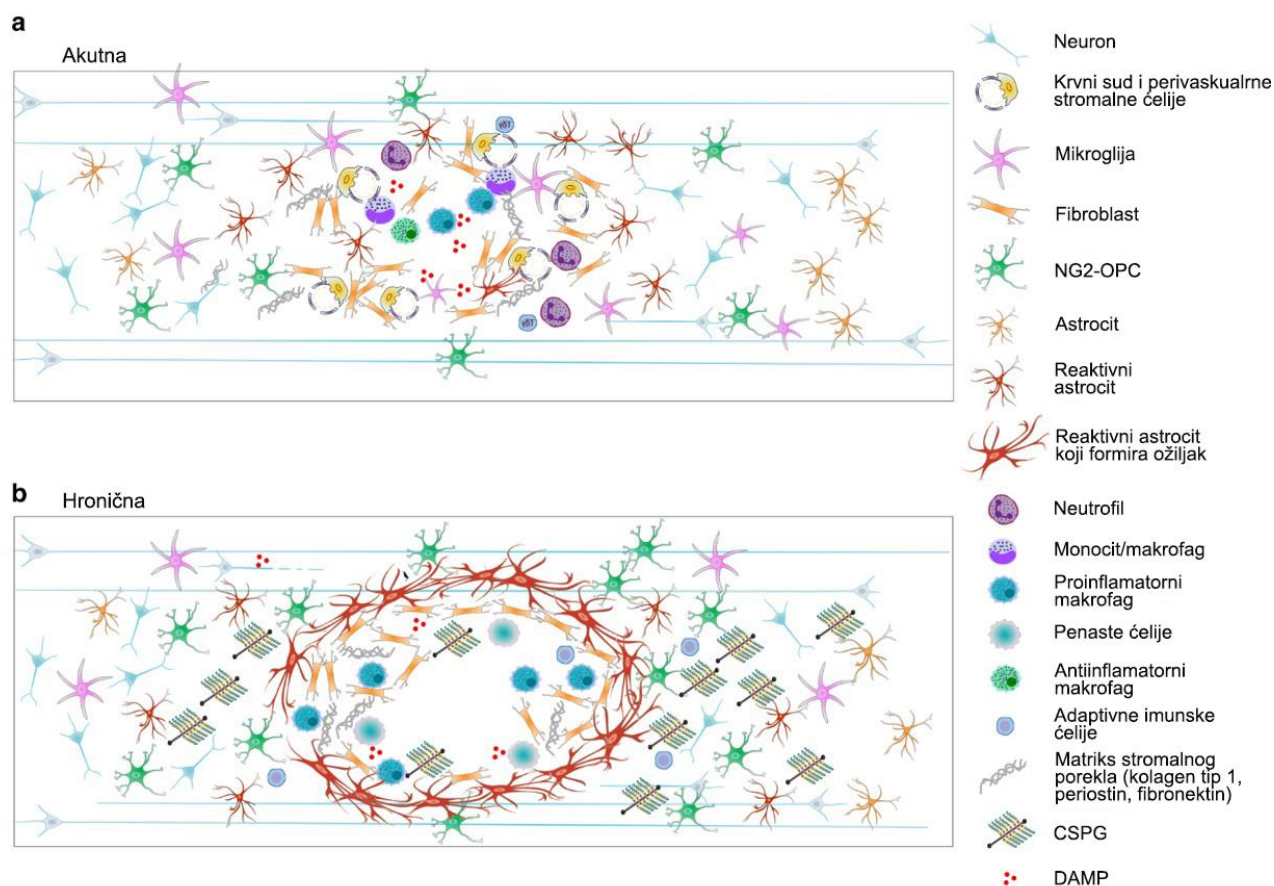
Nakon inicijalne povrede nastaju velike količine ćelijskog debrisa koji mora biti uklonjen jer sadrži i toksične komponente koje dalje prolongiraju štetu. Astrociti i mikroglia započinju momentalno uklanjanje ali kako imaju ograničen fagocitarni kapacitet privlače inflamatorne ćelije iz krvi sintezom različitih faktora (Hawkins & Devitt, 2013). Stromalne ćelije nastale od perivaskularnih fibroblasta, meningealni fibroblasti i periciti proliferišu, mešaju se sa endotelnim progenitorima, novonastalim krvnim sudovima, kao i fibrocitima, makrofagima, neutrofilima, limfocitima i drugim leukocitima koje dolaze iz krvotoka i komponentama ECM (O'Shea et al., 2017; Soderblom et al., 2013). Kako se polako debris uklanja i ćelije poreklom iz krvi se povlače, jezgro sazreva i tada ga sačinjavaju uglavom neneuralne stromalne ćelije i molekuli ECM kao što su fibronektin, kolagen, proteoglikani i laminini (Burda & Sofroniew, 2014). Ovaj centralni region, ranije često nazivan fibrozni, mezenhimalni ili stromalni ožiljak, može činiti više malih klastera, ali i velikih regiona od po par centimetara kod čoveka.

Astrocitna granična zona

Oko jezgra povrede, u periodu od par dana do treće nedelje od povrede, proliferacijom i migracijom astrocita i preplitanjem njihovih nastavaka formira se granični sloj astrocita koji odvajaju okolno neoštećeno tkivo (Wanner et al., 2013). Njihova uloga je stukturano i funkcionalno slična glia limitans graničnoj zoni duž meningi i krvnih sudova u zdravom tkivu centralnog nervnog sistema (CNS) gde odvajaju neuralno od neneuralnog tkiva (O'Shea et al., 2017; Sofroniew, 2015). Ovaj sloj je vrlo uzak, debljine od nekoliko ćelija, i pored reaktivnih astrocita a u ovom sloju se mogu naći i reaktivne progenitorske ćelije oligodendrocita (engl. *oligodendrocyte progenitor cells*, OPC) koje eksprimiraju hondroitin sulfatni proteoglikan 4, poznat i kao neuron/glijalni antigen 2 (NG2) (Sofroniew, 2018).

Reaktivno okolno nervno tkivo

Na astrocitni ožiljak se nadovezuje širok region nepogođen povredom, ali reaktivnog nervnog tkiva u kome dolazi do značajne reorganizacije sinapsi. U ovom regionu su reaktivni astrociti, mikroglia, NG2-OPC, a stepen hipertrofije ćelija opada sa udaljavanjem od povrede (Burda & Sofroniew, 2014). Hipertrofični reaktivni astrociti u ovom sloju se veoma razlikuju od astrocita u ožiljačnoj zoni i fenotipski i funkcionalno (Khakh & Sofroniew, 2015).



Slika 2. Ćelijski i vanćelijski sastav ožiljka u povredi kičmene moždine. Traumatska povreda kičmene moždine pokreće kompleksnu kaskadu događaja koja kulminira formiranjem ožiljka koji se sastoji od brojnih ćelijskih tipova kao i vanćelijskih i neneuronalnih komponenti. a) U akutnoj fazi posle povrede (0-48h), ćelijska smrt i oštećenje vode do oslobađanja velikog broja DAMP iz ćelija i krvi. DAMP su potentni aktivirajući i inflamatorni stimulus stromalnih ćelija, astrocita, NG2⁺ OPC i mikroglije. Fibroblasti perivaskularnog porekla proliferišu. Aktivirane ćelije povećavaju deponovanje molekula ECM poput CSPG i matriksa poreklom iz strome. Neutrofil i monociti iz cirkulacije bivaju regrutovani i njihova relativna ekspresija citokina, hemokina i matriksnih metaloproteinaza je oblikovana okruženjem koje se formira tokom rane povrede i formira se i antiinflamatorni (engl. pro-resolving) i dominantni proinflamatorni fenotip. b) U ožiljku u hroničnoj povredi, makrofage/mikroglija poreklom od monocita zadobija predominantno proinflamatorni fenotip. Umesto ulaska u fazu razrešenja, ćelije urođenog imunskog sistema prezentuju veliki broj DAMP ćelijama adaptivnog imunskog sistema u cirkulaciji i patologija se širi. Reaktivni astrociti postaju hipertrofični, povećavaju ekspresiju proteina povezanih sa intermedijarnim filamentima i oslobađaju matriksne CSPG. Fibroblasti doprinose remodelovanju fibrotičnog tkiva i deponovanje matriksa poreklom iz strome. Urođene imunске ćelije gube sposobnost da efektivno obrade ćelijski i matriksni debrisi i postaju kao lipidima bogate penaste ćelije. Reaktivni astrociti koji formiraju ožiljak se organizuju u strukturu nalik barijeri koja odvaja okolno tkivo od centralnog regiona inflamacije i fibroze gde zaceljivanje ne uspeva. U većini sisarskih vrsta, razvija se hronična cistična kavitacija. Valerova degeneracija oštećenih aksonskih projekcija doprinosi kontinuiranom vanćelijskom deponovanju aksonskog i mijelinskog debrisa, koje ne biva procesuirano od strane imunskih ćelija i zajedno sa CSPG dugotrajno inhibira regeneraciju neurona i neuroplastičnost. Preuzeto i izmenjeno (Bradbury & Burnside, 2019).

1.2.1 Ćelijske komponente ožiljka

Astroцити

Astroцити su prisutni u svim regionima CNS, a prema morfologiji se ugrubo mogu svrstati u protoplazmatske, prisutne u sivoj masi gde obuhvataju nastavcima sinapse ili fibrozne lokalizovane uglavnom u beloj masi gde prave kontakte sa Ranvijevim ćvorovima (Sofroniew & Vinters, 2010). Oba tipa astrocита ostvaruju kontakt sa krvnim sudovima, u zdravnom CNS imaju nepreklapajuće ćelijske domene, a nastavcima, preko puktinastih veza formiraju funkcionalni sincicijum

(Nedergaard et al., 2003). Odlikuje ih postojanje specifičnih kalcijumskih talasa koji se smatraju pandanom akcionim potencijalima u neuronima u kontekstu komunikacije kako astrocita međusobno tako i sa neuronima (Nedergaard et al., 2003; Sofroniew & Vinters, 2010; Volterra & Meldolesi, 2005).

Tokom razvića imaju ulogu u navođenu aksona, neophodni su za nastanak funkcionalnih sinapsi, a utiču i na proces sinaptičkog orezivanja (Barres, 2008; Powell & Geller, 1999; Ullian et al., 2001). Astrociti utiču i na promenu dijametra krvnih sudova i to u skladu sa promenama neuronske aktivnosti, a održavaju i homeostazu jona, pH, transmitera kao i vodeni balans CNS (Gordon et al., 2007; Wolf & Kirchhoff, 2008). Preuzimaju transmitere iz sinaptičke pukotine, a takođe otpuštaju gliotransmitere kao što su glutamat, purini, γ -aminobuternu kiselinu (GABA) i D-serin utičući na samu sinapsu usled čega je skovan inicijalno termin tripartitna, a u novije vreme i pentapartitna sinapsa (Araque et al., 1999; Semyanov & Verkhratsky, 2021). Na sinapsu utiču i oslobađanjem neurosteroida kao što su estradiol i progesteron, a utiču i na metabolizam CNS kao glavni depoi glikogena posebno u sinaptički gustim regionima CNS (Sofroniew & Vinters, 2010).

U odgovoru na patološka stanja astrociti postaju i prolaze kroz promene u genskoj ekspresiji, morfološkim i funkcionalnim svojstvima, što se kolektivno naziva astroglioza (Sofroniew & Vinters, 2010). Može se napraviti opšta podela na tri kategorije astroglioze, mada je zapravo reč o čitavom kontinuumu procesa i promena (Sofroniew & Vinters, 2010). Blaga do umerena astroglioza se javlja pri blagim povredama bez penetracije tkiva ili u regionima udaljenim od fokalne povrede i ne dovodi do promena ekspresije kiselog glijalnog fibrilarnog proteina (GFAP), hipertrofije ćelijskog tela i nastavaka, gubitka domena pojedinačnih ćelija kao i proliferacije (Sofroniew, 2009; Wilhelmsson et al., 2006). Teška difuzna reaktivna gliozna dovodi do dugotrajne reorganizacije tkiva u regionima koji okružuju teške fokalne lezije, a dovodi do značajnog povećanja ekspresije GFAP, proliferacije, naglašene hipertrofije tela i nastavaka i njihovog preplitanja, ali bez formiranja guste barijere kao u glijalnom ožiljku (Sofroniew & Vinters, 2010). Teška reaktivna astroglioza sa kompaktnim glijalnim ožiljkom se javlja kao dugotrajna promena usled penetrirajućih trauma, sa naglašenim povećanjem ekspresije GFAP i drugih gena, jakom hipertrofijom tela i nastavaka, izraženim preplitanjem i gubitkom ćelijskih domena, veoma povećanom proliferacijom i formiranjem kompaktnog ožiljka (Sofroniew & Vinters, 2010). Na ovaj način se duž granice nekrotičnog tkiva formira neuroprotektivna barijera u kojoj reaktivni astrociti interaguju sa drugim tipovima ćelija i dolazi do depozicije gustog kolagenskog matriksa koji sadrži različite faktore koji inhibiraju razrastanje neurita i migraciju ćelija (Faulkner et al., 2004; Silver & Miller, 2004). Molekularni okidači reaktivne glioze su polipeptidni faktori rasta kao što su interleukin 6 (IL-6), inhibitorni faktor leukemije (LIF), cilijarni neurotrofni faktor (CNTF), faktor nekroze tumora α (TNF- α), interferon γ (INF- γ), IL-1, IL-10, transformišući faktor rasta β (TGF- β), faktor rasta fibroblasta 2 (FGF-2), potom ligandi Toll-like receptora (TLR), neurotransmiteri kao što su glutamate i noradrenalin, purini, reaktivne kiseonične vrste, hipoksija i glukozna deprivacija (Sofroniew & Vinters, 2010).

Treba istaći da je GFAP dugo smatran glavnim markerom astrocita, a i indikatorom njihove reaktivnosti (Eng et al., 2000). Međutim njegova ekspresija varirira i lokalno i regionalno i često se ni ne detektuje u astrocitima zdravog CNS ili regionima udaljenim od povreda (Sofroniew, 2009). Pokazano je da ekspresija GFAP nije ni nužna za normalno funkcionisanje astrocita u zdravom CNS u eksperimentima na transgenim miševima, ali da jeste neophodna za proces reaktivne glioze i formiranje glijalnog ožiljka (Pekny & Pekna, 2004). U novije vreme se kao dodatni markeri reaktivnosti astrocita koriste i glutamin sintetaze i S100 β , mada oni nisu ekskluzivno prisutni u astrocitima, a pokazuje se da dobar marker svih astrocita, pa i u zdravom tkivu je Aldh1L1 (Gonçalves et al., 2008).

Rezidentna mikroglia i ćelije urođenog i stečenog imuniteta

Mikroglia predstavlja imunske ćelije nervnog sistema. Dugo se smatralo da su poreklom do monocita iz krvi, međutim u skorije vreme se pokazuje da zajedno sa tkivnim makrofagima imaju

odvojeno poreklo od ćelija krvi (Li & Barres, 2018). Mikroglialne ćelije čine 5-10 % ćelija CNS i predstavljaju parenhimalne makrofage, a zajedno sa perivaskularnim, meningealnim i makrofagima horoidnog pleksusa nadledaju ceo CNS svojim ramifikovanim nastavcima (Frost & Schafer, 2016; Prinz et al., 2017). Tokom razvića je intenzivno uključena u remodelovanje sinapsi i njihovo sazrevanje (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). Mikroglia eksprimira između ostalog komponente sistema komplementa kao što su komponenta komplementa 1q (C1q), receptori komplementa CR3, CR5 koji obeležavaju određene sinapse za uklanjanje od strane mikroglije (Stephan et al., 2012). Mikroglia takođe fagocituje mrtve ili oštećene ćelije kako tokom razvića tako i u adultnom periodu (Li & Barres, 2018). ATP nastao aktivnošću drugih ćelija kao što su neuroni ili astrociti, a i u slučaju patoloških stanja deluje na purinergički receptor P2Y12 na mikrogliji što dovodi do brze promene njene morfologije, pokretljivosti i na kraju funkcije (Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Schafer et al., 2012).

U patološkim uslovima su prvi tip ćelija koji reaguje u kaskadi reakcija nakon povrede (Bellver-Landete et al., 2019; David & Kroner, 2011). U roku od 24h monociti bivaju regrutovani iz krvotoka u region povrede gde pod uticajem različitih DAMP postaju inflamatorni makrofagi, dok se rezidentna mikroglia takođe aktivira i morfološki ova dva tipa ćelija postaju vrlo slični. Mogu se razlikovati na osnovu ekspresije komponente komplementa 45 (CD45), a u novije vreme i na osnovu ekspresije specifičnih markera za mikrogliju, kao što su transmembranski protein 119 (Tmem119), P2Y12R i FCRLS (engl. *Fc receptor-like 5, scavenger receptor*) (Bennett et al., 2016; Bradbury & Burnside, 2019). Tokom prve nedelje od povrede mikroglia dostiže maksimum proliferacije i tada učestvuju intenzivno u inflamatornom odgovoru, fagocitozi debrisa, održavanju aktiviranog fenotipa astrocita otpuštanjem citokina kao što su faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, koji dodatno mobilizuju lokalne i ćelije poreklom iz krvi da fagocituju debrisi i utiču na razvoj inflamatornog fenotipa svih ćelija u regionu povrede (Bellver-Landete et al., 2019; Bradbury & Burnside, 2019). Aktivirana mikroglia u regionu povrede takođe produkuje reaktivne kiseonične i azotne vrste, a ključni enzim u ovom procesu je inducibilna azot oksid sintetaza (iNOS) koja koristi arginin u produkciji azot oksida (Cherry et al., 2014).

Za razliku od povreda u drugim tkivima, ovde ne dolazi do efektivne faze rezolucije, već aktivirane ćelije ostaju neodređeno vreme u regionu povrede, a aktivirana mikroglia značajno doprinosi razvoju hroničnog neuropatskog bola (G. Chen et al., 2018; Prüss et al., 2011).

Fibroblasti

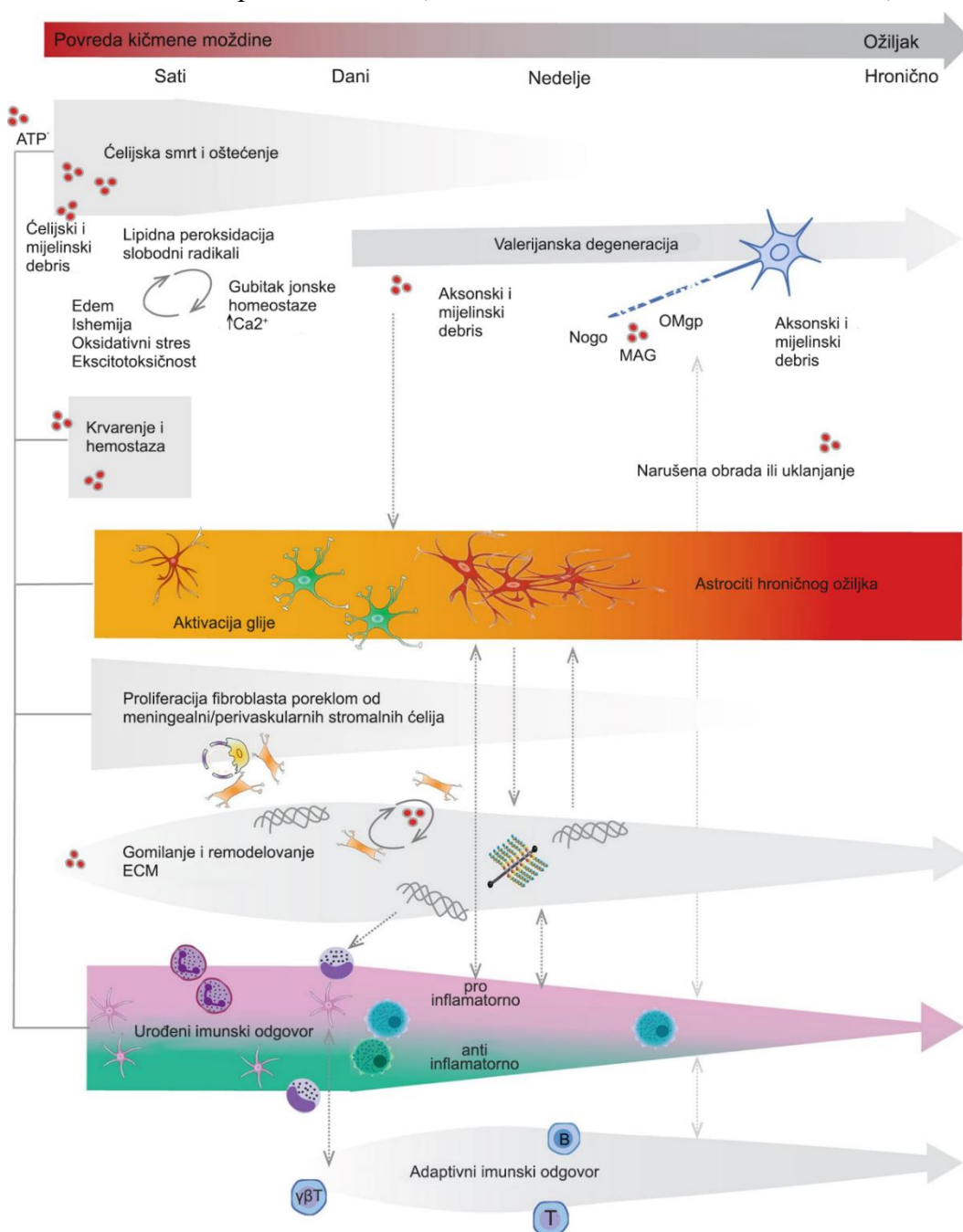
U fiziološkim uslovima u CNS ćelije nalik fibroblastima su prisutne uglavnom samo u nivou bazalne lamine. U toku povrede ove ćelije proliferišu od meningealnih, perivaskularnih ćelija i određenih podtipova pericita i počinju intenzivno da luče i deponuju komponente ECM i ti stromalni elementi kasnije čine takozvano fibrozno jezgro povrede koje je barijera za regeneraciju neurona i migraciju ćelija, a od ostalog tkiva je odeljeno astrocitnim ožiljkom (Bradbury & Burnside, 2019; Soderblom et al., 2013).

Oligodendrocitne prekursorske ćelije

U graničnom regionu povrede počinju da proliferišu i zadobijaju reaktivni fenotip i NG2 pozitivne OPC (Hackett & Lee, 2016; Levine, 2016). S jedne strane one doprinose pokušaju remijelinizacije kroz oligodendrogenezu ili diferencijaciju u remijelinizujuće Švanove ćelije, a s druge mogu da hipertrofiraju i povećaju ekspresiju NG2 za koji se smatra da deluje inhibitory na oporavak neurona (Assinck et al., 2017; Bartus et al., 2019; Filous et al., 2014; Hesp et al., 2015).

Astrociti, OPC, mikroglia, infiltrirane imunske ćelije kontinuirano utiču jedne na druge u regionu povrede. Perivaskularni astrociti su svojim završnim stopalima (engl. endfeet) deo endotelne krvno-tkivne barijere i regulišu na taj način stepen ulaska leukocita. Astrocitna ekspresija Socs3 i

jedarnog faktora κB (NF- κB) dovodi po povećane infiltracije monocita, a takođe astrociti sintetišu i citokine kao što su IL-6, IL-1 β , ligand (C-C motiva) hemokina 2 (engl. *C-C motif chemokine ligand 2*, CCL2) za koje postoje receptori na mikrogliji i makrofagima preko kojih se potencira njihov proinflamatorni fenotip, dok s druge strane imunske ćelije luče IFN- γ , IL-6, IL-1 β , TNF- α i time promovišu reaktivni fenotip kod astrocita (Liddel et al., 2017; Sofroniew, 2009).



Slika 3. Od povrede do ožiljka: vremenski tok progresivne patologije ožiljka pokazuje veze između različitih komponenti ožiljka u povredi kičmene moždine. Nakon traumatske povrede kičmene moždine, akutno oštećenje i smrt ćelija pokreće oslobađanje ćelijskih i krvnih DAMP, oslobađanje ATP, narušava homeostazu jona, izaziva oksidativni stres i ekscitotoksičnost. Sve su to potentni stimulusi za aktivaciju glije, proliferaciju stromalnih ćelija, deponovanje ECM i regrutovanje urođenih imunskih ćelija iz krvotoka. U toku nekoliko dana nakon povrede, makrofagi/mikroglija poreklom od monocita zadobijaju predominantno proinflamatorni fenotip koji ne favorizuje razrešenje i remodelovanje tkiva i vodi fibrozi. Proinflamatorne ćelije urođenog imunskog sistema takođe prezentuju DAMP antigene (kao što je MBP) T i B ćelijama. Za uzvrat, B ćelije mogu predstaviti antigene T ćelijama, tako pokrećući njihovo širenje. Tokom ovog vremena, astrociti proliferišu, hipertrofiraju i preklapaju se u cilju izolacije zone povrede od ostatka tkiva. Oni oslobađaju matriksne CSPG za koje je poznato sa smanjuju neuronsku plastičnost. Valerova degeneracija aksona doprinosi kontinuiranom

deponovanju aksonskog i mijelinskog debrisa koji ne biva efektivno uklonjen od strane imunskih ćelija i već dovodi do deponovanja mijelinskih molekula (MAG, Nogo, OMgp) za koje je poznato da inhibiraju ponovni rast neurona. Valerova degeneracija tokom kasnijih faza nakon povrede pokreće gliozu i neuroinflamaciju. Isprekidane sive strelice pokazuju najčešće dvosmernu interakciju različitih komponenti ožiljka. Na primer, smatra se da CSPG oslobođeni od strane reaktivnih astrocita aktiviraju receptore na makrofagima/mikrogliji i indukuju proinflamatorni fenotip što vodi povećanju inflamacije i daljoj reaktivaciji astrocita i deponovanju CSPG. Fibroblasti sintetisu kolagen tipa 1, koji indukuje astrogliozu i dalje deponovanje molekula matriksa. Interakcija između urođenog i adaptivnog imunskog odgovora takođe propagira inflamatornu patologiju i utiče na aktivaciju glije i produkciju CSPG. Dinamične interakcije između inflamacije, remodelovanja tkiva i ECM i reaktivnih ćelijskih i vanćelijskih promena dovodi do progresivne i razvijajuće patologije koja kulminira formiranjem ožiljka. Preuzeto i izmenjeno iz (Bradbury & Burnside, 2019).

1.3 Vanćelijski matriks

Vanćelijski matriks CNS čine glikozaminoglikani (hijaluronan), proteoglikani lektikanse familije (neurokan, brevikan, versikan, agrekan), glikoproteini (tenascini) i fibrozni proteini (kolagen, fibronektin i vitronektin) (Lam et al., 2019). Proteoglikani su makromolekuli koji sadrže sržni protein za koga je vezano više glikozaminoglikanskih lanaca (GAG). GAG uključuju hijaluronan, hondroitin, dermatan, heparan i keratan sulfate, a u formiranju proteoglikana učestvuju svi sem hijaluronana. Hondroitin sulfat proteoglikani (CSPG) su najzastupljeniji u CNS i obuhvataju neurokan, brevikan, versikan, agrekan (Vecino & Kwok, 2016).

Nakon povrede rezidentne glijalne i stromalne ćelije počinju da sintetisu komponente matriksa i vanćelijske DAMP, što inače nije njihova fiziološka uloga (Bradbury & Burnside, 2019). Fibrozni matriks premošćuje ozleđeni region pogotovo u slučaju potpunog prekida kontinuiteta tkiva. Kolagenski matriks poreklom od fibroblasta je takođe bitna komponenta novog ECM (Klapka & Müller, 2006). Bazalna lamina se uspostavlja depozicijom kolagena VI, nidogena, fibronektina i laminina koji se smatraju permisivnim molekulima za neurone, ali fibronektin, teneascin C i hijaluronan takođe predstavljaju molekularne obrasce povezane sa oštećenjima (DAMP) u povredi (Bradbury & Burnside, 2019).

1.3.1 Tenascin

Tenascini su familija glikoproteina ECM koji su evoluirali u ranim hordatima i sadrže četiri člana: tenascin-C (TnC), tenascin-R (TnR), tenascin-X (TnX) i tenascin-W (TnW) (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011). Ekspimirani su prvenstveno u toku embrionalnog razvoja pogotovo nervnog, skeletnog i vaskularnog sistema, a potom se u adultom stanju ekspimiraju u tkivima koja prolaze intezivno remodelovanje usled povreda, regeneracije nerava, involucije tkiva, vaskularnih bolesti i tumora (Scheetz Jones & Jones, 2000). Zahvaljujući svojoj multimodularnoj organizaciji, veoma dinamičnoj prostornoj i vremenskoj ekspresiji, kao i sposobnosti da interaguju kako sa drugim komponentama ECM tako i sa brojnim ćelijskim receptorima, ostvaruju ogroman dijapazon funkcija koje su često suprotstavljene.

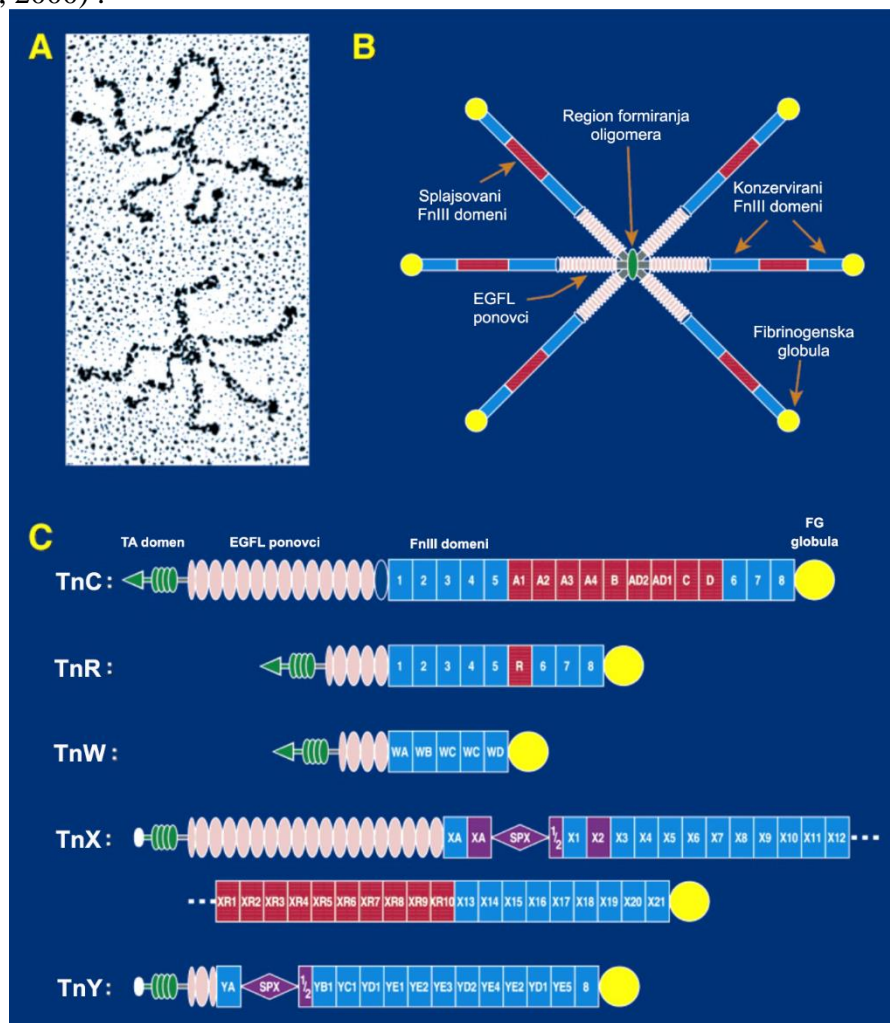
Ime cele familije predstavlja kombinaciju latinskih reči *tenere* (držati) koja je u korenu engleskog naziva tetiva (engl. *tendons*) i *nascere* (roditi se, razvijati se), što reflektuje dominantnu lokaciju i razvojnu fazu ekspresije u periodu kada je protein otkrivan (K. S. Midwood & Orend, 2009). TnC je prvi otkriveni član, a otkriven je nezavisno u više studija koje su izučavale različite aspekte ćelija, razvića i tumora pa je izvorno imao više imena među kojima su glijalni/mezenhimalni ECM protein, miotendinozni antigen, J1 glikoprotein, heksabrahion, citotaktin, tenascin i neuronektin (Scheetz Jones & Jones, 2000). Kako su otkrivani ostali članovi, dobio je naziv TnC od citotaktin na osnovu jednog od dominantnih svojstava da posreduje u ćelijskoj adheziji (Grumet et al., 1985). TnR, poznat i kao restriktin jer mu je ekspresija većinski ograničena na nervni sistem sintetisu uglavnom oligodendrociti tokom mijelinizacije u toku razvića, a učestvuje u formiranju i reorganizaciji perineuralnih mreža u adultnom periodu (Kwok et al., 2011; Scheetz Jones & Jones, 2000). TnX je

ime dobio jer se tada smatralo da je kodiran nepoznatim genom X, a karakterističan je za poprečno-prugastu muskulaturu, kožu i nervno tkivo (Scheetz Jones & Jones, 2000). TnY je ortolog TnX, nađen je samo kod ptica i sada predstavlja deo TnX podfamilije (Scheetz Jones & Jones, 2000). Poslednji član je TnW koji je ime dobio po istraživaču Weberu koji ga je otkrio (Philipp Weber), a eksprimira se u koštanom tkivu i glatkim mišićima krvnih sudova (Tucker et al., 2006).

1.3.1.1 Struktura TnC polipeptida

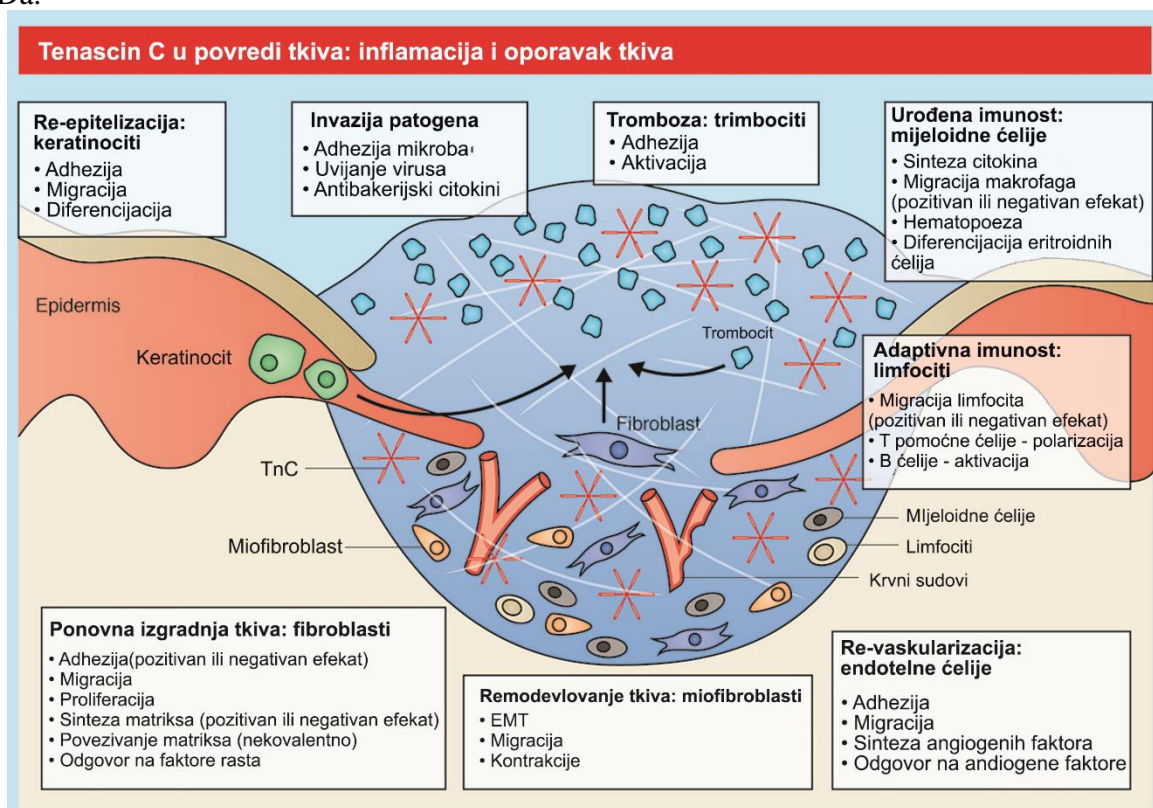
Svi članovi tenascinske familije imaju istu molekulsku arhitekturu (Slika 4). Svaki monomer građen je od nekoliko domena koji se nastavljaju jedan na drugi. Počevši od N-terminusa monomera proteina TnC prvi je tenascinski povezujući domen (engl. *tenascin assembly domain*, TA). Ovaj domen sadrži cisteinske ostatke koje posreduju u povezivanju trimera koji potom disulfidnim mostovima formiraju strukturu heksamera (Erickson, 1993; Taylor et al., 1989). TnC je jedini član tenascinske porodice koji formira heksabrahion (šest monomera tvori simetrični heksamer nazvan heksabrahion, Slika 4A, B), mada je moguće i formiranje monomera, dok ostali formiraju trimere (Kammerer et al., 1998).

