

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina D. Milićević

**UTICAJ IMUNSKIH FAKTORA NA ODGOVOR
ASTROCITA I MIKROGLIJE U
INFLAMACIJSKIM PROCESIMA
CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Katarina D. Milićević

**THE EFFECT OF IMMUNE FACTORS ON THE
RESPONSE OF ASTROCYTES AND
MICROGLIA IN THE INFLAMMATORY
PROCESSES OF THE CENTRAL NERVOUS
SYSTEM**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2023

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

1. dr Ljiljana Nikolić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za Biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
2. dr Milena Milošević, docent, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

1. dr Pavle Anđus, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet
2. dr Jelena Bogdanović Pristov, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja
3. dr Ivana Bjelobaba, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za Biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
4. dr Danijela Bataveljić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet
5. dr Marija Adžić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

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 (451-03-9/2023-14/200178), Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (451-03-9/2023-14/200007) i Instituta za multidisciplinarna istraživanja (451-03-47/2023-01/200053).

Zahvaljujem se:

mentorki dr Ljiljani Nikolić na polaznoj ideji, pomoći u osmišljavanju eksperimenata, diskusiji rezultata, pomoći u pisanju radova i izradi disertacije, smirenosti i podršci u toku celog ovog procesa;

mentorki dr Mileni Milošević uz koju sam naučila prve metode i obradila prve rezultate, na zajedničkim eksperimentima i diskusijama, za savete i pomoć u toku pisanja disertacije;

prof. dr Pavlu Anđusu na ukazanom poverenju, svakoj vrsti podrške i pomoći u toku pisanja radova i disertacije, pruženim prilikama za stručno usavršavanje i brojnim naučnim lekcijama;

dr Danijeli Bataveljić na nesebičnom deljenju znanja i iskustva, podršci u toku eksperimentalnog rada i velikoj pomoći u toku pisanja radova i disertacije, ali i na druženju;

dr Jeleni Bogdanović Pristov na saradnji i doprinosu u toku eksperimentalnog rada i stručnim savetima tokom izrade disertacije;

dr Ivani Bjelobabi na izdvojenom vremenu i konstruktivnim komentarima koji su doprineli uobličavanju ovog teksta;

dr Mariji Adžić Bukvić na svemu što me je naučila i pomoći u radu, beskrajnom strpljenju, prijateljstvu i podršci, i konstruktivnim komentarima u toku pisanja disertacije;

dr Dunji Bijelić na nesebičnom deljenju znanja, uključivanju u saradnje, pomoć u radu, prijateljstvu i podršci od prvog dana u laboratoriji, kao i dr Mini Perić na prenetom znanju i savetima, saradnji i druženju;

dr Đorđu Miljkoviću i kolegama Odeljenja za imunologiju na Insititutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju na saradnji oko eksperimenata koji su se ticali izolacije i pripreme imunskih ćelija;

dr Zorici Stević i dr Ireni Živković za prikupljanje i pripremu materijala;

svim starim i novim CLM kolegama na lepoj saradnji i druženju;

porodici i prijateljima na beskrajnoj podršci i motivaciji.

UTICAJ IMUNSKIH FAKTORA NA ODGOVOR ASTROCITA I MIKROGLIJE U INFLAMACIJSKIM PROCESIMA CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA

Neuroinflamacija je inflamacijski odgovor koji se odigrava u centralnom nervnom sistemu (CNS) u toku bolesti ili povrede CNS, a posredovan je komunikacijom između CNS i imunskog sistema. Odlikuje se regrutovanjem tj. infiltracijom imunskih ćelija i imunskih faktora sa periferije u CNS i njihovom interakcijom sa astrocitima i mikroglijom. Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje interakcije astrocita i mikroglije sa komponentama imunskog sistema u multiploj sklerozi (MS) i amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (ALS). Naši rezultati u pacovskom modelu MS – eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE) pokazuju da je ćelija-ćelija interakcija između astrocita i imunskih ćelija infiltriranih u CNS (CNS-IIĆ) u kičmenoj moždini posredovana spregom astroglijalnih purinskih P2X7 receptora (P2X7R), koneksin-43 hemikanala i β_3 -integrina. Takođe, kontrolni astrociti reaguju brzim Ca^{2+} odgovorom na prisustvo CNS-IIĆ izolovanih iz kičmene moždine EAE pacova posredstvom P2X7R koji se aktiviraju autokrino/parakrino oslobođenim ATP kroz hemikanale, kao i da je $\alpha_v\beta_3$ -integrin važan za otpočinjanje dok su mitohondrijalni Ca^{2+} transporteri važni za završetak ovog odgovora. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da astrociti izolovani iz hSOD1^{G93A} pacova, modela za ALS, imaju poremećenu Ca^{2+} homeostazu (povećan nivo skladištenog Ca^{2+} u endoplazmatičnom retikulumu) usled čega pokazuju izraženiji Ca^{2+} odgovor na imunoglobuline G (IgG) iz seruma ALS pacijenata u odnosu na kontrolne astrocite. Sa druge strane, mikroglija ne pokazuje promene u Ca^{2+} aktivnosti nakon izlaganja ALS IgG. U ovoj doktorskoj disertaciji su predstavljena nova otkrića o neuroinflamacijskim procesima u životinjskim modelima MS i ALS, kao i novi koncept istraživanja o interakciji glije sa imunskim faktorima koji se može primeniti u dizajniranju novih terapijskih pristupa za tretman ovih neizlečivih bolesti CNS.

KLJUČNE REČI: neuroinflamacija, kalcijum, purinska signalizacija, P2X7R, Cx-43, integrini, EAE, ALS, astrociti, mikroglija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

THE EFFECT OF IMMUNE FACTORS ON THE RESPONSE OF ASTROCYTES AND MICROGLIA IN THE INFLAMMATORY PROCESSES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Neuroinflammation is an inflammatory response of the central nervous system (CNS) during a CNS disease or an insult. It is characterized by the recruitment of immune cells and immune factors and their infiltration into the CNS where they interact with astrocytes and microglia. The aim of this doctoral dissertation was to investigate astrocytes' and microglia's interaction with the components of the immune system in multiple sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). By using a rat model of MS - experimental autoimmune experimental encephalomyelitis (EAE) we show that cell-to-cell interaction between astrocytes and CNS-infiltrated immune cells (CNS-IIC) is mediated through the coupling of the astroglial purinergic P2X7 receptors (P2X7R), connexin-43 chemichannels, and β_3 -integrin in the spinal cord. Control astrocytes respond to the presence of CNS-IICs isolated from the spinal cord of EAE rat with a fast and transient Ca^{2+} response through the hemichannel-dependent ATP release that activates P2X7R in an autocrine/paracrine manner. Initiation of this cell-to-cell interaction is mediated by astroglial $\alpha_v\beta_3$ -integrins, while mitochondria facilitate the termination of this response. Data presented in this doctoral dissertation show that astrocytes isolated from a hSOD1^{G93A} rat – an animal model of ALS show Ca^{2+} homeostasis dysregulation (increased sequestering of Ca^{2+} in the endoplasmic reticulum) that causes increased Ca^{2+} response to immunoglobulin G (IgG) from ALS patients' sera compared to control astrocytes. On the other hand, microglia does not show changes in Ca^{2+} activity following the exposure to ALS IgG. This doctoral dissertation presents novel findings concerning the neuroinflammatory processes underlying MS and ALS and offers new conceptual framework for investigating glial interaction with immune factors that can be used for designing new therapeutic strategies to treat these incurable CNS diseases.

KEY WORDS: neuroinflammation, calcium, purinergic signaling, P2X7R, Cx-43, integrins, EAE, ALS, astrocytes, microglia

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH NEUROBIOLOGY: Neurobiology

Lista skraćénica

AChR – receptor za acetilholin
AQP4 – akvaporin-4
ALS – amiotrofična lateralna skleroza
AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiselina
APS – amonijum persulfat
ATP – adenzin-3-fosfat
BSA – albumin izolovan iz seruma govečeta (eng. bovine serum albumin)
C9ORF72 – otvoreni okvir čitanja 72 na hromozomu 9 (eng. Chromosome 9 Open Reading Frame 72)
cAMP – ciklični adenzin-monofosfat
cDNK – komplementarna DNK
CIK – cirkulišući imunski kompleksi
CNS – centralni nervni system
CNS-IIĆ – imunske ćeije infiltrirane u CNS
Cx-43 – koneksin-43
CSF – likvor (eng. cerebrospinal liquid)
DA – eng. Dark Agouti
DAG – diacilglicerol
DAPI – 4',6-diamidin- 2-fenilindiol dihidrohlorid
DMEM – eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – dimetil sulfoksid
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP – dezoksiribonukleotid trifosfati
EAE – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
ECL – eng. Enhanced Chemiluminescence
ECS – vanćelijski rastvor (eng. extracellular slution)
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina (eng. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA – etilen glikol tetrasirćetna kiselina (eng. ethylene glycol tetraacetic acid)
ER – endoplazmatični retikulum
ERK – kinaza regulisana vanćelijskim signalima (eng. extracellular signal-regulated protein kinase)
fALS – familijalni oblik ALS
FBS – fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum)
FCS – fetalni teleći serum (eng. fetal calf serum)
GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. glial fibrillary acidic protein)
GLT-1 – glutamatni transporter-1
GPCR – receptor spegnut sa proteinom G (eng. G protein-coupled receptor)
GS – glutamin sintetaza
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonična kiselina
HRP – peroksidaza rena (eng. horseradish peroxidase)
IgG – imunoglobulin G
IL – interleukin
IP3 – inozitol-3-fosfat
IP3R – receptor za inozitol-3-fosfat
IPS – izotonični rastvor Percoll® (eng. isotonic Percoll solution)
JNK – c-Jun N terminalna kinasa
Kir 4.1 – ulazni kalijumov ispravljač
KMB – krvno-moždana barijera
LIF – inhibitorni faktor leukemije (eng. leukemia inhibitory factor)
LPS – lipopolisaharid

MAPK – kinaza aktivirana mitogenima (eng. mitogen-activated protein kinase)
MCU – mitohondrijalni kalcijumski uniporter (eng. mitochondrial calcium uniporter)
MHCII – glavni kompleks tkivne podudarnosti II (eng. major histocompatibility complex II)
mHCX – mitohondrijalni H^+/Ca^{2+} -izmenjivač
mPTP – mitohondrijalna pora (eng. mitochondrial premeability transition pore)
MS – multipla skleroza
NCLX – mitohondrijalni Na^+/Ca^{2+} -izmenjivač
NCX – Na^+/Ca^{2+} -izmenjivač
NF κ B – nuklearni faktor κ B
NMDA – N-metil-D-aspartat
NO – azot-monoksid
OPC – prekursorsna ćelija oligodendrocita (eng. oligodendrocyte precursor cell)
PBS – fiziološki rastvor bez dvovalentnih katjona sa fosfatnim puferom (eng. phosphate buffered saline)
PCC – Pirsonov koeficijent korelacije
PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. polymerase chain reaction)
periferne IĆ - periferne imunske ćelije
PFA – paraformaldehid
PLC – fosfolipaza C
PVDF – polivinilidid difluorid
RNK – ribonukleinska kiselina
ROI – region od interesa
ROS – reaktivne kiseonične vrste (eng. reactive oxygen species)
RPMI – eng. Roswell Park Memorial Institute
RyR – rijanodinski receptor
sALS – sporadični oblik ALS
SD – eng. Sprague-Dawley
SDS – natrijum dodecil sulfat
SERCA – Ca^{2+} pumpa na ER (eng. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)
SOCE – ulazak Ca^{2+} posredovan depoima (eng. store-operated Ca^{2+} entry)
SOD1 – superoksid dismutaza 1
STIM1 – eng. Stromal interaction protein 1
TDP-43 – TAR DNK vezujući protein od 43 kDa (eng. TAR DNA-binding protein 43 kDa)
TNF- α – faktor nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor α)
TRPA1 – katjonski kanali u osnovi prolaznog receptorskog potencijala, podfamilija A, član 1 (eng. transient receptor potential A1 Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)
TRPC – katjonski kanali u osnovi prolaznog receptorskog potencijala (eng. transient receptor potential cation channel)
VGCC – voltažno-zavisni kanali za Ca^{2+} (eng. voltage-gated Ca^{2+} channels)
wt – divlji genotip (eng. wild type)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Značaj i fiziološka svojstva astrocita	1
1.1.1. Ca ²⁺ signalizacija astrocita	3
1.1.1.1. Jonotropni i metabotropni receptori astrocita	5
1.1.2. Putevi oslobađanja gliotransmitera u toku Ca ²⁺ aktivnosti astrocita.....	7
1.2. Značaj i fiziološka svojstva mikroglije	8
1.3. Komponente imunskog sistema	9
1.4. Uloga glijalnih ćelija u inflamacijskim procesima CNS.....	9
1.4.1. Astrociti u neuroinflamaciji	10
1.4.1.1. Astrogljalna purinska signalizacija u neuroinflamaciji	11
1.4.2. Mikroglija u neuroinflamaciji	12
1.5. Značaj glije u bolestima CNS praćenih neuroinflamacijom	12
1.5.1. Multipla skleroza – patofiziološki procesi.....	12
1.5.1.1. Patofiziološke promene astrocita u MS	13
1.5.1.2. Interakcija astrocita sa komponentama imunskog sistema u MS	15
1.5.2. Amiotrofična lateralna skleroza - patofiziološki procesi.....	15
1.5.2.1. Patofiziološke promene astrocita i mikroglije u ALS.....	17
1.5.2.2. Interakcija astrocita i mikroglije sa imunskim faktorima u ALS	19
2. Ciljevi istraživanja	21
3. Materijal i metode.....	22
3.1. Materijali, reagensi i rastvori, antitela, blokatori i prajmeri koji su korišćeni u ovoj studiji.....	22
3.2. Eksperimentalne životinje.....	26
3.2.1. hSOD1 ^{G93A} Sprague-Dawley soj - model ALS	26
3.2.2. Genotipizacija	26
3.2.3. Indukovanje eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)	27
3.3. Izolacija imunskih ćelija	28
3.4. Izolacija IgG iz seruma ALS pacijenata	28
3.5. Priprema primarne ćelijske kulture	28
3.5.1. Izolacija ćelija glije.....	28
3.5.2. Gajenje primarne kulture astrocita.....	29
3.5.3. Gajenje primarne kulture mikroglije	29
3.6. Kalcijumsko oslikavanje	29
3.6.1. Određivanje promene unutarćelijskog Ca ²⁺ astrocita i mikroglije nakon tretmana ALS IgG.....	30
3.6.2. Određivanje promena unutarćelijskog Ca ²⁺ astrocita nakon tretmana CNS-IIĆ.....	30
3.6.3. Analiza Ca ²⁺ signala.....	31
3.7. Merenje vanćelijskog ATP.....	31
3.8. Imunofluorescentno obeležavanje tkivnih preseka i ćelija u kulturi.....	32

3.8.1. Priprema tkiva.....	32
3.8.2. Imunohistohemija	32
3.8.3. Imunocitohemija.....	32
3.8.4. Konfokalna mikroskopija	32
3.8.5. Analiza mikrografija	33
3.9. Izolacija proteina i određivanje koncentracije	33
3.10. Koimunoprecipitacija.....	34
3.11. Western blot	34
3.12. Statistička analiza.....	34
4. Rezultati	36
4.1. Efekat CNS-IIĆ na Ca ²⁺ homeostazu i purinsku signalizaciju astrocita u kulturi	36
4.1.1. Uticaj CNS-IIĆ na dinamiku Ca ²⁺ u astrocitima	36
4.1.2. Povećanje unutarćelijskog Ca ²⁺ u astrocitima nakon susreta sa CNS-IIĆ ne zavisi od metabotropnih glutamatnih receptora i TRPA1 kanala	38
4.1.3. CNS-IIĆ izazivaju Ca ²⁺ odgovor u astrocitima putem aktivacije P2X7R.....	40
4.1.4. Aktivacija astroglijalnog P2X7R i povećanje unutarćelijskog Ca ²⁺ po izlaganju CNS-IIĆ je posredovano astroglijalnim hemikanalima.....	40
4.1.5. CD4 ⁺ T ćelije infiltrirane u CNS interaguju sa astrocitima i izazivaju Ca ²⁺ odgovor	43
4.2. Sprega astroglijalnih P2X7 receptora, β3-integrina i koneksina-43 posreduje u međućelijskoj interakciji astrocita sa autoreaktivnim imunskim ćelijama u EAE	44
4.2.1. Ekspresija P2X7R je smanjena u kičmenoj moždini EAE pacova, dok se ekspresija Cx-43 ne menja.....	44
4.2.2. Astroglijalni Cx-43 i P2X7R interaguju i koncentrišu u neposrednoj blizini infiltriranih CD4 ⁺ ćelija u kičmenoj moždini EAE pacova.....	47
4.2.3. Mitohondrije su uključene u direktnu interakciju između astrocita i CNS-IIĆ	50
4.2.4. α _v β ₃ -integin je neophodan za direktnu interakciju astrocita sa CNS-IIĆ i nizvodnu signalizaciju u astrocitima.....	51
4.2.5. β ₃ -integin interaguje sa P2X7R i pokazuje povećanu ekspresiju u EAE.....	54
4.3. Upotreba primarne kulture astrocita i mikroglije u ispitivanju glijalne interakcije sa imunskim faktorima u ALS.....	54
4.3.1. U kičmenoj moždini ALS hSOD1 ^{G93A} pacova nisu detektovene CD4 ⁺ T ćelije.....	54
4.3.2. Povećan Ca ²⁺ odgovor hSOD1 ^{G93A} astrocita na ALS IgG je usled izmenjenog mehanizma regulacije unutarćelijskog Ca ²⁺	55
4.3.3. Mikroglija ne pokazuje promene u Ca ²⁺ odgovoru nakon izlaganja ALS IgG	56
5. Diskusija.....	59
5.1. Interakcija astrocita i imunskih ćelija je posredovana ATP i aktivacijom astroglijalnog P2X7R.....	59
5.2. Promena ekspresije P2X7R i interakcija sa Cx-43 u neposrednoj blizini CD4 ⁺ T ćelija karakteriše EAE	62
5.3. Astroglijalni α _v β ₃ -integrin je incijator, dok su mitohondrije zadužene za okončanje Ca ²⁺ odgovora nakon kontakta sa CNS-IIĆ	63

5.4. Interakcija astrocita i mikroglije sa perifernim imunskim faktorima u hSOD1 ^{G93A} ALS modelu.....	64
6. Zaključak.....	67
Literatura.....	68
Biografija autora.....	92

1. Uvod

Nakon decenija istraživanja posvećenih brojanju različitih ćelijskih tipova u mozgu, danas znamo da je mozak čoveka izgrađen od jednakog broja glijalnih ćelija i neurona (von Bartheld et al., 2016). Iako prenos informacija obavljaju neuroni, funkcionisanje centralnog nervnog sistema (CNS) u velikoj meri zavisi od glijalnih ćelija – astrocita, mikroglije i oligodendrocita. Ove ćelije se međusobno razlikuju po strukturnim i biohemijskim svojstvima kao i funkciji koju obavljaju. U narednim poglavljima će biti opisane karakteristike astrocita i mikroglije, glijalnih ćelija koje imaju brojne uloge u održavanju homeostaze CNS, dok u patološkim uslovima odgovaraju na signale opasnosti koji bi mogli ugroziti normalno funkcionisanje CNS (Vainchtein and Molofsky, 2020).

1.1. Značaj i fiziološka svojstva astrocita

Astrociti su dugo posmatrani kao „lepak” u CNS bez konkretnih funkcija. Preokret u shvatanju uloge ovog ćelijskog tipa je bilo otkriće da eksprimiraju veliki broj jonskih kanala i receptora kao i da im je svojstvena brza unutarćelijska Ca^{2+} signalizacija (Volterra and Meldolesi, 2005). Astrociti vode poreklo od neuralnih progenitorskih ćelija subventrikularne zone, a migracijom preko nastavaka radijalne glije naseljavaju ceo CNS (Baldwin et al., 2023). Nakon migracije, astrociti proliferišu i počinju da razvijaju brojne nastavke i astroglijalna stopala (Clavreul et al., 2019; Ge et al., 2012). Morfološka diferencijacija astrocita se dešava paralelno sa formiranjem i sazrevanjem sinapsi (Bushong et al., 2004; Clavreul et al., 2019). U toku ovog perioda astrociti se povećavaju, dobijaju kompleksnu morfologiju i formiraju svoje teritorije koje se minimalno preklapaju sa teritorijama astrocita u okruženju (Bushong et al., 2004; Clavreul et al., 2019). Astrociti se odlikuju veoma heterogenom morfologijom i funkcijom, a na osnovu morfologije astrociti u svojoj masi se označavaju kao protoplazmatični, a u beloj masi fibrozni (Lim et al., 2021). Protoplazmatični astrociti imaju ćelijsko telo sa kog polaze nastavci koji se dalje granaju, tako da ovaj tip astrocita ima sunderastu morfologiju (Bushong et al., 2002). Fibrozni astrociti sa druge strane imaju manji broj primarnih nastavaka koji su orijentisani u smeru pružanja aksona (Lundgaard et al., 2014).

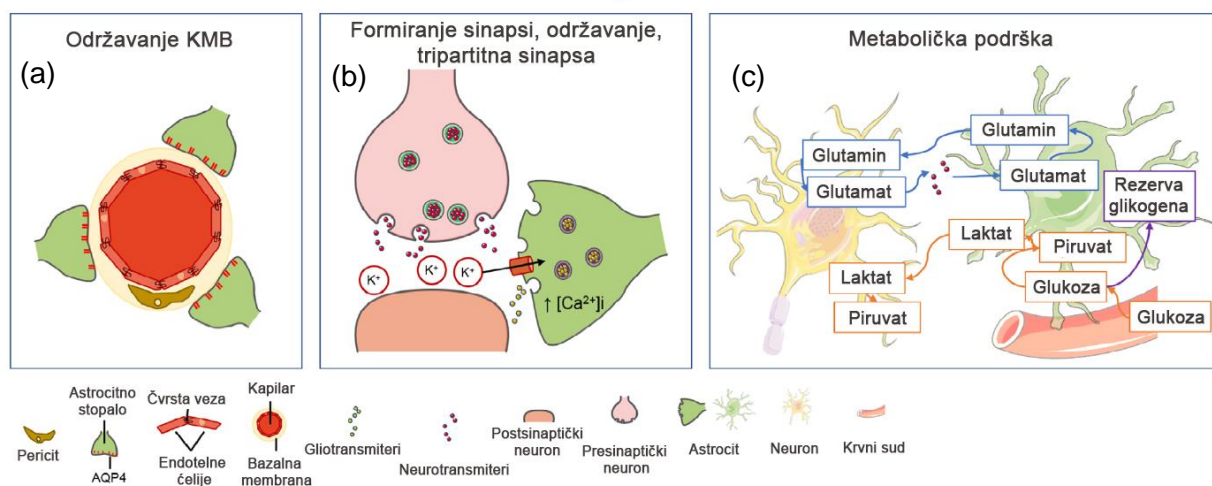
Astrociti čine glavni deo granične glijalne membrane (lat. *glia limitans*) i aktivno doprinose formiranju i održavanju krvno-moždane barijere (KMB). KMB odvaja CNS od periferne cirkulacije i omogućava strogu kontrolu mikrosredine (Abbott et al., 2006; Sofroniew, 2015a), a čine je endotelne ćelije koje grade kapilare, bazalna lamina, periciti i astroglijalna stopala (Abbott et al., 2006) (Slika 1a). Endotelne ćelije kapilara u CNS su povezane čvrstim vezama što ograničava prolazak molekula iz krvi u parenhim CNS (Abbott et al., 2006). Ključni proteini eksprimirani na astroglijalnim stopalima koji učestvuju u izgradnji KMB su specijalizovani kanal za vodu – akvaporin-4 (AQP4), ulazni kalijumov ispravljač (Kir 4.1), koneksin-43 (Cx-43) i glukozni transporteri (Abbott et al., 2006; Keaney and Campbell, 2015). Ovi proteini omogućavaju astrocitima direktnu razmenu molekula sa endotelnim ćelijama i na taj način regulišu prolazak vode, jona i solubilnih molekula kroz KMB (Abbott et al., 2006; Keaney and Campbell, 2015). Astrociti lokalno regulišu protok krvi kroz krvne sudove tako što oslobađaju vazoaktivne molekule (prostaglandini, arahidonska kiselina, azot-monoksid (NO)) (MacVicar and Newman, 2015). Takođe regulišu drenažu intersticijalne tečnosti. Naime, likvor (eng. cerebrospinal fluid, CSF) ulazi u mozak preko periarterijalnog prostora, prolazi u intersticijum preko AQP4 eksprimiranog na perivaskularnim astroglijalnim stopalima i potom zajedno sa intersticijalnom tečnošću ulazi u venski sistem (Plog and Nedergaard, 2018). U formiranju KMB značajnu ulogu imaju astroglijani integritini koji su transmembranski proteini sačinjeni od α i β subjedinice, a zaduženi su za međućelijsku komunikaciju i interakciju (Slack et al., 2022). Njihov značaj se ogleda u tome da se kod kondicionog „knock-out” miša za α_V - (McCarty et al., 2005) ili β_8 -integrina (Proctor et al., 2005) KMB ne razvija pravilno, dolazi do prerane smrti ili razvoja različitih CNS patologija poput cerebralne hemoragije (Tanigami et al., 2012).

Svojim nastavcima astrociti uspostavljaju kontakt sa pre- i postsinaptičkim završecima i zajedno sa njima formiraju tripartitnu sinapsu (Slika 1b) (Arizono et al., 2020; Perea et al., 2009).

Integrini se smatraju bitnom komponentom u posredovanju interakcije astrocita sa neuronima i formiranja tripartitne sinapsise (Eroglu and Barres, 2010). Poseban značaj je dat $\alpha_v\beta_3$ -integrinu koji učestvuje u dvosmernoj komunikaciji astrocita i neurona. Interakcija astrocitnog $\alpha_v\beta_3$ -integrina sa glikoproteinom Thy-1 na membrani neurona pokreće signalizaciju u astrocitima koja za posledicu ima formiranje fokalne adhezije i stresnih vlakana (Hermosilla et al., 2008). Sa druge strane ova interakcija dovodi do grupisanja Thy-1 na membrani neurona, što za posledicu ima ograničavanje razrastanja neurita i povlačenje postojećih nastavaka ta (Herrera-Molina et al., 2012). Astroцити učestvuju u regulaciji sinaptogeneze, sinaptičke plastičnosti i stabilnosti, preuzimaju oslobođene neurotransmitere i kontrolišu vanćelijsku koncentraciju K^+ (Allen and Eroglu, 2017; Linnerbauer et al., 2020; Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Pored regulatornih funkcija, astroцити aktivno učestvuju u sinaptičkoj transmisiji. Astroцити eksprimiraju veliki broj receptora za neurotransmitere, tako da prisustvo neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini dovodi do brzih promena unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u astrocitima i posledičnim oslobađanjem gliotransmitera (Araque et al., 2014; Verkhratsky and Nedergaard, 2018) (Slika 1b).