Potom sledi EGFL (engl. *epidermal growth factor-like*) domen sa većim brojem epidermalnom faktoru rasta sličnih linearnihponovaka (roze elipse na slikama 4B, C), koji se sastoje iz 31 aminokiseline sa 6 cisteinskih ostataka kojima se ostvaruju intralančane disulfidne veze. Ovaj domen ima 13,5 ponovaka kod svih kičmenjaka, a samo u slučaju sisara 14,5. Ovaj domen je važan za migraciju neurona i navođenje aksona tokom perioda razvića (Loers & Schachner, 2007; Scheetz Jones & Jones, 2000).



Slika 4. Struktura članova porodice tenascina. a) Mikrografije dva mišja TnC heksabrahiona. Svaki krak je aproksimativno 100 nm dužine. B) Model TnC heksabrahiona. Domen tenascinskog povezivanja (TA) povezuje šest lanaca preko heptadnih ponovaka (centralna zelena spojnica). Van heptadnog regiona nalaze se serije cisteinskih rezidua sa visoko konzerviranim prostorom koji se pojavljuje u svim poznatim tenascinskim polipeptidima (sivi pravougaoni deo ruku). U nastavku, u smeru ka C-terminusu, nalaze se sledeći domeni: niz EGFL ponovaka (roze elipse), dva tipa FNIII domena: 1) one koje su konzervirane u svim varijantama TnC (svetlo plavi pravougaonici) i 2) one koji su alternativno prekrojani (crveni pravougaonici), i terminalna fibrinogenska glava (žuti krug). C: Šematski dijagrami pet poznatih tenascina. TnC ima 13 EGFL ponovaka koji su zajednički za sve kičmenjačke vrste (roze elipse) i 14. EGFL ponovak koji je nađen u sisarskim vrstama (tamno plava elipsa), FNIII domeni su crveni a FG je žute boje. TnR ima 4.5 EGFL ponovaka i 8 ili 9 FNIII ponovaka. Dodatni FNIII domen (crveni pravougaonik označen kao R) je ukrojen na poziciji koja je porediva sa TnC. Varijacije u TnR polipeptidima se takođe dešavaju u TA domenu. Tn-W sadrži pet FNIII ponovaka (WA-WD) koji su najbliži jedan drugom. TnX sadri 18.5 EGFL ponovaka i najmanje 33 FNIII ponovka. TnY sadri heptadni ponovak, mali EGFL niz koji sadri jednu polovnu, 1 ceo i još jednu polovinu EGFL ponovka, SPX-1/2FN-III domen sličan onom u TnX, 12 FNIII ponovaka i fibrinogensku globulu. Jedanaest od 12 FNIII ponovaka u TnY (označeni YA-YE) su znatno više srodni sa onima u TnY nego sa FNIII domenima u drugim tenascinima. Međutim, ovaj poslednji ponovak je sličan ponovku 8 iz TnC i TnR. Preuzeto i izmenjeno (Scheetz Jones & Jones, 2000).

Zatim sledi FNIII domen (eng. *fibronectin type III*) sa 17 ponovaka fibronektin tip III koji zauzimaju najveći deo monomera sa po 90 amino-kiselina u vidu sedam antiparalelnih β ploča koje stvaraju elastičnu globularnu strukturu, koja može da se istegne i nekoliko puta u odnosu na inicijalnu dužinu (Scheetz Jones & Jones, 2000). U ovom regionu se nalaze brojna vezivna mesta za druge komponente ECM kao i ćelijske receptore, ali i mesta koja prepoznaju proteolitički enzimi, na prvom mestu matriksne metaloproteinaze (MMP) i serin proteaze u procesima remodelovanja ECM (Imai et al., 1994; Scheetz Jones & Jones, 2000). U okviru FNIII ponovaka postoje konstitutivno eksprimirani domeni (Fn1-8; plavi pravougaonici na slikama 4B,C) i devet alternativno eksprimiranih domena (FnA1/2/3/4, B, AD2, AD1, C, D) koji su smešteni između Fn5 i 6 (Scheetz Jones & Jones, 2000). Oko 27 različito spojenih varijanti otkriveno je samo kod miša u fazi razvića (Joester & Faissner, 1999). U zavisnosti od alternativnog prekrajanja ovog domena, monomer TnC varira između 190 i 300kDa.



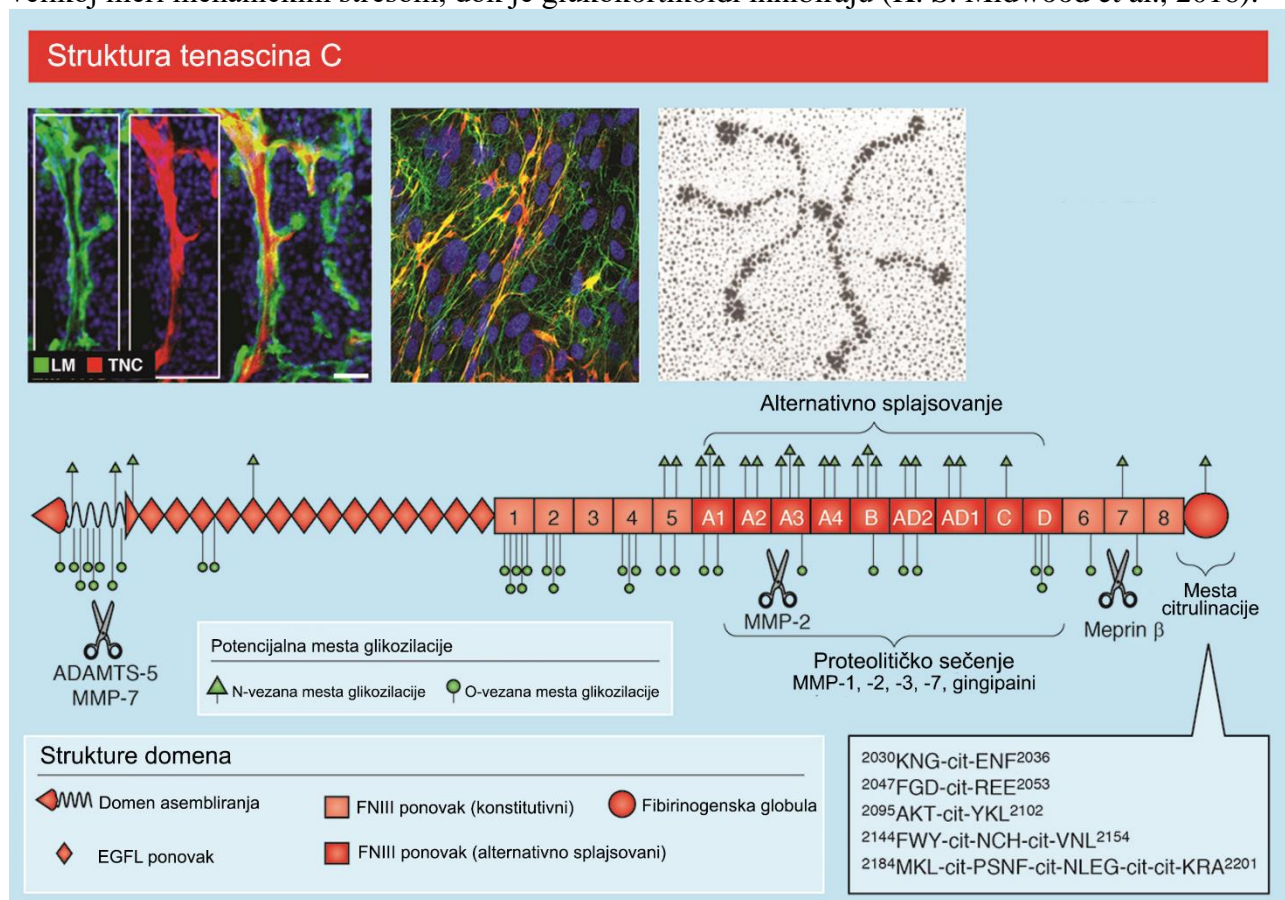
Slika 5. Tenascin C u povredi tkiva: inflamacija i oporavak tkiva. Na slici je dat šematski prikaz različitih procesa u

kojima TnC učestvuje u tkivima koja prolaze intenzivno remodelovanje usled traume i inflamacije. Preuzeo i izmenjeno iz (K. S. Midwood et al., 2016).

Na C-termnusu je globula nalik fibrinogenu (fibrinogenska globula, FG; žuti krug na slikama 4B,C), ovaj region se odlikuje Ca^{2+} vezivnim mestom koje posreduje u interakcijama sa drugim proteinima. Zbog svog terminalnog položaja posreduje i u vezivanju za druge komponente ECM i ćelijske receptore, a takođe može i da moduliše već postojeću interakciju drugog domena TnC i određenog proteina (Joester & Faissner, 1999; Loers & Schachner, 2007; Nies et al., 1991; Scheetz Jones & Jones, 2000).

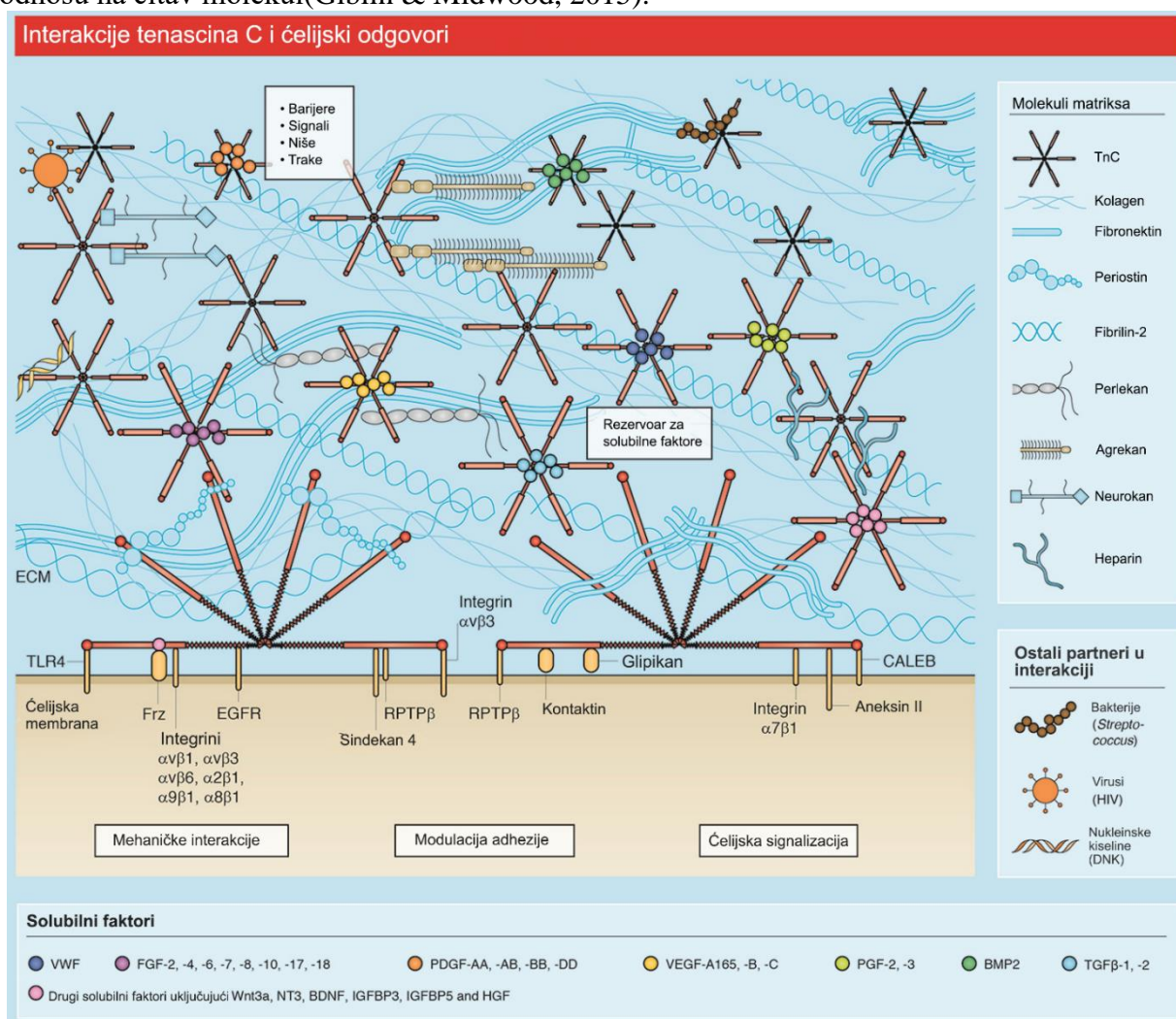
TnC je visoko eksprimiran u toku embrionalnog razvoja u zonama intenzivne migracije ćelija i morfogeneze u vezivnim tkivima u kostima, hrskavicama i tetivama i u nervnom sistemu (Akbareian et al., 2013; Chiquet, 1992; Giblin & Midwood, 2015; Wiese & Faissner, 2015). U adultnom tkivu eksprimira se vrlo retko i ograničeno, u tkivima izloženim stalnom pritisku, ispod nekih epitela i u nišama stem ćelija (Giblin & Midwood, 2015). Međutim u slučaju trauma i inflamacije njegova ekspresija vrlo brzo raste (Slika 5) (K. S. Midwood et al., 2016). Takođe je primećeno da kod pacijenata sa viskim nivoima C-reaktivnog proteina (koji je povišen nakon infekcija i inflamacije) zabeležen je i visoki nivo TnC (sCHENK et al., 1995). Vrlo brzo se pojavljuje nakon mehaničkih ili hemijskih povreda gde ga u velikoj meri sintetišu stromalne ćelije, mada i inflamatorni leukociti, ali i astrociti, potom u bolestima sa hroničnom inflamacijom kao što je reumatoidni artritis i u brojnim kancerima (Goh et al., 2010; K. S. Midwood et al., 2011; Yoshida et al., 2015).

TnC je visokoregulisani gen što se ogleda i u činjenici da sadrži TATA boks u promotorskom regionu, a brojni transkripcioni faktori regulišu njegovu diferencijalnu ekspresiju u embrionalnom i adultnom periodu (Chiovaro et al., 2015). Ekspresiju TnC podstiču različiti citokini u procesima inflamacije, potom SMAD 2 i 3 preko TGF- β , faktora rasta trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) preko PI3K-AKT puta, Delta i Jagged preko Notch puta, a ekspresija je regulisana i u velikoj meri mehaničkim stresom, dok je glukokortikoidi inhibiraju (K. S. Midwood et al., 2016).



Slika 6. Struktura tenascina C. Mikrografija lokalizacije TnC u mišjem insulinomu (laminin, zelena, TnC crvena), humanim dermalnim fibroblastima (TnC crvena, fibronektin zelena). Elektronska mikrografija TnC heksabrahiona. Strukturni prikaz monomera TnC sa naznačenim mestima za modifikaciju: alternativno prekrajanje, glikozilaciju, citrulinaciju i proteolitičko sečenje. Preuzeto i izmenjeno iz (K. S. Midwood et al., 2016).

Ogroman broj funkcija koje TnC ima posledica je različitih modifikacija od transkripcionog do postranslacionog nivoa (Slika 6). Prvenstveno alternativnim prekrajanjem može da nastane veliki broj različitih izoformi, hipotetički čak 511, a ovaj proces je pogotovo dinamičan u slučaju tumora gde koordiniše različite ćelijske procese (Giblin & Midwood, 2015). Potom, na brojnim mestima je moguća glikozilacija usled čega može doći do narušavanja sposobnosti povezivanja u heksamere, zaštite od proteolitičke degradacije, kao i do izmena u sposobnosti vezivanja za različite partnere (Giblin & Midwood, 2015). Posttranslaciono se javlja citrulinacija, a primećeno je da ova modifikacija u FG domenu povećava imunogenost C-terminalnih rezidua što dovodi do nastanka autoantitela u pacijentima obolelim od reumatoidnog artritisa gde njihov titar vrlo verno predviđa razvoj bolesti (Schwenzer et al., 2016). TnC je podložan proteolitičkom sečenju pogotovo od strane MMP što doprinosi obrtu TnC u tkivu. Najveći broj mesta za sečenje nalazi u okviru alternativno prekrojenog regiona gde deluju MMP1,2,3 i 7, mada 7 deluje i u okviru TA domena. Na ovaj način mogu biti otkrivena kriптиčna mesta ili nastati solubilni fragmenti koji mogu imati i drugačije funkcije u odnosu na čitav molekul (Giblin & Midwood, 2015).



Slika 7. Interakcija tenascina C sa drugim molekulima. Šematski prikaz interakcija TnC sa komponentama ECM, ćelijskim receptorima, patogenim komponentama i solubilnim faktorima. Preuzeto i izmenjeno iz (K. S. Midwood et al., 2016).

TnC interaguje sa preko 25 molekula koji su klasifikovani u komponente ECM, ćelijske receptore, patogene komponente i solubilne faktore i na taj način moduliše procese ćelijske migracije, adhezije, proliferacije, preživljavanja, razrastanja neurita, reorganizacije ECM, sinteze proteaza i citokina (Slika 7.) (Giblin & Midwood, 2015).

Među komponentama ECM, najznačajniji partner TnC je fibronektin za koga vezivna mesta postoje u okviru FnIII ponovaka čime se moduliše adhezija ćelija, dok postoje i vezivna mesta za kolagen, periostin i fibrilin 2 koja nisu u potpunosti opisana. U okviru Fn 3-5 ponovaka i FG domena nalaze se vezivna mesta za proteoglikane lektikanske familije i perlekan, a poseduje i vezivna mesta za kontaktin, CSPG5 i glipikan (Midwood et al., 2011). Smatra se da se ovim intramatričkim interakcijama reguliše sveukupna rigidnost tj. fluidnost matriksa kao i pokretljivost ćelija. Što se tiče interakcija sa ćelijskim receptorima, TnC se vezuje za integrine uglavnom preko Fn3 ponovaka ali i preko vezivnih mesta u okviru alternativno prekrojenih ponovaka kao i FG domena i moduliše procese adhezije i migracije ćelija (K. S. Midwood et al., 2016). Interakcijom sa receptorima epidermalnog faktora rasta (EGF) je pokazan efekat na proliferaciju ćelija (Scott Swindle et al., 2001). Interakcijom sa Toll-like receptor 4 (TLR4) dolazi do modulacije inflamatornih signalnih puteva (K. S. Midwood et al., 2016). Što se tiče solubilnih faktora, pokazane su interakcije sa Wnt/wingless 3a (Wnt3a), potom TGF- β i vaskularnim endotelnim faktorom rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) uglavnom preko ponovaka u regionu FnIII3-5. Smatra se da se na ovaj način produžava njihovo vreme poluživota, povećava koncentracija i menja konformacija (K. S. Midwood et al., 2016). TnC se vezuje i za patogene među kojima su i Streptococcus kao i virus humane imunodeficijencije (HIV), a smatra se da tu učestvuje kao barijera za patogene. Vezivanje TnC za HIV-1 hemokinski receptor neutralizuje viralnu aktivnost (Fouda et al., 2013).

1.4 Terapeutske strategije

U toku povrede najviše stradaju neuroni. U slučaju kičmene moždine može doći do gubitka senzomotornih funkcija kao i do paralize. Neuroni adultnog sisarskog CNS imaju malu sposobnost oporavka usled nedostatka signala za rast i nedovoljno efikasne mašinerije za oporavak i izrastanje neurita (Ahuja et al., 2017). Veliki deo terapija je usmeren ka signalnim putevima za rast, manipulaciju genima uključenim u taj put, pokušajima povećanja sinteze i transporta materijala neophodnih za razrastanje i modulaciju aksonskog citoskeleta, a pogotovo ka upotrebi stem ćelija (Bradbury & Burnside, 2019; Schepici et al., 2020).

Postoji jako veliki broj istraživanja kao i kliničkih studija za oporavak i regeneraciju kičmene moždine, međutim nijedan pristup do sada nije doveo do većeg neurološkog oporavka i ponovnog uspostavljanja funkcija (Donovan & Kirshblum, 2018; Tator, 2006). Težina primarne povrede je svakako najveći prognostički indikator oporavka, međutim za veliki deo pacijenata stepen oštećenja koji nastane tokom sekundarne povrede zapravo ograničava restorativni potencijal i daje preciznije predviđanje daljeg toka patoloških promena (Dumont et al., 2001). Što se tiče primarne faze povrede, moguće su samo mere prevencije i zaštite. S druge strane sva istraživanja su fokusirana na kaskadu događaja u sekundarnoj povredi, na pokušaj stimulacije regeneracije i razrastanja neurita, zaustavljanje samoubrzavajuće degeneracije i repopulaciju mesta povrede neuronima i glijalnim ćelijama *de novo* koje bi se potom funkcionalno integrisale u postojeće tkivo (Oyinbo, 2011). Tokom vremena se promenilo shvatanje pojma regeneracija. Sada se zna da postoji ogroman potencijal za remodelovanje i reorganizaciju neuralnih mreža kako u zdravom, tako i u povređenom CNS kao i da se funkcija može ponovo uspostaviti na različite načine (O'Shea et al., 2017; Tuszynski & Steward, 2012). U skladu sa tim često se pravi podela na razrastanje aksona i remodelovanje sinapsi iznad ili ispod regiona povrede kao i kroz sam region povrede (Sofroniew, 2018).

Formiranje ožiljka se u pogledu oporavka često kategoriše kao povoljan ili nepovoljan proces (Anderson et al., 2016; Liddelow & Barres, 2016). U terapeutske svrhe se ipak pokazalo kao konstruktivnije da se targetiraju pojedinačno njegove komponente. Uglavnom se baziraju na pokušaju

redukovanja formiranja ožiljka, blokiranja inhibitornih molekula, primenama hirurških, farmakoloških i genetičkih pristupa (Bradbury & Burnside, 2019). Prevencija formiranja astrocitnog ožiljka se pokazala kao negativna za oporavak, ali su se terapijski pristupi okrenuli ka mezenhimalnim i fibroznim komponentama (Klapka et al., 2005). Farmakološka redukcija migracije fibroblasta ožiljka je dovela do reparacije aksona i funkcionalnog oporavka, a u ovu svrhu su korišćeni lekovi koji već imaju primenu u lečenju kancera (Gilad & Gilad, 2001). Potom inhibicija sinteze kolagena i inhibicija proliferacije meningealnih fibroblasta je takođe dovela do smanjenja fibroznog ožiljka i aksonske regeneracije na veće distance (Klapka et al., 2005). Terapijski pristupi su se fokusirali i na izmenu genske ekspresije u astrocitima i to na selektivnu inhibiciju NF- κ B signalizacije čime se redukuje inflamacija (Brambilla et al., 2005). U pogledu komponenti ECM, razvile su se terapije koje uključuju primenu monoklonskih antitela na periostin u periodu od par dana do 2 nedelje nakon povrede, što je dovelo do poboljšanja u animalnim modelima, potom antitela za neutralizaciju N-kadherina, što je dovelo do smanjenja formiranja astrocitnog ožiljka, a veliki broj studija ispituje efekat genetičke manipulacije i uklanjanja enzima bitnih za sintezu CSPG (Bradbury & Burnside, 2019).

Što se tiče samog TnC, nivoi njegove ekspresije se već očitavaju kao merilo uspešnosti reparacije tkiva, a TnC se koristi i u pristupima za reparaciju i tkivnu zamenu baziranu na stem ćelijama (K. S. Midwood et al., 2016). Integrin- α 7 β 1- aktivirajući TnC peptid je inkorporiran u posebne biogelove za koje je potom pokazano da podstiču razrastanje neurita i diferencijaciju ćelija osteogene linije (Berns et al., 2016; Mercado et al., 2004; Sever et al., 2014). Takođe, platinasti navoji korišćeni za reparaciju povreda arterija su davali bolji ishod kada su bili obloženi TnC (Miura et al., 2016).

2. Ciljevi istraživanja

Jedan od najzahtevnijih medicinskih izazova današnjice predstavlja oporavak od traumatskih povreda CNS. Pošto oštećeni neuroni imaju malu sposobnost da se regenerišu, dolazi do gubitka senzomotornih funkcija, pa čak i paralize. Nakon povrede počinje višestepeni proces stvaranja glijalnog ožiljka s ciljem da se nastala povreda ograniči i zatvori, ali za razliku od povreda drugih tkiva, ne dolazi do faze rezolucije niti uspostavljanja prethodne strukture i funkcija tkiva. U regionu povrede bitnu ulogu imaju brojni reaktivirani ćelijski tipovi, komponente ECM kao i solubini faktori koji međusobnim interakcijama održavaju inflamatorno stanje.

Vanćelijski glikoprotein TnC je zastupljen u ECM tkiva koja prolaze intenzivno remodelovanje, a nakon povreda CNS ga sintetišu astrociti. Usled svoje multimodularne, prostorno i vremenski visoko regulisane ekspresije, kao i brojnih partnera sa kojima interaguje, poput komponenti ECM i ćelijskih receptora, može da ostvari pletoru efekata koji su često i oprečni. TnC moduliše procese ćelijske adhezije, migracije, proliferacije, preživljavanja, razrastanja neurita, reorganizacije ECM i sinteze proteaza i citokina.

Cilj ove doktorske disertacije je da ispita efekat različitih domena proteina tenascina-C na morfološka i funkcionalna svojstva astrocita i mikroglije u ranim fazama nakon mehaničke povrede kičmene moždine i u kulturi ćelija miša. Stoga, definisani su i pojedinačni ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Praćenje stope zatvaranja mehaničke povrede u kulturi astrocita nakon tretmana različitim fragmentima tenascina-C
2. Ispitivanje stope proliferacije astrocita i mikroglije u modelu povrede *in vivo* i *in vitro*
3. Ispitivanje morfologije i lokalizacije ćelija u odnosu na region povrede *in vivo* i *in vitro* nakon tretmana različitim fragmentima tenascina-C
4. Produkcija citokina *in vitro* nakon tretmana različitim fragmentima tenascina-C
5. Ispitivanje efekata FnD fragmenta TnC na nishodne interagujuće partnere

3. Material i metode

3.1. Tabela prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma

Tabela 2. Nazivi i proizvođači hemikalija

Naziv hemikalije	Proizvođač
NaCl - natrijum hlorid NaOH - natrijum hidroksid HCl - hlorovodonična kiselina KCl - kalijum hlorid Na ₂ HPO ₄ - dinatrijum hidrogen fosfat NaH ₂ PO ₄ - natrijum dihidrogen fosfat KH ₂ PO ₄ - kalijum dihidrogen fosfat NaHCO ₃ - natrijum hidrogen karbonat Borna kiselina Glukoza	Sigma-Aldrich, MO, SAD
EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina EGTA - etilen glikol-bis(β-aminoetil etar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina PFA - paraformaldehid Mowiol Glicerol SDS - natrijum dodecil sulfat Bromfenol plavo Tween-20 Triton X-100 Akrilamid/Bis-akrilamid TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamin APS - amonijum persulfat Etidijum bromid Na-orto-vanadat Diethyl-pirokarbnat (DEPC) Hloroform NP-40 Tris baza, Tris (hidroksimetil)-metilamin β-merkaptioetanol	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Glicin Saharoza	Carl Roth GmbH, Nemačka
Metanol Izopropanol	Zorka Pharm, Srbija
BSA - goveđi serum albumin Tripsin Na-piruvat PLL – poli-L-lizin PLO – poli-L-ornitin	Sigma-Aldrich, MO, SAD
DMEM - Dulbekov modifikovani Eagle medijum L-15 - Leibovitz' medijum Pen+Strep - Penicilin/Streptomycin	Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, SAD

Tabela 3. Sastav rastvora, pufera i medijuma

Metoda	Rastvor	Sastav i koncentracije
PCR	TDB, pufer za digestiju pH 8,4	50 mM Tris pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS
	5x TBE, Tris-boratni-EDTA pufer	0,45 M Tris 0,45 M Borna kiselina 50 mM EDTA pH 8,0
Imunofluorescencija	0,2 M PB, fosfatni pufer pH 7,4	0,16 M Na ₂ HPO ₄ 0,04 M NaH ₂ PO ₄ ddH ₂ O
	4% PFA, paraformaldehid pH 7,4 (1M NaOH)	40 g PFA 500 ml ddH ₂ O 500 ml 0,1M PB
	0,01 M PBS, fosfatni pufer	0,2 M PB 20x 147 mM NaCl ddH ₂ O
	Mowiol medijum	9,6% Mowiol 24% Glicerol 48% 0,2 M Tris pufer pH 8,5 24% ddH ₂ O
Ćelijska kultura	PBS, fosfatni pufer za ćelije pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
	DMEM+, medijum za gajenje ćelija	10% FBS 1% Pen+Strep, 1% Na-piruvat DMEM
Western blot	RIPA, pufer za liziranje pH 7,4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% NP-40 0,1% SDS 10 mM EDTA 10 mM EGTA 0,5% Triton X-100
	6x Leammli, pufer za nalivanje uzoraka	12% SDS 0,06% Bromfenol plavo 60% Glicerol 375 mM Tris-HCl pH 6,8
	5x Pufer za elektroforezu (Running buffer)	124 mM Tris baza 0,96 M Glicin 17 mM SDS
	10x Transfer pufer	204 mM Tris baza 1,5 M Glicin

1x Transfer pufer	Transfer pufer 10x 20% Metanol dd H ₂ O
TBST, Tris pufer soli sa 0,1% Tween-20	20 mM Tris baza 150 mM NaCl 0,1% Tween-20
Blagi pufer za skidanje antitela (Mild stripping buffer) pH 2,2	15 g glicin 1 g SDS 10 ml Tween20 1000 ml ddH ₂ O

3.2 Eksperimentalne životinje

Za potrebe eksperimenata korišćeni su tencin-C deficijenti miševi (TnC^{-/-}) sa genetičkom pozadinom C57BL/6 soja i miševi divljeg soja (TnC^{+/+}) C57BL/6. U eksperimentima su korišćene životinje oba pola. Kolonija TnC^{-/-} miševa je dobijena iz originalnog legla (Evers et al., 2002) iz Centra za Molekularnu Neurobiologiju, Univerziteta u Hamburgu, ljubaznošću prof. dr Melitte Schachner i dr Igora Jakovčevskog. Životinje su uzgajane u lokalnoj koloniji Instituta za fiziologiju i biohemiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Životinje su gajene u standardnim uslovima 21±1°C, 50% vlažnosti, 12:12h svetlost/mrak i imale su *ad libitum* pristup hrani i vodi. Sve eksperimentalne procedure i briga o životinjama sprovedeni su u skladu sa NIH Direktivom za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja (1985) i u skladu sa Evropskom direktivom (86/609/EEC) i bili su odobreni od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (#323-07-05121/2017-05).

3.2.1 Određivanje genotipa miševa

Određivanje genotipa miševa, odnosno prisustvo, TnC^{+/+}, ili odsustvo, TnC^{-/-}, TnC proteina, određivano je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*; PCR). DNK je izolovana iz repa miševa. Mišu je odsecan vršni deo repa dužine 5mm i potapan u 13 µl proteinaze K (Thermo Fisher Scientific, Nemačka; Kat. br. EO0492) rastvorene u TDB (Tabela 3) u finalnoj koncentraciji 1,3 mg/ml. Tkivo je inkubirano u termo bloku na 65 °C, 5 sati. Uzorci su centrifugirani na 14000 x g, 5min. Skupljena DNK je razblažena 20x u sterilnoj ddH₂O i denaturisana na 95 °C 15min. Finalna zapremina reakcione smeše za PCR je iznosila 25 µl, dok su početne koncentracije i zapremine pojedinačnih komponenti po reakciji bile:

PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, Nemačka; Kat br. KO172)	7 µl
ddH ₂ O	14 µl
prajmer ES (5'-AGC-CCC-TGC-CTA-CCT-TTT-CCT-AAT-3') (20 µM)	0,95 µl
prajmer ES TnC (pos) (5'-CCA-GCT-TTA-TCG-GAT-CCA-TAA-CTT-CG-3') (20µM)	0,95 µl
prajmer ES WT (5'-CCT-CGG-GAG-TGA-GGG-CAA-ACA-AAG-3') (20 µM)	1,1
DNK, razblažena i denaturisana	1µl

Pri svakoj genotipizaciji, pored uzoraka kod kojih je ispitivano odsustvo TnC, pripremani su i kontrolni uzorci:

1. pozitivna kontrola za TnC – DNK miša divljeg soja koji ima TnC, (TnC^{+/+})
2. pozitivna kontrola za odsustvo TnC – DNK miša koji nema TnC protein, (TnC^{-/-})
3. negativna kontrola reakcije – sterilna H₂O umesto uzorka DNK

PCR reakcija je puštana na mašini ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija u trajanju od 2,5 min na 94 °C, praćena sa 30 ciklusa u kojima su se smenjivale faze denaturacije od 30 sec na 94 °C, hibridizacije trajmerima od 45 sec na 65 °C i ekstenzije trajmerima od 50 sec na 72 °C. Potom je sledila finalna elongacija od 5 min na 72 °C, nakon čega su uzorci čuvani u mašini na +4°C do dalje analize.

Proizvodi PCR reakcije proveravani su elektroforezom u 1,3% agaroznom gelu (Lonza, ME, SAD; Kat. br. 50000) pripremljenom korišćenjem pufera 0,5x TBE (Tabela 2) sa 0,005% etidijum bromidom na 100 V, 20 min, a signal je vizuelizovan na Chemi DocIt gel/blot Imager (UVP systems, Nemačka).

3.3 Primarne kortikalne kulture glijalnih ćelija

Za pripremu primarnih kortikalnih kultura glijalnih ćelija korišćeni su TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševi starosti 0-3 dana, oba pola. Primarne kulture astrocita i primarne mešovite kulture mikroglije i astrocita za svaki genotip pripremane su od korteksa 3 miša istog genotipa.

3.3.1 Kortikalna kultura astrocita

Primarne ćelijske kulture astrocita pripremane su prema prethodno objavljenom protokolu (Bijelić et al., 2020). Korteks je mehanički disociran i centrifugiran na 500 x g, 5 min, dva puta. Neposredno pre trećeg centrifugiranja, ćelijska suspenzija je propuštena kroz igle dijametra 0,8mm i 0,6mm, 3-5 puta. Svi koraci su rađeni u Leibowitz L-15 medijumu za izolaciju u koji je dodato 100 U/ml penicilina, 0,1 mg streptomocina i 0,1% BSA. Ćelije su resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija DMEM sa dodatkom 10% FBS, 25 mmol/L D-glukoze, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomocina a potom zasejane u Petri šolje dijametra 60mm i održavane na 37 °C u atmosferi sa 92-95% vlažnosti i 5% CO₂. Medijum za gajenje ćelija menjan je svaka 2-3 dana. Nakon dostizanja konfluentnosti ćelije su pasažirane rastvorom 0,25% tripsina i 0,02% EDTA a potom zasejavane u nove Petri šolje i gajenje do ponovnog dostizanja konfluentnosti nakon čega su ponovo pasažirane i zasejavane u Petri šolje ili na pokrovna stakla dijametra 15 mm u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna. Pripremane su po tri nezavisne ćelijske kulture za svaki genotip.

3.3.2 Mešovite kortikalne kulture mikroglije i astrocita

Korteksi miševa su izolovani u sterilnom, hladnom PBS (Tabela 2). Tkivo je potom inkubirano u rastvoru tripsina u koncentraciji 1mg/ml u PBS 10min na 37°C. Nakon enzimske digestije, dodata je 4 x veća zapremina DMEM+ (Tabela 2) da bi se inaktivirao tripsin, i suspenzija je potom centrifugirana na 500 x g, 8 min. Talog je resuspendovan u DMEM+ i ćelije su dodatno razdvojene propuštanjem kroz igle dijametra 0,8 i 0,6 mm, 3-5 puta a potom opet centrifugirane na 500 x g 8min. Talog je resuspendovan u 1 ml DMEM+ i ćelije su razdvojene propuštanjem suspenzije kroz igle dijametra 0,6 mm i zasejane u zavisnosti od potreba eksperimenta: u ploče sa 6 bunara zasejavane su ćelije za Western blot i RT-PCR a za imunofluorescentno obeležavanje na pokrovna stakla, dijametra 15 mm, prethodno obložena PLO (Tabela 2). Ćelije su gajene na 37 °C u atmosferi sa 92-95% vlažnosti i 5% CO₂. Ćelijama je zamenjen medijum nakon 24h a nakon toga medijum za gajenje je menjan svaka 2-3 dana tako što je 50% volumena postojećeg medijuma zamenjeno sveže pripremljenim DMEM+. Mešovita kultura mikroglije i astrocita gajena je 12-14 dana a potom su rađeni eksperimenti. U ovim mešovitim kulturama astrocita i mikroglije ćelije mikroglije činile su u proseku 20% ćelija u TnC^{+/+} kulturama odnosno 16% u TnC^{-/-} kulturama. Pripremljene su po tri nezavisne ćelijske kulture za svaki genotip.

3.4 Model povrede u primarnim kortikalnim kulturama ćelija glije

Model povrede u primarnoj kulturi astrocita, kao i primarnoj mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, je dobijan nanošenjem ogrebotine u sloju ćelija (engl. *Scratch wound*, SW). SW je nastajao povlačenjem sterilnog nastavka pipete od 200 μ l, čime su uklanjane ćelije na putanji povlačenja nastavka i ostajala praznina što je sveukupno stvaralo model povrede u monosloju ćelija. Region povrede smatran je centralnim regionom koji je oivičen frontom astrocita dok je kao graničnim regionom smatran region ćelija koji direktno okružuje region povrede.

3.4.1 SW na primarnoj kulturi ćelija glije

Za potrebe ispitivanja zatvaranja povrede u SW modelu u primarnoj kulturi astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, astrociti su zasejavani u Petri šolje prečnika 35 mm i održavane u kulturi do dostizanja potpune konfluentnosti (Környei, Cziró, et al., 2000; Lampugnani, 1999). Nakon dostizanja konfluentnosti pravljena su 3-4 SW po Petri šolji te su dalje dodavani tretmani od interesa i praćeno je zatvaranje povrede. Zatvaranje povrede nakon dodatih tretmana praćeno je snimanjem istih regiona povrede u 0, 6, 12, 24 i 48h nakon SW i tretmana na mikroskopu (detaljnije objašnjenje u odeljku 3.8.1). Da bi se obezbedilo snimanje istih kadrovi u različitim vremenskim tačkama, povlačena je crna linija na sredini dna Petri šolje. Za svaki SW snimani su kadrovi iznad i ispod linije.

Proliferacija ćelija praćena je u primarnoj kulturi astrocita i mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} i zasejanih na pokrovna stakla. Na ćelijama je urađen SW i apliciran je tretman, a nakon 24 ili 48h, u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna, ćelije su fiksirane i imunofluorescentno obeležavane markerima od interesa i potom snimane.

Za eksperimente ispitivanja ekspresije proteina (Western blot metoda) i prisustva oslobođenih proteina u ćelijaski medijum (metoda enzimskog imunoseja), primarne kulture astrocita i primarne mešovite kulture mikroglije i astrocita izolovane iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa zasejavane su u Petri šolje prečnika 60 mm. Nakon dostizanja konfluentnosti, ćelije su podvrgnute SW i tretmanima. Nakon 24 ili 48h, u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna, uklanjan je ćelijaski medijum koji je korišćen u eksperimentima enzimskog imunoseja dok su ćelije prikupljane i izolovana je frakcija ukupnih proteina.

U cilju ispitivanja ekspresija gena u primarnoj kulturi astrocita i primarnoj mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara. Nakon dostizanja konfluentnosti, nanošen je SW i ćelije su prošle odgovarajuće tretmane. RNK je uzorkovana 6h nakon SW i tretmana u eksperimentima gde je ispitivano delovanje tretmana 24h. U eksperimentima u kojima je ispitivano delovanje tretmana 48h, RNK je uzorkovana 30h od nanete povrede i tretmana.

3.5 Model kompresione povrede kičmene moždine

Kompresiona povreda kičmene moždine izvođena je na 10-12 nedelja starim miševima TnC^{+/+} i TnC^{-/-}, kako je prethodno opisano (J. Chen et al., 2010). Ukratko, pre operacije, životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom ketamina (100mg/kg) i ksilazina (5mg/kg). Laminektomija je urađena u nivou kičmenih pršljenova T7-T9 torakalnog regiona primenom makaza za laminektomiju (Fine Science Tools, SAD). Oslobođeni region kičmene moždine komprimovan je u trajanju od 1s primenom prilagođene pincete na stereotaksičnom okviru. Nakon toga, koža je ušivena i životinje su držane na podlozi koja održava temperaturu od 35 °C tokom 24h da bi se sprečila hipotermiju. Životinje su žrtvovane 7 dana nakon povrede i tretmana. Kompresiona povreda kičmene moždine i aplikacija tretmana je rađen na 32 životinje, odnosno na po 4 životinje po tretmanu u svakom genotipu. Kriterijumi za isključivanje životinja iz studije na osnovu etičkih zahteva

podrazumevali su gubitak 20% težine u toku 24h, pasivnu poziciju životinja u kavezu i nedostatak reakcije na eksperimentatora kao i generalna procena lošeg zdravstvenog stanja. Na osnovu ovih kriterijuma tri životinje isključene su iz studije i humano žrtvovane.

3.6 Tretmani

U cilju ispitivanja uloge TnC na astrocite i mikrogliju u SW modelu povrede kao i u kompresionom modelu povrede kičmene moždine korišćeno je pet rekombinantno eksprimiranih proteina koji predstavljaju različite domene TnC proteina. Fragmenti su sintetisani prema prethodno opisanom protokolu (Dorries et al., 1996). Alternativno prekrajanje fragmenti su od posebnog interesa za ispitivanje jer je pokazano da upravo ove fragmente odlikuje povećana ekspresija nakon povrede nervnog sistema (Jakovceviski et al., 2013).

3.6.1 Tretmani u primarnoj kulturi kortikalnih astrocita

Efekat TnC na zatvaranja povrede ispitan je u primarnoj kulturi astrocita izolovanoj iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa. Nakon izvođenja SW, ispitivani su efekti dodavanja konstitutivno eksprimiranih domena Fn6-8 i EGFL i domena koji nastaju alternativnim prekrajanje FnA, FnD i FnC. Prethodne studije ukazale su na značajan potencijal delovanja fragmenata FnD i FnA, *in vitro* (Meiners et al., 2001) i *in vivo* (J. Chen et al., 2010) te je ispitan i efekat kombinovanog tretmana fragmentima Fn(D+A) kao i Fn(D+A+C). Odmah nakon nanošenja SW na primarne kulture astrocita, dodavani su ispitivani fragmenti rastvoreni u DMEM+ medijumu u finalnoj koncentraciji 10 µg/ml. Tretmani fragmentima trajali su 24h, osim u eksperimentalnoj postavci uzorkovanja RNK i ispitivanja genske ekspresije u kojoj su uzorci prikupljeni nakon 6h tretmana.

3.6.2 Tretmani u primarnoj mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita

U primarnoj mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, ispitan je efekat TnC domena FnD na mikrogliju i astrocite u procesu zarastanja SW povrede. Efekat FnD na ćelije glije ispitan je u tri vremenske tačke. Nakon SW, FnD fragment dodavan je u DMEM+ medijum u koncentraciji 10 µg/ml u trajanju od 24h (24h SW + FnD) ili 48h (48h SW + FnD) u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna. Ispitano je i odloženo dodavanje FnD na glijalne ćelije. Naime, 24h nakon SW, FnD je dodavan u medijum i uzorci su tretirani naredna 24h (48h: 24h + FnD). Kao kontrolne za navedene tretmane korišćene su kulture istog genotipa kojima je nanet SW ali bez dodavanja fragmenata i koje su praćene 24h (24h SW) i 48h (48h SW).

3.6.3 Tretmani primenjeni u modelu povrede kičmene moždine u TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševima

Efekat dodatih fragmenata TnC ispitan je i u modelu kompresione povrede kičmene moždine u TnC^{+/+} i TnC^{-/-} životinjama. Odmah nakon povrede, fragmenti FnD, FnA i njihova kombinacija Fn(D+A), u koncentraciji 300 µg/ml za svaki fragment, ili kontrolni rastvor (0,9% NaCl u vodi) injektovani su u mesto povrede kao i 1 mm rostralno i kaudalno od mesta povrede.

3.7 Imunofluorescencija

3.7.1 Imunofluorescentno obeležavanje primarne kulture kortikalnih astrocita

Za eksperimente imunoobeležavanja, primarne kulture astrocita izolovane iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa zasejavane su na pokrovna stakla prečnika 15 mm (MenzelGlasser, Nemačka) obložena PLL. Posle 24h nakon SW i tretmana fragmentima TnC, ćelije su fiksirane u rastvoru 4% PFA u 0,1 M PB (Tabela 2) 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon nekoliko ispiranja u PBS (Tabela 2), ćelije su permeabilizovane u rastvoru 0,1% Tritona u PBS 15min, na sobnoj temperaturi i inkubirane u blokirajućem rastvoru koji sadrži 5% BSA u PBS, 1h na sobnoj temperaturi. Ćelije su potom inkubirane u rastvoru primarnih antitela u 1% BSA u PBS, preko noći na +4 °C. Nakon nekoliko ispiranja u PBS, nanošen je rastvor sekundarnih antitela konjugovanih sa fluoroforom u PBS i ćelije su inkubirane 2h u mraku na sobnoj temperaturi. Višak nevezanog antitela je uklonjen ispiranjem u PBS, a uzorci su potom inkubirani sa DAPI bojom za jedra 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS, ćelije su fiksirane Mowiol medijumom. Upotrebljena primarna i sekundarna antitela i korišćene koncentracije prikazani su u Tabeli 4.

3.7.2 Imunofluorescentno obeležavanje primarne mešovite kulture mikroglije i astrocita

Za eksperimente imunofluorescentnog obeležavanja u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, ćelije su fiksirane 24 ili 48h nakon SW i tretmana u 4% PFA u 0,1 M PB, 20 min na sobnoj temperaturi. Ukoliko je antigen od interesa bio vanćelijski domen proteina, ćelije su prvo inkubirane u blokirajućem rastvoru koji je sadržao 5% BSA u PBS, 1h na sobnoj temperaturi a potom inkubirane u rastvoru primarnih antitela preko noći na +4 °C. Nakon uklanjanja viška nevezanog antitela ispiranjem u PBS, ćelije su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela u PBS, 2h u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon fluorescentnog obeležavanja proteina od interesa na površini ćelije, uzorci su permeabilizovane u rastvoru 0,05% Tritona u PBS, 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su inkubirane u blokirajućem rastvoru 5% BSA u PBS 1h na sobnoj temperaturi a zatim u rastvoru primarnih antitela u PBS na +4 °C, preko noći. Nakon uklanjanja viška nevezanog antitela ispiranjem u PBS, ćelije su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela u PBS, 2h u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon nekoliko ispiranja, u cilju obeležavanja ćelijskih jedara uzorci su inkubirani u rastvoru Hoechst boje u PBS u finalnoj koncentraciji 2 µg/ml 15 min, na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom ispirani nekoliko puta u PBS i fiksirani Mowiol medijumom. Protokol koji je podrazumevao izostanak primarnih antitela (negativna kontrola bojenja), nije doveo do pojave specifične imunoreaktivnosti. Korišćena primarna i sekundarna antitela i koncentracije prikazani su u Tabeli 4.

3.7.3 Imunohistohemijsko obeležavanje preseka kičmene moždine

3.7.3.1 Priprema tkiva transkardijalnom perfuzijom

Kontrolni i tretirani TnC^{-/-} i TnC^{+/+} miševi anestetizirani su intraperitonealanom injekcijom koja sadrži ketamine (100mg/kg) i ksilazin (5mg/kg). Kada su životinje ušle u duboku anesteziju i pokazale odustvo okularnog refleksa, otvoren je grudni koš životinje i uvedena je igla u apeks leve komore srca i presečena je desna pretkomora srca. Kroz iglu je prvo pušten 0,9% NaCl 30 sekundi do promene boje jetre u svetlobraon i potom je nastavljena perfuzija 4% PFA u 0,1M PB 10 min. Nakon izvršene dvostruke laminektomije izolovana je kičmena moždina koja je dodatno fiksirana u 4% PFA 2h na +4 °C. Tkivo je dehidratirano u 30% rastvoru saharoze u 0,1 M PB na +4 °C i

zamrznuto na -80 °C do dalje upotrebe. Serijski sagitalni preseki kičmene moždine debljine 25 µm napravljeni su na kriotomu (CM 1850, Leica, Nemačka) i skupljeni na mikroskopske pločice (Superfrost Plus, Menzel-Glasser, Nemačka) koje su čuvane na -20 °C do dalje upotrebe.

3.7.3.2 Imunohistohemija

Nakon rehidratacije u PBS, sagitalni preseki kičmene moždine kontrolnih i fragmentima tretiranih TnC^{-/-} i TnC^{+/+} miševa, inkubirani su u rastvoru 0,1% glicina u PBS, 10 min na sobnoj temperaturi. Preseci su potom inkubirani u blokirajućem rastvoru koji sadrži 10% BSA i 0,1% tritona u 0,01M PBS (Tabela 3) 45min na sobnoj temperaturi a zatim su uzorci inkubirani u rastvoru primarnih antitela u 2% BSA u PBS na +4 °C preko noći. Posle nekoliko ispiranja u PBS u cilju uklanjanja nevezanog antitela, preseci su inkubirani u rastvoru sekundarnih antitela u 2% BSA u PBS, 2h u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja uzorci su inkubirani sa TO-PRO 3 bojom u PBS radi obeležavanja jedara a potom i isprani nekoliko puta PBS i fiksirani Mowiol medijumom. Spisak korišćenih primarnih i sekundarna antitela prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Spisak korišćenih antitela i razblaženja

Antitelo/poreklo	Razblaženje	Proizvođač	Kataloški broj
Ki67 , zečje anti-Ki67	1:500	Abcam, UK	ab15580
GFAP , zečje anti-glijalni fibrilarni kiseli protein	1:500	Dako, SAD	Z0334
GFAP , mišje anti-glijalni fibrilarni kiseli protein	1:200	Sigma Aldrich, Nemačka	MAB360
OX-42/CD11b pacovsko anti-mišje CD11b	1:300	Serotec, UK(BioRad)	MCA711
iNOS , zečje anti-inducibilna azotna oksid sintaza	1:300	Abcam, UK	ab15323
β1-intgerin , zečje anti- β1-intgerin	1:1000	SynapticSystems, Nemačka	240-003
P2Y12 , zečje anti-P2Y12	1:200	Alomone Labs, Izrael	APR-012
Iba1 , kozje anti-jonizovani adaptorski Ca ²⁺ vezujući molekul 1	1:200	Abcam, UK	ab5076
magareće anti-zečje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Life Technologies, OR, SAD	A31572
magareće anti-mišje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, OR, SAD	A31570
magareće anti-pacovsko Alexa Fluor IgG (H+L) 488	1:200	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, OR, SAD	A21208
magareće anti-zečje Alexa Fluor IgG (H+L) 647	1:200	Life Technologies, OR, SAD	A31573
magareće anti-mišje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, OR, SAD	A31570
DAPI	1:4000		
TO-PRO-3	1:4000	Invitrogen, Molecular Probes, OR, SAD	1027459
Hoechst	1:4000	Thermo Scientific, IL, SAD	62249

3.8 Mikroskopija i analiza mikrografija

3.8.1 Mikroskopsko snimanje i analiza zatvaranja povrede u SW modelu u primarnoj kulturi astrocita

Astrociti iz primarne kulture snimani su nakon SW i dodavanja TnC fragmenata u sledećim vremenskim tačkama: 0h, 6h, 12h, 24h i 48h. Zatvaranje povrede snimano je upotrebom invertovanog svetlosnog AxioObserver A1 mikroskopa (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) opremljenog EM512 CCD kamerom (Digital Camera System, Evolve, Photometrics) i objektivom 10x (A-Plan, Carl Zeiss, Nemačka). Duž SW snimana su po dva kadra, iznad i ispod orijentacione linije za svaki SW. Isti kadrovi snimani su u svakoj navedenoj vremenskoj tački. Mikrografije su analizirane u ImageJ (NIH, SAD) programu. Korišćenjem opcije Merenje (engl. *Measure*) računata je površina povrede (engl. *Area*). Relativno zarastanje povrede računato je prema sledećoj formuli $[(A(t_0) - A(t))/A(t_0)]$, pri čemu A predstavlja površinu povrede izraženu u μm^2 u vremenu t_0 odnosno 0h nakon nanošenja povrede i tretmana i u vremenu t odnosno u ostalim vremenskim tačkama merenja.

3.8.2 Analiza proliferacije u primarnoj kulturi astrocita

Proliferacija astrocita praćena je u regionu povrede u primarnoj kulturi astrocita 24h nakon SW i tretmana. Čelije fluorescentno obeležene Ki67 markerom proliferacije i DAPI jedarni marker snimane su fluorescentnim invertovanim mikroskopom AxioObserver A1 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) sa EM512 CCD kamerom (Digital Camera System, Evolve, Photometrics) i i objektivom 10x (A-Plan, Carl Zeiss, Nemačka). Mikrografije su analizirane ImageJ programom. Stopa proliferacije računata je kao poroporcija Ki67 pozitivnih (Ki67⁺) jedara u odnosu na ukupan broj DAPI pozitivnih (DAPI⁺) jedara.

3.8.3 Konfokalna mikroskopija

Imunofluorescentno obeležena mešovita kultura astrocita i mikroglije i imunofluorescentni preseci kičmene moždine snimani su na konfokalnom laserskom-skenirajućem mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Nemačka) koji ima argonsku lasersku liniju (488 nm) i dve helijum-neonske laserske linije (543 i 633 nm). Za snimanje fluorofora laserskim linijama 488 i 555, korišćeno je dihroičko ogledalo NFT 488/543, a potom filteri uskog opsega propuštanja (BP) 505-530 i BP565-610, redom. Za snimanje fluorofora pobuđivanih laserom 633 korišćeno je dihroičko ogledalo NFT 543/633 i filter širokog opsega propuštanja LP 650. Mikrografije su snimane upotrebom uljanog imerzionog objektiva uveličanja 40x sa numeričkom aperturom 1.3, (Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil; Carl Zeiss, Nemačka). Parametri snimanja bili su identični za kontrolne grupe i tretmane tokom snimanja mešovite kulture. Identični parametri korišćeni su prilikom snimanja kontrolnih i tretiranih preseka kičmene moždine.

3.8.4 Analiza poliferacije i gustine ćelija u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita

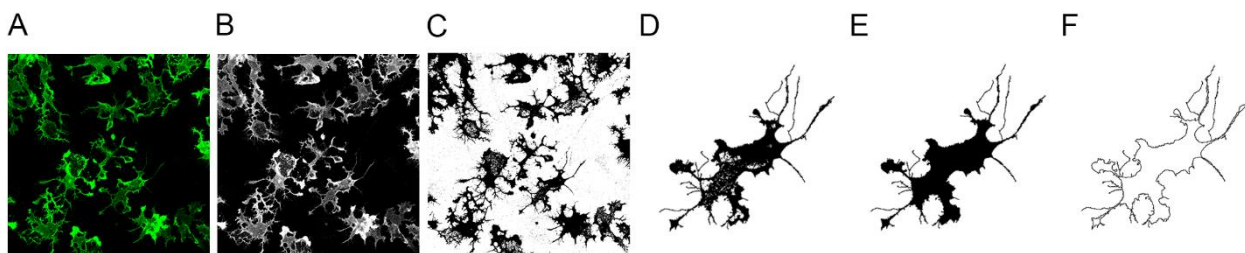
Za ispitivanja gustine i proliferacije u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocita ćelije su imunofluorescentno obeležene markerima mikroglije (OX-42) i astrocita (GFAP), markerom proliferacije Ki67 i markerom jedara Hoechst 24h ili 48 h nakon SW i tretmana u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna. Snimano je po 12 kadrova po kulturi, u regionu povrede i u graničnom regionu, po svakom tretmanu (24h SW, 48h SW, 24h SW + FnD, 48h SW + FnD and 24h SW + 24h FnD) i svakom genotipu (TnC^{+/+}, TnC^{-/-}).

Gustina ćelija računata je prema ćelijskom tipu. Gustina mikroglije računata je kao broj OX42⁺ ćelija dok je gustina astrocита računata kao broj GFAP⁺ ćelija podeljen sa površinom regiona povrede ili površinom graničnog regiona.

Stopa proliferacije računata je takođe prema ćelijskom tipu u regionu povrede i u graničnom regionu. Stopa proliferacije mikroglije određena je deljenjem broja OX42⁺/Ki67⁺ mikroglije sa ukupnim brojem OX42⁺ mikroglije u datom regionu. Stopa proliferacije astrocита dobijena je deljenjem broja GFAP⁺/Ki67⁺ astrocита sa ukupnim brojem GFAP⁺ astrocита u ispitivanom regionu.

3.8.5 Analiza morfologije mikroglije u mešovitoj kulturi mikroglije i astrocита

U cilju analize morfologije mikroglije u region povrede u mešovitoj kulturi astrocита i mikroglije, ćelije su imunofluorescentno obeležene sa OX-42/CD11b, GFAP i Hoechst i snimane na konfokalnom mikroskopu. Analizirane su po četiri nasumično odabrane ćelije u svakom tretmanu (24h SW, 48h SW, 24h SW + FnD, 48h SW + FnD i 24h SW + 24h FnD) i genotipu (TnC+/+, TnC-/-) po kulturi, odnosno 36 ćelija ukupno. Analiza morfologije pojedinačnih ćelija mikroglije rađena je u ImageJ softveru korišćenjem opcije Merenje i dodatka FracLac(Karperien, 2013). Morfologija mikroglije je ispitana prema prethodno publikovanom protokolu (Fernández-Arjona et al., 2017). Mikrografije u standardnom formatu konfokalnih slika, RGB (engl. *Red/Green/Blue*) su prvo transformisane u 8-bitne slike sive skale a potom su binarizovane da bi se dobile crno bele slike na kojima su postavljanjem prazne vrednosti signala (engl. *threshold*) uklonjeni nespecifični signali (Slika 8.). Ćelije od interesa su potom izdvajane sa slike i analizirano je 11 parametara koji se standardno koriste za opisivanje morfologije mikroglije (Fernández-Arjona et al., 2017). Analizirani morfološki parametri bili su: površina ćelije (μm^2), perimetar ćelije (μm), površina konveksnog trupa (CHA) – površina najmanjeg poligonalnog oblika koji okružuje ćeliju (μm^2), perimetar konveksnog trupa (μm), indeks hrapavosti (odnos perimetra ćelije i perimetra convex hull), fraktalna dimenzija (FD) – mera ćelijske kompleksnosti dobijena metodom „box counting“, lakunarnosti – distribucija praznih površina unutar ćelije - poroznost ćelije, odnos širine i dužine (AR) – odnos najduže i najkraće ose ćelije, ćelijska cirkularnost - $(4\pi \times \text{površina ćelije})/(\text{perimetar ćelije})^2$, solidnost odnosno gustina ćelije – površina ćelije/površina konveksnog trupa, zaobljenost ćelije - $4 \times \text{area} / (\pi \times \text{major axis}^2)$.



Slika 8. Obrada mikrografija za morfometrijske analize. RGB slike mikroglije u regionu povrede (A) su transformisane u 8-bitne slike sive skale (B) i binarizovane (C). Slike su manuelno obrađivane (D) da bi se dobio kontinuiran set piksela za odabranu ćeliju koja je potom isečena i sačuvana kao pun (E) ili oivičen oblik (F).

3.8.6 Analiza klastera

Hijerarhijska analiza klastera (engl. *Hierarchical Cluster Analysis*; HCA) rađena je u cilju grupisanja setova podataka koji uključuju veliki broj parametara. Na osnovu sličnosti, veliki setovi podataka koji uključuju proliferaciju i gustinu mikroglije i astrocита i morfologiju mikroglije grupisani su u klaster. Setovi podataka su prvo standardizovani korišćenjem Z vrednosti da bi se dobile uporedive vrednosti a potom su primenom Ward's metode dobijene vrednosti grupisane u klaster. Tako dobijen stabilan broj klastera korišćen je kao informacija „K-means“ analize klastera koja je pružila vrednost statističke značajnosti parametara korišćenih za klasterovanje, odredila distribuciju

klastera i prikazala udaljenost konkretnih vrednosti od centra klastera za svaku datu ulaznu informaciju. Za ispitivanje proliferacije i gustine mikroglije i astrocita, mikrografije su podeljene u tri klastera na osnovu 4 vrednosti (vrednosti proliferacije i gustine mikroglije i astrocita) za svaku sliku. Za ispitivanje morfologije mikroglije, analizirane ćelije su podeljene u dva klastera na osnovu dobijenih vrednosti 11 ispitivanih parametara za svaku ćeliju.

3.8.7 Analiza konfokalnih mikrografija tkivnih preseka

Ćelijska proliferacija i imunoreaktivnost GFAP u regionu povrede analizirani su na presecima kičmene moždine tri životinje iz svakog tretmana i iz svakog genotipa (mesto povrede, mesto povrede+FnA, FnD, Fn(D+A)). Analizirana je ekspresija i proliferacija u po pet preseka iz svake kičmene moždine. Za računanje stope proliferacije, rezultati su prikazani kao udeo Ki67⁺ jedara od ukupnog broja TO-PRO-3 obojenih jedara u presecima tkiva. Intenzitet signala imunofluorescencije GFAP, nakon uklanjanja pozadine korišćenjem „Rolling ball“ metode dobijen je merenjem integrisane gustine signala u opciji Merenja u ImageJ programu.

3.8.8 Stereološka analiza

Gustina mikroglije u tkivnim presecima kičmene moždine analizirana je kako je prethodno opisano (Jakovceviski et al., 2009). Brojanje ćelija urađeno je na mikroskopu Axio Imager M1 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) sa motorizovanim postoljem na sistemu za stereologiju (MicroBrightField Stereology System 9, SAD). Upotrebom 10 x objektiva ograničen je region povrede kao i region koji se nalazi do 1,5 mm rostralno i kaudalno od regiona povrede. U oba genotipa, upotrebom objektiva 20x (Plan-Neofluar 20/0.50, Carl Zeiss, Nemačka) snimano je po šest preseka iz po tri kičmene moždine u grupi tretiranoj TnC fragmentom (FnD) i kontrolnoj grupi (povreda). Ćelije su brojane na osnovu Iba1 imunoreaktivnosti i DAPI fluorescencije i klasifikovane kao aktivirana mikroglija ukoliko ih je odlikovao poligonalni oblik ili kao neaktivirana mikroglija ukoliko su pokazivale granatu morfologiju. Brojanje je rađeno na osnovu sledećih postavljenih parametara: granična dubina 2mm, baza i visina graničnika 60x60mm i 10mm, distanca između optičkih graničnika 180 mm.

3.9 Western blot

3.9.1 Priprema uzoraka za Western blot

Glijalne ćelije, astrociti ili mešovite kulture astrocita i mikroglije izolovane iz korteksa TnC+/+ i TnC-/- miševa gajene su u Petri šoljama do dostizanja konfluentnosti. Nakon SW, primenjan je odgovarajući tretman, a u zavisnosti od eksperimentalnog dizajna, ćelije su skupljane 24h ili 48h kasnije. Pre prikupljanja ćelija, u Petri šolje je dodavana zapremina hladnog sterilnog PBS a potom su ćelije prikupljane mehaničkim skidanjem sa podloge sterilnim špatulama i centrifugirane na 500 x g, 5min. Talog je resuspendovan u 150-500ul pufera za liziranje RIPA (Tabela 2) sa dodatkom proteaznih inhibitora (Sigma Aldrich, MO, SAD; Kat. br. S8820) i Na-orto-vanadata. Nakon inkubiranja u puferu za liziranje 20min na ledu, uzorci su centrifugirani na 10 000 x g 10min na +4°C. Prikupljen je supernatant i zamrznut na -80°C za dalju upotrebu.

3.9.2 Western blot protokol

Koncentracija proteina u prikupljenim uzorcima određena je BCA Pirsovim proteinskim kitom (Thermo Fisher Scientific; Kat. br. 23225) prema uputstvima proizvođača. Uzorci su razblaženi u 6x Leammli puferu (Tabela 3) sa 5% β-merkpto-etanolom kao redukujućim agensom. Proteinski

standard (Thermo Scientific, MA, SAD; Kat. br.26619) i jednaka količina proteina (5-10 µg) iz svakog uzorka su nalivani u bunare 4% SDS-poliakrilamidnog gela za koncentrovanje (Tabela 5). Proteini su elektroforetski razdvajani na 10% i 12,5% SDS-poliakrilamidnom gelu (Tabela 5) u 1x puferu za elektroforezu (Tabela 3) na 120 V, 1,5 h. Nakon elektroforeze, proteini su vlažnim transferom, u 1x transfer puferu (Tabela 3) prenošeni na noseće membrane od polivinilfluorida sa porama prečnika 0,45 µm (Immobilon-P, Millipore, Kat. br. IPVH00010). Transfer se odvijao na 100 V na +4°C u trajanju od 1,5 h. Membrane su blokirane u 5% BSA u TBST (Tabela 2) 1,5 h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela, zečji anti-glijalni fibrilarni kiseli protein (1:7000, Dako, SAD), zečji anti-P2Y12 (1:200, Alomone Labs, Izrael), zečji anti-β1-intgrin (1:1000, Synaptic Systems, Nemačka), mišji anti-β aktin (1:1000, Santa Cruz, SAD; Kat. br. sc-47778) inkubirana su preko noći na +4 °C. Nakon ispiranja u TBST, membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela konjugovanih sa peroksidazom rena (HRP) 1,5 h na sobnoj temperaturi. Korišćena su sekundarna antitela magareće anti-zečje (1:10000, Santa Cruz, SAD; Kat. br. sc-2305) i magareće anti-mišje (1:10000, Santa Cruz, SAD; Kat.br. sc-2096). Membrane su vizuelizovane upotrebom Clarity Western-ECL supstrata (Bio-Rad, kat. br. 170-5061) prema uputstvu proizvođača, na Chemi DocIt gel/blot Imager (UVP systems, Nemačka). Nakon vizuelizacije svakog antitela, i pre inkubacije u novom interesnom antitelu, blotovi su bili podvrgnuti protokolu blagog uklanjanja antitela (engl. *Mild stripping*) koji podrazumeva inkubaciju membrana u puferu za skidanje antitela (Tabela 2), ispiranje u PBS i TBST a potom inkubaciju u blokirajućem rastvoru i novom interesnom primarnom antitelu i odgovarajućem sekundarnom antitelu konjugovanom sa HRP. Analiza blotova je urađena korišćenjem Gel Analyzer opcije u ImageJ programu. Dobijena optička gustina ispitivanog proteina normalizovana je na odgovarajuću optičku gustinu kontrole nalivanja odnosno β-aktina.

Tabela 5. Sastav korišćenih SDS-poliakrilamidnih gelova

	4% gel za koncentrovanje	10% gel za razdvajanje	12,5% gel za razdvajanje
dH2O	1,487 ml	2,32 ml	1,65 ml
30 % Akrilamid	0,337 ml	1,33 ml	2,1 ml
Tris-HCl	0,625 ml (0,5 M, pH 6,8)	1,25 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,25 ml (1,5 M, pH 8,8)
10 % SDS	25 ul	50 ul	50 ul
10 % APS	25 ul	50 ul	50 ul
TEMED	2,5 ul	5 ul	5 ul

3.10 Enzimski imunoesej (ELISA)

Za određivanje prisustva oslobođenog IL-1β i TNF-α u medijumu primarnih mešovitih kultura astrocita i mikroglije izolovanih iz korteksa TnC+/+ i TnC-/- miševa rađen je enzimski imunosorbentni esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Enzimski imunoesej rađen je na uzorcima medijuma skupljenim 24 i 48h nakon nanošenja SW i tretmana. Imunoesejom pored tretiranih grupa ispitana je i ekspresija u intaktnoj kulturi, kojoj nije naneta SW. Enzimski imunoesej rađen je u pločama sa 96 bunara koje su prethodno inkubirane antitelom za IL-1β (1:250; ThermoFisher Scientific, SAD; Kat. br. 88-7013-88) i TNF-α (1:500; ThermoFisher Scientific, SAD, Kat. br. 14-7423-81) odnosno hvatajućim antitelom (engl. *capture antibody*), preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja viška antitela ispiranjem rastvorom 0,05% Tween-20 u PBS, bunari ploča su inkubirani sa blokirajućim rastvorom 5% BSA u PBS, 1h na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja blokirajućeg rastvora, u bunare su naneti uzorci i standardi za protein od interesa odnosno IL-1β (ThermoFisher Scientific, SAD, Kat. br. 39-8012-60) u rasponu koncentracija 0,015 – 1ng/ml i TNF-α (ThermoFisher Scientific, SAD, Kat. br. 14-8321) u rasponu koncentracija 0,062 – 4 ng/ml) i inkubirani 2h na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji, bunari su isprani i naneto je

biotinizovano antitelo za detekciju (engl. *detection antibody*) za IL-1 β (1:250; ThermoFisher Scientific, SAD, Kat. br. 88-7013-88) i TNF- α (1:500; ThermoFisher Scientific, SAD, Kat. br. 14-7423-81) koja su inkubirani 2h na sobnoj temperaturi a potom je ispiranjem uklonjen višak nevezanog antitela. Za detekciju biotinizovanih antitela korišćen je avidin-HRP antitelo (1:750, Thermo Fischer Scientific, SAD, Kat. br. 18-4100-51) koje je inkubirano 20 min na sobnoj temperaturi a potom isprano. Kao supstrat za razvijanje reakcije u bunare je dodat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB, Thermo Fischer Scientific, SAD; Kat. br. 00-4201-56) i inkubiran na sobnoj temperaturi. Reakcija je stopirana dodavanjem 2N H₂SO₄ a produkt reakcije određen je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm, dok je korigovana apsorbancija očitavana na 570 nm.

3.11 Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

3.11.1 Izolacija ukupne RNK

Primarne kulture astrocita i primarne mešovite kulture mikroglije i astrocita izolovane iz korteksa TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa su zasejavane u ploče sa 6 bunara. Nakon dostizanja konfluentnosti, nanet je SW i uzorci su tretirani odgovarajućim tretmanima. U zavisnosti od eksperimentalnog dizajna, ćelije su lizirane dodavanjem TRIzol reagensa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD; Kat. br. 15596018) 6h ili 30h nakon SW i tretmana. Ukupna RNK iz uzoraka izolovana je standardnom metodom fenol/hloroform ekstrakcije i precipitacije etanolom (Rio et al., 2010). Ukratko, ćelijski lizati u TRIzol reagensu su homogenizovani pipetiranjem i dodat je hloroform. U cilju faznog razdvajanja nukleinskih kiselina, proteina i debris, uzorci su centrifugirani na 12000 x g 15min na +4°C. Iz površinske, odnosno vodene faze prikupljena je RNK u koju je dodat izopropanol, uzorci su homogenizovani i zamrznuti na -80 °C preko noći. Nakon odmrzavanja, uzorci su centrifugirani na 12000 x g, 30min na +4 °C. Talog je resuspendovan u 75% etanolu i centrifugiran na 7500 x g 15min, +4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je ostavljan da se osuši na sobnoj temperaturi 15 min a potom resuspendovan u sterilnoj vodi. Koncentracije RNK su određene merenjem apsorbance na 260 nm (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS, Austrija). Čistoća uzoraka je proverena merenjem odnosa apsorbance 260 nm/280 nm i 260 nm/230 nm. Kvalitet izolovane RNK proveren je elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

3.11.2 Reverzna transkripcija

Za sintezu komplementarne DNS (cDNK) korišćen je komercijalno dostupan kit za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, SAD; Kat. br. 4368814) prema uputstvima proizvođača. Korišćen je 1 μ g RNK po reakciji i pripremljena je reakciona smeša prema uputstvu proizvođača koja pored RNK sadrži mešavinu dezoksiribonukleotida, nasumičnih heksamernih prajmera, MultiScribe reverznu transkriptazu, odgovarajući pufer i H₂O. Reakcione smeše su inkubirane 10min na 25 °C, a zatim 2h na 37 °C, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 85 °C u trajanju od 5min. Ovako dobijena cDNK je razblažena 10x u sterilnoj vodi i čuvana do upotrebe na -20 °C.

3.11.3 Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR)

Sintetisana cDNK amplifikovana je u PCR reakciji u realnom vremenu primenom specifičnih prajmera za gene od interesa i komercijalno dostupnog kita Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA; Kat. br. 4367659). U reakcionu smešu pripremljenu prema uputstvima proizvođača dodati su specifični prajmeri za gen od interesa u finalnoj koncentraciji 100 pmol/ml i cDNK u koncentraciji 10 ng/ml. Spisak i pregled sekvenci korišćenih prajmera prikazan je

u Tabeli 6. Real-Time PCR reakcija urađena je na QuantStudio™3 Real-Time PCR sistemu (Applied Biosystems, SAD), pod sledećim uslovima: početna inkubacija na 50°C u trajanju od 2 min, zatim aktivacija enzima u trajanju od 10 min na 95 °C, 40 ciklusa u trajanju od 15s na 95 °C, 30 s za vezivanje prajmera na 64 °C, 30 s umnožavanja na 72 °C i 5s za očitavanje fluorescence na 72 °C. Relativna genska ekspresija prikazana je kao \log_2 promena ekspresije iRNK. Promena ekspresije gena od interesa izražava se relativno u odnosu na nivo ekspresije kontrolnog gena odnosno unutrašnja kontrole a u ovom slučaju korišćenje *Actb* i *Gapdh*.