Astroцити imaju ključnu ulogu u regulaciji metaboličke homeostaze i obezbeđivanju energenata za neurone. Ove ćelije obavljaju konverziju glutamata u glutamin (glutamat-glutaminski ciklus), preuzimanje glukoze iz krvi i njene transformacija u laktat, koji je energetski pogodan za neurone, kao i skladištenje rezerve energije u obliku glikogena (Magistretti and Allaman, 2018) (Slika 1c). Astroцити uklanjaju glutamat iz sinaptičke pukotine posredstvom glutamatnih transportera (glutamatni transporter-1 (GLT-1) i glutamat-aspartatni transporter) i aktivnošću glutamin sintetaze (GS) konvertuju glutamat u glutamin koji neuroni preuzimaju i konvertuju u aktivni neurotransmiter glutamat (Magistretti and Allaman, 2018; Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Fiziološke uloge astrocita



Slika 1. Uloge astrocita u fiziološkim uslovima. (a) Astroцити imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze CNS. Astrocitna stopala zajedno sa endotelnim ćelijama i pericitima učestvuju u izgradnji krvno-moždane barijere (KMB). Astrocitna stopala eksprimiraju proteine poput AQP4 i Kir4.1 koji su uključeni u kontrolu sastava vanćelijske sredine, kao i pH. Pored toga oslobađaju vazoaktivne komponente koje utiču na protok krvi. (b) Astroцити ostvaruju kontakt sa pre- i postsinaptičkim neuronima i kao element tripartitne sinapse učestvuju u formiranju i održavanju sinapsi i sinaptičkoj transmisiji. Takođe su i aktivni učesnici tripartitne sinapse kroz regulisanje vanćelijske koncentracije K^+ , preuzimanje neurotransmitera i oslobađanje gliotransmitera. (c) Astroцити imaju metaboličku ulogu u CNS: (1) uklanjaju glutamat posredstvom GLT-1 i aktivnošću glutamin sintetaze (GS) konvertuju glutamat u glutamin koji neuroni preuzimaju i konvertuju u aktivni neurotransmiter glutamat, (glutamat-glutaminski ciklus); (2) degraduju glukožu do piruvata i laktata koji su energetski supstrati za neurone; (3) čuvaju rezerve glukoze u vidu glikogena. Slika je modifikovana, a preuzeta iz das Neves et al. (2020).

Astroцити primaju signale od neurona, ali i od vaskularnih ćelija, drugih astrocita, mikroglije i oligodendrocita. Komunikacija astrocita sa drugim ćelijama je izuzetno bitna za njihovu ulogu u održavanju metaboličkih zahteva neurona - astroцити obezbeđuju osnovnu energiju za neurone kroz glukozni i glikogenski put (Magistretti et al., 1999; Pellerin and Magistretti, 1994) (Slika 1c) i

regulišu protok krvi prema lokalnim potrebama za kiseonikom i metabolitima (Gordon et al., 2008; Haydon and Carmignoto, 2006; MacVicar and Newman, 2015; Mulligan and MacVicar, 2004; Zonta et al., 2003) (Slika 1a). Astrociti moždanog stabla detektuju lokalne promene u pH vrednosti (Gourine et al., 2010). Astrociti registruju i promene u osmolalnosti vanćelijske sredine i održavaju homeostazu vode (Haj-Yasein et al., 2011).

1.1.1. Ca^{2+} signalizacija astrocita

Ca^{2+} signalizacija astrocita je prvi put otkrivena u kulturi pre više od 30 godina (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990), a vremenom je ustanovljeno njeno postojanje i značaj u akutno pripremljenim preseccima mozga (Duffy and MacVicar, 1995), kao i kod budnih slobodno pokretnih laboratorijskih životinja (Hirase et al., 2004). Aktivnost astrocita se ogleda u pojavi kalcijumskih tranzijenata i talasa (Bezzi and Volterra, 2001), zahvaljujući brojnim jonskim kanalima, receptorima i izmenjivačima (Verkhatsky and Nedergaard, 2018) (Slika 2). Promene u ekspresiji, lokalizaciji i funkcionisanju ovih membranskih proteina astrocita mogu izazvati poremećaj jonske homeostaze, poremećaje u oslobađanju neurotransmitera, stvaranje depozicija proteina, oksidativni stres i neuroinflamaciju (Wang et al., 2022).

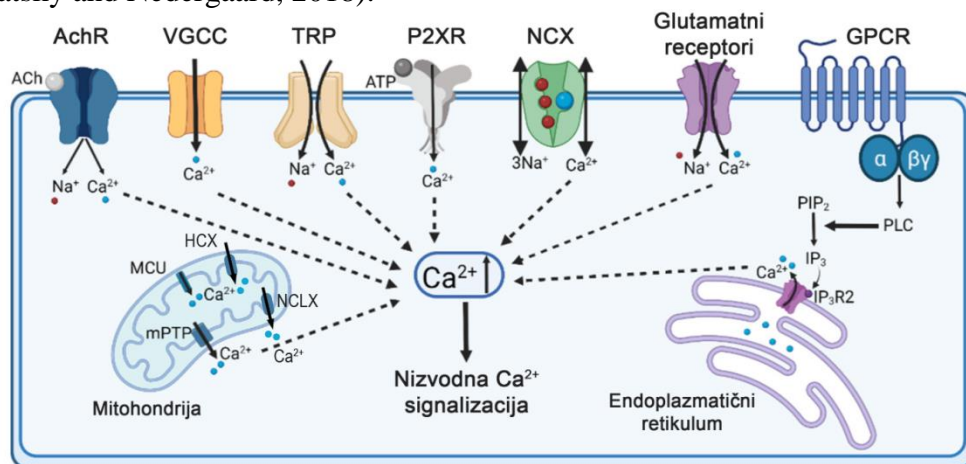
Kalcijumski tranzijent ili odgovor astrocita je promena unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} usled aktivacije receptora na membrani astrocita (Araque et al., 2014; Volterra et al., 2014). Sa druge strane, Ca^{2+} talas se definiše kao lokalizovani porast unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} koji se prostire dalje u vidu talasa. Ca^{2+} talas može biti na nivou jedne ćelije (untarćelijski Ca^{2+} talas) ili se širiti na okolne ćelije od ćelije inicijatora (međućelijski Ca^{2+} talas) (Scemes and Giaume, 2006). Astrociti su povezani koneksinima (Theis and Giaume, 2012) koji su propustljivi za Ca^{2+} i inozitol-3-fosfat (IP3) i na taj način se Ca^{2+} talas širi na okolne astrocite (Höfer et al., 2002). Drugi način prostiranja Ca^{2+} talasa je usled difuzije signalnih molekula oslobođenih iz aktiviranog astrocita, a koji deluju na astrocite u okruženju i posredstvom aktivacije odgovarajućih receptora dovode do Ca^{2+} odgovora (Scemes and Giaume, 2006). ATP i purinska signalizacija na ovaj način učestvuju u međućelijskoj komunikaciji astrocita (Guthrie et al., 1999). Ova dva puta funkcionišu zajedno i obezbeđuju koordinisanu aktivnost grupe astrocita, kako onih u neposrednom kontaktu, tako i astrocita u okruženju (Fujii et al., 2017). Razlike u tipu i broju membranskih receptora i koneksinskih kanala su odgovorne za definisanje granica prostiranja međućelijskog Ca^{2+} talasa (Scemes and Giaume, 2006).

Ca^{2+} signali astrocita nastaju pokretanjem različitih signalnih puteva koji uključuju različite receptore, kanale, izmenjivače i pumpe eksprimirane na njihovoj ćelijskoj membrani i na membrani unutarćelijskih organela koje skladište ovaj jon. Glavni unutarćelijski depoi su endoplazmatični retikulum (ER) i mitohondrije (Lim et al., 2021; Verkhatsky and Nedergaard, 2018; Verkhatsky et al., 2012) (Slika 2).

Unutarćelijska koncentracija Ca^{2+} u astrocitima u mirovanju je ~100 nM, što je slično kao u drugim ćelijskim tipovima (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). U vanćelijskoj sredini se koncentracija Ca^{2+} održava u opsegu između 1,5 i 2 mM i u živom organizmu je strogo kontrolisana (Berridge et al., 2003; Shigetomi et al., 2010). U oblikovanju Ca^{2+} tranzijenata astrocita učestvuju jonski kanali eksprimirani na njihovoj membrani, a to su: voltažno-zavisni kanali za Ca^{2+} (eng. voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCC) (Cheli et al., 2016; Letellier et al., 2016), kanali Orai familije koji su Ca^{2+} kanali aktivirani oslobađanjem Ca^{2+} (eng. Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels) (Verkhatsky and Parpura, 2014), unutarćelijski Ca^{2+} kanali poput rijanodinskog receptora (RyR) na ER (Matyash et al., 2002) i receptora za IP3 (IP3R) (Verkhatsky and Nedergaard, 2018; Verkhatsky and Parpura, 2014) (Slika 2).

ER je glavni unutarćelijski depo Ca^{2+} i prisutan je u ćelijskom telu i nastavcima astrocita (Bernardinelli et al., 2014; Patrushev et al., 2013). U *in vitro* uslovima je pokazano da je koncentracija Ca^{2+} unutar ER u opsegu između 100 i 200 μM (Dematteis et al., 2020; Golovina and Blaustein, 1997). STIM1 protein koji se nalazi na membrani ER je zadužen za održavanje koncentracije Ca^{2+} u lumenu ER. Smanjenje koncentracije Ca^{2+} u ER dovodi do polimerizacije

STIM1, što posledično otvara TRPC ili ORAI1 kanale i omogućava ulazak Ca^{2+} u ER. Ovaj mehanizam se označava kao ulazak Ca^{2+} posredovan depoima (eng. store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) (Verkhatsky and Parpura, 2014). U membrani ER je prisutna Ca^{2+} -ATPaza (eng. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) koja je zadužena za preuzimanje Ca^{2+} iz citosola i skladištenje u lumenu ER (Golovina, 2005; Lencesova et al., 2004; Morita and Kudo, 2010). Na membrani ER je prisutan IP3R kog posredno aktiviraju brojni metabotropni receptori za neurotransmitere (koji aktivacijom fosfolipaze C (PLC) dovode do stvaranja IP3 iz fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2)), a njegova aktivacija dovodi do oslobađanja Ca^{2+} iz lumena ER (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).



Slika 2. Ca^{2+} signalizacija astrocita. Promene u unutarćelijskoj koncentraciji Ca^{2+} su dinamički regulisane kroz delovanje različitih receptora, Ca^{2+} kanala, pumpi i transportera na ćelijskoj membrani i unutarćelijskim depoima (endoplazmatični retikulum (ER), mitohondrije). Astroцити експримирају бројне рецепторе за neurotransmitere i neuromodule koji mogu biti metabotropni i jonotropni. Metabotropni receptori posrednom signalizacijom dovode do oslobađanja Ca^{2+} iz ER. Jonotropni receptori su ligand-zavisni Ca^{2+} kanali čiji su ligandi neurotransmiteri i neuromodulatori. Neki od njih, koji su prikazani na slici, su jonotropni purinski P2X receptori koje aktivira adenozin-3-fosfat (ATP), glutamatni receptori NMDAR, AMPAR i kainatni receptori, i nikotinski receptor za acetilholin (AChR). Na membrani astrocita su eksprimirani voltažno-zavisni Ca^{2+} kanali (eng. voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCC), koji propuštaju Ca^{2+} u odgovoru na membransku depolarizaciju, kao i kanali koji pripadaju familiji katjonskih kanala u osnovi prolaznog receptorskog potencijala (eng. transient receptor potential cation channel, TRPC) koje mogu aktivirati različiti stimuli iz van- i unutarćelijske sredine. Astroцити експримирају изменјиваче poput $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača (NCX) koji su odgovorni za efluks Ca^{2+} . Na membranama unutarćelijskih depoa su takođe eksprimirani brojni proteini uključeni u homeostazu Ca^{2+} . Na endoplazmatičnom retikulumu se nalaze Ca^{2+} pumpa (SERCA, eng. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) (nije prikazana na slici) i receptor za inozitol-3-fosfat (IP3R) koji je ligand-zavisni kanal za Ca^{2+} . Na mitohondrijama se nalaze mitohondrijalni uniporter (MCU), mPTP (eng. mitochondrial permeability transition pore), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (NCLX) i $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivač (mHCX). Slika je modifikovana, a preuzeta je iz Ahmadpour et al. (2021).

Mitohondrije su drugi tip organela sa ulogom u održavanju homeostaze Ca^{2+} u astroцитима. U toku Ca^{2+} aktivnosti velikog intenziteta imaju ulogu u preuzimanju velike količine Ca^{2+} u cilju zaštite ćelije od prevelike unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (Lim et al., 2021; Walsh et al., 2009). Sa druge strane, same mogu uzrokovati Ca^{2+} tranzijente u astroцитима (Agarwal et al., 2017; Lim et al., 2021; Walsh et al., 2009). U unutrašnjoj membrani mitohondrija se nalaze brojni proteini zaduženi za regulaciju Ca^{2+} : mitohondrijalna tranziciona pora (eng. mitochondrial permeability transition pore, mPTP) (Agarwal et al., 2017), mitohondrijalni Ca^{2+} uniporter (eng. mitochondrial Ca^{2+} uniporter, MCU) (Dematteis et al., 2020), mitohondrijalni $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivač (eng. mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCLX) (Parnis et al., 2013) i $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivač ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, HCX) (Gunter et al., 2000; Santo-Domingo and Demareux, 2010). NCLX je uključen u regulaciju mitohondrijalnog efluksa Ca^{2+} , dok je HCX zadužen za regulaciju mitohondrijalnog influksa Ca^{2+} (Gunter et al., 2000; Parnis et al., 2013; Santo-Domingo and Demareux, 2010). U stanju mirovanja koncentracija Ca^{2+} u lumenu mitohondrija je oko 7 μM (Golovina and Blaustein,

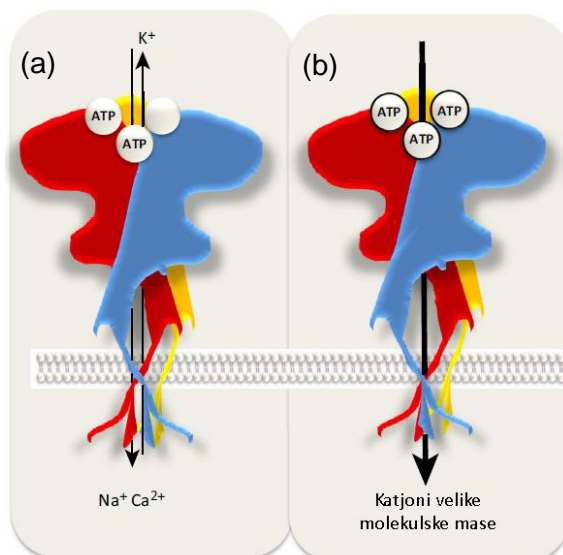
1997). Stimulacija astrocita ATP produkuje mitohondrijalne Ca^{2+} tranzijente čija amplituda može dostići i 20 μM (Dematteis et al., 2020). Povećanje koncentracije Ca^{2+} u lumenu mitohondrija ubrzava Krebsov ciklus i posledično dovodi do povećane proizvodnje ATP (Traaseth et al., 2004).