Tabela 6. Lista korišćenih prajmera

Gen od interesa	F prajmer	R prajmer
<i>Gfap</i>	CGGAGACGCATCACCTCTG	TGGAGGAGTCATTCGAGACAA
<i>Il1b</i>	AAAAGCCTCGTGCTGTCGGACC	TTGAGGCCCAAGGCCACAGGT
<i>Actb</i>	GGGCTATGCTCTCCCTCAC	GATGTCACGCACGATTTCC
<i>Tnfa</i>	GCCCACGTCGTAGCAAACCAC	GGCTGGCACCCTAGTTGGTTGT
<i>Nos2</i>	GGTGTCTTTGCTTCCATGCTAAT	GTCCCTGGCTAGTGCTTCAGA
<i>Arg1</i>	TAACCTTGGCTTGCTTCGG	GTGGCGCATTACAGTCAC
<i>Gapdh</i>	GTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC

3.12 Statistička analiza

Statistička analiza je rađena u SPSS v20 programu (SPSS Inc., SAD). Dvosmerna analiza varijanse (ANOVA) sa post-hoc Bonfferoni testom i nezavisni Studentov t-test korišćeni su za određivanje efekata tretmana i genotipa na ispitivanim parametrima u primarnoj kulturi astrocita, tkivnim presecima, kao i za određivanje gustine mikroglije i astrocita u mešovitoj kulturi glijalnih ćelija. Trosmerna ANOVA korišćena je u analizi efekta tretmana, genotipa i pozicije uzorkovanja (povreda, kaudalni i rostralni region) u ispitivanju gustine mikroglije. Određene su statistički značajne interakcije, glavni efekti i statističke vrednosti poređenja po parovima. Podaci iz svakog eksperimenta prikazani su kao „box-whisker“ grafikoni i prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

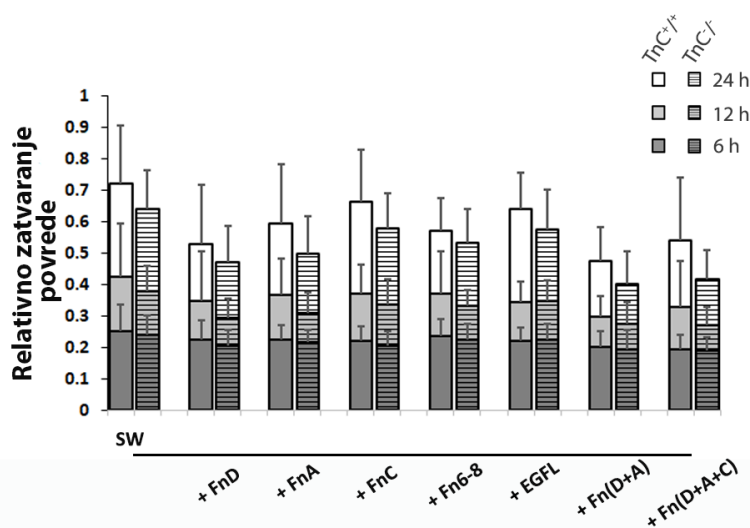
U rezultatima dobijenim na kulturi primarnih astrocita i tkivnih preseka, *p* vrednosti su tabelarno prikazane, pri čemu su *p* vrednosti u opsegu od 0,05-0,001 prikazane kao tačni brojevi, dok su *p* vrednosti koje su niže od 0,001 prikazane kao <0,001. Statistička značajnost rezultata dobijenih na primarnim mešovitim kulturama mikroglije i astrocita prikazani su kao slova pri čemu ista slova ukazuju na odsustvo statističke razlike između tretmana ili genotipova u okviru iste grupe.

4. Rezultati

4.1 Efekat fragmenata TnC na astrocite u SW modelu u kortikalnoj kulturi astrocita

4.1.1 Fragmenti TnC usporavaju zatvaranje povrede u kulturi primarnih astrocita

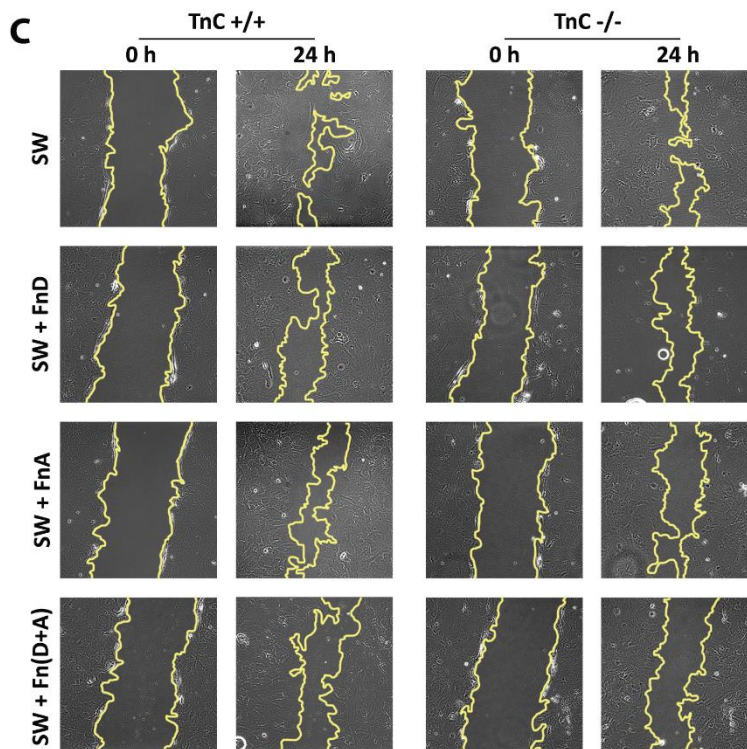
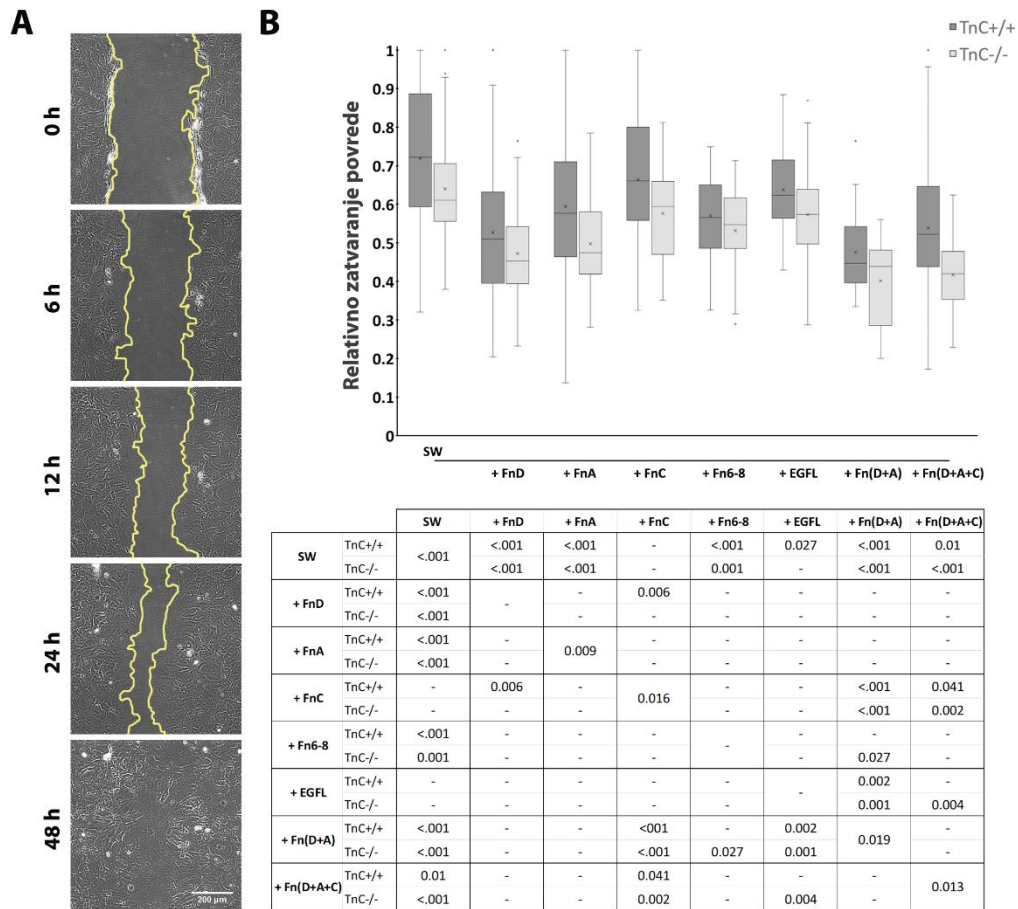
Efekat različitih dodatih fragmenata TnC je ispitan na modelu mehaničke povrede u kortikalnoj kulturi astrocita izolovanih iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa. Nakon SW, kulture su tretirane fragmentima TnC i zatvaranje povrede je praćeno u 0, 6, 12, 24 i 48h od povrede i tretmana. Primećeno je da su do 48h sve povrede, bez obzira na tretman, zarasle. Relativno zatvaranje povrede u navedenim satnicama, prikazano je u odnosu na inicijalnu nultu površinu (Slika 9.). Među praćenim satnicama uočeno je da je najinformativnija tačka 24h za procenu efekta fragmenta, reaktivacije astrocita i stabilne progresije astrocitnog fronta, a ova satnica se izdvojila kao relevantna i u sličnoj studiji (Adzic & Nedeljkovic, 2018).



Slika 9. Relativno zatvaranje povrede po satima u kortikalnim kulturama TnC^{+/+} i TnC^{-/-} astrocita nakon SW i tretmana različitim TnC fragmentima. Prikazano je kumulativno zatvaranje povrede u 6, 12 i 24h po grupi po genotipu, obračunato u odnosu na površinu povrede izmerenu u 0h za datu grupu. Naslagane kolumne predstavljaju srednje vrednosti relativne zatvorenosti povrede \pm SD. n= 3 nezavisne kulture

Primer merenja površine povrede u svim satnicama pomoću ImageJ programa je dat na Slici 10A. Kvantifikacija relativnog zatvaranja povrede u 24h nakon SW i tretmana data je na Slici 10B. Statistički značajnim su se pokazali i efekat tretmana i genotipa ($p < 0,001$). Povreda je sporije zarasla u odsustvu TnC u poređenju sa TnC^{+/+} SW kontrolom ($p < 0,001$). U TnC^{-/-} kulturama dodatak FnD, FnA, Fn6-8 kao i kombinacija Fn(D+A) i Fn(D+A+C) je dodatno usporio zarastanje u odnosu na SW grupu ($p < 0,001$ za sve osim $p = 0,010$ za Fn6-8), dok FnC i EGFL nisu imali uticaja. Kombinacija fragmenata Fn(D+A) je dodatno usporila zatvaranje povrede u odnosu na FnC, Fn6-8 i EGFL ($p < 0,001$, $p = 0,027$, $p < 0,001$, redom), a kombinacija Fn(D+A+C) je dovela do manjeg zatvaranja nego u grupama FnC ($p < 0,001$) i EGFL ($p = 0,004$). SW grupa u TnC^{+/+} kulturama je imala najveću stopu zarastanja povrede, a dodavanje FnA, FnD, Fn6-8, EGFL, Fn(D+A) i Fn(D+A+C) je dovelo do značajnog smanjenja zatvaranja ($p < 0,001$ za FnA, FnD, Fn6-8, Fn(D+A); $p = 0,027$ za EGFL; $p = 0,010$ za Fn(D+A+C)). Tretman FnC ni u TnC^{+/+} kulturama nije imao uticaja na stopu zarastanja povrede. FnD tretman je značajno usporio zatvaranje povrede i u odnosu

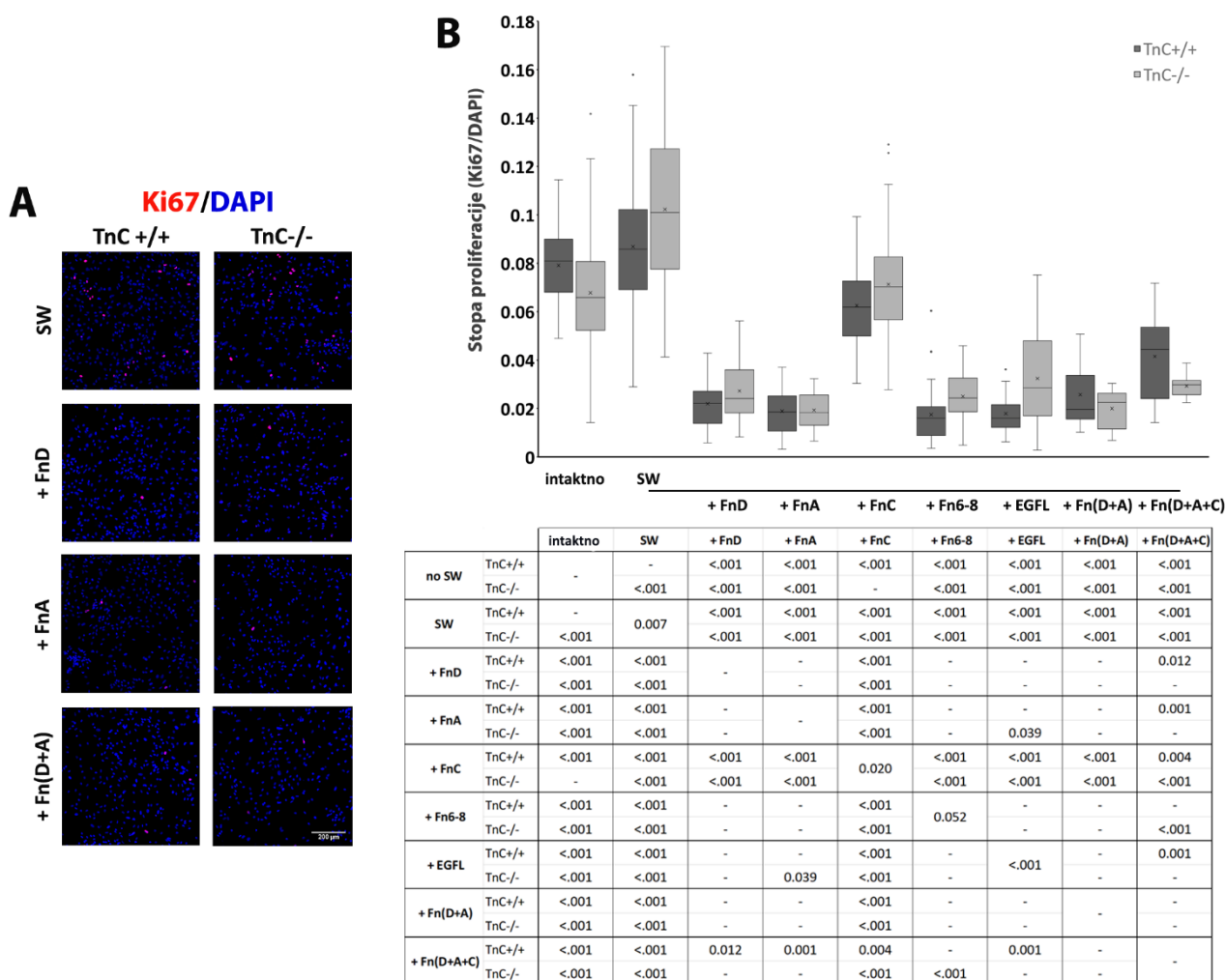
na FnC ($p = 0,006$). Kombinacija fragmenata Fn(D+A) je smanjila zatvaranje u poređenju sa FnC ($p < 0,001$)



Slika 10. Tretman fragmentima TnC dovodi do usporavanja zatvaranja povrede u kulturi astrocita. Reprezentativne slike svetlog polja regiona povrede u pet vremenskih tačaka (0,6,12,24 i 48h) sa površinom izmerenom u ImageJ programu (A). Relativno zatvaranje povrede u 24h u TnC+/+ i TnC-/- kulturama astrocita nakon tretmana TnC fragmentima je prikazano pomoću „box-whisker” grafikona (B). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Sva međusobna poređenja su prikazana u tabeli ispod grafikona. (n=3 nezavisne kulture) Reprezentativne slike regiona povrede u 0 i 24h su prikazane za kontrolnu SW grupu kao i za grupe tretirane sa FnD, FnA i Fn(D+A) (C). Skala =200µm.

i EGFL ($p < 0,001$), dok je kombinacija Fn(D+A+C) usporila zarastanje u odnosu na sam fragment FnC ($p = 0,041$). U slučaju tretmana FnA, FnC, Fn (D+A), Fn (D+A+C) primećeno je sporije zarastanje povrede u TnC-/- nego u TnC+/+ kulturama ($p = 0,009$; $p = 0,016$; $p = 0,019$; $p = 0,013$; *redom*). Reprezentativne slike regiona povrede u 0 i 24h za kontrolnu SW grupu kao i grupe tretirane fragmentima FnD, FnA i njihovom kombinacijom Fn(D+A) su prikazane na Slici 10C.

4.1.2 Fragmenti TnC smanjuju stopu proliferacije astrocita u primarnoj kulturi astrocita

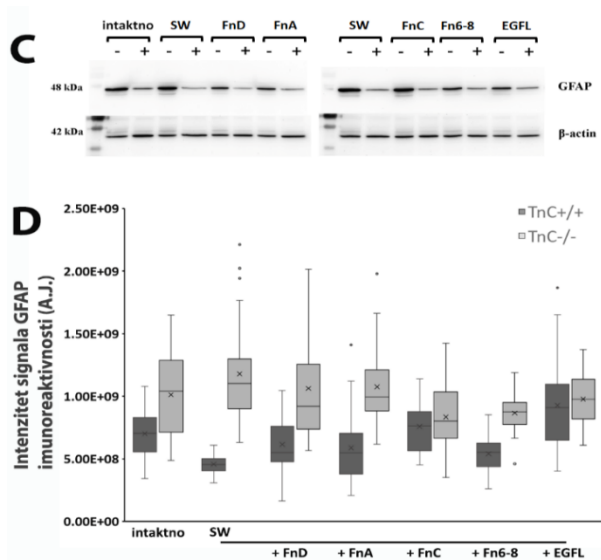
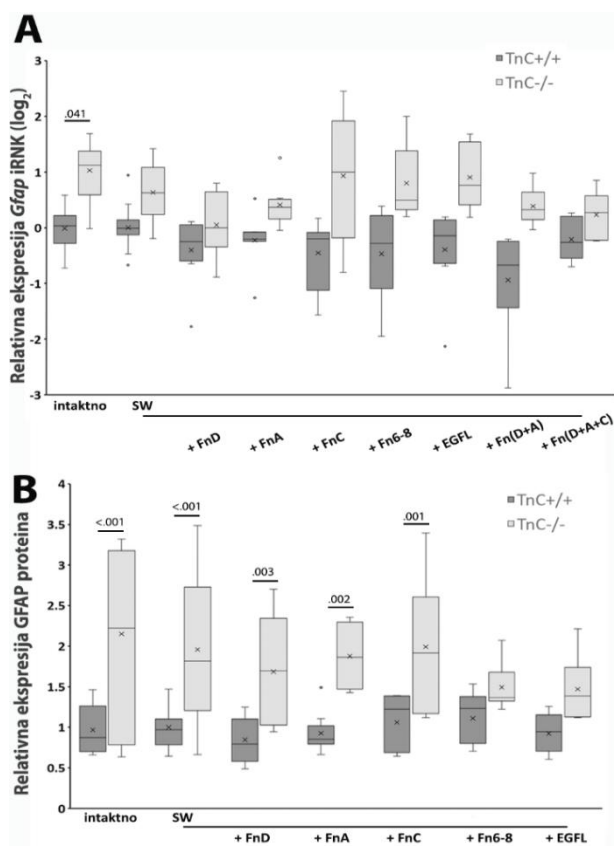


Slika 11. Fragmenti TnC značajno smanjuju stopu proliferacije astrocita u regionu oko povrede u TnC+/+ i TnC-/- kulturama. Reprezentativne mikrografije graničnog regiona povrede sa imunofluorescentno obeleženim proliferišućim jedrima (Ki67, magenta) i svim jedrima (DAPI, tamno plava) su prikazane za kontrolnu grupu SW, kao i grupe tretirane sa FnD, FnA i Fn(D+A); skala =200µm (A). Stopa proliferacije astrocita, izračunata kao udeo Ki67⁺ od ukupnog broja DAPI⁺ jedara, prikazana pomoću „box-whisker” grafikona po grupi po genotipu (B). Dvosmerna ANOVA analiza je

urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Sva međusobna poređenja su prikazana u tabeli ispod grafikona. (n=3 nezavisne kulture)

Nakon stope zarastanja povrede ispitali smo uticaj fragmenata TnC na stopu proliferacije astrocita u graničnom regionu povrede. Na zatvaranje povrede utiču procesi migracije i proliferacije, ali je pokazano da u *in vitro* modelu povrede u kulturi astrocita, migracija ima manju ulogu. Pokazano je da se stopa migracije astrocita nije razlikovala između kultura sa povredom i kultura sa niskom gustinom astrocita, dok se stopa proliferacije značajno uvećala u modelu povrede, ukazujući da povreda podstiče više procese proliferacije (Környei, Czirók, et al., 2000).

Stopa proliferacije astrocita je računata u 24h u odnosu na SW i tretman fragmentima kao broj Ki67⁺ jedara u odnosu na ukupan broj DAPI⁺ jedara (Slika 11A, B). Dvosmerna ANOVA je pokazala da su statistički značajni interakcija efekata genotipa i tretmana na stopu proliferacije astrocita ($p=0,005$), kao i pojedinačni efekti genotipa i tretmana ($p = 0,040$, $p < 0,001$, redom). U ovom eksperimentu je postojala i dodatna intaktna grupa, odnosno grupa u kojoj nije urađen SW. U intaktnoj grupi nisu primećene razlike u stopama proliferacije između genotipova. Povreda (SW) je značajno povećala stopu proliferacije u TnC^{-/-} kulturama u odnosu na intaktne kulture ($p<0,001$), dok u TnC^{+/+} kulturama nije primećena razlika. TnC^{-/-} SW grupa je takođe imala višu stopu proliferacije i u odnosu na TnC^{+/+} SW grupu ($p=0,007$). Dodatak fragmenta TnC nakon SW je značajno smanjio stopu proliferacije u odnosu na SW kontrole u oba genotipa ($p < 0,001$ za sve). EGFL, FnA, FnD, Fn6-8, Fn(D+A), Fn(D+A+C) su takođe imali značajno manju stopu proliferacije u oba genotipa i u poređenju sa FnC grupom ($p<0,001$ za sve sem za Fn(D+A+C) u TnC^{+/+}, $p=0,004$). U TnC^{+/+} kulturama dodatak kombinacije Fn(D+A+C) je indukovao veće stope proliferacije od pojedinačnih fragmenata FnD ($p = 0,012$), FnA ($p = 0,001$), Fn6-8 ($p < 0,001$), kao i EGFL ($p = 0,001$). Više stope proliferacije su zabeležene u TnC^{-/-} u odnosu na TnC^{+/+} kulture u grupama FnC ($p=0,020$), Fn6-8 ($p = 0,052$), EGFL ($p < 0,001$).



Slika 12. GFAP ekspresija je povećana u TnC^{-/-} kulturama astrocita bez obzira na tretman. Relativna promena ekspresije *Gfap* iRNK (\log_2) 6h nakon SW i tretmana fragmentima TnC je prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona; n=4 nezavisne kulture (A). Relativna ekspresija GFAP na proteinskom nivou 24h nakon SW i tretmana fragmentima TnC procenjena Western blot analizom, prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona; n=3 nezavisne kulture (B) Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Reprezentativna slika membrane GFAP (48 kDa) i β -aktina (42 kDa) (C). Integrisana gustina GFAP imunoreaktivnosti; n=1 kultura astrocita (D).

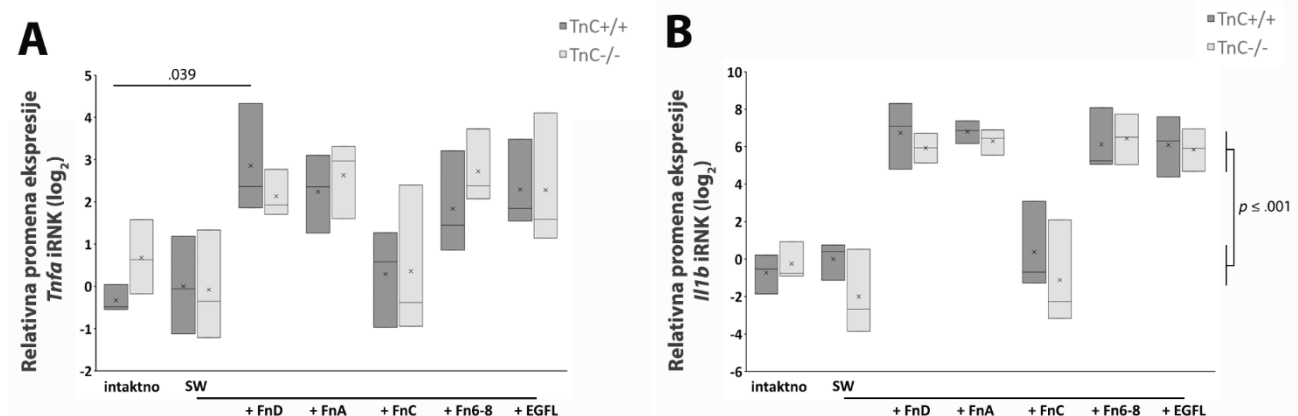
4.1.3 Ekspresija GFAP je povećana u TnC^{-/-} kulturama primarnih astrocita bez obzira na tretman

Ispitali smo ekspresiju *Gfap* iRNK 6h nakon SW i tretmana fragmentima TnC (Slika 12A). Dvosmerna ANOVA je pokazala statistički značajan efekat enotipa ($p < 0,001$). U TnC^{-/-} kulturama je uočen porast ekspresije iRNK za *Gfap* u odnosu na TnC^{+/+} kulture oko 2 puta (na y-osi izraženo kao \log_2). U odnosu na TnC^{+/+} kulture, najveći porast ekspresije je bio u TnC^{-/-} intaktnoj grupi (1,061 \log_2 -puta promena, $p = 0,041$) kao i u FnC grupi (1,180 \log_2 -puta promena), dok se u grupi sa kombinacijom Fn(D+A) javila samo tendencija ka porastu (0,680 \log_2 -puta promena).

Proteinski nivou GFAP u 24h nakon povrede i tretmana su ispitani Western blot analizom (Slika 12B). Dvosmerna ANOVA je pokazala statistički značajan efekat genotipa ($p < 0,001$). GFAP je bio značajno više ekspimiran u TnC^{-/-} kulturama u odnosu na TnC^{+/+} kulture u slučaju intaktne grupe ($p < 0,001$), SW ($p < 0,001$), FnD ($p = 0,003$), FnA ($p = 0,002$), FnC ($p = 0,001$). Reprezentativni imunoblotovi GFAP (48 kDa) i β -aktina (42 kDa) su prikazani na Slici 12C. Imunofluorescentno obeležavanje GFAP je urađeno da bi se vizuelno potvrdili rezultati Western blot tehnike. Integrisana gustina GFAP imunoreaktivnosti je prikazana na Slici 12D.

4.1.4 Fragmenti TnC povećavaju ekspresiju iRNK za citokine TNF- α i IL-1 β u kulturi astrocita

Ekspresija gena na nivou iRNK za *Tnf- α* , IL-1 β , IL-6 i IL-10 je ispitivana u TnC^{+/+} i TnC^{-/-} kulturama kortikalnih astrocita 6h nakon SW i tretiranja fragmentima TnC. *Il6* i *Il10* nisu bili detektabilni. U slučaju *Tnfa*, dvosmerna ANOVA na RT-PCR rezultatima je pokazala da je tretman statistički značajan ($p < 0,001$). U oba genotipa fragmenti FnD, FnA, Fn6-8 i EGFL su povećali oko 2 \log_2 -puta nivoe iRNK *Tnfa* u poređenju sa SW, intaktnom i FnC grupom (Slika 13A). Efekat tretmana je bio statistički značajan i u slučaju *Il1b* ($p < 0,001$). Fragmenti FnD, FnA, Fn6-8 i EGFL su i ovde doveli do povećanja nivoa iRNK za *Il1b* u oba genotipa dok FnC nije imao efekta (Slika 13B). U TnC^{-/-} kulturama FnD, FnA, Fn6-8 i EGFL su povećali *Il1b* iRNK ekspresiju u odnosu na SW, intaktnu i FnC grupu ($p \leq 0,001$). U TnC^{+/+} kulturama FnD, FnA, Fn6-8 i EGFL su takođe doveli do povećanja ekspresije iRNK za *Il1b* u odnosu na SW i intaktnu grupu ($p \leq 0,001$) kao i u odnosu na FnC grupu ($p = 0,001$ za FnD i FnA; $p = 0,003$ za EGFL i Fn6-8).



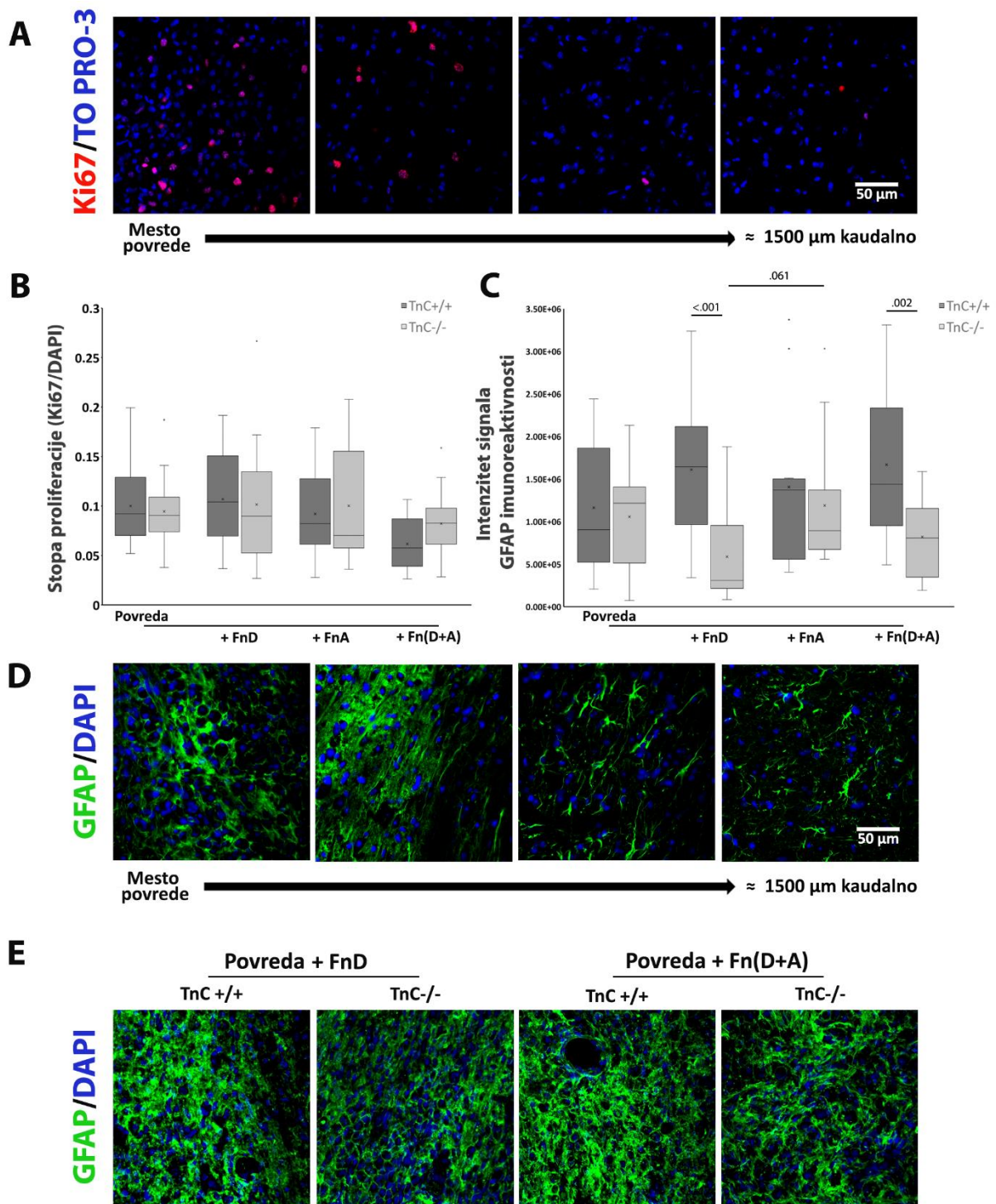
Slika 13. FnD, FnA, Fn6-8 i EGFL povećavaju nivoe proinflammatoryh citokina TNF- α i IL-1 β u oba genotipa u kulturama astrocita. Relativna promena ekspresije *Tnfa* iRNK (\log_2) (A) i *Il1b* iRNK (B) 6h nakon SW i tretmana fragmentima TnC je prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona. Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. n=3 nezavisne kulture

4.1.5 TnC utiče na astrocite i mikrogliju/makrofage u regionu povrede u kičmenoj moždini

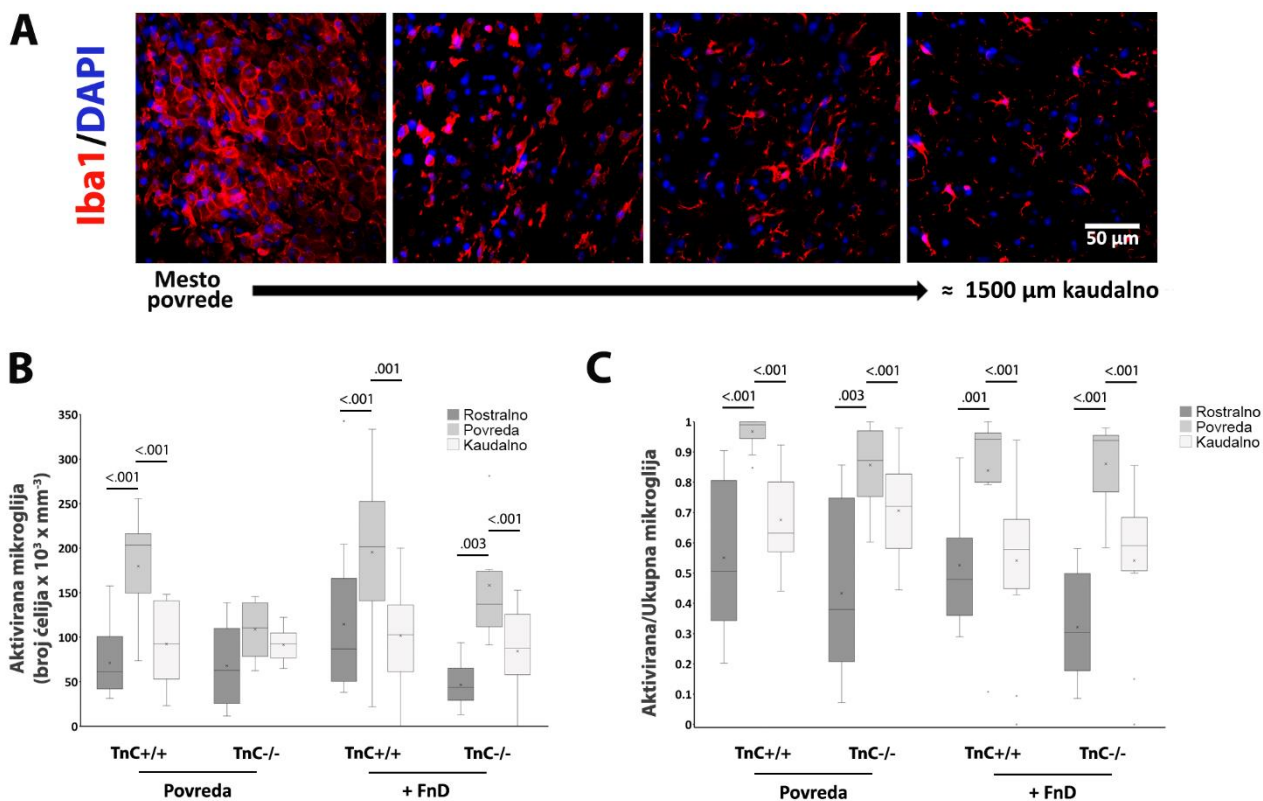
Ukupna stopa proliferacije u regionu povrede je procenjena 7 dana od povrede i tretmana fragmentima FnD, FnA i njihovom kombinacijom Fn(D+A) jer su se izdvojili po efektu u *in vitro* eksperimentima među alternativno prekrivenim fragmentima. Imunofluorescentno obeležavanje markerom za proliferaciju ćelija Ki67 je ukazalo na povećanu stopu proliferacije u regionu povrede u odnosu na okolno tkivo (Slika 14A). Stopa proliferacije je procenjena na osnovu udela Ki67⁺ jedara od ukupnog broja TO PRO-3⁺ jedara (Slika 14B). Dvosmerna ANOVA je pokazala sveukupno statistički značajan efekat tretmana ($p=0,043$). Poređenjem grupa nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu ukupne stope proliferacije ćelija.

Potom je ispitivana GFAP imunoreaktivnost u regionu povrede (Slika 14C). Dvosmerna ANOVA je pokazala statistički značajan efekat genotipa ($p<0,001$), kao i interakcije genotipa i tretmana ($p=0,034$). Nisu primećene razlike između genotipova u kontrolnim netretiranim grupama sa povredom. U grupi tretiranoj FnD fragmentom, pokazana je manja GFAP imunoreaktivnost u regionu povrede kičmene moždine TnC^{-/-} u odnosu na TnC^{+/+} miševе ($p<0,001$). I u grupi u kojoj je dodavana kombinacija fragmenata Fn(D+A) je bila smanjena imunoreaktivnost GFAP u TnC^{-/-} kičmenim moždinama ($p=0,002$). Takav efekat nije primećen u slučaju izolovanog fragmenta FnA. U kičmenim moždinama TnC^{-/-} miševa FnD tretirane grupe su imale smanjenu imunoreaktivnost GFAP u odnosu na FnA tretirane grupe, ali samo na nivou trenda ($p=0,061$). Morfologija GFAP pozitivnih astrocita se menjala od regiona povrede ka udaljenijim rostralnim i kaudalnim delovima kičmene moždine (Slika 14D). U okviru regiona povrede, astrociti su formirali strukturu saća koja je inače karakteristična za glijalni ožiljak (Sun & Jakobs, 2012), a zadržavali su fibrozni mirujući fenotip u udaljenim regionima. Reprezentativne mikrofografije GFAP imunofluorescence u okviru regiona povrede u grupama tretiranim FnD i kombinacijom Fn(D+A) u oba genotipa su prikazane na Slici 14E.

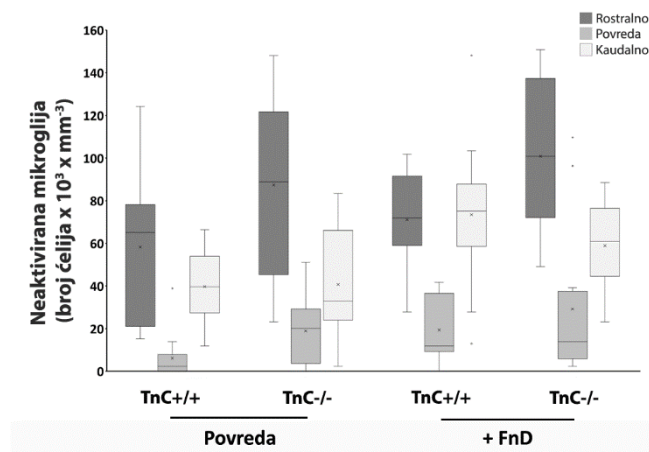
Za razliku od astrocita koji se u regionu povrede teško mogu pojedinačno identifikovati, aktivirana mikroglija/makrofagi se lako uočavaju kao poligonalne ćelije uokvirene astrocitima, dok u distalnim rostralnim i kaudalnim regionima zadržavaju neaktivirani granati fenotip (Slika 15A). Gustine aktivirane i ramifikovane mikroglije su kvantifikovane u regionu povrede kao i u okružujućim regionima rostralno i kaudalno (Slika 15B). Sveukupan efekat genotipa i pozicije uzorkovanja na gustinu aktivirane mikroglije su bili statistički značajni ($p<0,001$), kao i njihova interakcija u netretiranoj kontrolnoj grupi sa povredom ($p=0,032$). Gustina aktivirane mikroglije/makrofaga je bila veća u regionu povrede u odnosu na rostralne i kaudalne regione u kičmenim moždinama TnC^{+/+} miševa i u kontrolnim i u FnD tretiranim grupama ($p<0,001$). U kičmenim moždinama TnC^{-/-} životinja nije primećena statistički značajna razlika u gustini aktivirane mikroglije među regionima u kontrolnim grupama, ali sa dodatkom FnD gustina aktivirane mikroglije je bila veća u regionu povrede u odnosu na rostralni ($p=0,003$) i kaudalni region ($p<0,001$). Ako se posmatra udeo aktivirane mikroglije/makrofaga u ukupnom broju mikroglije/makrofaga, ovaj odnos je veći u regionima povrede u poređenju sa rostralnim i kaudalnim regionima u svim slučajevima ($p<0,001$), a najveću vrednost je dostigao u TnC^{+/+} kontrolnoj grupi (Slika 15C). Ukupna mikroglija je računata kao suma aktivirane i neaktivirane mikroglije. Gustina neaktivirane mikroglije je prikazana na Slici 16.



Slika 14. Efekat FnD i FnA na ukupnu stopu proliferacije i GFAP imunoreaktivnost u regionu povrede kičmenih moždina TnC+/+ i TnC-/- miševa. Reprezentativne mikrografije regiona povrede sa imunofluorescentno obeleženim proliferišućim ćelijama (Ki67, crveno) i jedrima svih ćelija (TO PRO-3, plava) (A). Stopa proliferacije svih ćelija u regionu povrede, računata kao udeo Ki67⁺ jedara od ukupnog broja TO PRO-3⁺ jedara, 7 dana nakon povrede i tretmana fragmentima TnC, prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona (B). GFAP imunoreaktivnost u regionu povrede 7 dana nakon povrede i tretmana fragmentima TnC, prikazana kao integrisana gustina pomoću „box-whisker“ grafikona (C). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. n=3 životinje po grupi po genotipu. Reprezentativne mikrografije sa imunofluorescentno obeleženim astrocitima (GFAP, zeleno) i jedrima svih ćelija (DAPI, plavo) koje ukazuju na promenu morfologije astrocita u regionu povrede u odnosu na rostralne i kaudalne regione kičmene moždine (prikazan kaudalni region) (D). Reprezentativne mikrografije sa imunofluorescentno obeleženim astrocitima (GFAP, zeleno) i jedrima svih ćelija (DAPI, plavo) u okviru regiona povrede u grupama tretiranim FnD i kombinacijom Fn(D+A) u oba genotipa (E). Skala =50μm.



Slika 15. Efekat FnD na gustinu aktivirane mikroglije u povrede u *TnC+/+* i *TnC-/-* miševima. Reprezentativne mikrografije sa imunofluorescentno obeleženom mikroglijom (Iba1, crveno) i jedrima (DAPI, plavo) na kojima se vidi aktivirana poligonalna mikroglija u regionu povrede i mirujuća ramifikovana mikroglija u distalnim rostralnim i kaudalnim regionima (prikazan samo kaudalni region), skala =50 μ m (A) Gustina aktivirane mikroglije procenjena uz pomoć stereološke analize u regionu povrede kao i rostralno i kaudalno, 7 dana nakon povrede i tretmana fragmentom FnD, prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona (B). Udeo aktivirane mikroglije u totalnoj mikrogliju po regionu i tretmanu (C). n=3 životinje po grupi po genotipu



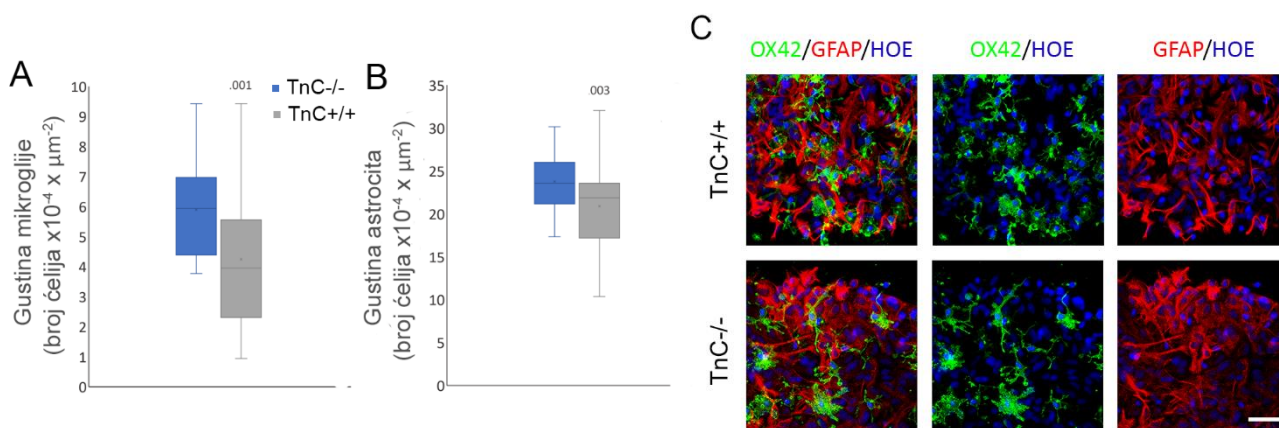
Slika 16. Efekat FnD na gustinu neaktivirane mikroglije u *TnC+/+* i *TnC-/-* miševima u povredi. Gustina mirujuće mikroglije u kičmenim moždinama *TnC+/+* i *TnC-/-* miševa 7 dana nakon povrede i tretmana FnD u regionu povrede i okružujućim rostralnim i kaudalnim regionima, procenjena stereološkom analizom, prikazana pomoću „box-whisker“ grafikona. n=3 životinje po grupi po genotipu.

4.2 Efekat TnC fragmenta FnD na zatvaranje povrede u mešovitoj kortikalnoj kulturi mikroglije i astrocita

Na osnovu prethodnih rezultata zaključili smo da fragmenti TnC utiču na astrocite u kulturi i da od alternativno prekrejnih fragmenta, FnD, FnA, kao i njihove kombinacije imaju jak efekat na inhibiciju proliferacije astrocita, usporavanje zatvaranja povrede i povećanu sintezu proinflammatoryh citokina. Efekat ovih fragmenata je dalje ispitan u *in vivo* modelu povrede gde je pokazano da FnD utiče i na astrocite i na mikrogliju/makrofage u regionu povrede. Potom smo odlučili da razlučimo njegove efekte na ovim ćelijskim tipovima u modelu mešovite kulture koji predstavlja redukcionističku, ali kontrolisanu aproksimaciju *in vivo* modela povrede.

4.2.1 Gustina astrocita i mikroglije u mešovitim glijalnim kulturama

U mešovitim kortikalnim kulturama astrocita i mikroglije, mikroglija je većinski prisutna ispod monosloja astrocita. Gustina i mikroglije i astrocita je bila veća u TnC+/+ u odnosu na TnC-/- kulture ($p=0,001$, $p=0,003$, Slika 17A,B).



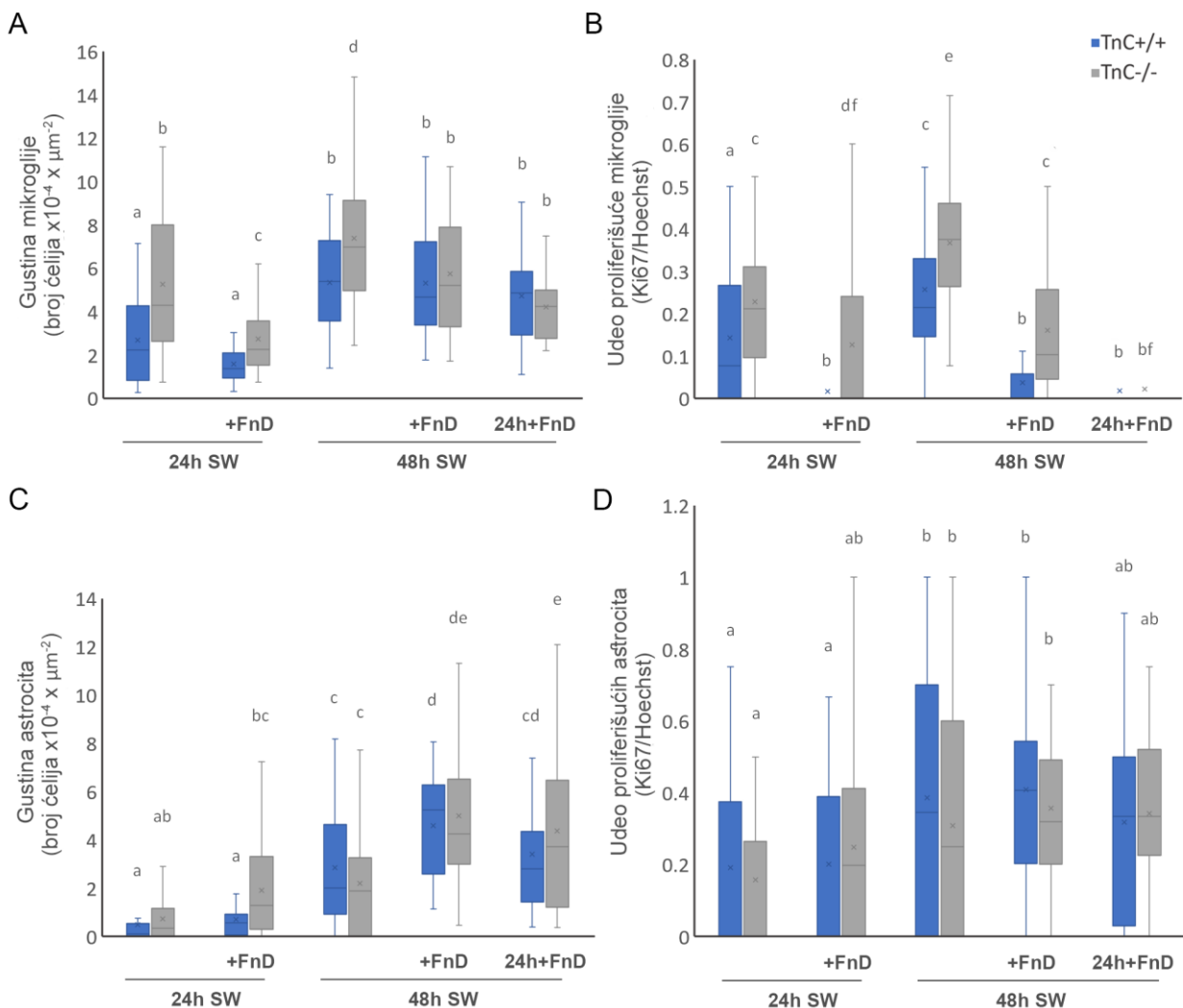
Slika 17. Gustine mikroglije i astrocita su veće u TnC+/+ u odnosu na TnC-/- kulture. Gustina mikroglije (A) i astrocita (B) u mešovitoj kulturi prikazane pomoću „box-whisker“ grafikona. Statističke značajnosti su određene t-testom za nezavisne uzorke. Reprezentativne mikrografije na kojima su imunofluorescentno obeležene mikroglija (OX-42, zelena), astrociti (GFAP, crvena) i jedra (Hoechst, plavo) su prikazane za oba genotipa (C). Skala =50μm; n= 3 nezavisne kulture

Na osnovu pilot eksperimenata sa SW u mešovitoj kulturi je zaključeno da će se pratiti povreda u 24 i 48h. Pre 24h vrlo mali broj ćelija ulazi u povredu, a nakon 48h je teško identifikovati pojedinačne ćelije. Primećeno je da u region povrede prvo ulazi mikroglija dok astrociti ostaju u graničnom regionu i napreduju kao front koji zatvara povredu u kontrolnim grupama. Do 48h oba tipa ćelija se mogu naći u regionu povrede, ali mikroglija je znatno više prisutna (Slika 18A, C; Slika 19). Dobijeni rezultati su i u skladu sa literaturnim podacima i redosledom događaja u tkivu nakon povrede (Beck et al., 2010; Zhou et al., 2020). Prvo smo pratili lokalizaciju, gustine i proliferaciju astrocita i mikroglije nakon SW i tretmana FnD. Na staklima sa mešovitom kulturom je izvođen SW i tretman pa su 24 i 48h kasnije ćelije fiksirane i imunofluorescentno obeležavane markerima za mikrogliju (OX42) i astrocite (GFAP) kao i jedarnim markerom (Hoechst, HOE) i markerom za proliferaciju ćelija (Ki67). Ćelije su praćene u regionu povrede i graničnom regionu koga su činili okružujući frontovi astrocita.

4.2.2 FnD smanjuje gustinu mikroglije u odsustvu TnC i smanjuje stopu proliferacije mikroglije u oba genotipa u regionu povrede

Gustina mikroglije (Slika 18A; Slika 19) je bila veća u TnC^{-/-} u poređenju sa TnC^{+/+} kulturama u obe kontrolne grupe 24h SW i 48h SW ($p < 0,001$), a ostala je povećana i po dodatku FnD u toku prva 24h nakon SW ($p = 0,037$). U TnC^{-/-} kulturama FnD tretman je smanjio gustinu mikroglije u prva 24h u poređenju sa 24h SW kontrolom ($p < 0,001$). Gustina mikroglije je bila veća u 48h SW TnC^{-/-} grupi u poređenju sa 24h SW grupom ($p = 0,001$), ali i u poređenju sa FnD tretiranim grupama 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD ($p = 0,030$, $p < 0,001$, redom). U grupi 48h SW + FnD gustina mikroglije je bila veća nego u 24h SW + FnD ($p < 0,001$), dok je 24h odloženo dodavanje FnD (48h SW: 24h + FnD) uzrokovalo gustine mikroglije jednake gustinama u obema FnD grupama. U TnC^{+/+} kulturama, gustine mikroglije su bile jednake u okviru grupa 24h i 48h i sve 48h grupe su imale veću gustinu od 24h grupa ($p < 0,001$). Dvosmerna ANOVA je pokazala da su i efekti tretmana i genotipa bili značajni ($p < 0,001$) kao i njihova interakcija ($p = 0,002$).

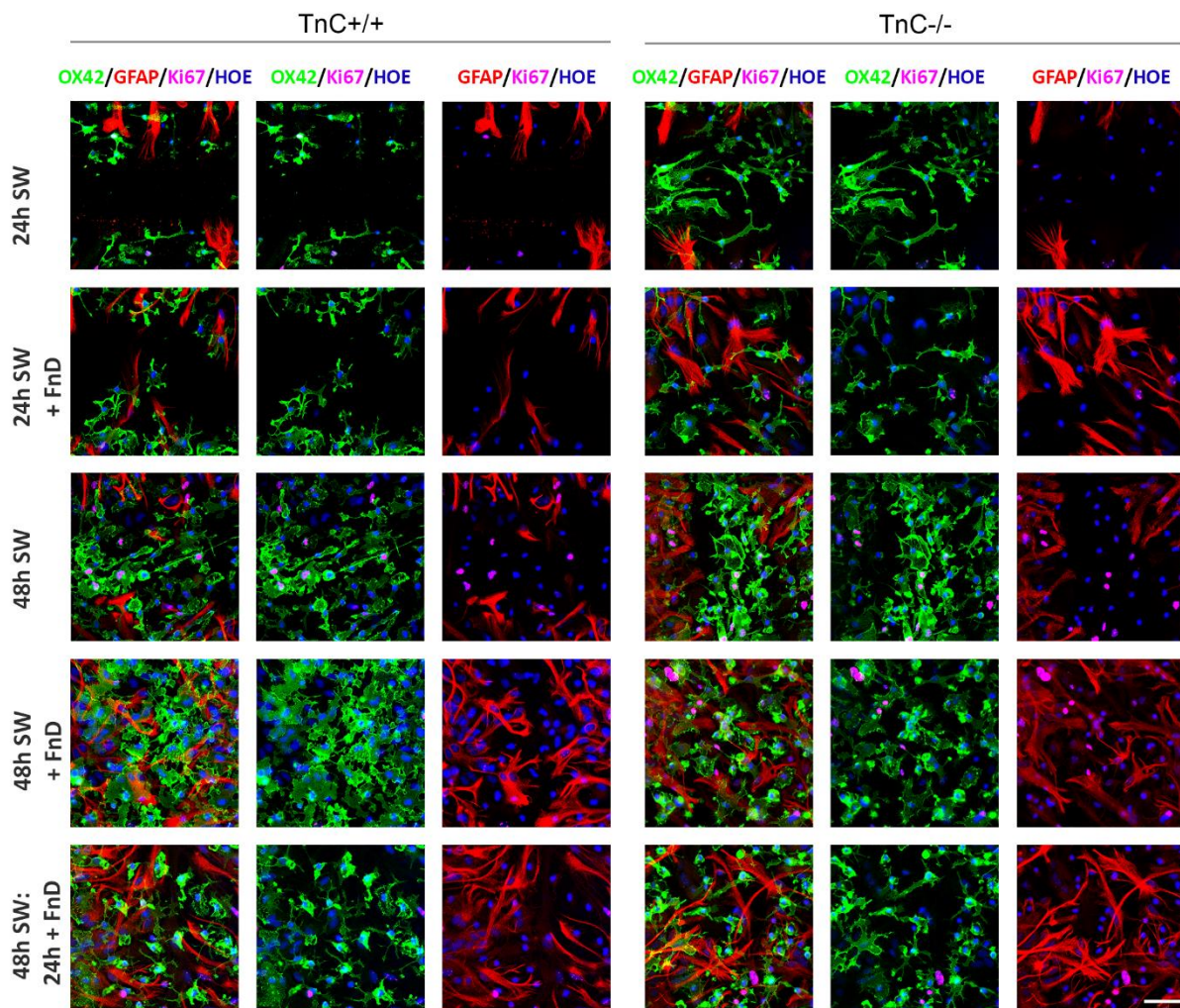
Promene vezane za gustinu mikroglije u graničnoj zoni su bile manje izražene nego u regionu povrede (Slika 20A). U TnC^{-/-}, 24h SW + FnD grupa je imala smanjenu gustinu mikroglije u poređenju sa 24h SW ($p = 0,005$), 48h SW + FnD ($p = 0,003$), a nije se razlikovala od grupe sa 24h odloženim FnD tretmanom. U TnC^{+/+} grupama nije bilo značajnih razlika u gustini mikroglije. Sveukupno, samo je efekat tretmana bio statistički značajan ($p < 0,001$).



Slika 18. FnD smanjuje gustinu i proliferaciju mikroglije, a podiže gustinu astrocita ne menjajući njihovu proliferaciju u regionu povrede. Mikrografije sa imunofluorescentno obeleženim astrocitima, mikroglijom, jedrima i proliferišućim jedrima su korišćene za procenu gustine i stope proliferacije ćelija. Gustina i proliferacija mikroglije su prikazani pomoću „box-whisker” grafikona (A, B), kao i gustina i proliferacija astrocita (C,D) u okviru regiona povrede. Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo statistički ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. (Br. Mikrografija= 36 iz 3 nezavisne kulture, po tretmanu, po genotipu).

Udeo proliferišuće mikroglije (Slika 18B; Slika 19) je bio veći u svim TnC^{-/-} grupama u poređenju sa TnC^{+/+} grupama ($p=0,032$ 24h SW, $p=0,002$ 24h SW + FnD, $p<0,001$ 48h SW i 48h SW + FnD), osim sa grupom 48h SW: 24h + FnD. U TnC^{-/-} kulturama, 24h SW + FnD grupa je imala manji udeo proliferišuće mikroglije od 24h SW kontrolne grupe ($p=0,017$). 48h SW grupa je imala veći udeo proliferišuće mikroglije u odnosu na 24h SW i sve 48h FnD tretirane grupe ($p<0,001$). 24h odloženo dodavanje FnD je dovelo do još većeg smanjenja proliferacije nego u grupi 48h SW + FnD ($p=0,001$), ali je smanjenje bilo jednako kao u grupi 24h SW + FnD. U TnC^{+/+} grupama, dodavanje FnD je značajno smanjilo udeo proliferišuće mikroglije u poređenju sa 24h SW grupom ($p<0,001$). 48h SW grupa je imala značajno veći udeo proliferišuće mikroglije u odnosu na 24h SW grupu ($p=0,021$) i sve 48h FnD tretirane grupe ($p<0,001$). Statistički su bili značajni i efekat tretmana i genotipa ($p<0,001$).

U graničnom regionu, u TnC^{-/-} 48h SW: 24h + FnD grupa dovodi do smanjenja proliferacije u odnosu na 48h SW i 48h SW + FnD grupe ($p<0,001$) (Slika 20B). U TnC^{+/+} grupama, takođe u druga 24h od povrede obe FnD tretirane grupe (48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD) dovode do smanjenja proliferacije mikroglije u odnosu na 48h SW grupu ($p<0,001$). U grupi 48h SW + FnD

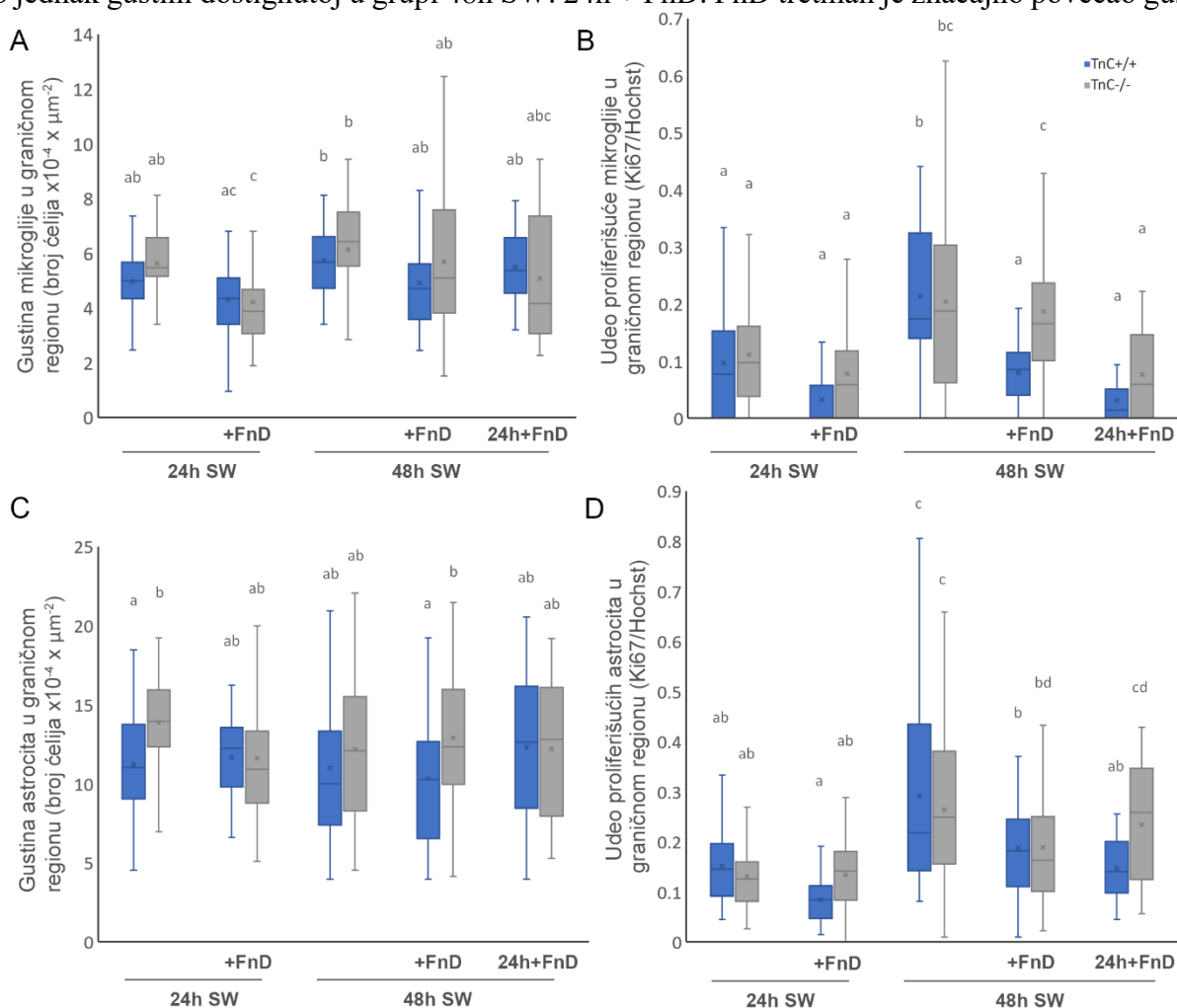


Slika 19. Reprezentativne mikrografije regiona povrede koje prikazuju različite gustine i stope proliferacije mikroglije i astrocita po tretmanu i po genotipu. Mikrografije sa imunofluorescentno obeleženom mikroglijom (OX-42, zeleno), astrocitima (GFAP, crveno), proliferišućim jedrima (Ki67, magenta) i jedrima (Hoechst, plavo) u regionu povrede po tretmanu po genotipu. Skala=50 μ m.

veće stope proliferacije mikroglije su bile zabeležene u TnC^{-/-} kulturama nego u TnC^{+/+} kulturama ($p < 0,001$). Sveukupno, statistički su bili značajni efekti genotipa i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihova međusobna interakcija ($p = 0,010$).

4.2.3 FnD ne utiče na proliferaciju astrocita, ali podiže njihovu gustinu u regionu povrede 48h nakon SW

Samo odsustvo TnC u TnC^{-/-} kulturama svukupno nije imalo efekta na gustinu astrocita (Slika 18C; Slika 19) u kontrolnim grupama 24h SW i 48h SW. U TnC^{-/-} kulturama u toku prva 24h od SW tretman FnD nije uticao na gustinu astrocita. Grupa 48h SW je imala veće gustine astrocita od grupe 24h SW ($p = 0,024$), a još veće vrednosti za gustinu astrocita su dostignute u grupama 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD ($p \leq 0,001$ za sva poređenja). U TnC^{+/+} kulturama, u toku prva 24h su takođe kontrolna 24h SW grupa i 24h SW + FnD grupa imale iste gustine astrocita. Gustina astrocita je očekivano bila veća u grupi 48h SW u odnosu na 24h SW ($p < 0,001$). Do još većeg porasta je došlo u grupi 48h SW + FnD u odnosu na 24h SW + FnD, i 48h SW ($p < 0,001$, $p = 0,003$), mada je taj porast bio jednak gustini dostignutoj u grupi 48h SW: 24h + FnD. FnD tretman je značajno povećao gustinu



Slika 20. FnD tretman smanjuje gustinu mikroglije u prva 24h nakon SW i smanjuje proliferaciju i mikroglije i astrocita 48h nakon SW u graničnom region. Mikrografije imunofluorescentno obeležene mikroglije, astrocita, jedara i proliferišućih jedara su korišćene za procenu gustine i stope proliferacije astrocita i mikroglije. Gustina i proliferacija mikroglije su prikazani pomoću „box-whisker” grafikona (A, B), kao i gustina i proliferacija astrocita (C,D) u graničnom regionu oko povrede. Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo statistički ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. (Br. mikrografija= 36 iz 3 nezavisne kulture, po tretmanu, po genotipu).

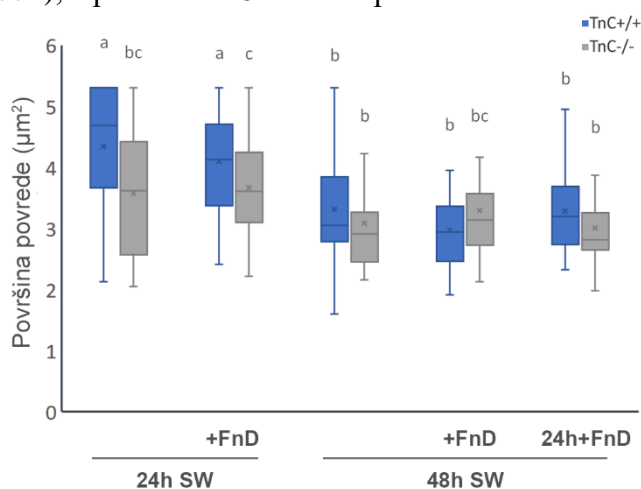
astrocita u TnC -/- u poređenju sa TnC +/+ kulturama u grupama 24h SW + FnD ($p=0,007$) i 48h SW: 24h + FnD ($p=0,032$). Statistički su bili značajni i efekat genotipa i tretmana ($p<0,001$, $p=0,017$, redom), kao i njihova interakcija ($p=0,037$). U graničnom regionu u pogledu gustine astrocita (Slika 20C) efekat genotipa je bio sveukupno značajan ($p=0,006$). Nije bilo značajnih razlika u pogledu vremena i tretmana među grupama, osim što su primećene veće gustine astrocita u TnC-/- kulturama u odnosu na TnC+/+ u okviru grupa 24h SW ($p=0,006$) i 48h SW + FnD ($p=0,008$).

Odsustvo TnC u TnC-/- grupama nije imalo značajnog efekta na proliferaciju astrocita u region povrede (Slika 18D; Slika 19) kao ni tretman FnD. U TnC-/- kulturama samo 48h SW grupa je imala značajno veće udele proliferišućih astrocita nego 24h SW ($p=0,041$). U TnC+/+ kulturama, udeo proliferišućih astrocita je bio jednak u okviru 24h i 48h grupa. Grupa 48h SW je imala veće stope proliferacije astrocita nego grupa 24h SW ($p=0,017$), a grupa 48h SW + FnD veće u odnosu na 24h SW + FnD ($p=0,019$). Samo je efekat tretmana bio statistički značajan ($p<0,001$).

Što se tiče stope proliferacije astrocita u graničnom region (Slika 20D), efekat tretmana je bio statistički značajan ($p<0,001$) kao i interakcija genotipa i tretmana ($p=0,018$). U TnC-/- kulturama nije bilo razlike u stopi proliferacije između kontrolne 24h SW i FnD tretirane grupe 24h SW + FnD. U 48h SW grupi stopa proliferacije je bila značajno veća u odnosu na 24h SW grupu ($p<0,001$). Grupa 48h SW + FnD je imala smanjenu stopu proliferacije astrocita u odnosu na 48h SW ($p=0,036$). U TnC+/+ kulturama isto nije bilo razlike u stopi proliferacije astrocita u toku prvih 24h. Grupa 48h SW je imala najveću stopu proliferacije i značajno veću od grupe 24h SW ($p<0,001$), dok je u grupama 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD došlo do smanjenja stope proliferacije u odnosu na 48h SW ($p\leq 0,001$). U grupi 48h SW: 24h + FnD je bila veća stopa proliferacije u TnC-/- kulturama u odnosu na TnC+/+ ($p=0,006$).

4.2.4 Površine regiona povrede su bile manje u toku prvih 24h u odsustvu TnC a tretman FnD nije imao efekta

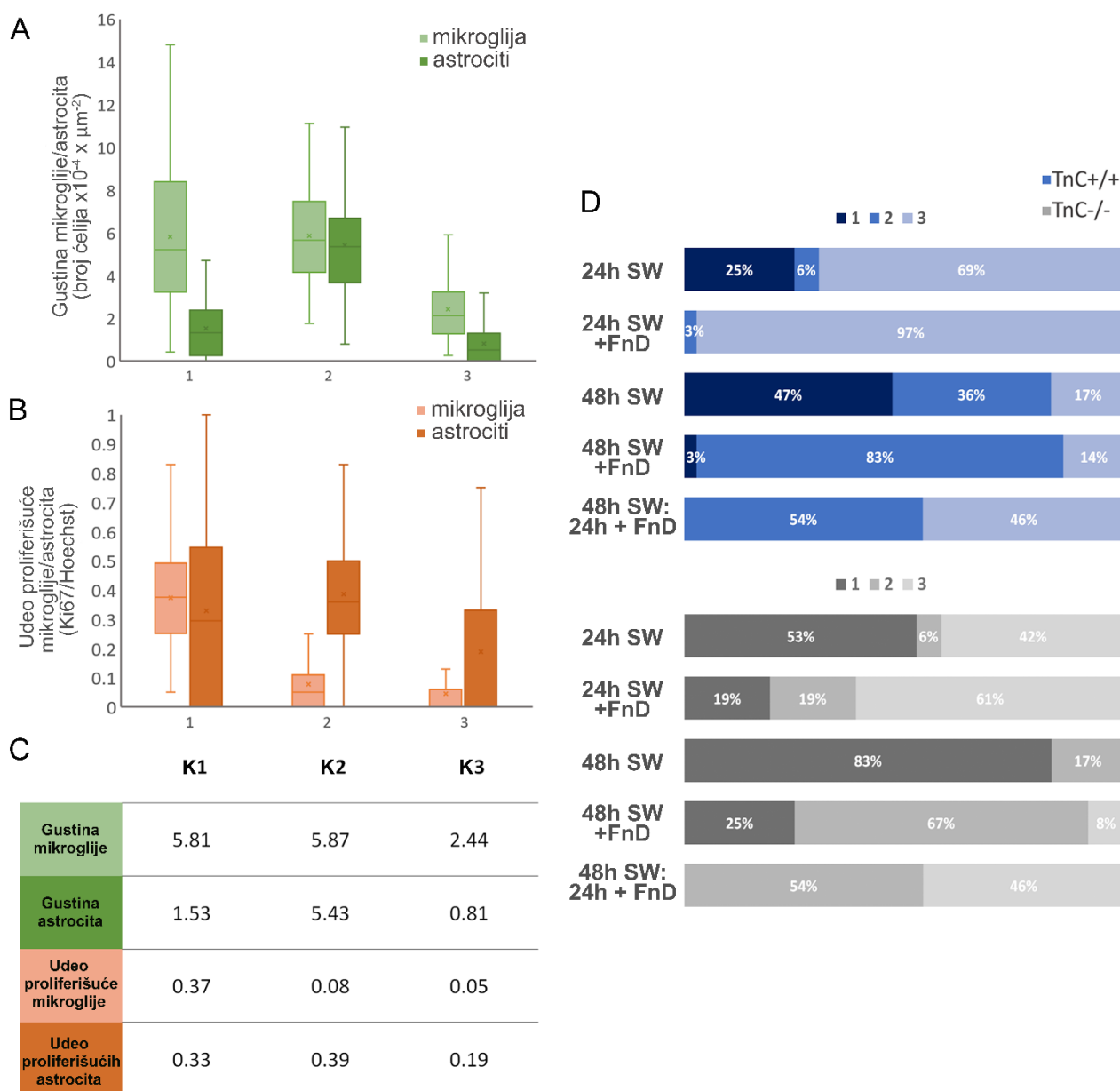
U TnC+/+ kulturama površine povreda su bile manje u 48h u odnosu na 24h kao što je i očekivano (Slika 21). Odsustvo TnC u TnC-/- 24h SW kontroli je podstaklo brže zatvaranje povreda u odnosu na TnC+/+ kulture ($p<0,001$), a potom do 48 h su sve površine bile slične u oba genotipa.