1.1.1.1. Jonotropni i metabotropni receptori astrocita

Do sada je pokazano da astrociti ekspimiraju brojne receptore za neurotransmitere, što im omogućava da reaguju na neurohemijske promene u CNS (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). U zavisnosti od načina aktivacije i toga kako utiču na funkcionisanje ćelije, receptori se dele na jonotropne i metabotropne.

Jonotropni receptori su receptori koji u svom sastavu imaju mesto za vezivanje liganda (neurotransmitera ili neuromodulatora) i jonski kanal. Vezivanje liganda dovodi do konformacione promene i otvaranje kanala, što omogućava prolazak jona za koje je kanal propustljiv. U slučaju receptora propustljivih za Ca^{2+} , aktivacija dovodi do povećanja unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (Lim et al., 2021). Jonotropni receptori, poseduju i izvesnu propustljivost za jon Na^+ što može delovati na funkcionisanje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjivača (NCX), koji je zadužen za uklanjanje Ca^{2+} iz ćelije, i stoga bitan element u kontroli unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (Rose et al., 2020). Astrociti poseduju veliki broj jonotropnih receptora, među kojima su purinski, glutamatni, acetilholinski i GABA receptori (Lim et al., 2021; Verkhatsky and Nedergaard, 2018) (Slika 2).

Purinski jonotropni receptori označavaju se kao P2X receptori (P2XR); pokazano je da astrociti ekspimiraju P2X1-5 i 7, ali se funkcionalnim smatraju samo P2X1, 5, 7 (Lalo et al., 2008; Oliveira et al., 2011). Afinitet P2XR za ATP se kreće između 1 i 10 μM , sa izuzetkom P2X7R koji reaguje veći opseg koncentracija ATP (do 1000 μM) (Abbracchio et al., 2009). Aktivacija P2X7R manjim koncentracijama agonista dovodi do otvaranja kanala propustljivog za Na^+ , K^+ i Ca^{2+} i nizvodne ćelijske signalizacije (Abbracchio et al., 2009), dok velike koncentracije agonista izazivaju otvaranje pore i propuštanja katjona velike molekulske mase, što je povezano sa ćelijskom smrću (Khadra et al., 2013) (Slika 3). Astrogljalni P2X7R privlači dosta pažnje usled svog značaja u patološkim uslovima (inicijacija apoptoze, ćelijska liza, regulacija astroglioze, oslobađanje citokina) (Abbracchio et al., 2009; Coddou et al., 2011; Falzoni et al., 1995; Kim et al., 2001; Di Virgilio et al., 2017; Volonté and Amadio, 2022).



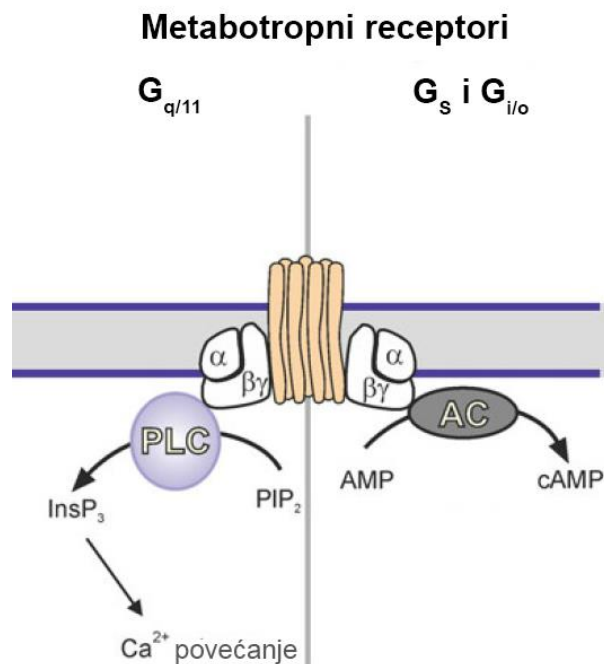
Slika 3. Uprošćeni prikaz strukture P2X7 receptora (P2X7R) u otvorenom stanju (a) i kada je formirana pora (b). (a) Mesta za vezivanje agonista se nalaze na mestu interakcije subjedinica homotrimer. Vezivanje agonista za 2 od 3 mesta je neophodno kako bi se kanal otvorio i postao propustljiv za Ca^{2+} , Na^+ i K^+ . Otvaranje kanala dovodi do ulaznog fluksa katjonske struje. (b) Dugotrajna ili ponovljena aktivacija receptora i vezivanje agonista za sva tri mesta dovodi do formiranja pore, nakon čega ovaj receptor postaje propustljiv za katjone velike molekulske mase. Preuzeto i modifikovano iz Sperlágth and Illes (2014).

Astroцити експримирају сва три типа јонотропних glutamatnih receptora – AMPA, NMDA и kainatne receptore (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). U izgradnji astroglialnih AMPA receptora mogu učestvovati sve četiri poznate subjedinice (GluA1, A2, A3 i A4), a sastav zavisi od regiona CNS. Zajedničko im je da pokazuju umerenu propustljivost za Ca^{2+} (Seifert and Steinhäuser, 1995). Astroglialni NMDA receptori su izgrađeni od kombinacije GluN1, 2C, 2D ili 3 subjedinice, a sastav definiše njihove specifične biofizičke osobine koje se ogledaju u slabom bloku jonom Mg^{2+} i propustljivošću za Ca^{2+} (Palygin et al., 2011; Schipke et al., 2001). Jonotropni GABA_A receptori su takođe prisutni na astroglialnoj membrani i propustljivi su za jone Cl^- (Meier et al., 2008), ali posrednim putem dovode do influksa Ca^{2+} kroz aktivaciju voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala (Vélez-Fort et al., 2012; Young et al., 2010). Astroцити експримирају nikotinske receptore za acetilholin (nAChR), a njihova aktivacija dovodi do otvaranja neselektivnog katjonskog kanala i ulazak Ca^{2+} i Na^+ , a izlazak K^+ (Oikawa et al., 2005; Piovesana et al., 2021).

Metabotropni receptori su proteini spregnuti sa proteinom G (eng. G protein-coupled receptor, GPCR) i predstavljaju najbrojniju porodicu membranskih receptora. Funkcionalni kompleks receptora se sastoji od 3 elementa: receptor od 7 transmembranskih segmenata, adapterski protein G i efektorni protein (Slika 4). Protein G se sastoji od tri subjedinice - α , β i γ . Aktivacija GPCR dovodi do disocijacije $\text{G}\alpha$ i $\text{G}\beta\gamma$ pri čemu oba elementa mogu pokrenuti nizvodnu signalizaciju (Jiang et al., 2022). Na osnovu signalizacije koju pokreće $\text{G}\alpha$ subjedinica metabotropni receptori za neurotransmitere na astroцитима se mogu podeliti u tri grupe:

1. G_S - aktivacija ovog receptora dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i stvaranja sekundarnog glasnika cikličnog adenzin-monofosfata (cAMP);
2. $\text{G}_{i/o}$ - aktivacija ovog receptora dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i prekida u stvaranju cAMP;
3. $\text{G}_{q/11}$ - aktivira PLC čijim delovanjem nastaju dva sekundarna glasnika – diacil glicerol (DAG) i IP_3 (Jiang et al., 2022).

G_S i $\text{G}_{i/o}$ posrednim putem mogu dovesti do promene aktivnosti i otvorenosti različitih kanala za Ca^{2+} , dok $\text{G}_{q/11}$ dovodi do aktivacije IP_3R na ER i oslobađanja Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa (Slika 4).



Slika 4. Metabotropni receptori za neurotransmitere na astroцитима. Metabotropni receptori su proteini spegnuti sa proteinom G i sastoje se od 3 elementa: receptor od 7 transmembranskih segmenata, adapterski protein G i efektorni protein. G protein se sastoji od 3 subjedinice (α , β , γ). Na osnovu signalizacije koju pokreće $\text{G}\alpha$ subjedinica metabotropni receptori za neurotransmitere na astroцитима se mogu podeliti u tri grupe: (1) $\text{G}_{q/11}$ (aktivacijom fosfolipaze C (PLC) nastaju dva sekundarna glasnika – diacil-glicerol (DAG) i

inozitol-3-fosfat (IP3); IP3 aktivira IP3 receptor (IP3R) i dovodi do oslobađanja Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa; (2) G_s (aktivacija ovog receptora dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i stvaranje sekundarnog glasnika cikličnog adenozin-monofosfata (cAMP)); (3) $G_{i/o}$ (aktivacija ovog receptora dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i prekida stvaranja cAMP). Preuzeto i modifikovano iz Verkhatsky et al. (2019).

Astroцити експримирају метаботропне рецепторе за пурине, глутамат, GABA, ацетилхолін, серотонин, допамин, адреналин и норадреналин (Verkhatsky et al., 2019).

Пурински метаботропни рецептори које астрoцити експримирају су P1 и P2Y (Franke et al., 2012). Лиганд за P1 рецепторе је аденозин, а на мембрани астрoцита су присутни и A1 и A3 рецептори који су спрегнути са $G_{i/o}$, као и A2A и A2B рецептори спрегнути са G_s (Rodrigues et al., 2019). Са друге стране, лиганди за P2YR су ATP и ADP, а према типу G протеина са којим су спрегнути поделjeni су у две групе: P2Y_{1, 2, 4, 6} спрегнути са G_q/G_{11} протеином и P2Y_{12, 14} спрегнути са $G_{i/o}$ (Abbracchio and Ceruti, 2006; Verkhatsky and Burnstock, 2014).

Метаботропни рецептори за глутамат који су експримирани на астрoцитима су mGluR1, mGluR5 спрегнути са $G_{q/11}$ и mGluR3 спрегнут са $G_{i/o}$ (Cuellar-Santoyo et al., 2022). Метаботропни GABA_B су заступљени у астрoцитима и њихова активација доводи до осlobаđanja Ca^{2+} из ER, иако су спрегнути са $G_{i/o}$ (Kang et al., 1998; Meier et al., 2008). Астрoцити експримирају M1 и M2 мускаринске ацетилхолинске рецепторе спрегнуте са $G_{q/11}$ (Verkhatsky et al., 2019). Астрoцити експримирају и α -адреналинске рецепторе спрегнуте са $G_{q/11}$ (Bekar et al., 2008; Ding et al., 2013) и β -адреналинске метаботропне рецепторе спрегнуте са $G_{i/o}$ (Horvat et al., 2016). Метаботропни рецептори за серотонин експримирани на мембрани астрoцита су 5-HT2A и 2B, спрегнути са $G_{q/11}$, и 5HT1 и 5 спрегнути са $G_{i/o}$ (Verkhatsky et al., 2019). На мембрани астрoцита су присутни и допамински D1 и D2 рецептори спрегнути са $G_{q/11}$ (Khan et al., 2001; Reuss and Unsicker, 2001).

1.1.2. Пuteви ослобаđanja gliotransmitera у току Ca^{2+} активности астрoцита

Астрoцити, као учесници триpartитне синапсе, активно комуницирају са неурoнимa. Осим способности да детектују ослобођене неурoтрансмитере у синапси, они и сами утичу на синаптичку трансмисију тако што ослобађају неурoактивне молекуле. Ова способност астрoцита да утичу на синаптичку трансмисију и неурoнску сигнализацију се назива gliotransмисија (Araque et al., 2014). Gliotransмитери укључују велики број разнородних молекула: екscитаторне и инхибиторне аминoкиселине (глутамат, аспарат, GABA, глицин, таурин, серин), ATP, липидне медијаторе (проstagландини), неурoпептиде, неурoтрофине, цитoкине, хемoкине, и факторе раста (Bergami et al., 2008; Bezzi and Volterra, 2001; Blum et al., 2008; Santello et al., 2012; Snyder and Kim, 2000; Vardjan et al., 2019).