Slika 21. Površine povreda su manje u odsustvu TnC u prvih 24h nakon SW dok FnD tretman nema efekta. „Box-whisker” grafikoni površina povreda su prikazani. Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo statistički ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. (Br. mikrografija= 36 iz 3 nezavisne kulture, po tretmanu, po genotipu).

Dodavanje FnD nije dovelo do značajnih razlika u oba genotipa po pitanju površine povrede. U grupi 24h SW + FnD u TnC^{-/-} kulturama površina povrede je bila manje od TnC^{+/+} kultura ($p=0,030$). Sveukupno i efekat genotipa i tretmana su bili statistički značajni ($p=0,001$; $p<0,001$, redom) kao i njihova interakcija ($p=0,005$).

4.2.5 Odgovori mešovitim kulturama na SW i FnD tretman se raspoređuju u tri klastera prema gustinama i stopama proliferacija astrocita i mikroglije



Slika 22. Vreme aplikacije i trajanje FnD tretmana indukuju različite vrednosti za gustinu i proliferaciju mikroglije u reginu povrede po genotipu. Odgovori mikroglije i astrocita u mešovitim kulturama na SW i tretman FnD se raspoređuju u tri klastera u zavisnosti od ćelijske gustine i proliferacije. Opseg vrednosti za gustine mikroglije i astrocita

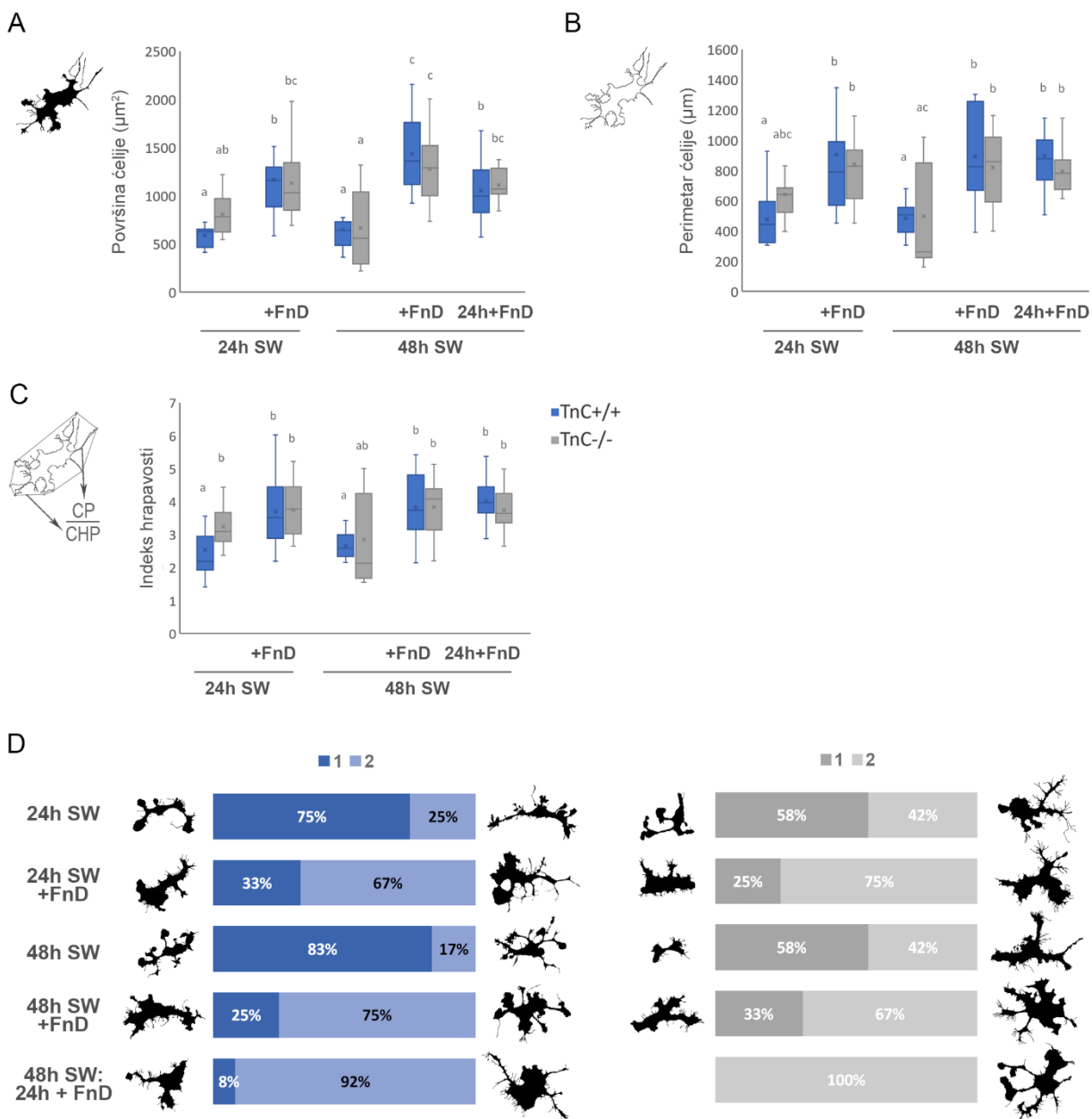
po klasteru je dat u vidu „box-whisker” grafikona (A). Opseg vrednosti za stope proliferacije mikroglije i astrocita po klasteru je dat u vidu „box-whisker” grafikona (B). Srednje vrednosti parametara koje predstavljaju centre klastera su date u tabeli (C). Procentualna zastupljenost klastera po grupi u okviru svakog genotipa je data (D). Hijerarhijska i „K-means” analiza su urađene za raspodelu po klasterima. Klasteri su označeni kao 1, 2, i 3 (A, B,D) i K1, K2 i K3 (C). (Br. mikrografija= 36 iz 3 nezavisne kulture, po tretmanu, po genotipu).

Gustina i proliferacija mikroglije, kao i gustina i proliferacija astrocita u regionu povrede su prvo analizirani pojedinačno, a potom da bi se ustanovio sveukupan efekat SW i tretmana FnD, vrednosti za sva četiri parametra po mikrografiji su posmatrana zajedno. Upotrebom hijerarhijske klaster analize i potom „K-means” klaster analize, mikrografije su sortirane u tri klastera na osnovu ova 4 parametra, pri čemu su sva 4 parametra statistički značajno doprinela sortiranju ($p < 0,001$; Slika 22). Vrednosti za gustine mikroglije i astrocita po klasteru su date na Slici 22A, a vrednosti za stope proliferacije oba ćelijska tipa po klasteru su data na Slici 22B. Srednje vrednosti za svaki od 4 parametra koje označavaju centre tri klastera su date na Slici 22C. Prvi klaster karakterišu veće vrednosti za gustinu mikroglije sa višim stopama proliferacije uz srednje gustine astrocita i više njihove stope proliferacije. Drugi klaster se takođe odlikuje višim gustinama mikroglije, ali sa nižim stopama proliferacije, sa najvišim gustinama astrocita koji imaju takođe visoke stope proliferacije. U trećem klasteru su zastupljene najniže vrednosti za gustine i proliferacije oba tipa ćelija. Na Slici 22D je prikazana raspodela slika za svaki tretman u okviru tri klastera po genotipovima.

U prva 24h, odsustvo TnC u TnC^{-/-} kulturama je dovelo do jednake raspodele slika u klasterima jedan i tri u poređenju sa TnC^{+/+} kulturama gde je klaster tri bio najzastupljeniji (Slika 22D). Bez TnC, gustine i stope proliferacije mikroglije su bile češće više u poređenju sa TnC^{+/+} kulturama. Razlika nije bila tako očigledna sa astrocitima jer su u toku prva 24h bili inače vrlo retki u regionu povrede (Slika 19). Dodatak FnD je doveo do veće distribucije u trećem klasteru usled smanjenja gustine mikroglije i njihovih stopa proliferacije. Efekat je bio više izražen u TnC^{+/+} kulturama što ukazuje na sinergistički efekat dodatog FnD i endogeno eksprimiranog TnC. U 48h, odsustvo TnC u TnC^{-/-} kulturama je značajno povećalo zastupljenost prvog klastera koji odlikuju najveća gustine i proliferacija mikroglije, dok su u TnC^{+/+} kulturama klaster jedan i dva bili jednako zastupljeni. Dodatak FnD je u 48h povećao zastupljenost klastera usled povećanja gustine astrocita u regionu povrede u 48h (Slika 19). U slučaju 24h odloženog dodavanja fragmenta FnD (48h SW: 24h + FnD), mikrografije su bile jednako raspoređene u drugom i trećem klasteru bez učešća prvog klastera. Odloženi FnD tretman je po učinku izbalansirao efekte 24 i 48h prisutnog FnD.

4.2.6 FnD indukuje morfologiju aktivirane mikroglije u regionu povrede

Jedanaest morfoloških parametara je analizirano za svaku odabranu ćeliju u regionu povrede. Ćelije su potom klasterovane na osnovu svih jedanaest parametara u dva klastera, svi parametri su statistički značajno doprineli klasterovanju ($p < 0,001$, za sve osim za solidnost, $p = 0,020$; Slika 23D, Tabela 7). Za većinu parametara srednje vrednosti su bile manje u prvom klasteru, osim za ćelijsku cirkularnost, indeks odnosa širine i visine i solidnost. Ispunjeni oblici reprezentativnih ćelija za svaki klaster su prikazani na Slici 23D. Odsustvo TnC je povećalo zastupljenost drugog klastera u poređenju sa TnC^{+/+} kulturama, ali prvi klaster je i dalje bio dominantan. Nakon FnD tretmana, tanji i izduženi nastavci mikroglije su počeli da se spajaju a citoplazma je ispunjavala prostore između, čime su nastali zadebljali nastavci i došlo je do sveukupnog povećanja površine ćelija. Na površini ćelija se pojavilo znatno više tankih filopodija što je uzrokovalo povećanje perimetra i indeksa hrapavosti. Tri parametra, sa najizraženijim razlikama, ćelijska površina, perimetar i hrapavost su predstavljani na Slici 23A-C, dok su preostalih 8 parametara dati na Slici 24.



Slika 23. FnD tretman indukuje aktiviranu morfologiju mikroglije u regionu povrede. „Box-whisker” grafikoni koji prikazuje površinu mikroglijalnih ćelija (A), perimetar (B) i indeks hrapavosti (C). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo statistički ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. Mikroglijalne ćelije su podeljene u dva klastera na osnovu jedanaest morfoloških parametara po ćeliji (Tabela 7). Prikazana je procentualna zastupljenost klastera po grupi u okviru svakog genotipa, uključujući i reprezentativne oblike ćelija koje su odabrane kao članovi klastera sa najmanjom udaljenošću od centra klastera (D). Klasteri su obeleženi kao 1 i 2 (D). (Br. ćelija= 12 iz 3 nezavisne kulture, po tretmanu, po genotipu).

Tabela 7. Srednje vrednosti ispitivanih morfoloških parametara mikroglije

Parametar	Klaster 1	Klaster 2	Parametar	Klaster 1	Klaster 2
Površina ćelije	708,46	1174,91	Indeks hrapavosti	2,56	3,98
Perimetar	453,57	903,94	Fraktalna dimenzija	1,21	1,30
Cirkularnost	0,05	0,02	Lakunarnost	0,29	0,33
Odnos širine i dužine	2,44	1,68	Površina konveksnog trupa	1803,64	3421,44
Zaobljenost	0,49	0,64	Perimetar konveksnog trupa	174,84	225,67
Solidnost	0,40	0,35			

4.2.6.1 FnD tretman dovodi do uvećanja površine mikroglije, a odsustvo TnC ima istu tendenciju

Površine mikroglijalnih ćelija su bile slične u proseku u oba genotipa, ali u odsustvu TnC postojala je tendencija ka većim površinama (Slika 23A). Dodatak FnD u prva 24h nije imao značajan efekat u TnC-/- kulturama, ali je doveo do povećanja površina ćelija u TnC+/+ kulturama u poređenju sa kontrolnom 24h SW grupom ($p=0,001$). U 48h u kontrolnim grupama ćelijske površine su bile slične onim u 24h SW grupama u oba genotipa. U TnC-/- kulturama, u grupama 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD je došlo do povećanja površine ćelija u odnosu na 48h SW grupu ($p<0,001$, $p=0,003$, redom), a sve FnD tretirane grupe su bile međusobno jednake. U TnC+/+, tretman 48h SW + FnD je prouzrokovao veće površine ćelija u poređenju sa 48h SW grupom kao i u odnosu na druge dve FnD tretirane grupe, 24h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD ($p<0,001$, $p=0,045$, $p=0,017$, redom). Grupa 48h SW: 24h + FnD je imala veće površine ćelija u odnosu na 48h SW grupu ($p=0,003$), a slične površine grupi 24h SW + FnD. Sveukupno, samo je tretman bio statistički značajan ($p<0,001$).

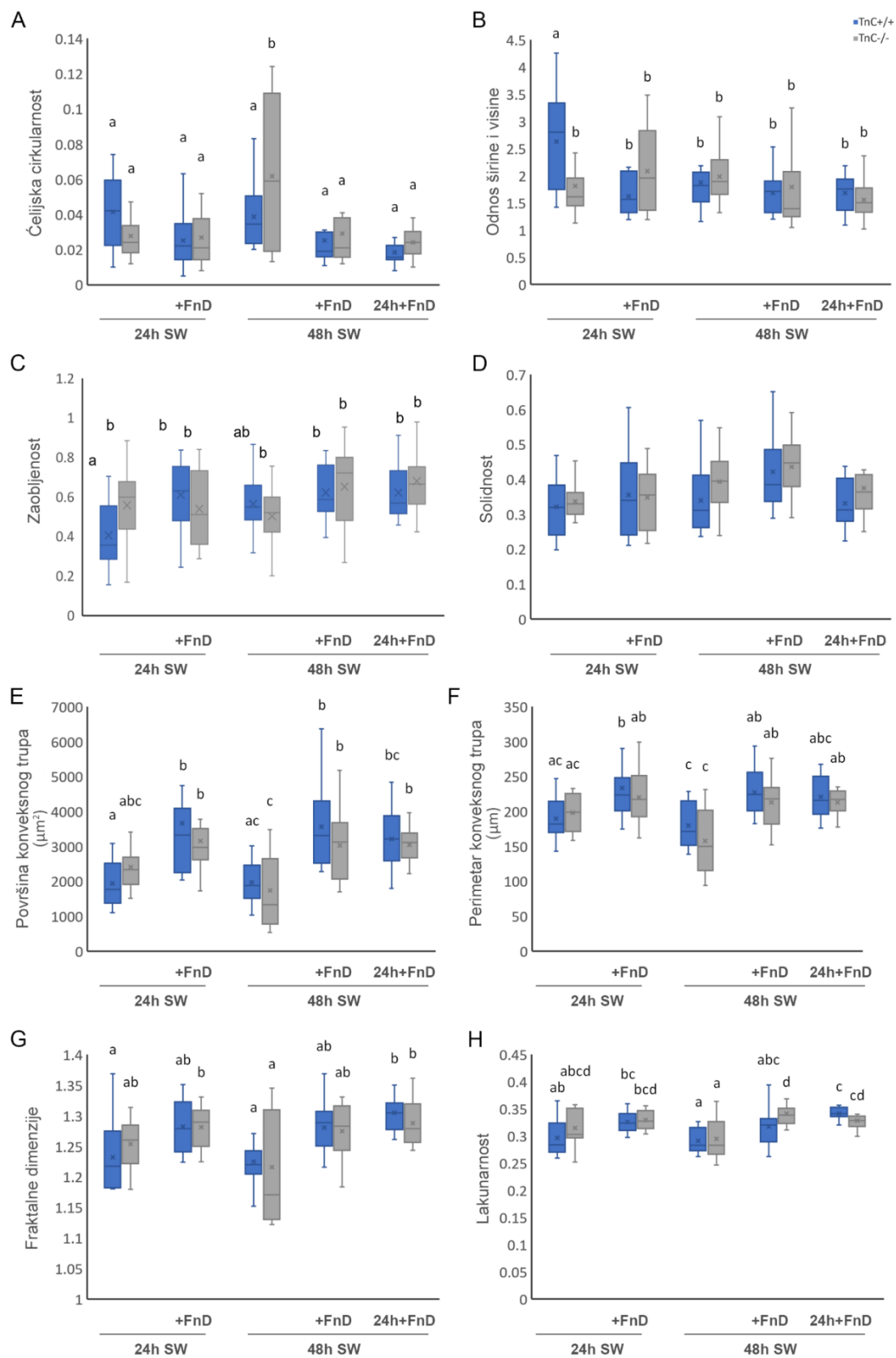
4.2.6.2 FnD tretman je poruzrokovao povećanje perimetra mikroglijalnih ćelija

Perimetri mikroglijalnih ćelija (Slika 23B) su bili slični među kontrolnim grupama oba genotipa, mada je primećeno da u odustvu TnC u TnC-/- kontrolnoj grupi postoji tendencija ka većim perimetrima. U TnC-/- kulturama dodatak FnD nije doveo do značajnih promena u toku prva 24h, ali kasnije je doveo do povećanja perimetra mikroglije u grupama 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD u odnosu na grupu 48h SW ($p=0,010$, $p=0,023$, redom). U svim FnD tretiranim grupama u TnC-/- genotipu, ćelijski perimetri su bili slični. U TnC+/+ kulturama, FnD je uticao na povećanje perimetra u grupi 24h SW + FnD u odnosu na 24h SW ($p=0,023$), a grupe 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD su imale veći perimetar od 48h SW ($p<0,001$). Takođe, ni ovde nije bilo razlika u perimetru među FnD tretiranim grupama.

4.2.6.3 FnD tretman je povećao indeks hrapavosti ćelija u TnC+/+ kulturama dok su TnC-/- ćelije inicijalno imale povećan indeks hrapavosti

Odsustvo TnC je omogućilo veće indekse hrapavosti mikroglije (Slika 23C) u kontrolnoj 24h SW grupi u poređenju sa TnC+/+ kulturama ($p=0,008$). FnD tretman nije imao dodatni učinak u TnC-/- kulturama. S druge strane, u TnC+/+ kulturama 24h SW + FnD grupa je imala veći indeks hrapavosti od grupe 24h SW ($p=0,001$). Nije bilo razlike među grupama 24h SW i 48h SW, ali grupe

48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD su imale veći indeks hrapavosti od grupe 48h SW ($p=0,009$, $p=0,001$).

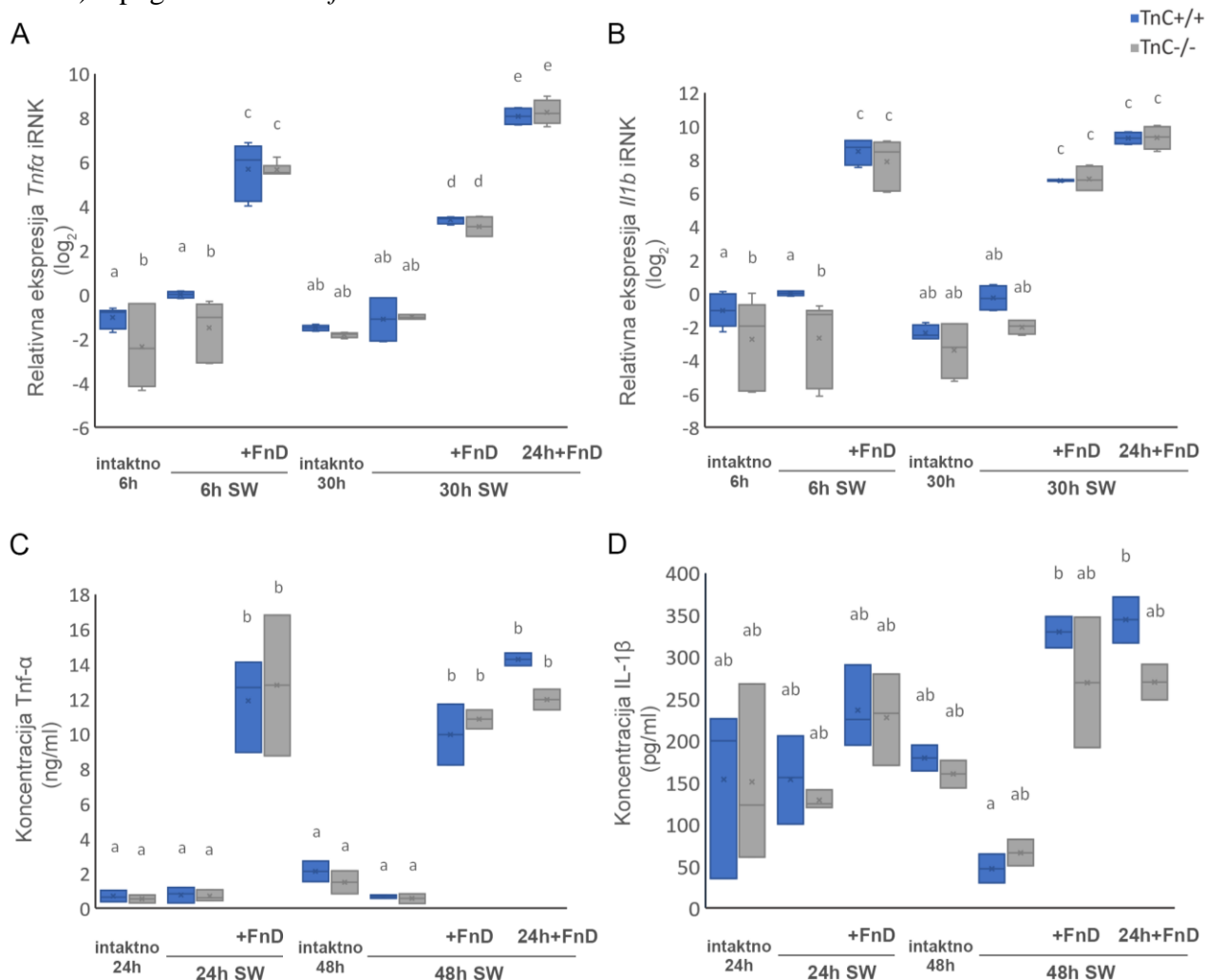


Slika 24. Dodatni morfometrijski parametri mikroglijalnih ćelija u regionu povrede. „Box-whisker” grafikoni prikazuju ćelijsku cirkularnost (A), odnos širine i visine (B), zaobljenost(C), solidnost (D), površinu konveksnog trupa

(E), perimetar konveksnog trupa (F), fraktalne dimenzije (G), lakunarnost (H). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo ne razlikuju međusobno.

4.2.7 FnD tretman dovodi do povećanja nivoa proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β u mešovitoj kulturi

Da bi se dalje ispitaio reaktivni profil glijalnih ćelija nakon SW i FnD tretmana, Tnf- α i IL-1 β su ispitani na nivou iRNK ekspresije kao i na nivou koncentracija citokina oslobođenih u medijum (Slika 25). U odsustvu TnC nivoi *Tnfa* iRNK su bili niži nakon 6h i u intaktnoj i u SW kontrolnoj grupi u odnosu na TnC+/+ genotip ($p=0,008$, $p=0,003$, redom; Slika 25A). Kasnije nisu primećene razlike među genotipovima u ovim grupama. U okviru genotipova, intaktna i SW grupa su imale slične vrednosti u 6h i 30h, a sve FnD tretirane grupe su pokazale značajno povećanje iRNK nivoa u poređenju sa svim netretiranim grupama ($p<0,001$). U oba genotipa najveće povećanje je zabeleženo u grupi 30h SW: 24h + FnD u poređenju sa grupama 6h SW + FnD i 30h SW + FnD ($p\leq 0,001$). Grupa 6h SW + FnD je imala i statistički značajno povećanje i u odnosu na 30h SW + FnD u TnC+/+ i TnC-/- ($p=0,002$, $p<0,001$, redom). Sveukupno, i genotip i tretman su bili značajni ($p=0,032$, $p<0,001$, redom) u pogledu nivoa *Tnfa* iRNK.



Slika 25. FnD tretman podiže nivoe proinlamatornih citokina TNF- α i IL-1 β . Relativna promena ekspresije *Tnfa* iRNK (\log_2) (A) i relativna promena *Il1b* iRNK (\log_2) (B) su prikazani u vidu „box-whisker” grafikona. Koncentracije citokina oslobođenih u medijum su prikazane pomoću „box-whisker” grafikona za TNF- α (C) i IL-1 β (D). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koje imaju isto slovo statistički ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. (n= 3 nezavisne kulture, analize rađene u duplikatu).

iRNK nivoi *Il1b* su takođe inicijalno bili veći u TnC^{+/+} kulturama u 6h intaktnoj grupi i 6h SW nego u TnC^{-/-} kulturama ($p=0,029$, $p=0,001$, redom; Slika 25B). Nisu primećene razlike u intaktnim i SW grupama među genotipovima u 30h i sve FnD tretirane grupe su međusobno bile jednake ali su imale značajno povećane nivoe iRNK za *Il1b* u odnosu na netretirane grupe ($p<0,001$). Statistička analiza iRNK *Il1b* je pokazala da su sveukupno i genotip i tretman značajni ($p=0,002$, $p<0,001$, redom).

Koncentracija citokina oslobođenih u medijum je procenjena ELISA metodom. U slučaju Tnf- α , nisu primećene razlike između genotipova i samo je tretman bio statistički značajan ($p<0,001$, Slika 25C). Intaktne i SW grupe su imale slične koncentracije u svim vremenskim tačkama, a sve FnD tretirane grupe su imale više koncentracije ($p\leq 0,001$) nije bilo značajne razlike među njima.

U toku prvih 24h u svim grupama u oba genotipa slične koncentracije IL-1 β su bile oslobođene u medijum (Slika 25D). U 48h koncentracija IL-1 β se nije promenila u intaktnoj grupi u oba genotipa i ostala je jednaka koncentracijama iz 24h. Nasuprot tome, diskrepanca je primećena u TnC^{+/+} grupi između FnD grupa 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD i kontrolne 48h SW grupe jer su koncentracije IL-1 β opale u kontrolnoj grupi, a porasle u FnD tretiranim grupama ($p=0,004$, $p=0,002$, redom). Ista tendencija je primećena i u TnC^{-/-} genotipu, ali nije bilo statističkih značajnosti. Sveukupno, samo tretman je bio značajan ($p<0,001$).

4.2.8 FnD tretman povećava nivoe ekspresije iNOS u skladu sa proinlamatornim fenotipom

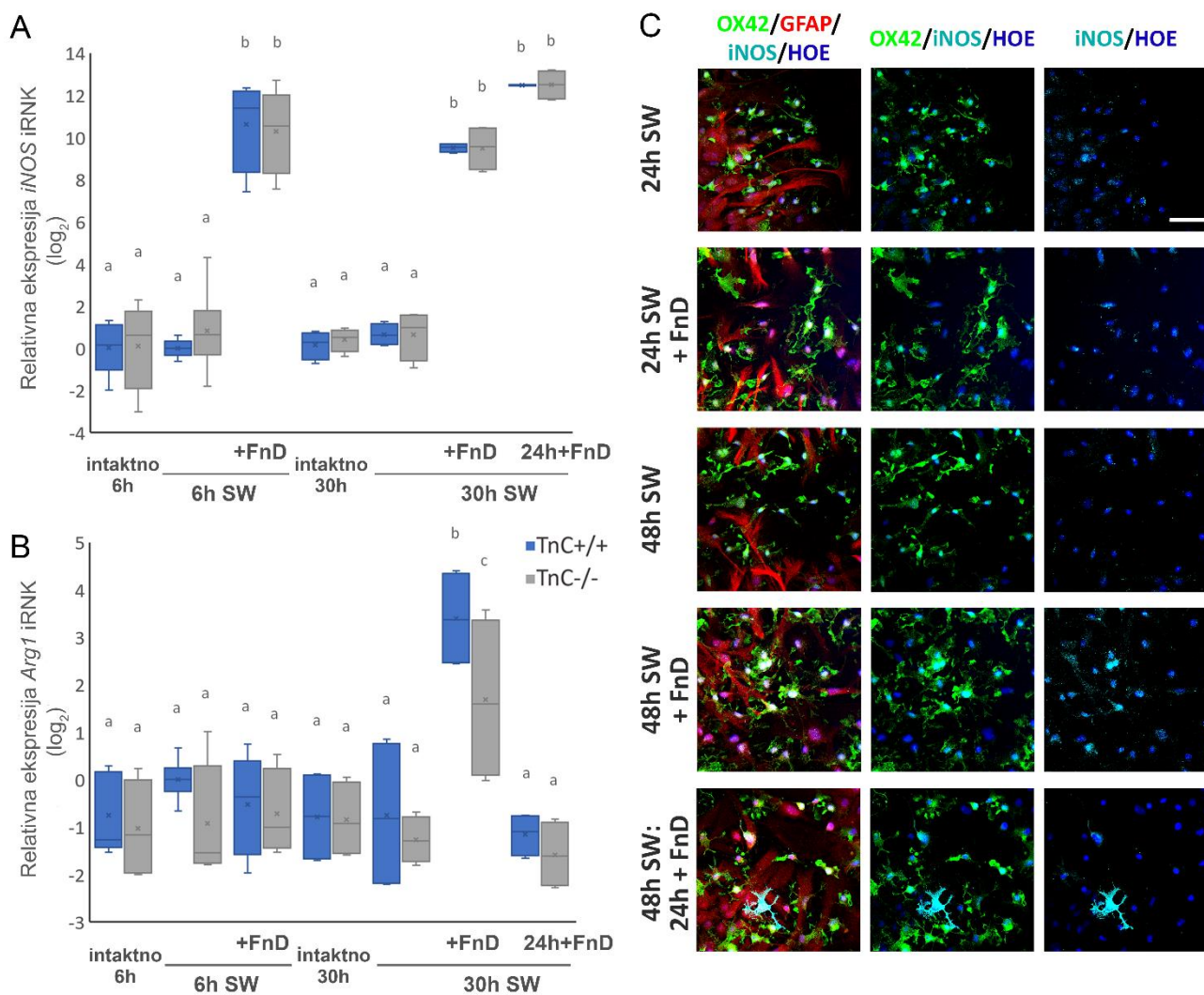
U pogledu nivoa ekspresije *iNOS* iRNK (\log_2) (Slika 26A), sve intaktne i SW grupe su imale niže relativne nivoe ekspresije iRNK u poređenju sa svim FnD tretiranim grupama ($p<0,001$). Nije bilo razlika među genotipovima. Samo je tretman bio statistički značajan ($p<0,001$). U grupi 48h SW: 24h + FnD u oba genotipa, jaka iNOS imunoreaktivnost je primećena u pojedinim mikroglialnim ćelijama predominantno u regionu povrede na ćelijskom telu i nastavcima (Slika 26C, samo TnC^{+/+} genotip prikazan).

Relativna promena ekspresije *Arg1* iRNK (\log_2) je bila slična u proseku u svim grupama u oba genotipa osim u grupi 30h SW + FnD (Slika 26B). U TnC^{+/+}, ova grupa je imala najviše nivoe *Arg1* iRNK u poređenju sa svim drugim grupama ($p<0,001$). Ovo povećanje je bilo značajno veće i u odnosu na istu grupu u TnC^{-/-} genotipu ($p=0,019$). U TnC^{-/-}, u 30h SW + FnD grupi *Arg1* iRNK nivo je bio povećan u odnosu na 6h SW + FnD, 30h SW, 30h SW: 24h + FnD ($p=0,010$, $p=0,002$, $p=0,001$). I genotip i tretman su bili značajni ($p=0,022$, $p<0,001$, redom).

4.2.9 FnD povećava udeo prekursorske u odnosu na zrele izoformu β 1 integrina

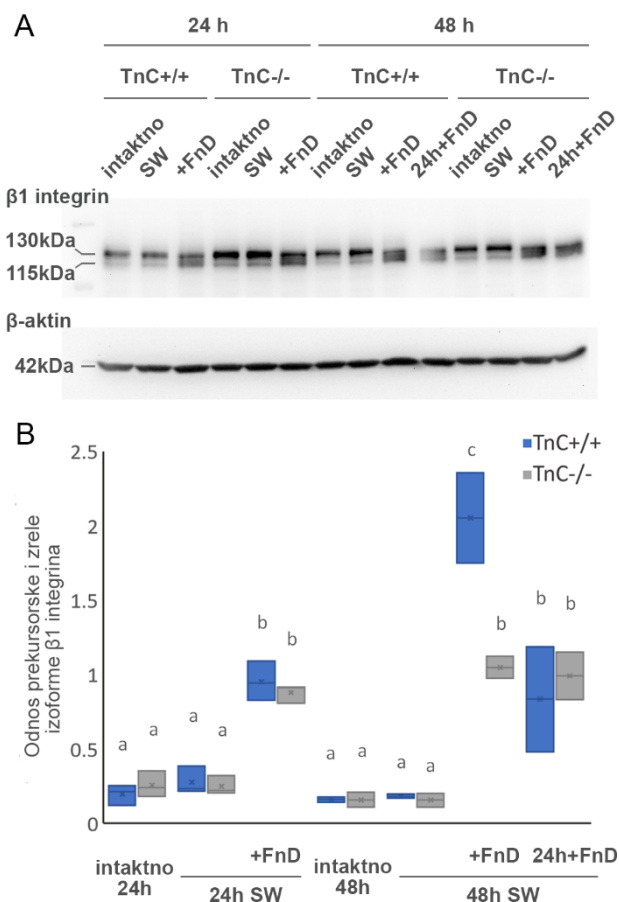
Interakcijom sa ćelijskim receptorima integrinima, TnC utiče na njihovu adheziju, proliferaciju, migraciju i signalizaciju i produkciju citokina (Sriramarao et al., 1993). Stoga smo odlučili da ispitamo ekspresiju β 1 integrina nakon povrede i dodavanja FnD u mešovitim kulturama astrocita i mikroglije.

Ekspresija β 1 integrina je analizirana metodom Western blot. Primećene su i potpuno glikozilovana traka na 130kDa kao i parcijalno glikozilovana traka na 115kDa (Slika 27A). Analiziran je odnos prekursorske i zrele forme (Slika 27B). Sve intaktne i SW grupe u oba genotipa su imale sličan odnos sa većom ekspresijom zrele forme. Međutim, sve grupe tretirane sa FnD su imale veću ekspresiju



Slika 26. FnD tretman povećava ekspresiju *iNOS* u svim vremenskim tačkama, a ekspresiju *Arg1* samo 30h nakon SW. „Box-whisker” grafikon relativne *iNOS* iRNK (log₂) promene ekspresije (A) i relativne *Arg1* iRNK (log₂) promene ekspresije (B). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo ne razlikuju međusobno, p vrednosti su istaknute u tekstu. (n= 3 nezavisne kulture, analize rađene u duplikatu) Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentno obeležene mikroglije (OX-42, zeleno), astrocita (GFAP, crveno), iNOS (cijan), jedara (Hoechst, plavo) (C). Jaka imunoreaktivnost je primećena samo na pojedinim mikroglijalnim ćelijama u regionu povrede u grupi 48h SW: 24h + FnD u oba genotipa (prikazan samo TnC+/+). Skala = 50μm

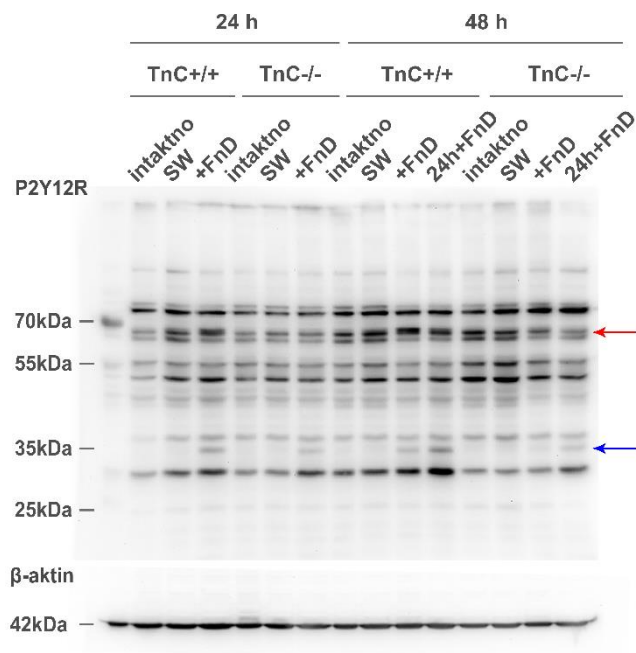
prekursorske forme. Najviše vrednosti prekursorske forme su dostignute u grupi 48h SW + FnD, a pogotovo u TnC+/+ genotipu. U TnC+/+ genotipu, 24h SW + FnD grupa je imala veći odnos nego 24h SW grupa ($p=0,002$). U grupama sa 48h prisutnim FnD i sa 24h odloženo dodatim FnD odnos je bio povećan u poređenju sa grupom 48h SW ($p<0,025$, $p<0,001$, redom). Grupa 48h SW + FnD je takođe imala veće nivoe prekursorske izoforme nego grupa 24h SW + FnD ($p<0,001$). U TnC-/-, grupa 24h SW + FnD je imala veći odnos nego grupa 24h SW ($p=0,005$), a obe grupe 48h SW + FnD i 48h SW: 24h + FnD su imale veći udeo prekursorske forme u poređenju sa 48h SW ($p=0,001$, $p=0,002$, redom). Grupa 48h SW + FnD je imala više vrednosti prekursorske forme u TnC+/+ u odnosu na TnC-/- genotip ($p<0,001$). Sveukupno i genotip i tretman su bili statistički značajni, kao i njihova interakcija ($p=0,043$, $p<0,001$, $p=0,002$, redom). TnC, a posebno FnD nije indukovao promene u pogledu ekspresije $\beta 3$ integrina u odnosu na poziciju ili intenzitet traka.



Slika 27. FnD tretman povećava udeo prekursorske u odnosu na zrele izoforme β1 integrina. Reprezentativna membrana je pokazana za β1 integrin i odgovarajući β-aktin (A). „Box-whisker” grafikon odnosa prekursorske prema zreloj izoformi β1 integrina (B). Dvosmerna ANOVA analiza je urađena za utvrđivanje statističkih značajnosti. Rezultati međusobnih poređenja su na grafikonima prikazani pomoću slova, pri čemu se grupe koja imaju isto slovo ne razlikuju međusobno. p vrednosti su istaknute u tekstu. (n= 3 nezavisne kulture).

4.2.10 FnD izaziva pojavu specifičnih monomernih P2Y12R traka

P2Y12R na površini mikroglije je usko povezan sa njenim brzim promenama morfologije u povredi usled interakcije sa oslobođenim ATP, stoga smo ispitali efekat FnD u modelu povrede u mešovitoj kulturi astrocita i mikroglije na ekspresiju P2Y12R metodom Western blot. U svim grupama tretiranim FnD, bez obzira na vreme, primećeno je prisustvo traka na oko 35kDa koje odgovaraju monomerima P2Y12R (Slika 28). Dodatno, u opsegu dimera (oko 60kDa), po dve trake su bile vidljive, a u FnD tretiranim grupama gornje trake su bile većeg intenziteta. Ovaj efekat je bio izraženiji u TnC+/+ kulturama. Naši rezultati ukazuju na to da po FnD tretmanu dolazi do *de novo* pojave monomernih P2Y12R traka dok se u nivou dimera dešavaju rearanžmani. Ispitali smo i ekspresiju P2Y13R, ali trake su bile uniformne bez obzira na FnD tretman (rezultati nisu prikazani).



Slika 28. Pojava specifičnih P2Y12R monomernih traka nakon FnD tretmana. Reprezentativna membrana je prikazana za P2Y12R i odgovarajući β -aktin. Plava strelica ukazuje na pozicije monomernih traka na oko 35kDa. Dodatne trake se pojavljuju samo sa FnD tretmanom. Crvena strelica ukazuje na dve trake u nivou dimera na oko 60kDa P2Y12R. U grupama tretiranim FnD, gornje trake su jačeg intenziteta (efekat izraženiji u TnC+/+ kulturama). n=3 nezavisne kulture

5. Diskusija

Vančelijski glikoprotein TnC je visoko eksprimiran kod kičmenjaka tokom embrionalnog razvića, a potom u tkivima koja se intenzivno remodeluju, kao u slučaju reparacije nakon povrede (Jakovcevski et al., 2013; Marzeda & Midwood, 2018; K. S. Midwood & Orend, 2009; Tucker & Chiquet-Ehrismann, 2009). Zahvaljujući multimodularnosti, visoko regulisanoj prostornoj i vremenskoj ekspresiji i brojnim vezivnim partnerima, ostvaruje mnoštvo funkcija. Nakon povreda CNS astrociti ga intenzivno sintetišu i oslobađaju u ECM astrociti (Laywell et al., 1992; Wiese et al., 2012). TnC izoforme sa manjom molekulskom masom (<200 kDa) ne sadrže alternativno prekrojene domene i uglavnom su prisutne u fiziološkim uslovima, dok izoforme sa većom molekulskom masom (>200kDa) sadrže bar jedan alternativno iskrojen domen i njihova ekspresija je povećana u tumorima i nakon povreda (Giblin & Midwood, 2015; Okada & Suzuki, 2021).

Pokazano je da je oporavak lokomotornih funkcija nakon povrede kičmene moždine u TnC^{-/-} miševima redukovano u poređenju sa TnC^{+/+}, dok je prekomerna ekspresija FnD (fragmenta TnC) dovela do poboljšane regeneracije (J. Chen et al., 2010). Ovi nalazi se slažu i sa prethodnim literaturnim podacima da TnC, a posebno FnD pomažu razrastanje neurita i preživljavanje neurona (Lochter & Schachner, 1993; Meiners et al., 2001).

U ovoj doktorskoj disertaciji smo ispitivali efekte TnC i njegovih fragmenata na mišje glijalne ćelije u modelu povrede *in vitro* i *in vivo*. U kulturi kortikalnih astrocita, egzogeno dodavanje različitih fragmenta TnC dovelo je do usporavanja zatvaranja povrede, velikim delom usled redukovanja stope proliferacije astrocita. Najizraženiji efekat uočen je nakon tretmana sa fragmentima FnD, FnA i Fn(D+A). Kulture astrocita izolovane iz TnC^{-/-} miševa su imale povećanu ekspresiju GFAP na proteinskom i genskom nivou, nezavisno od tretmana. Tretiranje fragmentima dovelo je i do povećane sinteze proinflamatornih citokina u kulturi astrocita. *In vivo*, ispitali smo delovanje fragmenata TnC u ranim fazama zarastanja kompresione povrede kičmene moždine TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa i pokazali da tretman fragmentima FnD i kombinacijom Fn(D+A) dovodi do pojave razlika među genotipovima, u vidu povećane ekspresije GFAP u regionu povrede u TnC^{+/+} miševima. FnD tretman TnC^{-/-} miševa je doveo do povećane gustine aktivirane mikroglije/makrofaga u regionu povrede, dok ukupna stopa proliferacije ćelija nije bila promenjena.

Na osnovu ovih rezultata odlučili smo da dalje ispitamo efekat FnD u modelu povrede u mešovitoj kulturi astrocita i mikroglije. Pokazali smo da ćelije mikroglije u TnC^{-/-} kulturama ulaze u većem broju u region povrede i imaju veću stopu proliferacije u odnosu na TnC^{+/+} kulture, dok se astrociti koncentrišu u graničnom regionu i omogućavaju brže zatvaranje povrede. Stopa proliferacije mikroglije značajano je redukovana nakon tretmana FnD. Gustina mikroglije je takođe redukovana, delom usled redukovane proliferacije kao i migracije i kontaktne inhibicije između uvećanih FnD tretiranih ćelija. Morfologija FnD tretirane mikroglije je bila nalik proinflamatornim ćelijama, a u prilog ovakvom fenotipu govori i povećana ekspresija iNOS u ovim ćelijama nakon FnD tretmana. Efekat FnD na astrocite je bio drugačiji. Naime, FnD nije uticao na proliferaciju astrocita u regionu povrede ali je stimulisao migraciju reaktivnih astrocita u region povrede nakon 48h. Povećana ekspresija i oslobađanje TNF- α i IL-1 β nakon tretmana FnD ukazao je na sveukupni razvoj inflamacije. Osim toga, uočena je i povećana ekspresija prekursorske trake za β 1 integrin i pojava monomernih traka P2Y12R nakon FnD tretmana koje dodatno razjašnjavaju ulogu ovog TnC fragmenta u promeni morfologije i pokretljivosti ćelija.

Sveukupno rezultati ove studije ukazuju na kompleksnu i raznovrsnu uogu TnC, a posebno FnD u tekućoj inflamaciji nakon povrede i spatiotemporalnoj organizaciji regiona povrede i neposrednog okruženja.

Ekspresija i oslobađanje TnC u kulturi astrocita pokazana je u nekoliko studija. Nishio i kolege su pokazali dvofazno oslobađanje TnC u medijum u dugotrajnim primarnim kulturama gde su uočili prvi visoki skok oslobađanja nakon 4h i drugi, niži skok 48h nakon indukovanja astroglione (Nishio et al., 2003). Takođe, ispitivali su oslobađanje TnC u medijum od strane astrocita u kulturi nakon SW i primetili su otpuštanje najveće TnC izoforme sa maksimumom oko 12h nakon povrede (Nishio et al., 2005).

S obzirom na uočene razlike među genotipovima u našim eksperimentima, možemo zaključiti da se određena forma TnC sintetisala i oslobađala u našim TnC^{+/+} kulturama do 24h nakon povrede. Diskrepanca između genotipova je bila izraženija u modelu mešovite kulture, dok je u slučaju čiste kulture astrocita tretman bio značajniji od efekta genotipa. Kako se povećanje nivoa TnC ekspresije očekuje nakon povrede, u eksperimentima na mešovitim kulturama koje su analizirane do 48h, smatrali smo da je odloženo dodavanje FnD fiziološki približnije *in vivo* situaciji. Ovaj 24h odložen tretman je doveo do pojačavanja efekata primećenih u TnC^{-/-} kulturama, a nije imao efekat u TnC^{+/+} kulturama.

Iako *in vitro* modelima povrede nedostaju brojne komponente prisutne *in vivo* (Yoo et al., 2016), često se koriste za proučavanje patofizioloških procesa akutne i subakutne faze povrede, jer omogućavaju preciznu kontrolu uslova i lako dostupan i ponovljiv pristup pojedinačnim ćelijama (Goshi et al., 2020; Slovinska et al., 2016).

Ćelijska migracija i proliferacija su glavni mehanizmi kroz koje se tkivo obnavlja i ponovo naseljava nakon povrede (Cavanagh, 1970; Giordana et al., 1994; Latov et al., 1979; Liddelov et al., 2020; K. S. Midwood & Orend, 2009; Rhodes et al., 2003). Za TnC se pokazalo da ima i adhezivne i antiadhezivne efekte za različite ćelije usled različite funkcije njegovih domena, postojanja višestrukih partnera za vezivanje i naknadne nizvodne unutarćelijske signalizacije (Chiquet-Ehrismann, 1991; Scholze et al., 1996). Istovremeno postojanje pro- i anti- adhezivnih funkcija je osnova procesa ćelijske migracije. Kada su različiti domeni TnC analizirani pojedinačno, Fn1-3 ponovci su prepoznati kao mesta za promociju vezivanja ćelija, zajedno sa Fn7,8 i FG motivom na C-terminusu, a za Fn1-3 domen je pokazano da podržava rast i diferencijaciju cerebelarnih neurona *in vitro* (Gotz et al., 1996). S druge strane, EGFL ponovcima, Fn4-5 i alternativno prekrojenom regionu se uglavnom pripisuju anti-adhezivna svojstva (Gotz et al., 1996; Prieto et al., 1992; Scholze et al., 1996). Za TnC, a pogotovo za FnB i FnD je pokazano u različitim studijama da promovišu razrastanje neurita (Crossin et al., 1990; Faissner, 1997; Gotz et al., 1996; Husmann et al., 1992; Lochter & Schachner, 1993). Oдавно je ustanovljeno da TnC, a posebno njegovi alternativno prekrojeni domeni indukuju dozno-zavisnu redukciju fokalne adhezije, kao što je prvo pokazano u slučaju goveđih endotelnih ćelija (Murphy-Ullrich et al., 1991) i to posredovano vezivanjem za aneksin II (Chung & Erickson, 1994). Chung i kolege su takođe prijavili da gubitak fokalne adhezije nakon vezivanja FnA-D za aneksin II podstiče ćelijsku migraciju u slučaju indukovane povrede u endotelijalnoj ćelijskoj liniji (Chung et al., 1996).

Dualni efekti TnC su prijavljivani i u pogledu ćelijske proliferacije. Naime, poznato je da TnC promoviše proliferaciju u kanceru, ali suprimira ili inhibira u slučaju fibroblasta (Yoshida et al., 2015). Dok konstitutivno eksprimirani domeni Fn1-5 i 6-8 promovišu adheziju i proliferaciju humanih hematopoetskih ćelija (Seiffert et al., 1998), u ovoj studiji smo primetili smanjenje proliferacije astrocita u graničnom regionu povrede nakon tretmana fragmentima FnA, FnD, Fn6-8 i EGFL. Crossin i kolege su pokazali da egzogeno dodat TnC inhibira proliferaciju fibroblasta *in vitro*, čak i u prisustvu mitogenih stimulatora kao što su faktori rasta i promoteri tumora izazivajući ranu inhibiciju unutar alkalizacije koja se dešava pri mitogenoj stimulaciji (Crossin, 1991). Druga studija je pokazala da TnC inhibira adheziju i proliferaciju fibroblasta zavisnih od usidrenja tako što redukuje aktivnost ciklin-zavisne kinaze 2 i zaustavlja ćelije u G1/S fazi ćelijskog ciklusa, interferirajući sa fibronektin-sindekan -4 interakcijama (Orend et al., 2003).

U ovoj studiji, nedostatak TnC u TnC^{-/-} u poređenju sa TnC^{+/+} kulturama izolovanih astrocita u 24h od povrede doveo je do povećane proliferacije u astrocitnom frontu, ali kako je povreda sporije zarastala, može se zaključiti da ovaj nedostatak na neki način inhibirao migraciju astrocita u sam region povrede i da su se oni koncentrisali u graničnom regionu. Nedostatak TnC u TnC^{-/-} u poređenju sa TnC^{+/+} mešovitim kulturama u prva 24h od povrede je slično doveo do povećane gustine astrocita u graničnom regionu, iako ovde nije primećena promena u stopi proliferacije. Nedostatak TnC u mešovitim kulturama u toku prva 24h od povrede nije uticao na gustinu i proliferaciju astrocita u regionu povrede u kome ih je svakako u ovom periodu bilo daleko manje u odnosu na mikrogliju, dok je znatno povećao i gustinu i proliferaciju mikroglijalnih ćelija. Kako je u slučaju mešovitih kultura u 24h od povrede uočeno brže zatvaranje povrede u TnC^{-/-} u odnosu na TnC^{+/+} kulture, može se zaključiti da na migraciju astrocitnog fronta u mešovitoj kulturi očigledno utiče neka komponenta koja izostaje u čistim kulturama astrocita. To mogu biti same mikroglijalne ćelije, sekretovani citokini, hemoatraktanti, ali i diferencijalna ekspresija receptora na astrocitima u čistim i mešovitim kulturama. Fragmenti TnC, egzogeno dodati u čistim kulturama astrocita, su usporavali zatvaranje povrede i smanjivali proliferaciju u astrocitnom frontu u prva 24h od povrede. FnD u mešovitoj kulturi u graničnom regionu povrede je takođe doveo do smanjenja proliferacije astrocita mada nešto kasnije, u periodu druga 24h od povrede.

Što se tiče mikroglije, odustvo TnC u TnC^{-/-} mešovitim kulturama je promovisalo proliferaciju i najverovatnije migraciju mikroglije u region povrede jer je njihova gustina bila veća u odnosu na TnC^{+/+} kulture. Ovaj efekat je izostao u graničnom regionu. Sa FnD tretmanom, stopa proliferacije mikroglije je bila redukovana u regionu povrede tokom 48h nakon SW, a u graničnom regionu tek u druga 24h od povrede. Tretman FnD je redukovao i gustinu mikroglije u regionu povrede tokom 48h u TnC^{-/-} kulturama, smanjivši njihovu proliferaciju ali potencijalno i migraciju dok nije imao uticaja na gustinu astrocita tokom prva 24h ali je intenzivno promovisao njihovu migraciju u region povrede u druga 24h nakon SW.

In vivo nije primećena razlika između TnC^{-/-} i TnC^{+/+} miševa u ukupnoj stopi proliferacije ćelija u regionu povrede u 7. danu od povrede. Izostanak razlika se može pripisati prisustvu brojnih drugih ćelijskih tipova na čiju proliferaciju TnC tj. njegovo odsustvo može uticati diferencijalno usled različitih eksprimiranih receptora, ili vremenskom periodu u kome je efekat posmatran.

Među najvažnijim vezivnim partnerima TnC su integrini, transmembranski receptori koji su uključeni u interakcije ćelija sa drugim ćelijama i ECM i koji modulišu ćelijski rast, adheziju, migraciju, proliferaciju, signalizaciju i produkciju citokina (Sriramarao et al., 1993). Za kombinacije heterodimera integrina $\alpha 2/7/8/9\beta 1$ i $\alpha \beta 1/3/6$ se zna da posreduju u signalizaciji između ćelija i TnC (Yoshida et al., 2015). Interakcije sa $\alpha 9\beta 1$ i $\alpha V\beta 3$ promovišu ćelijsku proliferaciju, a migracija je i stimulirana i inhibirana ovim interakcijama. Za $\alpha 7\beta 1$ je pokazano da se specifično vezuje za FnD i promovise razrastanje cerebelarnih granularnih neurona (Tucker & Chiquet-Ehrismann, 2015). U ovoj studiji, uočili smo dve trake $\beta 1$ integrina u mešovitim kulturama astrocita i mikroglije, koje odgovaraju literaturno opisanim izoformama $\beta 1$ integrina: 115kDa parcijalno glikozilovana i 130 kDa zrela izoforma. Dodatak FnD je u našim eksperimentima indukovao značajno veću ekspresiju prekursorske izoforme. Jedna studija je prijavila da prekomerna ekspresija Nm23 metastatskog supresornog gena u ćelijskoj liniji hepatokarcinoma rezultuje dvema tipičnim $\beta 1$ integrinskim trakama kao i da je povećana ekspresija prekursorske trake u odnosu na zrelu formu (She et al., 2010). Ovaj efekat je pripisan narušenoj glikozilaciji $\beta 1$ integrinskog prekursora što je potom smanjilo nivo eksprimiranog $\beta 1$ integrina na površini ćelije i rezultovalo smanjenom interakcijom sa fibronektinom, narušenom fokalnom adhezijom, formiranjem aktinskog citoskeleta i ćelijskom migracijom. Integrini stalno prolaze kroz endocitotski put recikliranja što je osnova procesa ćelijske adhezije i migracije (Moreno-Layseca et al., 2019). Pokazano je da su mesta za N-glikozilaciju na monomerima integrina esencijalna za internalizaciju, jer su u njihovom odsustvu internalizacija i širenje ćelija po podlozi bili inhibirani, a promovisana je fokalna adhezija (Hang et al., 2017; Isaji et al., 2009). Sindekan-4 i aneksin II koji su poznati vezivni partneri TnC su takođe identifikovani i kao neki od ključnih

kontrolora integrinskog reciklažnog puta (Morgan et al., 2013; Rankin et al., 2013). Kroz aktivnost proteolitičkih enzima i konformacione promene, inače skrivena mesta proteina ECM bivaju sečena na biološki aktivne fragmente, poznate još i kao matrikriptine. Za fibronektin je poznato da ima FNIII14, 22-merni matrikriptin koji suprimira β 1-integrinom posredovanu ćelijsku adheziju za fibronektin. Za sličan matrikriptin u TnC, TnIIIA2, je pokazano da stimuliše ćelijsku adheziju promovišući interakciju β 1 integrina sa sindekanom-4 (Saito et al., 2007).

Jedan od bitnih vezivnih partnera TnC je i TLR4 preko kog se kroz interakciju sa TnC reguliše hemotaksa, fagocitoza kao i produkcija proinflamatornih citokina (Haage et al., 2019; Marzeda & Midwood, 2018; K. Midwood et al., 2009). Aktiviranjem TLR4 TnC promovise sekreciju proinflamatornih medijatora (IL-6, IL-8 i TNF) u raznim ćelijskim tipovima kao što su makrofagi, dendritske ćelije, fibroblasti i hondrociti (Zuliani-Alvarez et al., 2017). Ovo takođe dovodi i do aktivacije inflamazoma i posledične produkcije IL-1 β i IL-18 (Broz & Dixit, 2016). U ovoj studiji smo pokazali da tretman fragmentima FnA, FnD, Fn6-8 i EGFL nakon SW dovodi do povećanja nivoa proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β u kulturi astrocita. U kokulturi mikroglije i astrocita, takođe smo pokazali da tretman FnD značajno podiže nivoe iRNK za *Tnfa* i *Il1b* kao i koncentraciju oslobođenih TNF- α i IL-1 β u medijumu u većoj meri u odnosu na čiste kulture astrocita, što ukazuje na reaktivni i inflamatorni fenotip i mikroglije i astrocita (Orihuela et al., 2016; Walker et al., 2014).

Povećana ekspresija GFAP na nivou iRNK i proteina je često povezivana sa reaktivnošću astrocita u raznim patološkim uslovima, degenerativnim poremećajima kao i početnim fazama nakon povrede (ben Haim & Rowitch, 2016; Escartin et al., 2019). Kako se pokazalo da se astrociti u raznim regionima CNS razlikuju, između ostalog i po nivou ekspresije GFAP, kao i kapacitetu da menjaju njegovu ekspresiju, a potom i da je ekspresija GFAP promenljiva i u fiziološkim uslovima, sve više se smatra da može biti indikator reaktivnog remodelovanja, ali ne samostalno, već uz procenu i nekoliko dodatnih markera reaktivnosti (Escartin et al., 2021).

U našim eksperimentima, TnC^{-/-} kulture čistih astrocita pokazivale su konzistentno povećanu ekspresiju GFAP na proteinskom i genskom nivou, nezavisno od tipa fragmenata korišćenih u tretmanu. Kako je prethodno pokazano, ekspresija GFAP bila je povećana i u kičmenoj moždini TnC^{-/-} embriona, međutim ova razlika nije uočena kasnije u adultnim kičmenim moždinama nepovređenih miševa (Karus et al., 2011). U našoj studiji in vivo, 7 dana nakon povrede kičmene moždine, imunoreaktivnost GFAP bila je ista u kontrolnim TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševima kao i miševima tretiranim FnA. Injektovanje FnD ili Fn(D+A) dovelo je do razlike između genotipova, pri čemu je ekspresija GFAP bila veća u TnC^{+/+} u odnosu na TnC^{-/-} miševe.

Proizvodnja iNOS je jedno od obeležja proinflamatornog fenotipa mikroglije dok je Arg1 prisutna više u pro-rezolucionom fenotipu (Cherry et al., 2014). Aktivacija TLR 4 podiže i nivoe ekspresije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze i produkcije iNOS (Deng et al., 2015). Naši eksperimenti su pokazali da nakon tretmana FnD dolazi do povećanja nivoa iRNK za iNOS, a u slučaju 24h kasnije dodatog FnD primećena je i specifična izražena imunoreaktivnost prisutna na pojedinim mikroglijalnim ćelijama uglavnom u regionu povrede. *Arg1* iRNK nivoi su sa druge strane bili povišeni samo u mešovitim kulturama u grupama tretiranim FnD u periodu od 48h i to više u TnC^{+/+} kulturama ukazujući na to da možda u tom periodu takođe počinje da se ispoljava i pro-rezolutivni fenotip. Ovo može biti od posebnog značaja u kontekstu trajanja različitih efekata FnD, jer je dobro poznato da, pogotovo u slučaju kičmene moždine, ne dolazi do rezolucije nakon povrede već održavanja hronične inflamacije (Ahuja et al., 2017).

Dalje smo potvrdili razvoj inflamatornog fenotipa mikroglije u mešovitim kulturama u regionu povrede kroz morfološke promene koje se dešavaju nakon FnD tretmana. Dodavanje FnD promovise nastajanje zadebljanih nastavaka i prisustvo većeg broja tankih filopodija što značajno uvećava površinu ćelije, njen perimenter i indeks hrapavosti. Za tanke nastavke je pokazano da su to aktivne filopodije odgovorne za brzu detekciju signala u diskretnim regionima (Bernier et al., 2019).

Treba naglasiti da su morfometrijske promene indukovane FnD tretmanom bile manje izražene u TnC-/- kulturama u poređenju sa SW kontrolom, pogotovo u prvih 24h nakon povrede, ukazujući da samo odsustvo TnC promoviše pojavu uvećanih ćelija sa više filopodija. Jedna od osnovnih uloga mikroglije je nadgledanje moždanog parenhima kroz kontinuirano pokretanje nastavaka (Nimmerjahn et al., 2005). U odgovoru na povredu, mikroglija prolazi kroz morfološke promene koje se kreću od uvećanja ćelijskih tela i nastanka debljih nastavaka do smanjenja i postizanja gotovo ameboidne morfologije usled aktivacije P2Y receptora oslobođenim ATP (Davalos et al., 2005; Davis et al., 1994; Morrison et al., 2017). Za P2Y12R se pokazalo da je vrlo važan za polarizaciju, migraciju i izduživanje nastavaka mikroglije prema hemotaktinima oslobođenim u regionu povrede kao i da nakon aktivacije mikroglije dolazi do smanjenja ekspresije ovog receptora (Haynes et al., 2006). Nasu-Tada i kolege su hipotezirali da aktivacija P2Y12R u povredi od strane ATP i ADP dovodi do premeštanja β 1 integrina u nabore membrane što smanjuje adheziju i proliferaciju, a promoviše migraciju ćelija u region povrede (Nasu-Tada et al., 2005). P2Y12R je intenzivno izučavan i u krvnim pločicama jer je neophodan za njihovu aktivaciju. U fiziološkim uslovima u krvnim pločicama P2Y12R se nalazi uglavnom u lipidnim raftovima u formi homooligomera, ali tretman klopogrelom koji sprečava formiranje ugrušaka izaziva disocijaciju u nefunkcionalne dimere i monomere koji se nalaze van lipidnih raftova (Savi et al., 2006). Funkcionalni oligomeri P2Y12R su veličine oko 220 kDa, dok su monomeri tj. dimeri veličine oko 40 kDa, odnosno 80 kDa (Y. Zhang et al., 2015). U našoj studiji, samo nakon FnD tretmana primećena je dodatna traka P2Y12R na oko 35kDa, koja odgovara monomernoj izoformi. U opsegu dimera, jači intenzitet gornjih traka je primećen samo u FnD tretiranim grupama, a efekat je bio izraženiji u TnC^{+/+} kulturama. Bez obzira da li FnD dovodi do *de novo* sinteze P2Y12R ili ima ulogu u njegovoj de-oligomerizaciji koja rezultuje pojavom monomernih traka, jasno je da FnD utiče na ekspresiju P2Y12R izoformi. Pokazano je da je P2Y12R na mikrogliji neophodan za detekciju ATP i ADP koji potiču od neuronske aktivnosti (Badimon et al., 2020). Na mikroglijalnim nastavcima se nalaze ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza 1 (NTPDaza 1) i ekto-5'-nukleotidaza (CD73), ektoenzimi odgovorni za konverziju ATP i ADP u adozin koji preko A1 receptora na membrani neurona smanjuje njihovu preteranu aktivaciju i moduliše njihovu ulogu u fiziološkim uslovima, ali i u bolesti (Badimon et al., 2020). Csrep i kolege su pokazali da u ishemijskoj povredi striatuma mikroglija pri promenama neuronske aktivnosti povećava broj nastavaka kojima ih prekriva, kao i da je proces zavisian od P2Y12R, jer inhibicija ovog receptora je dovela do manje prekrivenosti neurona, izmenjene funkcionalne konektivnosti, povećanja regiona povrede i sveukupno pogoršanog neurološkog ishoda (Cserép et al., 2020). Uzevši sve u obzir, povećanje intenziteta prekursorske izoforme β 1 integrina kao i pojava monomernih traka P2Y12R impliciraju da FnD domen TnC utiče na sled događaja nakon povrede u pogođenom regionu i okruženju ograničavajući proliferaciju mikroglije i infiltraciju u region povrede, ali pojačavajući njihov inflamatorni fenotip i izazivajući migraciju astrocita u region povrede.

In vivo, astrociti i mikroglija su pokazivali tipičnu morfologiju karakterističnu za region povrede, sa poligonalnim sitnijim mikroglijalnim ćelijama, ovičenim astrocitima, dok se njihova morfologija postepeno menjala ka normalnom fiziološkom fenotipu u distalnim rostralnim i kaudalnim regionima kičmene moždine miševa. Rezultati ove studije na mikrogliji/makroflagima u odgovoru na povredu su ukazali da FnD fragment povećava broj aktivirane mikroglije/makrofaga u samom regionu povrede.

Tretman FnD u našoj studiji je pokazao prostorno i vremenski različite efekte na mikrogliju i astrocite u leziji. U *in vivo* povredi, mikroglija ulazi u region povrede pre astrocita što je i uočeno u našim kontrolnim grupama u mešovitim kulturama. Odsustvo TnC je dodatno istaklo ovaj efekat na šta ukazuju povećana gustina i stopa proliferacije mikroglije, dok je FnD tretman značajno redukovao gustinu i proliferaciju mikroglije, promovisao njihov aktivirani fenotip. Sa druge strane, FnD je indukovao migraciju astrocita u region povrede, ali nije uticao na njihovu stopu proliferacije. Mander i kolege su pokazali da je stopa proliferacije mikroglije pacova *in vitro* regulisana vodonik

peroksidom proizvedenim od strane NADPH oksidaze nakon stimulacije proinflamatornim citokinima IL-1 β i TNF- α , jer je potpuno ukinuta primenom inhibitora NADPH oksidaze, dok nije bilo nikakvog efekta na proliferaciju astrocita (Mander et al., 2006). Dodatno, pokazano je da astrociti i mikroglia imaju drugačiji odgovor na model indukovane inflamacije. Naime, u toj studiji je pokazano da dok reaktivirani astrociti povećano oslobađaju IL-6, prostaglandin 2 i ciklooksigenazu 2, proinflamatorni fenotip mikroglije odlikuje povećano oslobađanje IL-1 β , TNF- α , azot oksida, iNOS i aktivacija STAT3 (Lu et al., 2014). Iako oba ćelijska tipa eksprimiraju integrine i TLR4, vreme njihove aktivacije i nishodna signalizacija se razlikuju, na šta ukazuje i različita dinamika Ca²⁺ signalizacije u ova dva tipa ćelija (Rieder et al., 2022). Astrociti i mikroglia eksprimiraju veliki broj P2Y i P2X receptora, međutim ovi receptori su diferencijalno aktivirani nukleotidima u zavisnosti od promena patofizioloških uslova i dalje posreduju u različitim dugoročnim promenama ovih ćelija tokom inflamatorne glioze (Abbracchio & Ceruti, 2006).

Vreme i mesto oslobađanja TnC su od ključnog značaja za njegovu ulogu. U slučaju povrede epitela je pokazano da se prvo u regionu povrede deponuje privremeni fibrin-fibronektin matriks u kome su fibroblasti ukotvljeni pomoću aktinskih stresnih vlakana, a kako se povreda sanira, matriks se kontrahuje. TnC se, međutim sintetise u graničnim regionima povrede gde sprečava formiranje aktinskih stresnih vlakana i fokalnu adheziju kroz inhibiciju kinaze fokalne adhezije (engl. *Focal adhesion kinase*, FAK) i RhoA (engl. *Ras homolog gene family, member A*) aktivnosti i time promoviše pokretni fenotip i sprečava prevremenu kontrakciju matriksa (K. S. Midwood & Schwarzbauer, 2002). U našem modelu FnD je primenjen egzogeno, međutim *in vivo*, FnD nastao proteolitičkim sečenjem od strane MMP bi bio ograničen na specifične regione uglavnom u graničnoj zoni gde su locirani astrociti. Stoga je moguće da u graničnoj zoni FnD inhibira prekomernu proliferaciju mikroglije i promoviše pokretni fenotip astrocita da bi funkcionalno odvojio region povrede od okružujućeg tkiva. Ovi nalazi bi verovatno bili još kompleksniji u model sistema sa još više različitih ćelijskih tipova. Naši rezultati pružaju nov pogled na važnost TnC i njegovih brojnih uloga, a dalji eksperimenti uključujući 3D i organotipske kulture kao i *in vivo* eksperimente su potrebni kako bi se primećeni efekti pozicionirali precizno u sledu događaja nakon povrede.

Zaključci

Vodeći se postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i analizom dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Nedostatak TnC dovodi do povećanja proliferacije i gustine mikroglije u regionu povrede kao i grupisanja astrocita u graničnom regionu gde doprinose bržem zatvaranju povrede.
2. Fragmenti TnC, a posebno FnD utiču na lokalizaciju, gustinu i proliferaciju mikroglije i astrocita u modelu povrede *in vitro* i *in vivo*
 - Dodati fragmenti TnC, FnD, FnA, Fn6-8, Fn(D+A), Fn(D+A+C) dovode do usporavanja zatvaranja povrede u kulturi astrocita, a najizraženiji efekat uočen je nakon tretmana sa fragmentima FnD, FnA i Fn(D+A).
 - Dodati fragmenti TnC, FnD, FnA, FnC, Fn6-8, EGFL, Fn(D+A), Fn(D+A+C) smanjuju proliferaciju u astrocitnom frontu u 24h nakon povrede u kulturi astrocita
 - FnD u mešovitoj kulturi astrocita i mikroglije u graničnom regionu smanjuje proliferaciju astrocita u 48h od povrede, dok u regionu povrede ne utiče na proliferaciju astrocita, a podstiče njihovu migraciju u povredu u 48h
 - FnD smanjuje gustinu mikroglije u mešovitoj kulturi astrocita i mikroglije u regionu povrede tokom 48h od povrede, delom na račun smanjene proliferacije, a potencijalno i na račun smanjene migracije kao i zbog kontaktne inhibicije između uvećanih FnD-tretiranih mikroglijalnih ćelija.
 - FnD tretman ne dovodi do promene ukupne stope proliferacije ćelija u regionu kompresione povrede kičmene moždine miševa 7 dana od indukovanja povrede, ali u povredama u TnC^{-/-} miševima dovodi do povećane gustine aktivirane mikroglije/makrofaga u regionu povrede.
3. Fragmenti proteina TnC podstiču razvoj proinflamatornog fenotipa astrocita i mikroglije *in vitro*.
 - Fragmenti proteina TnC, FnD, FnA, Fn6-8, EGFL dovode do povećane sinteze proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β u kulturi astrocita 24h nakon povrede, dok FnD takođe povećava sintezu TNF- α i IL-1 β u mešovitoj kulturi astrocita i mikroglije tokom 48h od povrede
 - FnD utiče na razvoj proinflamatorne morfologije mikroglije i povećanje ekspresije iNOS.
4. FnD ostvaruje ulogu u promeni morfologije i pokretljivosti ćelija potencijalno kroz povećanje ekspresije prekursorske forme β 1 integrina i ekspresiju monomera P2Y12R.

Sveukupno rezultati ove studije ukazuju na kompleksnu i raznovrsnu ulogu TnC, a posebno FnD u tekućoj inflamaciji nakon povrede i prostornoj i vremenskoj organizaciji regiona povrede i neposrednog okruženja.