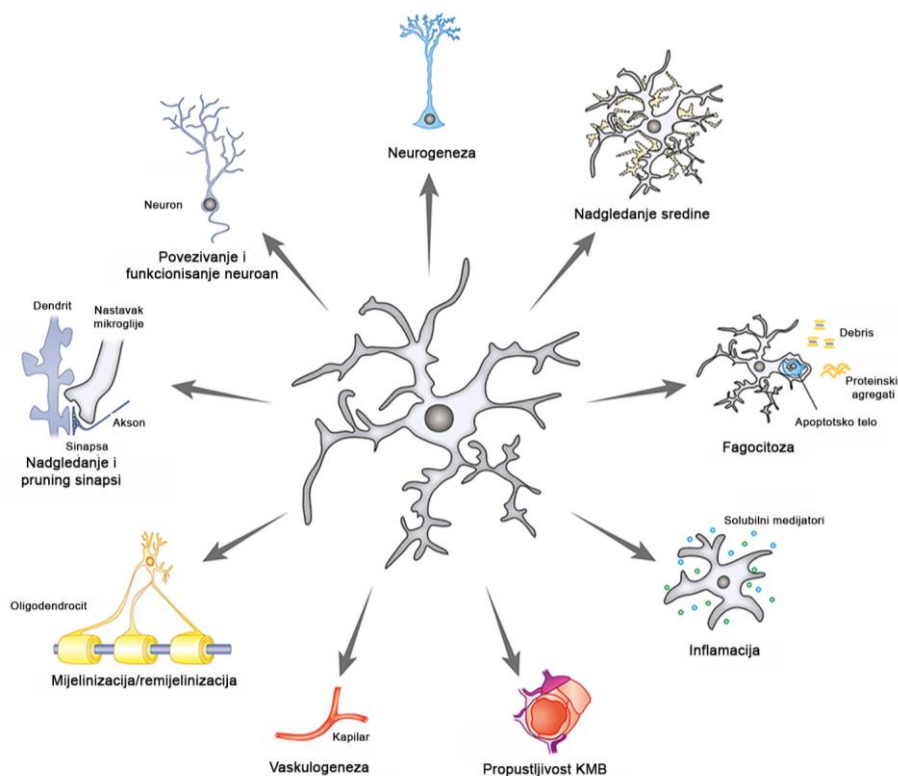
Астрoцити могу ослободити gliotransмитере егзocитозом, односно везикуларним путем (Fujita et al., 2009; Hussy et al., 2000; Vardjan et al., 2019; Woo et al., 2012). Показано је постојање микровезикула које су сличне синаптичким, као и компоненти SNARE комплекса укљученог у ослобађање садржаја везикула (Bezzi et al., 2004; Bohmbach et al., 2018; Hamilton et al., 2008; Vardjan et al., 2019). Овај процес је посредован активацијом астрoглијалних метаботропних GPCR рецептора, што води повећању унутарћелијске концентрације Ca^{2+} и последично ослобађање gliotransмитера из везикула (Crippa et al., 2006; Montana et al., 2004; Vardjan et al., 2019; Zhang et al., 2004). До сада је показано да везикуларним путем ослобађају глутамат (Bezzi et al., 1998, 2004; de Ceglia et al., 2023; Chai et al., 2017; Zhang et al., 2004), ATP (Bal-Price et al., 2002; Blum et al., 2008; Coco et al., 2003; Lalo et al., 2014), секретогранин II и атријумски науријетички пептид (Vardjan et al., 2019).

Други пут ослобађања gliotransмитера из астрoцита је кроз различите канале (анјонске канале регулисане запремином, хемиканале, мембранске поре које формира P2X7R) и транспортере (цистеин/глутаматни антипортер и транспортери оргaнских анјона (Goenaga et al., 2023; Vardjan et al., 2019). Астрoцити могу отпустити gliotransмитере глутамат, GABA и ATP кроз анјонске канале регулисане запремином (Kwak et al., 2020; Sabirov et al., 2001; Yang et al., 2019), као и кроз хемиканале изграђене од конексина (Cx) или панексина (Panx) (Fujii et al., 2017; Okada et al., 2021; Ransom et al., 2017). Структурно, Cx и Panx фамилија протеина чини групу хексамernih

transmembranskih pora koje su propustljive za jone, metabolite, sekundarne glasnike i medijatore purinske signalizacije veličine do 1,5 kDa (Loewenstein, 1981). Heksameri koji nisu povezani sa heksamerima na drugoj ćeliji se označavaju kao hemikanali kroz koje joni, metaboliti i medijatori purinske signalizacije veličine do 1,5 kDa izlaze u vanćelijski prostor. Kada se heksameri povežu sa heksamerima na susjednoj ćeliji, čine pukotinastu vezu koja obezbeđuje komunikaciju između dve ćelije putem direktne razmene unutarćelijskih molekula (Simard and Nedergaard, 2004).

1.2. Značaj i fiziološka svojstva mikroglije

Poreklo mikroglije u centralnom nervnom sistemu je dugo bilo nepoznato i predmet brojnih rasprava, ali je danas prihvaćeno da ove ćelije potiču od promijeloidnih progenitorskih ćelija poreklom iz žumancetne kese. U toku ranog embrionalnog razvića ove ćelije migriraju i naseljavaju CNS gde se diferenciraju u mikrogliju (Kabba et al., 2018). U fiziološkim uslovima mikroglija se odlikuje izuzetno razgranatom morfologijom. Sa malog ćelijskog tela polazi veliki broj nastavaka koji su u stalnom pokretu i intrakciji sa okruženjem koje čine krvni sudovi, astrociti, neuroni, oligodendrociti i prekursorne ćelije oligodendrocita (OPC) (Bilimoria and Stevens, 2015; Nimmerjahn et al., 2005) (Slika 5). Zahvaljujući brojnim receptorima prisutnim na nastavcima (purinski receptori, receptori za sistem komplementa, imunoglobuline, adhezivne molekule i inflamatorne stimulanse) ćelije mikroglije reaguju na promene u sredini ekspresijom i oslobađanjem neurotrofnih faktora i pro- i anti-inflamatornih citokina (Heneka et al., 2014; Nimmerjahn et al., 2005).



Slika 5. Uloge mikroglije u CNS. Mikroglija ima značajne uloge u fiziološkim i patološkim uslovima u CNS. Mikroglija interaguje sa drugim ćelijskim tipovima i utiče na njihove funkcije – neurone i njihove veze, diferenciranje neurona i neurogenezu, oligodendrocyte i mijelinizaciju, endotelne ćelije i vaskularizaciju, astrocite i održavanje i propustljivost KMB. Mikroglija ima ulogu u nadgledanju sredine u toku patoloških uslova i obavljanju imunskih funkcija – oslobađa inflamatorne medijatore i fagocituje ostatke. Slika je modifikovana i preuzeta iz Sierra et al. (2019).

Jon Ca^{2+} ima bitnu ulogu u prenosu signala i reagovanju mikroglije na iste. Kao i kod astrocita, a u zavisnosti od pokrenutog signalnog puta, Ca^{2+} može ući iz vanćelijske sredine kroz

različite jonske kanale eksprimirane na ćelijskoj membrani, ili biti oslobođen iz unutarćelijskih depoa (Helmut et al., 2011). Stimulusi za koje je poznato da u *in vitro* uslovima mogu indukovati Ca^{2+} tranzijente u mikroglijalnim ćelijama su neurotransmiteri, sistem komplemента, citokini i purini (Doolen et al., 2017; Ferreira and Schlichter, 2013; Haraguchi et al., 2017; Langfelder et al., 2015; Wang et al., 2018). Rezultat povećane unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} je povećana pokretljivost nastavaka mikroglije ili hemotaksija ka izvoru stimulusa (Nolte et al., 1996; Shideman et al., 2006). Ca^{2+} aktivnost mikroglije je povezana i sa njihovom fagocitarnom ulogom (Koizumi et al., 2007; Neher et al., 2014).

1.3. Komponente imunskog sistema

Imunski sistem predstavlja skup tkiva, ćelija i molekula koji koordinisano deluju protiv infekcije u cilju odbrane organizma. Osnovna podela je na urođeni i stečeni imunski sistem. Urođeni imunitet obezbeđuje inicijalnu odbranu od infekcije eliminacijom mikroorganizama, dok se stečeni imunitet razvija u susretu sa infekcijom i odlikuje se specifičnošću, a čine ga ćelijski i humoralni imunitet (Abbas et al., 2014).

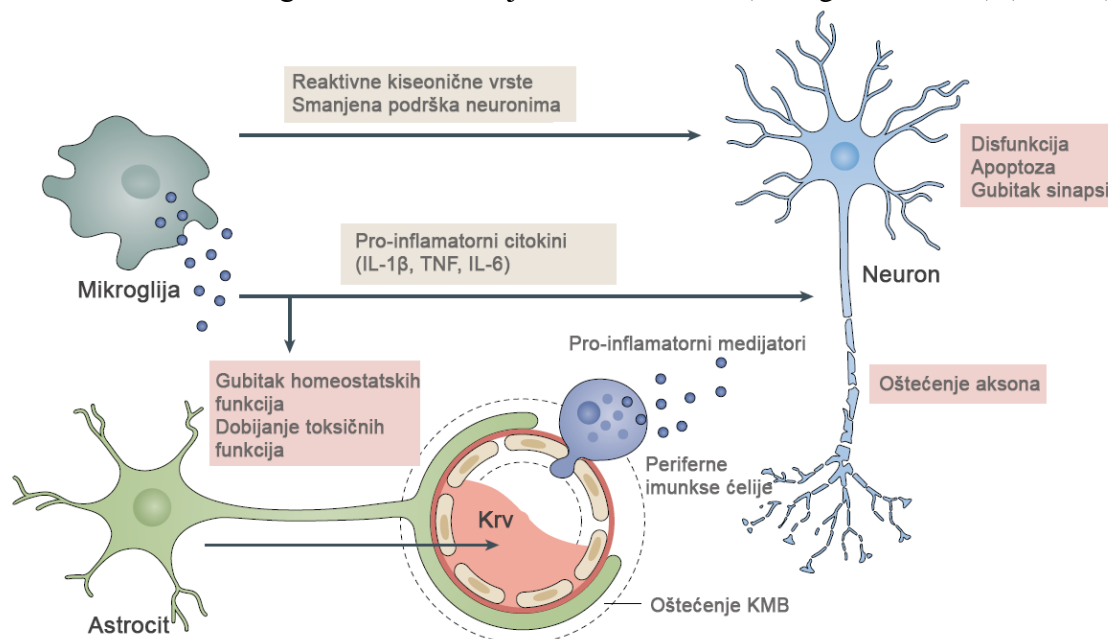
Ćelijski imunitet čine limfociti, antigen-prezentujuće ćelije (APC) i efektorske ćelije. Limfociti se prema načinu na koji prepoznaju antigene i reakciji na njih dele na B i T limfocite. B limfociti prepoznaju vanćelijske solubilne antigene i antigene na površini ćelije i u odgovoru na njih proizvode i oslobađaju antitela (imunoglobuline, IgG) koji su komponenta humoralne imunosti. T limfociti prepoznaju peptidne antigene prezentovane na APC i pomažu u fagocitozi mikroorganizama ili ubijaju inficirane ćelije. T limfociti se dele na CD4^+ pomoćne (Th) i CD8^+ citotoksične. CD8^+ citotoksični T limfociti ubijaju inficirane ili oštećene ćelije koje na svojoj površini eksprimiraju antigene. Th limfociti u odgovoru na antigene oslobađaju brojne molekule poput citokina i hemokina i na taj način pokreću inflamaciju, aktiviraju makrofage (efektorske ćelije) i dovode do diferencijacije B limfocita. CD4^+ pomoćne T ćelije se dele na Th1, Th2 i Th17. Th1 ćelije stimulišu fagocitujuće ćelije koje unose i uništavaju mikroorganizme. Najvažniji citokin koji proizvode Th1 ćelije je $\text{IFN-}\gamma$. Th2 ćelije pokreću imunski odgovor posredovan eozinofilima, a interleukini (IL) koje oslobađaju su IL-4, IL-5 i IL-13 (Abbas et al., 2014). Th17 ćelije oslobađaju IL-17 i ključni su medijatori inflamacije. Iako ovaj ćelijski tip ima važnu ulogu u odbrani domaćina, poslednjih godina im se poklanja dosta pažnje jer je ustanovljeno da su primarni medijatori u patogenezi autoimunskih poremećaja poput MS (Tesmer et al., 2008). Poseban tip T limfocita su regulatorne T ćelije (Treg) koje predstavljaju specijalizovani podtip sa ulogom u supresiji imunskog odgovora i održanju homeostaze. Marker ovih ćelija je unutarćelijski protein FoxP3. Smatra se da je izmenjena regulacija broja i funkcije Treg odgovorna za razvoj autoimunskih oboljenja (Kondělková et al., 2010).

Humoralni imunitet čine sistem komplemента (skup cirkulišućih i membransih proteina) koji je komponenta urođenog imunskog sistema i IgG koji su komponenta stečenog imunskog sistema. Aktivirani B limfociti u odgovoru na različite antigene stvaraju specifična antitela sa primarnom ulogom u inaktivaciji mikroorganizama. Nепroteinski antigeni (lipidi i polisaharidi) mogu direktno aktivirati B limfocite da sintetišu i oslobađaju antitela, dok proteinske antigene prezentuju CD4^+ T limfociti preko glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex, MHC). Postoji nekoliko klasa antitela, od kojih je najzastupljeniji imunoglobulin G (IgG), koji nastaje u odgovoru na proteinske antigene (Abbas et al., 2014).

1.4. Uloga glijalnih ćelija u inflamacijskim procesima CNS

Neuroinflamacija je inflamatorni odgovor u CNS na patološki stimulus koji može biti infekcija, trauma, ishemija, toksini, neurodegeneracija, a posredovan je komunikacijom između CNS i komponenti imunskog sistema (Slika 6). Mikroglija i astrociti u toku inflamatornog odgovora oslobađaju pro-inflamatorne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-18, faktor nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor, TNF α), hemokine (CCL1, CCL5, CXCL1), glasnike male molekulske mase (NO, prostaglandini) i reaktivne kiseonične vrste (eng. reactive oxygene species, ROS) (DiSabato et

al., 2016; Liddelow et al., 2017; Norden et al., 2016). Endotelne ćelije kapilara i imunске ćelije koje se infiltriraju u CNS takođe doprinose procesu neuroinflamacije, posebno u uslovima koji su praćeni oštećenjem i otvaranjem KMB (Dendrou et al., 2015; Ludewig et al., 2019). Bitno je napomenuti da u toku inflamacije dolazi i do oslobađanja anti-inflamatornih citokina (antagonist za receptor za IL-1, IL-4, IL-10 i IL-11) koji imaju ulogu u ograničavanju neuroinflamacije (DiSabato et al., 2016). Iako ovi događaji primarno imaju ulogu da održe homeostazu i favorizuju preživljavanje, neuroinflamacija u kontekstu neurodegenerativnih bolesti predstavlja hroničan proces i smatra se da je pokretač brojnih patoloških događaja (Zhang et al., 2023). Hronična neuroinflamacija se nalazi u osnovi svih neurodegenerativnih oboljenja (Zhang et al., 2023), uključujući multiplu sklerozu (MS) (Dendrou et al., 2015) i amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) (Béland et al., 2020). U toku hronične neuroinflamacije dolazi do povećane produkcije citokina i hemokina od strane glijalnih ćelija, infiltracije perifernih imunskih ćelija, otoka, povećane propustljivosti ili narušavanja KMB (DiSabato et al., 2016). Medijatori inflamacije postaju neurotoksični i dovode do dugoročne disfunkcije i smrti neurona (Zhang et al., 2023) (Slika 6).



Slika 6. Patološke uloge glijalnih ćelija u neuroinflamaciji. U toku neuroinflamacije dolazi do aktivacije glijalnih ćelija, astrocита i mikroglije. Aktivirana mikroglija oslobađa reaktivne kiseonične vrste, pro-inflamatorne citokine (IL-1β, TNFα, IL-6) koji ostvaruju direktne toksične efekte na neurone ili deluju na aktivaciju astrocита. Aktivirani astrociti gube svoje homeostatske funkcije i dobijaju nove toksične funkcije. Neuroinflamaciju odlikuju oštećenje krvno-moždane barijere (KMB) i infiltracija perifernih imunskih ćelija koje takođe oslobađaju brojne pro-inflamatorne medijatore. Neuroinflamatorna sredina dovodi do oštećenja aksona, disfunkcije neurona i gubitka sinapsi, kao i apoptoze neurona. Glijalne ćelije oslobađaju brojne hemokine koji regrutuju perifernе imunske ćelije u CNS kroz narušenu ili oštećenu KMB, što se takođe dešava u toku neuroinflamacije. Preuzeto i modifikovano iz Leng and Edison (2021).

1.4.1. Astrociti u neuroinflamaciji

U svakom patološkom stanju CNS dolazi do aktivacije astrocита. To podrazumeva da astrociti prolaze kroz molekularne i funkcionalne promene i dobijaju reaktivan fenotip (Liddelow and Barres, 2017; Sofroniew, 2020).

U toku neuroinflamacije reaktivni astrociti oslobađaju različite molekule – citokine (Fujita et al., 2009), hemokine (Kuboyama et al., 2011), NO (Narcisse et al., 2005), ATP (Burnstock, 2016) i glutamat (Bezzi et al., 2001). Sekretija neurotoksičnih vrsta dovodi do oštećenja i smrti neurona (Liddelow et al., 2017). U toku neuroinflamacije dolazi do smanjene astroglijalne metaboličke podrške neuronima (Ferraiuolo et al., 2011; Merlini et al., 2011; Polyzos et al., 2019), kao i do poremećaja u preuzimanju neurotransmitera i oslobađanja gliotransmitera (pre svega glutamata) što zajedno može voditi ekscitotoksičnosti i gubitku neurona (Bezzi et al., 2001; Pardo et al., 2006). U

neuronflamacijskim procesima dolazi i do poremećaja u preuzimanju ekstraćelijskog jona K^+ . Naime, ustanovljeno je značajno smanjenje ulazne Kir struje pri različitim koncentracijama vanćelijskog Ca^{2+} u kulturi hSOD1^{G93A} pacovskih astrocita, kao i smanjena ekspresija Kir4.1 u moždanom stablu i korteksu hSOD1^{G93A} pacova (Bataveljić et al., 2012). Ove promene ukazuju na smanjenu sposobnost astrocita da održavaju homeostazu K^+ što nepovoljno utiče na neurone i može dovesti do njihove disfunkcije i smrti (Bataveljić et al., 2012).

Rezidentne ćelije CNS i infiltrirane imunske ćelije oslobađaju brojne faktore koji modulišu aktivnost astrocita u neuroinflamaciji (Codarri et al., 2011; Liddelov and Barres, 2017; Mayo et al., 2014). Aktivirana mikroglia oslobađa pro-inflamatorne citokine (IL-1 α , TNF- α) i C1q komponentu sistema komplementa na koje astrociti odgovaraju transkripcionim promenama i povećanjem ekspresije markera neurotoksičnih astrocita - C3 proteina, smanjenjem fagocitarne uloge i ekspresijom neurotrofičkih faktora (Liddelov et al., 2017). Bitno je istaći da su neurotoksični astrociti identifikovani u mnogim bolestima CNS uključujući i ALS i MS (Linnerbauer et al., 2020).

1.4.1.1. Astroglialna purinska signalizacija u neuroinflamaciji

Purinska signalizacija koja je posredovana ATP i produktima njegove razgradnje je dominantan način međućelijske komunikacije astrocita sa drugim astrocitima i ostalim ćelijskim tipovima (Franke et al., 2012). ATP je važan signalni molekul u fiziološkim uslovima, ali i u toku neuroinflamacije, jer doprinosi razvoju astroglioze i pojavi reaktivnih astrocita (Brambilla and Abbracchio, 2001; Escartin et al., 2019; Franke et al., 1999; Hindley et al., 1994; Sofroniew, 2015b). Mikroinfuzija ATP, ADP ili analoga adenozina u *nc. accumbens* ili korteks mozga pacova dovodi do hipertrofije ćelijskog tela i povećane ekspresije GFAP, dok administracija antagonista P2R – suramina, reaktivnog plavog 2 i PPADS (piridokslfosfat-6-azofenil-2', 4'-disulfonska kiselina tetranatrijumska so) ostvaruje pozitivne efekte i smanjuje astrogliozu (Franke et al., 1999; Hindley et al., 1994). Astroцити u kulturi nakon izlaganja analogu ATP takođe razvijaju reaktivni fenotip koji je u potpunosti suprimiran prethodnom primenom PPADS (Brambilla and Abbracchio, 2001). ATP i njegovi analozi i u *in vivo* i *in vitro* uslovima dovode do povećane proliferacije astrocita, što je takođe odlika reaktivne astroglioze (Abbracchio et al., 1994; Franke et al., 1999, 2012).

U uslovima neuroinflamacije P2XR i P2YR su stimulisani usled povećane količine ATP u vanćelijskom prostoru (Franke et al., 2012). Njihova aktivacija dovodi do pokretanja različitih signalnih puteva uključених u neuroinflamatorni odgovor astrocita, poput ERK (eng. extracellular signal-regulated protein kinase), Akt kinaze (eng. serine-threonine kinase Akt), JNK (eng. c-Jun N terminal kinase), p38 kinaze i MAPK (eng. mitogen-activated protein kinase) (Erb et al., 2006; Franke et al., 2012). Aktivacija metabotropnog astroglialnog P2Y₁R dovodi do oslobađanja glutamata (Domercq et al., 2006), kao i do promene u ekspresiji gena koji kodiraju različite citokine (IL-6, TNF- α) (Fujita et al., 2009), hemokine (MCP1/CCL2, IP-10/ CXCL10) (Kuboyama et al., 2011) i neurotrofne faktore (GDNF) (Sun et al., 2008). Takođe, ATP dovodi do promene ekspresije proteina astrocita koji su uključeni u ćelijsku adheziju, poput N-kadherina, što utiče na ćelija-ćelija interakcije sa drugim ćelijama glije i neuronima (Tran et al., 2008).

Aktivacija astroglialnih P2R pokreće i Ca^{2+} signalizaciju astrocita (Parpura et al., 2012), koja može rezultovati u pokretanja njihove sekretorne aktivnosti i daljeg oslobađanja ATP (Anderson et al., 2004; Di Virgilio et al., 2017). Reaktivnu astrogliozu odlikuje hiperaktivnost astroglije koja se ogleda u izraženim Ca^{2+} talasima i tranzijentima unutar ćelije i u populaciji astrocita. U mišjem modelu Alchajmerove bolesti blokada P2Y₁R ili inhibicija oslobađanja ATP kroz hemikanale ograničava Ca^{2+} signalizaciju, što ukazuje na to da je uočena hiperaktivnost astrocita u ovom modelu posledica purinske signalizacije (Delekate et al., 2014; Reichenbach et al., 2018).

Osim što deluje na same astrocite, ATP utiče i na druge ćelijske tipove u neposrednom okruženju. Povećana vanćelijska količina ATP može dovesti do smrti neurona usled preterane aktivacije njihovih purinskih receptora (npr. P2Y₁R (Simões et al., 2018)). Komunikacija između

astrocita i mikroglije je između ostalog posredovana upravo ovim molekulom (Jha et al., 2019; Madry and Attwell, 2015), tako da ATP oslobođen iz astrocita dovodi do Ca^{2+} signalizacije mikroglije (Schipke et al., 2002) i povećanog oslobađanja pro-inflamatornih citokina kao što je IL-1 β (Bianco et al., 2005). Vanćelijski ATP reguliše dinamiku mikroglijalnih nastavka u zdravom mozgu, a njegovo oslobađanje od strane astrocita u patološkim uslovima dovodi do brzog odgovora mikroglije i povećanja pokretljivosti njenih nastavaka ka mestu oštećenja (Davalos et al., 2005). Komunikacija između astrocita i oligodendrocita je takođe posredovana purinima (Agostinho et al., 2020). ATP koji astrociti oslobode u toku mehaničke stimulacije dovodi do Ca^{2+} oscilacija u NG2 OPC putem aktivacije P2Y₁R i P2X7R (Hamilton et al., 2010). Astrociti u odgovoru na ATP oslobađaju inhibični faktor leukemije (LIF), pro-mijelinizujući citokin, koji promoviše sazrevanje OPC (Ishibashi et al., 2006). ATP astroglijalnog porekla uzrokuje Ca^{2+} odgovor OPC kroz ATP-zavisnu aktivaciju P2Y₁R i P2X7R. Preterana aktivacija oligodendroglijalnog P2X7R dovodi do smrti ovih ćelija, što doprinosi demijelinizaciji i razvoju bolesti (Agresti et al., 2005; Hamilton et al., 2017).

Iz opisanog se može zaključiti da purinska signalizacija, osim u održavanju homeostaze u fiziološkim uslovima, ima bitnu ulogu u remećenju astroglijalnih homeostatskih funkcija i modulaciji neuroinflamatornog odgovora astrocita.

1.4.2. Mikroglija u neuroinflamaciji

Kao komponenta urođenog imunskog sistema, ćelije mikroglije reaguju u traumi, ishemiji, neurodegenerativnim bolestima ili poremećenoj nervnoj aktivnosti. Aktivirana mikroglija hemotaksički migrira na mesta oštećenja i povećava svoj broj deobom (Helmut et al., 2011). Ovaj fenomen se označava kao reaktivna mikrogliaza (Block et al., 2007). U toku aktivacije mikroglija povlači nastavke i zadobija ameboidnu formu (Helmut et al., 2011). Osim morfoloških, dolazi do promena u genskoj i proteinskoj ekspresiji i funkcionisanju ovih ćelija. Pri aktivaciji menja se repertoar površinskih molekula mikroglije odgovornih za interakciju sa drugim ćelijama i vanćelijskim matriksom, dolazi do promene ekspresije unutarćelijskih proteina i oslobađanja brojnih pro-inflamatornih ili anti-inflamatornih i imunoregulatornih faktora (Helmut et al., 2011). Aktivirana mikroglija ima sposobnost fagocitoze, tako da ima ulogu u uklanjanju oštećenih ćelija, ostataka tkiva ili mikroorganizama (Helmut et al., 2011).

Ranije se smatralo da aktivirana mikroglija može imati jedan od dva fenotipa, M1 ili pro-inflamatorni i M2 ili anti-inflamatorni. Danas se zna da su ovo dva ekstrema u spektru fenotipa i da aktivirana mikroglija može imati karakteristike oba fenotipa u određenoj meri (Cherry et al., 2014). M1 ćelije su efektorske ćelije čija je funkcija uklanjanje patogena ili oštećenih sopstvenih ćelija. One eksprimiraju i oslobađaju pro-inflamatorne citokine, poput TNF- α , IL-1, IL-6, hemokine, proteaze, MHCII, ROS, NO i prostaglandine (Rojo et al., 2014). Mikroglija M2 fenotipa, koja ima reparativnu ulogu, eksprimira anti-inflamatorne citokine, poput IL-4, IL-13 i IL-10, TGF- β i brojne gene koji kodiraju proteine uključene u procese reparacije tkiva (Rojo et al., 2014). Aktivirana mikroglija u različitim neurodegenerativnim bolestima zadobija M1 fenotip i kao takva ostvaruje štetne efekte na okolne neurone (Heneka et al., 2014). Mikrogliju u hronično aktiviranom stanju održavaju konstantno prisutni oštećeni neuroni (Block et al., 2007). Neurotoksični produkti hronično aktivirane mikroglije svojim delovanjem dodatno povećavaju štetu, pa se smatra da na taj način doprinosi daljoj progresiji neurodegenerativnih bolesti (Block et al., 2007).