Literatura

- Abbracchio, M. P., & Ceruti, S. (2006). Roles of P2 receptors in glial cells: Focus on astrocytes. *Purinergic Signalling*, 2(4), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0>
- Adzic, M., & Nedeljkovic, N. (2018). Unveiling the role of Ecto-5'-nucleotidase/CD73 in astrocyte migration by using pharmacological tools. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00153>
- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
- Akbareian, S. E., Nagy, N., Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., Molnar, D., & Goldstein, A. M. (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Developmental Biology*, 382(2), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.08.006>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. v. (2016). Astrocyte scar formation AIDS central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 208–215.
- Assinck, P., Duncan, G. J., Plemel, J. R., Lee, M. J., Stratton, J. A., Manesh, S. B., Liu, J., Ramer, L. M., Kang, S. H., Bergles, D. E., Biernaskie, J., & Tetzlaff, W. (2017). Myelinogenic plasticity of oligodendrocyte precursor cells following spinal cord contusion injury. *Journal of Neuroscience*, 37(36), 8635–8654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2409-16.2017>
- Badimon, A., Strasburger, H. J., Ayata, P., Chen, X., Nair, A., Ikegami, A., Hwang, P., Chan, A. T., Graves, S. M., Uweru, J. O., Ledderose, C., Kutlu, M. G., Wheeler, M. A., Kahan, A., Ishikawa, M., Wang, Y. C., Loh, Y. H. E., Jiang, J. X., Surmeier, D. J., ... Schaefer, A. (2020). Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*, 586(7829), 417–423. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2777-8>
- Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. In *Neuron* (Vol. 60, Issue 3, pp. 430–440). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
- Bartus, K., Burnside, E. R., Galino, J., James, N. D., Bennett, D. L. H., & Bradbury, E. J. (2019). ErbB receptor signaling directly controls oligodendrocyte progenitor cell transformation and spontaneous remyelination after spinal cord injury. *GLIA*, 67(6), 1036–1046. <https://doi.org/10.1002/glia.23586>
- Beck, K. D., Nguyen, H. X., Galvan, M. D., Salazar, D. L., Woodruff, T. M., & Anderson, A. J. (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133(2), 433–447. <https://doi.org/10.1093/brain/awp322>
- Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M. E., Vernoux, N., Tremblay, M. È., Fuehrmann, T., Shoichet, M. S., & Lacroix, S. (2019). Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08446-0>

- ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 1, pp. 31–41). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1738–E1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Bernier, L. P., Bohlen, C. J., York, E. M., Choi, H. B., Kamyabi, A., Dissing-Olesen, L., Hefendehl, J. K., Collins, H. Y., Stevens, B., Barres, B. A., & MacVicar, B. A. (2019). Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Reports*, *27*(10), 2895–2908.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.010>
- Berns, E. J., Álvarez, Z., Goldberger, J. E., Boekhoven, J., Kessler, J. A., Kuhn, H. G., & Stupp, S. I. (2016). A tenascin-C mimetic peptide amphiphile nanofiber gel promotes neurite outgrowth and cell migration of neurosphere-derived cells. *Acta Biomaterialia*, *37*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.010>
- Bijelić, D. D., Milićević, K. D., Lazarević, M. N., Miljković, D. M., Bogdanović Pristov, J. J., Savić, D. Z., Petković, B. B., Andjus, P. R., Momčilović, M. B., & Nikolić, L. M. (2020). Central nervous system-infiltrated immune cells induce calcium increase in astrocytes via astroglial purinergic signaling. *Journal of Neuroscience Research*, *98*(11), 2317–2332. <https://doi.org/10.1002/jnr.24699>
- Bouma, G. J., Muizelaar, J. P., Stringer, W. A., Ci4oi, S. C., & Young, H. F. (1992). Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. In *J Neurosurg* (Vol. 77).
- Bradbury, E. J., & Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. In *Nature Communications* (Vol. 10, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., & Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(1), 145–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20041918>
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2004). Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 24, Issue 2, pp. 133–150). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 407–420). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. v. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. In *Neuron* (Vol. 81, Issue 2, pp. 229–248). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Carpenter, K. L. H., Jalloh, I., & Hutchinson, P. J. (2015). Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00112>

- Cavanagh, J. B. (1970). The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. In *J. Anat* (Vol. 106, Issue 3).
- Chen, G., Zhang, Y. Q., Qadri, Y. J., Serhan, C. N., & Ji, R. R. (2018). Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. In *Neuron* (Vol. 100, Issue 6, pp. 1292–1311). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.009>
- Chen, J., Joon Lee, H., Jakovcevski, I., Shah, R., Bhagat, N., Loers, G., Liu, H. Y., Meiners, S., Taschenberger, G., Kügler, S., Irintchev, A., & Schachner, M. (2010). The extracellular matrix glycoprotein tenascin-c is beneficial for spinal cord regeneration. *Molecular Therapy*, *18*(10), 1769–1777. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.133>
- Chen, Y., He, Y., & DeVivo, M. J. (2016). Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972–2014. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *97*(10), 1610–1619. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2016.03.017>
- Cheng, G., Kong, R. H., Zhang, L. M., & Zhang, J. N. (2012). Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 167, Issue 4, pp. 699–719). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02025.x>
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 11). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
- Chiovaro, F., Chiquet-Ehrismann, R., & Chiquet, M. (2015). Transcriptional regulation of tenascin genes. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 9, Issues 1–2, pp. 34–47). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008333>
- Chiquet, M. (1992). Tenascin: An extracellular matrix protein involved in morphogenesis of epithelial organs. *Kidney International*, *41*(3), 629–631. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.96>
- Chiquet-Ehrismann, R. (1991). *Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix*.
- Chiquet-Ehrismann, R., & Tucker, R. P. (2011). Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(5), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004960>
- Choo, A. M., Liu, J., Lam, C. K., Dvorak, M., Tetzlaff, W., & Oxland, T. R. (2007). Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. In *J. Neurosurg: Spine* (Vol. 6).
- Chung, C. Y., & Erickson, H. P. (1994). *Cell Surface Annexin II Is a High Affinity Receptor for the Alternatively Spliced Segment of Tenascin-C*.
- Chung, C. Y., Murphy-Ullrich, J. E., & Erickson, H. P. (1996). Mitogenesis, Cell Migration, and Loss of Focal Adhesions Induced by Tenascin-C Interacting with Its Cell Surface Receptor, Annexin II. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 7).
- Coles, J. P., Fryer, T. D., Smielewski, P., Chatfield, D. A., Steiner, L. A., Johnston, A. J., Downey, S. P. M. J., Williams, G. B., Aigbirhio, F., Hutchinson, P. J., Rice, K., Carpenter, T. A., Clark, J. C., Pickard, J. D., & Menon, D. K. (2004). Incidence and Mechanisms of Cerebral Ischemia in Early Clinical Head Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *24*(2), 202–211. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000103022.98348.24>

- Cripps, R. A., Lee, B. B., Wing, P., Weerts, E., MacKay, J., & Brown, D. (2011). A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: Towards a living data repository for injury prevention. In *Spinal Cord* (Vol. 49, Issue 4, pp. 493–501). <https://doi.org/10.1038/sc.2010.146>
- Crossin, K. L. (1991). Cytotactin binding: Inhibition of stimulated proliferation and intracellular alkalization in fibroblasts (morphogene^{sl}/growth control/second messengersx/telilar matrix). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Crossin, K. L., Prieto, A. L., Hoffman, S., & Jones, F. S. (1990). REVIEW Expression of Adhesion Molecules and the Establishment of Boundaries during Embryonic and Neural Development. In *EXPERIMENTAL NEUROLOGY* (Vol. 109).
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénárt, N., Fekete, R., László, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlág, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczky, Z., ... Dénes, Á. (2020). Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*, 367(6477), 528–537. <https://doi.org/10.1126/science.aax6752>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. v., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- David, S., & Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 12, Issue 7, pp. 388–399). <https://doi.org/10.1038/nrn3053>
- Davis, E. J., Foster, T. D., ~0~s', W. E., & Cetluiur, W. E. T. (1994). Cellular Forms and Functions of Brain Microglia. In *Pergamon Brain Research Bulletin* (Vol. 34, Issue 1).
- Deng, S., Yu, K., Zhang, B., Yao, Y., Wang, Z., Zhang, J., Zhang, X., Liu, G., Li, N., Liu, Y., & Lian, Z. (2015). Toll-Like Receptor 4 Promotes NO Synthesis by Upregulating GCHI Expression under Oxidative Stress Conditions in Sheep Monocytes/Macrophages. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/359315>
- Dewitt, D. S., & Prough, D. S. (2003). Traumatic Cerebral Vascular Injury: The Effects of Concussive Brain Injury on the Cerebral Vasculature. In *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* (Vol. 20, Issue 9).
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). *FREE RADICAL-INDUCED DAMAGE TO DNA: MECHANISMS AND MEASUREMENT*.
- Donovan, J., & Kirshblum, S. (2018). Clinical Trials in Traumatic Spinal Cord Injury. In *Neurotherapeutics* (Vol. 15, Issue 3, pp. 654–668). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0632-5>
- Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D., & Schachner, M. (1996). Distinct Effects of Recombinant Tenascin-C Domains on Neuronal Cell Adhesion, Growth Cone Guidance, and Neuronal Polarity. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 43).
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., John Hurlbert, R., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). *Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms*.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000)*. In *Neurochemical Research* (Vol. 25, Issue 9).

- Erickson, H. P. (1993). Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 5).
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. In *Nature Neuroscience* (Vol. 24, Issue 3, pp. 312–325). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 12, pp. 2221–2247). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Evers, M. R., Salmen, B., Bukalo, O., Rollenhagen, A., Bö Sl, M. R., Morellini, F., Bartsch, U., Dityatev, A., & Schachner, M. (2002). *Impairment of L-type Ca 2 Channel-Dependent Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Deficient in the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-C.*
- Faissner, A. (1997). The tenascin gene family in axon growth and guidance. In *Cell Tissue Res* (Vol. 290). Springer-Verlag.
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. v. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2143–2155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>
- Fehlings, M. G., & Nguyen, D. H. (2010). Immunoglobulin G: A potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. In *Journal of Clinical Immunology* (Vol. 30, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9404-7>
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>
- Filous, A. R., Tran, A., James Howell, C., Busch, S. A., Evans, T. A., Stallcup, W. B., Kang, S. H., Bergles, D. E., Lee, S. il, Levine, J. M., & Silver, J. (2014). Entrapment via synaptic-like connections between NG2 proteoglycan + cells and dystrophic axons in the lesion plays a role in regeneration failure after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 34(49), 16369–16384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1309-14.2014>
- Fouda, G. G., Jaeger, F. H., Amos, J. D., Ho, C., Kunz, E. L., Anasti, K., Stamper, L. W., Liebl, B. E., Barbas, K. H., Ohashi, T., Moseley, M. A., Liao, H. X., Erickson, H. P., Alam, S. M., & Permar, S. R. (2013). Tenascin-C is an innate broad-spectrum, HIV-1-neutralizing protein in breast milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18220–18225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307336110>
- Frost, J. L., & Schafer, D. P. (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 26, Issue 8, pp. 587–597). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>
- Giblin, S. P., & Midwood, K. S. (2015). Tenascin-C: Form versus function. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 9, Issues 1–2, pp. 48–82). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.987587>

- Gilad, G. M., & Gilad, V. H. (2001). b-Aminopropionitrile treatment can accelerate recovery of mice after spinal cord injury. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 430). www.elsevier.com/locate/ejphar
- Giordana, M. T., Attanasio, A., Cavalla, P., Migheli, A., Vigliani, M. C., & Schiffer, D. (1994). Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain. In *Neuropathology and Applied Neurobiology* (Vol. 20).
- Goh, F. G., Piccinini, A. M., Krausgruber, T., Udalova, I. A., & Midwood, K. S. (2010). Transcriptional Regulation of the Endogenous Danger Signal Tenascin-C: A Novel Autocrine Loop in Inflammation. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2655–2662. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903359>
- Gonçalves, C. A., Concli Leite, M., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 41, Issues 10–11, pp. 755–763). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- Gordon, G. R. J., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. In *GLIA* (Vol. 55, Issue 12, pp. 1214–1221). <https://doi.org/10.1002/glia.20543>
- Goshi, N., Morgan, R. K., Lein, P. J., & Seker, E. (2020). A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01819-z>
- Gotz, B., Scholze, A., Clement, A., Joester, A., Schiitte, K., Wigger, F., Frank, R., Spiess, E., Ekblom, P., & Faissner, A. (1996). *Tenascin-C Contains Distinct Adhesive, Anti-Adhesive, and Neurite Outgrowth Promoting Sites for Neurons*.
- Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K. L., & Edelman, G. M. (1985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction (cell-cell adhesion/cell-substrate-adhesion molecule/embryogenesis). In *Developmental Biology* (Vol. 82).
- Haage, V., Elmadany, N., Roll, L., Faissner, A., Gutmann, D. H., Semtner, M., & Kettenmann, H. (2019). Tenascin C regulates multiple microglial functions involving TLR4 signaling and HDAC1. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 470–483. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.047>
- Hackett, A. R., & Lee, J. K. (2016). Understanding the NG2 glial scar after spinal cord injury. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00199>
- Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Wang, Y., Fukuda, T., & Gu, J. (2017). A Key Regulator of Cell Adhesion: Identification and Characterization of Important N -Glycosylation Sites on Integrin $\alpha 5$ for Cell Migration . *Molecular and Cellular Biology*, 37(9). <https://doi.org/10.1128/mcb.00558-16>
- Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. In *Spinal Cord* (Vol. 41, Issue 7, pp. 369–378). <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101483>
- Hawkins, L. A., & Devitt, A. (2013). Current understanding of the mechanisms for clearance of apoptotic cells—a fine balance. *Journal of Cell Death*, 6(1), 57–68. <https://doi.org/10.4137/JCD.S11037>

- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>
- Hesp, Z. C., Goldstein, E. A., Miranda, C. J., Kaspar, B. K., & McTigue, D. M. (2015). Chronic oligodendrogenesis and remyelination after spinal cord injury in mice and rats. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1274–1290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2568-14.2015>
- Husmann, K., Faissner, A., & Schachner, M. (1992). *Tenascin Promotes Cerebellar Granule Cell Migration and Neurite Outgrowth by Different Domains in the Fibronectin Type III Repeats*.
- Imai, K., Kusakabe, M., Sakakurac, T., Nakanishi, I., & Okada, Y. (1994). Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases and serine proteinases. In *FEBS Letters* (Vol. 352).
- Inoue, Y., Shiozaki, T., Tasaki, O., Hayakata, T., Ikegawa, H., Yoshiya, K., Fujinaka, T., Tanaka, H., Shimazu, T., & Sugimoto, H. (2005). Changes in Cerebral Blood Flow from the Acute to the Chronic Phase of Severe Head Injury. In *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* (Vol. 22).
- Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T., & Gu, J. (2009). N-glycosylation of the I-like domain of β 1 integrin is essential for β 1 integrin expression and biological function. Identification of the minimal N-glycosylation requirement for α 5 β 1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12207–12216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807920200>
- Jakovcevski, I., Miljkovic, D., Schachner, M., & Andjus, P. R. (2013). Tenascins and inflammation in disorders of the nervous system. In *Amino Acids* (Vol. 44, Issue 4, pp. 1115–1127). <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1446-0>
- Jakovcevski, I., Siering, J., Hargus, G., Karl, N., Hoelters, L., Djogo, N., Yin, S., Zecevic, N., Schachner, M., & Irintchev, A. (2009). Close homologue of adhesion molecule L1 promotes survival of purkinje and granule cells and granule cell migration during murine cerebellar development. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 496–510. <https://doi.org/10.1002/cne.21981>
- Jalloh, I., Carpenter, K. L. H., Grice, P., Howe, D. J., Mason, A., Gallagher, C. N., Helmy, A., Murphy, M. P., Menon, D. K., Carpenter, T. A., Pickard, J. D., & Hutchinson, P. J. (2015). Glycolysis and the pentose phosphate pathway after human traumatic brain injury: Microdialysis studies using 1,2-¹³C₂ glucose. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(1), 111–120. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.177>
- Joester, A., & Faissner, A. (1999). *Evidence for Combinatorial Variability of Tenascin-C Isoforms and Developmental Regulation in the Mouse Central Nervous System**. <http://www.jbc.org>
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Fischer, D., & Rgen Engel, J. (1998). *Tenascin-C Hexabrachion Assembly Is a Sequential Two-step Process Initiated by Coiled-coil-Helices**. <http://www.jbc.org/>
- Karperien, A. L. (2013). *FracLac for ImageJ*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4775.8402>
- Karus, M., Denecke, B., Ffrench-Constant, C., Wiese, S., & Faissner, A. (2011). The extracellular matrix molecule tenascin C modulates expression levels and territories of key patterning genes during spinal cord astrocyte specification. *Development*, 138(24), 5321–5331. <https://doi.org/10.1242/dev.067413>
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. v. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>

- Klapka, N., Hermanns, S., Straten, G., Masannek, C., Duis, S., Hamers, F. P. T., Müller, D., Zuschmitter, W., & Müller, H. W. (2005). Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 3047–3058. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04495.x>
- Klapka, N., & Müller, H. W. (2006). Collagen Matrix in Spinal Cord Injury. In *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* (Vol. 23, Issue 4).
- Környei, Z., Cziró, A., Vicsek, T., & Madarász, E. (2000). Proliferative and Migratory Responses of Astrocytes to In Vitro Injury. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 61).
- Környei, Z., Czirók, A., Vicsek, T., & Madarász, E. (2000). Proliferative and Migratory Responses of Astrocytes to In Vitro Injury. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 61).
- Krause, J. S., Sternberg, M., Lottes, S., & Maides, J. (1997). *Mortality After Spinal Cord Injury: An 11-Year Prospective Study*.
- Kwok, J. C. F., Dick, G., Wang, D., & Fawcett, J. W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1073–1089. <https://doi.org/10.1002/dneu.20974>
- Kwon, B. K., Tetzlaff, W., Grauer, J. N., Beiner, J., & Vaccaro, A. R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. In *Spine Journal* (Vol. 4, Issue 4, pp. 451–464). <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2003.07.007>
- Lam, D., Enright, H. A., Cadena, J., Peters, S. K. G., Sales, A. P., Osburn, J. J., Soscia, D. A., Kulp, K. S., Wheeler, E. K., & Fischer, N. O. (2019). Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40128-1>
- Lampugnani, M. G. (1999). Cell Migration into a Wounded Area Cell Migration into a Wounded Area In Vitro. In *From: Methods in Molecular Biology* (Vol. 96). Adhesion Protein Protocols.
- LaPlaca, M. C., Simon, C. M., Prado, G. R., & Cullen, D. K. (2007). CNS injury biomechanics and experimental models. In *Progress in Brain Research* (Vol. 161, pp. 13–26). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)61002-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)61002-9)
- Latov, N., Nilaver, G., Zimmerman, E. A., Johnson, W. G., Silverman, A.-J., Defendini, R., & Cote, L. (1979). Fibrillary Astrocytes Proliferate in Response to Brain Injury A Study Combining Immunoperoxidase Technique for Glial Fibrillary Acidic Protein and Radioautography of Tritiated Thymidine'. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 72).
- Laywell, E. D., Dorriest, U., Bartscht, U., Faissnert, A., Schachnert, M., & Steindler, D. A. (1992). Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury (brain wounds/astrocytes/regeneration/in situ hybridization/immunocytochemistry). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 89).
- Lenahan, B., Street, J., Kwon, B. K., Noonan, V., Zhang, H., Fisher, C. G., & Dvorak, M. F. (2012). The epidemiology of traumatic spinal cord injury in British Columbia, Canada. *Spine*, 37(4), 321–329. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31822e5ff8>
- Levine, J. (2016). The reactions and role of NG2 glia in spinal cord injury. In *Brain Research* (Vol. 1638, pp. 199–208). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.026>

- Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 225–242). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Liddelov, S. A., & Barres, B. A. (2016). Regeneration: Not everything is scary about a glial scar. In *Nature* (Vol. 532, Issue 7598, pp. 182–183). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature17318>
- Liddelov, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liddelov, S. A., Marsh, S. E., & Stevens, B. (2020). Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? In *Trends in Immunology* (Vol. 41, Issue 9, pp. 820–835). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.006>
- Liu, M., Wu, W., Li, H., Li, S., Huang, L. T., Yang, Y. Q., Sun, Q., Wang, C. X., Yu, Z., & Hang, C. H. (2015). Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *Journal of Spinal Cord Medicine*, *38*(6), 745–753. <https://doi.org/10.1179/2045772314Y.00000000224>
- Lochter, A. !, & Schachner, M. (1993). Tenascin and Extracellular Matrix Glycoproteins: From Promotion to Polarization of Neurite Growth in vitro. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 13, Issue g).
- Loers, G., & Schachner, M. (2007). Recognition molecules and neural repair. *Journal of Neurochemistry*, *101*(4), 865–882. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04409.X>
- Lu, Y., He, M., Zhang, Y., Xu, S., Zhang, L., He, Y., Chen, C., Liu, C., Pi, H., Yu, Z., & Zhou, Z. (2014). Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108318>
- Mander, P. K., Jekabsons, A., & Brown, G. C. (2006). Microglia Proliferation Is Regulated by Hydrogen Peroxide from NADPH Oxidase. *The Journal of Immunology*, *176*(2), 1046–1052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1046>
- Marzeda, A. M., & Midwood, K. S. (2018). Internal Affairs: Tenascin-C as a Clinically Relevant, Endogenous Driver of Innate Immunity. In *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Vol. 66, Issue 4, pp. 289–304). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1369/0022155418757443>
- Meiners, S., Nur-E-Kamal, M. S. A., Lynn, M., & Mercado, T. (2001). *Identification of a Neurite Outgrowth-Promoting Motif within the Alternatively Spliced Region of Human Tenascin-C*. <http://rsb.info.nih.gov/>
- Mercado, M. L. T., Nur-E-Kamal, A., Liu, H. Y., Gross, S. R., Movahed, R., & Meiners, S. (2004). Neurite Outgrowth by the Alternatively Spliced Region of Human Tenascin-C Is Mediated by Neuronal $\alpha 7\beta 1$ Integrin. *Journal of Neuroscience*, *24*(1), 238–247. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4519-03.2004>
- Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P., & Orend, G. (2016). Tenascin-C at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(23), 4321–4327. <https://doi.org/10.1242/jcs.190546>

- Midwood, K. S., Hussenet, T., Langlois, B., & Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 19, pp. 3175–3199). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0783-6>
- Midwood, K. S., & Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. In *Journal of Cell Communication and Signaling* (Vol. 3, Issues 3–4, pp. 287–310). <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0075-1>
- Midwood, K. S., & Schwarzbauer, J. E. (2002). Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(10), 3601–3613. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-05-0292>
- Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A. M., Inglis, J., Trebault, A., Chan, E., Drexler, S., Sofat, N., Kashiwagi, M., Orend, G., Brennan, F., & Foxwell, B. (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Medicine*, *15*(7), 774–780. <https://doi.org/10.1038/nm.1987>
- Miura, Y., Tanemura, H., Fujimoto, M., Hamada, K., Miyamoto, K., Toma, N., Imanaka-Yoshida, K., Matsushima, S., Yoshida, T., Taki, W., & Suzuki, H. (2016). Aneurysm Organization Effects of Gellan Sulfate Core Platinum Coil with Tenascin-C in a Simulated Clinical Setting and the Possible Mechanism. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *25*(4), 771–780. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.12.010>
- Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2019). Integrin trafficking in cells and tissues. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 122–132). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0223-z>
- Morgan, M. R., Hamidi, H., Bass, M. D., Warwood, S., Ballestrem, C., & Humphries, M. J. (2013). Syndecan-4 Phosphorylation Is a Control Point for Integrin Recycling. *Developmental Cell*, *24*(5), 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.027>
- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
- Murphy-Ullrich, J. E., Lightner, V. A., Aukhil, I., Yan, Y. Z., Erickson, H. P., & Hook, M. (1991). Focal Adhesion Integrity Is Downregulated by the Alternatively Spliced Domain of Human Tenascin. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 115).
- Nasu-Tada, K., Koizumi, S., & Inoue, K. (2005). Involvement of $\beta 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: Different regulations by ADP through PKA. *GLIA*, *52*(2), 98–107. <https://doi.org/10.1002/glia.20224>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 10, pp. 523–530). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
- Nies, D. E., Hemesath, T. J., Kim, J. H., Gulcher, J. R., & Stefansson, K. (1991). The complete cDNA sequence of human hexabrachion (Tenascin): A multidomain protein containing unique epidermal growth factor repeats. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(5), 2818–2823. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)49920-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)49920-6)
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, *308*, 1314–1318.

- Nishio, T., Kawaguchi, S., Iseda, T., Kawasaki, T., & Hase, T. (2003). Secretion of tenascin-C by cultured astrocytes: Regulation of cell proliferation and process elongation. *Brain Research*, *990*(1–2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03448-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03448-6)
- Nishio, T., Kawaguchi, S., Yamamoto, M., Iseda, T., Kawasaki, T., & Hase, T. (2005). Tenascin-C regulates proliferation and migration of cultured astrocytes in a scratch wound assay. *Neuroscience*, *132*(1), 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.028>
- Okada, T., & Suzuki, H. (2021). The Role of Tenascin-C in Tissue Injury and Repair After Stroke. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607587>
- Orend, G., Huang, W., Olayioye, M. A., Hynes, N. E., & Chiquet-Ehrismann, R. (2003). Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene*, *22*(25), 3917–3926. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206618>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 173, Issue 4, pp. 649–665). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- O’Shea, T. M., Burda, J. E., & Sofroniew, M. v. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 9, pp. 3259–3270). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
- Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *71*, 281–299.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, *333*(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Pekny, M., & Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. In *Journal of Pathology* (Vol. 204, Issue 4, pp. 428–437). <https://doi.org/10.1002/path.1645>
- Pineau, I., & Lacroix, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: Multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *Journal of Comparative Neurology*, *500*(2), 267–285. <https://doi.org/10.1002/cne.21149>
- Powell, E. M., & Geller, H. M. (1999). Dissection of Astrocyte-Mediated Cues in Neuronal Guidance and Process Extension. In *GLIA* (Vol. 26).
- Prieto, A. L., Andersson-Fisone, C., & Crossin, K. L. (1992). *Characterization of Multiple Adhesive and Counteradhesive Domains in the Extracellular Matrix Protein Cytotactin*.
- Prinz, M., Erny, D., & Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. In *Nature Immunology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 385–392). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3703>
- Prüss, H., Kopp, M. A., Brommer, B., Gatzemeier, N., Laginha, I., Dirnagl, U., & Schwab, J. M. (2011). Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): Indices and resolution plateau. *Brain Pathology*, *21*(6), 652–660. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00488.x>

- Rankin, C. R., Hilgarth, R. S., Leoni, G., Kwon, M., den Beste, K. A., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2013). Annexin A2 regulates $\beta 1$ integrin internalization and intestinal epithelial cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15229–15239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.440909>
- Rhodes, K. E., Moon, L. D. F., & Fawcett, J. W. (2003). Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: Effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience*, 120(1), 41–56. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00285-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00285-9)
- Rieder, P., Gobbo, D., Stopper, G., Welle, A., Damo, E., Kirchhoff, F., & Scheller, A. (2022). Astrocytes and Microglia Exhibit Cell-Specific Ca^{2+} Signaling Dynamics in the Murine Spinal Cord. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.840948>
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., & Fehlings, M. G. (2007). Spinal cord injury: Time to move? *Journal of Neuroscience*, 27(44), 11782–11792. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3444-07.2007>
- Saito, Y., Imazeki, H., Miura, S., Yoshimura, T., Okutsu, H., Harada, Y., Ohwaki, T., Nagao, O., Kamiya, S., Hayashi, R., Kodama, H., Handa, H., Yoshida, T., & Fukai, F. (2007). A peptide derived from tenascin-C induces $\beta 1$ integrin activation through syndecan-4. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34929–34937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705608200>
- Savi, P., Zacharyus, J.-L., Delesque-Touchard, N., Labouret, C., Herve, C., Uzabiaga, M.-F., Pereillo, J.-M., Culouscou, J.-M., Bono, F., Ferrara, P., & Herbert, J.-M. (2006). The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *PNAS*, 103, 11069–11074.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Scheetz Jones, F., & Jones, P. L. (2000). *REVIEWS A PEER REVIEWED FORUM The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling*.
- sCHENK, S., Muser, J., vOLLMER, G., & Chiquet-ehrmann, R. (1995). TENASCIN-C IN SERUM: A QUESTIONABLE TUMOR MARKER. In *Int. J. Cancer*.
- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Traumatic brain injury and stem cells: An overview of clinical trials, the current treatments and future therapeutic approaches. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 56, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina56030137>
- Scholze, A., Gotz, B., & Faissner, A. (1996). GLIAL CELL INTERACTIONS WITH TENASCIN-C: ADHESION AND REPULSION TO DIFFERENT TENASCIN-C DOMAINS IS CELL TYPE RELATED. In *Pergamon Int. J. Devl Neuroscience* (Vol. 14, Issue 3).
- Schwab, M. E., & Strittmatter, S. M. (2014). Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 27, pp. 53–60). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.011>
- Schwenzer, A., Jiang, X., Mikuls, T. R., Payne, J. B., Sayles, H. R., Quirke, A. M., Kessler, B. M., Fischer, R., Venables, P. J., Lundberg, K., & Midwood, K. S. (2016). Identification of an

immunodominant peptide from citrullinated tenascin-C as a major target for autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(10), 1876–1883. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208495>

Scott Swindle, C., Tran, K. T., Johnson, T. D., Banerjee, P., Mayes, A. M., Griffith, L., & Wells, A. (2001). Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *Journal of Cell Biology*, 154(2), 459–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103103>

Seiffert, M. I., Beck, S. C., Schermutzki, F., Muller, C. A., Erickson, H. P., & Klein, G. (1998). Mitogenic and Adhesive Effects of Tenascin-C on Human Hematopoietic Cells Are Mediated by Various Functional Domains. In *Matrix Biology* (Vol. 17).

Semyanov, A., & Verkhratsky, A. (2021). Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 44, Issue 10, pp. 781–792). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.07.006>

Sever, M., Mammadov, B., Guler, M. O., & Tekinay, A. B. (2014). Tenascin-C mimetic peptide nanofibers direct stem cell differentiation to osteogenic lineage. *Biomacromolecules*, 15(12), 4480–4487. <https://doi.org/10.1021/bm501271x>

She, S., Xu, B., He, M., Lan, X., & Wang, Q. (2010). Open Access RESEARCH Nm23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migration on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. In *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (Vol. 29). <http://www.jeccr.com/content/29/1/93>

Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 2, pp. 146–156). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>

Slovinska, L., Blasko, J., Nagyova, M., Szekiova, E., & Cizkova, D. (2016). In Vitro Models of Spinal Cord Injury. In *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63459>

Soderblom, C., Luo, X., Blumenthal, E., Bray, E., Lyapichev, K., Ramos, J., Krishnan, V., Lai-Hsu, C., Park, K. K., Tsoulfas, P., & Lee, J. K. (2013). Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(34), 13882–13887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2524-13.2013>

Sofroniew, M. v. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 32, Issue 12, pp. 638–647). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

Sofroniew, M. v. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 5, pp. 249–263). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>

Sofroniew, M. v. (2018). Dissecting spinal cord regeneration perspective. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7705, pp. 343–350). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>

Sofroniew, M. v., & Vinters, H. v. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

Sriramarao, P., Mandler, M., & Bourdon, M. A. (1993). Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins. *Journal of Cell Science*, 105, 1001–1012.

- Stephan, A. H., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). The complement system: An unexpected role in synaptic pruning during development and disease. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 35, pp. 369–389). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>
- Stiefel, M. F., Tomita, Y., & Marmarou, A. (2005). Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. In *J. Neurosurg* (Vol. 103).
- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. In *Neuroscientist* (Vol. 18, Issue 6, pp. 567–588). <https://doi.org/10.1177/1073858411423441>
- Tator, C. H. (2006). Review of treatment trials in humanspinal cord injury: Issues, difficulties, and recommendations. In *Neurosurgery* (Vol. 59, Issue 5, pp. 957–982). <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000245591.16087.89>
- Taylor, H. C., Lightner, V. A., Beyer, W. F., Mccaslin, D., Briscoe, G., & Erickson, H. P. (1989). Biochemical and Structural Studies of Tenascin / Hexabrachion Proteins. In *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol. 41).
- Thuret, S., Moon, L. D. F., & Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 8, pp. 628–643). <https://doi.org/10.1038/nrn1955>
- Tucker, R. P., & Chiquet-Ehrismann, R. (2009). The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1793, Issue 5, pp. 888–892). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.012>
- Tucker, R. P., & Chiquet-Ehrismann, R. (2015). Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 65, pp. 165–168). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.003>
- Tucker, R. P., Drabikowski, K., Hess, J. F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R., & Adams, J. C. (2006). Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: Evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evolutionary Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-60>
- Tuszynski, M. H., & Steward, O. (2012). Concepts and Methods for the Study of Axonal Regeneration in the CNS. In *Neuron* (Vol. 74, Issue 5, pp. 777–791). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.006>
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504), 657–661. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.657>
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B., & Kiening, K. L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.046>
- van den Berg, M. E. L., Castellote, J. M., Mahillo-Fernandez, I., & de Pedro-Cuesta, J. (2010). Incidence of spinal cord injury worldwide: A systematic review. In *Neuroepidemiology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 184–192). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000279335>
- Vecino, E., & Kwok, J. C. F. (2016). The Extracellular Matrix in the Nervous System: The Good and the Bad Aspects. In *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*. InTech. <https://doi.org/10.5772/62527>
- Verweij, B. H., Muizelaar, J. P., Vinas, F. C., Peterson, P. L., Xiong, Y. E., & Lee, C. P. (2000). Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. In *J. Neurosurg* (Vol. 93).

- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 6, Issue 8, pp. 626–640). <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
- Walker, F. R., Beynon, S. B., Jones, K. A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., & Nilsson, M. (2014). Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 37, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.010>
- Wang, Y., Wang, H., Tao, Y., Zhang, S., Wang, J., & Feng, X. (2014). Necroptosis inhibitor necrostatin-1 promotes cell protection and physiological function in traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 266, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.007>
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M. v. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(31), 12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>
- Wells, J. M., & Watt, F. M. (2018). Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7705, pp. 322–328). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0073-7>
- Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 99, Issue 1, pp. 4–9). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bja/aem131>
- Wiese, S., & Faissner, A. (2015). The role of extracellular matrix in spinal cord development. *Experimental Neurology*, 274, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.018>
- Wiese, S., Karus, M., & Faissner, A. (2012). Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUN. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00120>
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., & Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602841103
- Wolf, F., & Kirchhoff, F. (2008). Imaging astrocyte activity. In *Science* (Vol. 320, Issue 5883, pp. 1597–1599). <https://doi.org/10.1126/science.1160122>
- Wu, H.-M., Huang, S.-C., Hattori, N., Glenn, T. C., Vespa, P. M., Yu, C.-L., Hovda, D. A., Phelps, M. E., & Bergsneider, M. (2004). Selective Metabolic Reduction in Gray Matter Acutely following Human Traumatic Brain Injury. In *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* (Vol. 21, Issue 2).
- Yoo, J. Y., Hwang, C. H., & Hong, H. N. (2016). A model of glial scarring analogous to the environment of a traumatically injured spinal cord using kainate. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 40(5), 757–768. <https://doi.org/10.5535/arm.2016.40.5.757>
- Yoshida, T., Akatsuka, T., & Imanaka-Yoshida, K. (2015). Tenascin-C and integrins in cancer. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 9, Issues 1–2, pp. 96–104). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008332>
- Zhang, B., & Gensel, J. C. (2014). Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain? Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord. In *Experimental*

Neurology (Vol. 258, pp. 112–120). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.007>

- Zhang, C., Morozova, A. Y., Abakumov, M. A., Gubsky, I. L., Douglas, P., Feng, S., Bryukhovetskiy, A. S., & Chekhonin, V. P. (2015). Precise delivery into chronic spinal cord injury syringomyelic cysts with magnetic nanoparticles MRI visualization. *Medical Science Monitor*, *21*, 3179–3185. <https://doi.org/10.12659/MSM.895624>
- Zhang, Y., Peti-Peterdi, J., Müller, C. E., Carlson, N. G., Baqi, Y., Strasburg, D. L., Heiney, K. M., Villanueva, K., Kohan, D. E., & Kishore, B. K. (2015). P2Y12 receptor localizes in the renal collecting duct and its blockade augments arginine vasopressin action and alleviates nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(12), 2978–2987. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010118>
- Zhou, X., Wahane, S., Friedl, M. S., Kluge, M., Friedel, C. C., Avrampou, K., Zachariou, V., Guo, L., Zhang, B., He, X., Friedel, R. H., & Zou, H. (2020). Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2. *Nature Neuroscience*, *23*(3), 337–350. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0597-7>
- Zuliani-Alvarez, L., Marzeda, A. M., Deligne, C., Schwenzer, A., McCann, F. E., Marsden, B. D., Piccinini, A. M., & Midwood, K. S. (2017). Mapping tenascin-C interaction with toll-like receptor 4 reveals a new subset of endogenous inflammatory triggers. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01718-7>

Biografija

Dunja Bijelić je rođena 21.11.1984. u Beogradu. Završila je osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, usmerenje Genetički iženjering i biotehnologija 2011. godine. Diplomski -master rad na temu „Efekti estradiola i izoflavona soje na somatotropne ćelije hipofize u animalnom modelu andropauze“ je uradila na Odeljenju za citologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković. 2013. godine je upisana na doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Neurobiologija-Neurofiziologija od ćelije do ponašanja. Eksperimentalni deo doktorske disertacije je uradila u Centru za lasersku mikroskopiju, Insituta za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Tokom doktorskih studija bila je učesnik više nacionalnih i međunarodnih projekata pod čijim okriljem je bila na nekoliko naučno-studijskih boravaka. Autor je devet radova publikovanih u međunarodnim časopisima od čega su dva proistekla iz rezultata doktorske disertacije, a autor je i brojnih kongresnih saopštenja sa međunarodnih kongresa. Bila je saradnik u nastavi na nekoliko predmeta. Godinama se intenzivno bavila organizovanjem raznih interaktivnih postavki i naučno-edukativnih projekata.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Дуња Д. Бијелић

Број индекса Б3021/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционала својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дуња Д. Бијелић

Број индекса Б3021/2013

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша

Ментори Др Игор Јаковчевски

Др Милена Милошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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.