1.5. Značaj glike u bolestima CNS praćenih neuroinflamacijom

1.5.1. Multipla skleroza – patofiziološki procesi

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) koja se odlikuje demijelinizacijom i degeneracijom aksona (Compston and Coles, 2008; Dendrou et al., 2015). Prema podacima iz 2020. godine u svetu trenutno živi 2,8 miliona ljudi sa dijagnozom MS (Walton et al., 2020). Prevalenca bolesti je 35,9 na 100 000 ljudi, incidenca javljanja je 2,1 na

100 000 ljudi po godini, a bolest je učestalija dva puta kod ženskog pola u odnosu na muški (Walton et al., 2020). MS je oboljenje koje se javlja kod mladih odraslih osoba i dovodi do fizičkog invaliditeta, što ima veliki uticaj na život obolele osobe, ali i njihovo okruženje i društvo u širem kontekstu. Predstavlja heterogenu, multifaktorijalnu bolest koja nastaje usled kompleksnih interakcija genetičkih i sredinskih faktora (Brambilla, 2019; Compston and Coles, 2008). Na osnovu kliničke slike koja se javlja kod pacijenata, razlikuju se tri oblika MS. Najčešći oblik, u 80 – 85% slučajeva, je relapsno remitentna multipla skleroza koja se odlikuje smenjivanjem perioda ispoljavanja kliničkih simptoma i faza oporavka (Nylander and Hafler, 2012). Usled ireverzibilne akumulacije neurodegenerativnih promena, prelazi u progresivni u toku kog neurološka disfunkcija postaje sve izraženija i označava se kao sekundarna progresivna MS. Kod 10 – 15% pacijenata MS počinje kao progresivna, što se označava kao primarna progresivna multipla skleroza (Nylander and Hafler, 2012). Ovaj oblik predstavlja jedinstven oblik MS ili jednostavno bez klinički uočljivih relapsa (Miller and Leary, 2007).

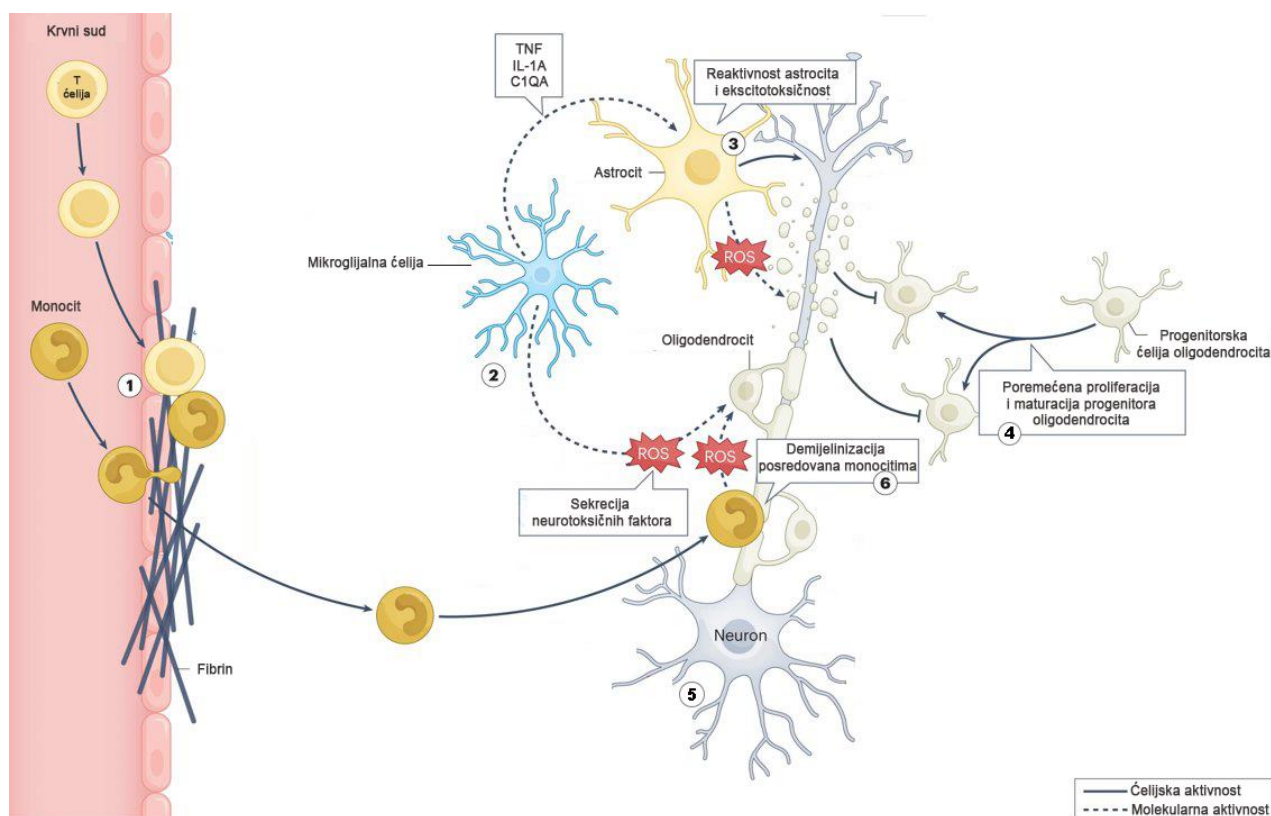
Glavno obeležje MS su lezije u CNS uzrokovane infiltracijom perifernih imunskih ćelija i posledičnom inflamacijom, demijelinizacijom i degeneracijom aksona (Slika 7). Postoje dve hipoteze o mehanizmu nastanka MS. Imuno-centrična, ujedno i prihvaćenija hipoteza, polazi od stanovišta da bolest ima autoimunsku osnovu i da je mesto inicijacije periferija, van CNS. Naime, pretpostavka je da autoreaktivni T limfociti na periferiji prepoznaju antigene karakteristične za CNS usled molekularne mimikrije, a zatim prolaze KMB i ulaze u CNS zajedno sa B ćelijama i makrofagima gde dovode do razvoja multifokalne inflamacije, gubitka oligodendrocita, demijelinizacije i degeneracije aksona (Baecher-Allan et al., 2018; Dendrou et al., 2015) (Slika 7). Međutim, potrebno je napomenuti da mehanizmi koji su posredovani imunskim ćelijama nisu dovoljni za objašnjenje degeneracije neurona bez razmatranja uloge rezidentnih ćelija CNS. Druga hipoteza je CNS-centrična i zastupa ideju da se inicijalni događaji zbivaju u samom CNS, a da je infiltracija autoreaktivnih ćelija sekundarna pojava i odgovor na dešavanja u CNS. Još uvek nije poznato šta bi bio primarni događaj, ali je poznato da infekcija Epštajn-Barovim virusom može biti okidač za razvoj ove bolesti (Robinson and Steinman, 2022). Studije su pokazale da primarna oštećenja mogu nastati na oligodendrocitima, što dalje vodi aktivaciji imunskog odgovora i neurodegeneraciji (Brambilla, 2019). Kada je u pitanju genetička predispozicija, geni koji privlače pažnju kao okidači su geni povezani sa imunološkim funkcijama organizma. Kao kandidati izdvojeni su geni koji kodiraju proteine sa imunološkim funkcijama poput gena za IL-2, gena za interferone i nuklearni faktor κ B (NF κ B) (Beecham et al., 2013).

U terapiji MS se koriste imunomodulatorne supstance, a u poslednje tri decenije je razvijen veliki broj lekova (Charabati et al., 2023). Jedan od prvih je interferon- β (IFN- β) koji deluje na različite podtipove imunskih ćelija, prevenstveno T ćelije, a deluje tako što menja balans pro- i anti-inflamatornih faktora (Klotz et al., 2019; Li et al., 2017). Razvijene su terapije koje sprečavaju migraciju imunskih ćelija u CNS, a primer su modulatori receptora za sfingozin-1-fosfat (Rothhammer et al., 2017) i blokator VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -integrin) (Yu et al., 2013). Treći vid su terapije koje dovode do smanjenja broja različitih tipova imunskih ćelija, poput anti-CD52 koji cilja T i B ćelije i anti-CD20 koji dovodi do smanjenja broja B ćelija (Cencioni et al., 2021; Chisari et al., 2022; Lee et al., 2021; Steinman et al., 2022). U toku su brojne kliničke studije za razvoj novih oblika terapija, a samo od nekih su inhibitori Brutnove tirozin kinaze koja cilja B ćelije i periferne mijeloidne ćelije i ograničava njihovu interakciju sa T ćelijama (Martin et al., 2020).

1.5.1.1. Patofiziološke promene astrocita u MS

Uloga astrocita u oboljenjima CNS, MS i odgovarajućem animalnom modelu – eksperimentalom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), koje prati neuroinflamacija je veoma značajna. MS karakteriše pojava reaktivnih neurotoksičnih astrocita koji oslobađaju brojne medijatore inflamacije koji dovode do regrutovanja perifernih imunskih ćelija, aktivacije mikroglije i promovisanja gubitka oligodendrocita i demijelinizacije (Brambilla, 2019; Dendrou et al., 2015; Linnerbauer et al., 2020) (Slika 7). Astroцити postaju reaktivni u ranim fazama MS i EAE, pre pojave prvih kliničkih simptoma i lezija, u periodu kada se dešavaju lokalne perivaskularne infiltracije

limfocita i narušavanje KMB (D'Amelio et al., 1990; Pham et al., 2009; Voskuhl et al., 2009; Wang et al., 2005).



Slika 7. Patološki procesi u CNS u toku multiple skleroze. (1) Glavna karakteristika multiple skleroze (MS) je infiltracija perifernih imunskih ćelija koje deluju direktno na neurone ili putem solubilnih neurotoksičnih faktora. (2, 3) Glijalne ćelje, astrociti i mikroglija, dobijaju reaktivni fenotip i direktno doprinose propadanju mijelinskog omotača. Dodatno, aktivirana mikroglija oslobađa citokine (TNF, IL-1A i C1QA) i reaktivne kiseonične vrste (ROS) i dovodi do transformacije astrocita u neurotoksične. (4) MS se odlikuje poremećenom proliferacijom i maturacijom prekursornih ćelija oligodendrocita. (5, 6) MS se karakteriše degeneracijom neurona i gubitkom mijelinskog omotača. Modifikovano i preuzeto iz Distéfano-Gagné et al. (2023).

U akutnim demijelinizujućim lezijama CNS MS pacijenata je uočeno da astroci eksprimiraju C3, klasični marker neurotoksičnih astrocita (Liddelov et al., 2017). Takođe, neurotoksični fenotip astrocita se u aktivnim lezijama ogleda u tome da oni eksprimiraju i oslobađaju pro-inflamatorne citokine TNF- α i IL-6 (Hofman et al., 1989; Schönrock et al., 2000).

Neurotoksični astrociti dovode do smrti zrelih oligodendrocita, dok usporavaju diferencijaciju i proliferaciju OPC (Liddelov et al., 2017). Astrociti u aktivnim lezijama i obodima hroničnih lezija produkuju i anti-inflamatorne citokine (IL-10, IL-4, IL-27) (Hulshof et al., 2002; Sénécal et al., 2016). Takođe, anti-inflamatorne uloge ostvaruju delujući direktno na imunске ćelije i izazivajući njihovu apoptozu preko povećane ekspresije liganada za Fas receptor, čija ablacija dovodi do pogoršanja simptoma EAE kod obolelih životinja (Choi et al., 1999; Linnerbauer et al., 2020; Wang et al., 2013).

Promene u signalizaciji i ekspresiji elemenata purinskog signalnog sistema u astrocitima su dovedene u vezu sa reaktivnim fenotipom astrocita i neuroinflamatornim odgovorom u toku EAE (Adzic Bukvic et al., 2023; Grygorowicz et al., 2016; Jakovljevic et al., 2017). Dosadašnja istraživanja *post mortem* CNS pacijenata i CNS EAE životinja su pokazala promene u ekspresiji P2X7R. Naime, ekspresija ovog receptora je povećana u astrocitima u lezijama prisutnim u frontalnom korteksu MS pacijenata, kao i u reaktivnim astrocitima koji okružuju infiltrirane imunске ćelije (Amadio et al., 2017; Narcisse et al., 2005). Povećana ekspresija P2X7R je uočena i u astrocitima u srednjem mozgu pacova sa indukovanim EAE (Grygorowicz et al., 2016). Tretman

humanih fetalnih astrocita pro-inflamatornim citokinom IL-1 β povećava ekspresiju P2X7R, kao i Ca²⁺ odgovor ovih astrocita posredovan aktivacijom P2X7R (Narcisse et al., 2005). Blokada ovog receptora Brilljantnim plavim G kod pacova kojima je indukovano EAE dovodi do smanjenja astroglioze i ublažava simptome bolesti (Grygorowicz et al., 2016). Deficijencija P2X7R kod „knock-out” *P2rx7* kod miša suprimira razvoj EAE, smanjuje aktivaciju astrocita i oštećenje aksona, iako nema uticaja na infiltraciju imunskih ćelija (Sharp et al., 2008). Osim toga, P2X7R koimunoprecipitira sa Panx1 u astrocitima pacova (Silverman et al., 2009), a „knock-out” *Panx1* miševi kasnije razvijaju kliničke simptome EAE u odnosu na miševe divljeg soja (Lutz et al., 2013). Svi ovi podaci jasno ukazuju na značaj astrogljalnog P2X7R u patologiji MS.

1.5.1.2. Interakcija astrocita sa komponentama imunskog sistema u MS

Centralna uloga perifernih imunskih ćelija – T ćelija, B ćelija i mijeloidnih ćelija je potvrđena analizom uzoraka MS pacijenata, kao i u animalnom modelu. Pokazano je da dovode do oštećenja oligodendrocita i neurona, aktiviranja rezidentnih ćelija CNS – astrocita i mikroglije (Charabati et al., 2023).

Autoreaktivne CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije pokazuju reaktivnost prema mijelinu, a neki od antigena koje prepoznaju su mijelinski bazni protein (eng. myelin basic protein), mijelinski glikoprotein oligodendrocita (eng. myelin oligodendrocyte glycoprotein), proteolipidni protein mijelina (eng. myelin proteolipid protein) (Hohlfeld et al., 2016). Intravenska injekcija Th1 i Th17 CD4⁺ ćelija, koje pokazuju specifičnost za antigene CNS, kod zdrave životinje dovodi do razvoja pasivnog EAE (Domingues et al., 2010).

Brojni su dokazi o direktnim uticajima međućelijskih interakcija imunskih i rezidentnih ćelija CNS u ovoj patologiji. Th1 ćelije stimulišu makrofage i mikrogliju i otežavaju preživljavanje OPC i njihovu diferencijaciju u oligodendrocite (Moore et al., 2015; Murphy et al., 2010). Th17 ćelije oštećuju KMB, podstiču infiltraciju fagocitujućih ćelija, modulišu funkcionisanje glijalnih ćelija i interaguju sa oligodendrocitima i neuronima, izazivaju oštećenja aksona i neurodegeneraciju (Siffrin et al., 2010; Wheeler et al., 2020).

Astrociti su prve rezidentne ćelije sa kojima imunske ćelije stupaju u kontakt u toku infiltracije u CNS (Charabati et al., 2023; Linnerbauer et al., 2020). Anatomska pozicija astrocitnih stopala omogućava da reaguju na solubilne faktore u prostoru između meningi (Sofroniew, 2015a). Dvosmerna interakcija između ova dva tipa ćelija aktivno moduliše proces regrutovanja, dijapedeze i ekstravazacije imunskih ćelija kroz endotelnu barijeru u perivaskularni prostor i parenhim CNS. Infiltrirane imunske ćelije, prvenstveno T ćelije, oslobađaju različite molekule poput pro-inflamatornih citokina i hemokina, deluju na astrocite i dovode do oslobađanja hemokina (CCL2, CCL20, CXCL1), citokina (TNF, IL-1 β , IL-6), faktora rasta (NGF, BDNF, VEGF-A), NO, gradivnih molekula vanćelijskog matriksa (Prins et al., 2014; Simpson et al., 2000; Sofroniew, 2009; Van Der Voorn et al., 1999). Sa druge strane, hemokini poput CCL2 i CXCL10 koje oslobađaju aktivirani astrociti pospešuju regrutovanje perivaskularnih imunskih ćelija u CNS (Kim et al., 2014; Mills Ko et al., 2014; Paul et al., 2014). Imajući navedeno u vidu, astrociti i međućelijske interakcije su atraktivni kandidati za terapijske intervencije u MS i potrebno je dodatno istražiti aspekte ove interakcije.

1.5.2. Amiotrofična lateralna skleroza - patofiziološki procesi

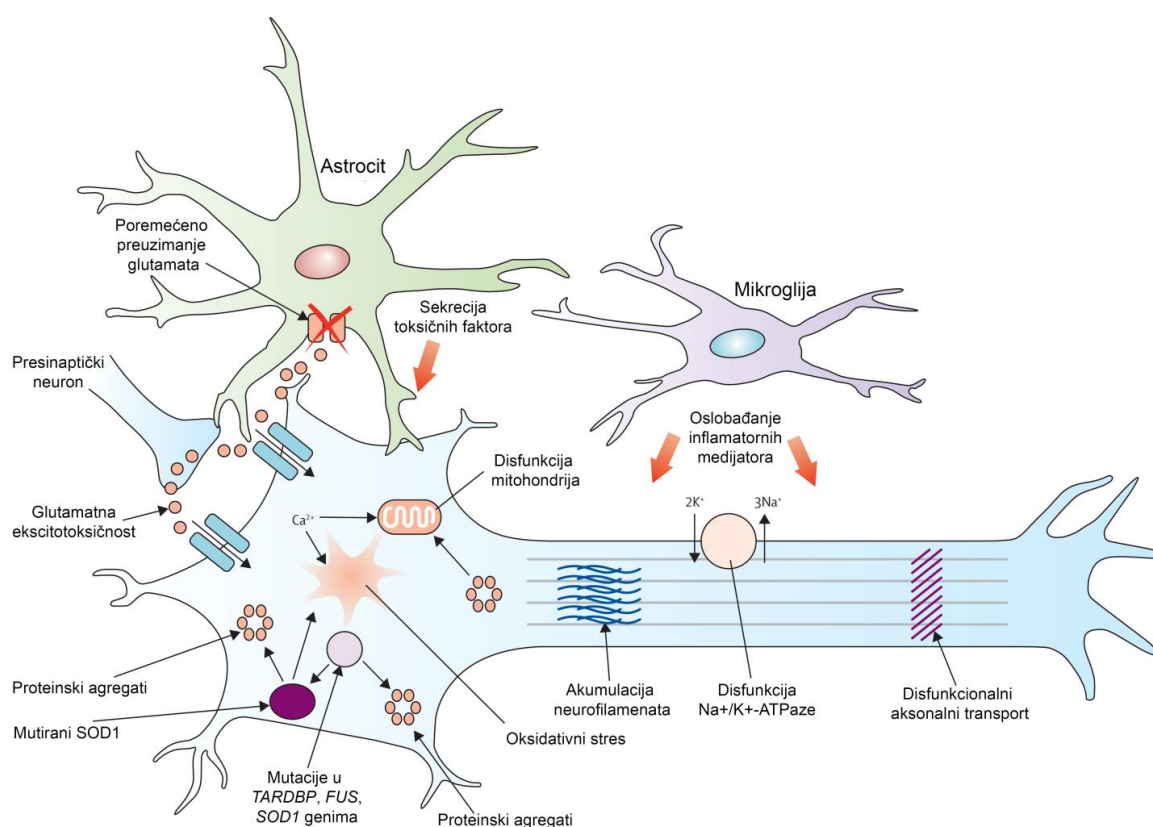
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je fatalna neurodegenerativna bolest koja se odlikuje progresivnim gubitkom motoneurona kičmene moždine, moždanog stabla, kortikospinalnog trakta i primarnog motornog korteksa, usled čega dolazi do mišićne paralize (Hardiman et al., 2017). ALS se smatra retkom neurodegenerativnom bolešću sa incidencom javljanja 2 - 3 slučaja na 100 000 stanovnika (Logroschino et al., 2010). Starost osoba kada se uoče prvi simptomi se kreće između 51 i 66 godina, a prvi simptomi su mišićna slabost, poremećena kontrola gutanja i govora. Odlikuje se izuzetno brzom progresijom, sa smrtnim ishodom 3 do 5 godina nakon pojave prvih simptoma (Brown and Al-Chalabi, 2017; Hardiman et al., 2017). Najveći broj slučajeva, oko 90%, spada u

sporadični oblik bolesti (sALS), dok je svega 10% sa poznatim genetičkim uzrokom i klasifikuje kao familijalni ALS (fALS) (Kim et al., 2020). Prva otkrivena mutacija koja je povezana sa nastankom ALS je mutacija u genu koji kodira enzim superoksid dismutazu 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993). Danas je poznato više od 40 gena čije su mutacije povezane sa nastankom ALS, a neke od najčešćih su u genu koji kodira TAR-DNK vezujući protein (TDP-43) (Gitcho et al., 2008), mutacija u genu koji kodira protein FUS (modularni protein asociran sa nukleinskim kiselinama uključen u procesovanje RNK i konzervaciju proteinskih domena) (Mackenzie et al., 2010) i ekspanzija heksanukleotidnih ponovaka GGGGCC u *C9ORF72* (otvoreni okvir čitanja 72 na hromozomu 9) (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Smatra se da ovo oboljenje nastaje usled složenih interakcija između genetičkih i sredinskih faktora, mada do sada nije otkrivena konzistentna veza između izloženosti sredinskim uticajima i razvoja ove bolesti (Hardiman et al., 2017).

Mehanizmi koji dovode do razvoja ALS su brojni: akumulacija proteinskih agregata koji ostvaruju toksične funkcije, poremećen metabolizam RNK, poremećeno funkcionisanje mitohondrija i oksidativni stres, glutamatna ekscitotoksičnost, oštećenje aksonskog i vezikularnog transporta, aktivacija astrocita i mikroglije i neuroinflamacija (Hardiman et al., 2017; Kiernan et al., 2011) (Slika 8). Postojanje citoplazmatskih proteinskih agregata (Slika 8) je karakteriska i sALS i fALS (Bilican et al., 2012; Mackenzie et al., 2007; Milicevic et al., 2022; Nomura et al., 2014; Tan et al., 2007). U CNS ALS pacijenata uočeni su agregati različitih proteina koji su karakteristični za ALS, poput SOD1, TDP-43 i FUS (Brettschneider et al., 2013; Jonsson et al., 2008; Milicevic et al., 2022). Proteinski agregati se javljaju u različitim ćelijskim tipovima – i u neuronima i u gliji (Mackenzie et al., 2007; Tan et al., 2007). Metabolizam granula stresa, koje se stvaraju kao odgovor ćelija na stres, a imaju ulogu u regulaciji sinteze proteina, je narušen u ALS, što se takođe ispituje kao mehanizam bolesti (Baradaran-Heravi et al., 2020; Li et al., 2013; Milicevic et al., 2022). U sastav granula stresa ulaze i proteini koji učestvuju u formiranju agregata u ALS (Milicevic et al., 2022). Uočeno je da granule stresa asociraju sa ćelijskim odeljcima poput ER, lizozoma i mitohondrija što ukazuje na njihovu potencijalnu implikaciju u stresu ER i oksidativnom stresu koji su karakteristični za ALS (Agresti et al., 2005; Amen and Kaganovich, 2021; Liao et al., 2019; Trnka et al., 2021). Istraživanja pokazuju da su u ALS narušena dva puta degradacije proteina: autofagija i ubikvitinski-proteazomski sistem (UPS), kao i da geni značajni za razvoj ALS (*C9ORF72*, *OPTN*, *SQSTM1*, *VCP* i *UBQLN2*) kodiraju proteine uključene u ova dva puta degradacije (Majcher et al., 2015). Pored toga što mutacije u *SOD1* genu uzrokuje nestabilnost i pogrešno savijanje SOD1 peptida usled čega se formiraju unutarćelijski proteinski agregati, one uzrokuju i pojavu nove toksične funkcije SOD1 koja doprinosi produkciji ROS i oksidativnom stresu (Milicevic et al., 2022). U CSF, serumu i urinu pacijenata obolelih od ALS je otkriveno povećano prisustvo markera oštećenja izazvanih ROS (4-hidroksi-2,3-nonenal u serumu i CSF; 8-oksodeoksiguanozin i 15-F(2t)-izoprostan u urinu) (Mitsumoto et al., 2008; Simpson et al., 2004; Smith et al., 1998), dok su u tkivu pacijenata detektovana oštećenja proteina, lipida, DNK i RNK kao posledice oksidativnog stresa (Chang et al., 2008; Coppedè, 2011; Cunha-Oliveira et al., 2020; Shaw et al., 1995; Shibata et al., 2001). U animalnom hSDO1^{G93A} ALS modelu je takođe potvrđen značaj oksidativnog stresa, a uočeno je povećanje vrednosti parametara oksidativnog stresa, kao i redukcija aktivnosti SOD1 (Stamenković et al., 2017a). Pokazano je da su mitohondrije motoneurona obolelih od ALS uvećane zapremine što se dovodi u vezu sa njihovom disfunkcijom (Siklós et al., 1996). Abnormalnosti su uočene i kod mitohondrija u animalnom SOD1 ALS modelu, i to: narušena aktivnost elektron transportnog lanca, respiracija i ATP sinteza, narušena sposobnost puferovanja Ca²⁺ i oštećenja proteina i lipida mitohondrija kao posledica oksidativnog stresa (Damiano et al., 2006; Mattiazzi et al., 2002) (Slika 8). Oštećenja neurona u ALS nastaju i usled glutamatne ekscitotoksičnosti koja je posledica smanjenog preuzimanja glutamata od strane astrocita iz sinaptičke pukotine usled smanjene ekspresije GLT-1 (Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002; Rothstein et al., 1995) (Slika 8). Osim promena koje se dešavaju na nivou neurona, uočene su brojne promene u fiziološkim osobinama mikroglije i astrocita (Slika 8). Dolazi do njihove aktivacije i hronične neuroinflamacije (Beers and Appel, 2019; Hardiman et al., 2017; Kiernan et al., 2011), a sve je više podataka i da imunski sistem ima ulogu u patogenezi ALS

(Béland et al., 2020). Iako ALS nije primarno demijelinizujuća bolest, uočene su i patološke promene na nivou oligodendrocita (Kang et al., 2013; Peric et al., 2021).

Uprkos brojnim kliničkim studijama malo je učinjeno u pogledu razvijanja terapije za ALS. Svega nekoliko jedinjenja je odobreno za upotrebu, poput riluzola i edavarona, ali oni imaju skroman uticaj na poboljšanje stanja pacijenata i produžetak njihovog života, a pozitivne efekte ostvaruju samo ukoliko su primenjeni u ranoj fazi bolesti (Jaiswal, 2019; Liscic et al., 2020). Nove terapijske strategije koje se trenutno razvijaju podrazumevaju upotrebu malih funkcionalnih molekula ili RNK protiv specifičnih ciljnih proteina ili RNK, upotrebu matičnih ćelija i neinvazivne stimulacije poput transkranijalne magnetne stimulacije (Liscic et al., 2020). Na osnovu navedenog je jasno da nedostatak adekvatne terapije i otežane rane dijagnostike ALS ukazuje na potrebu za boljim razumevanjem mehanizama nastanka bolesti i pronalaženjem novih biomarkera, pre svega onih koji su prisutni u ranim fazama.



Slika 8. Mehanizmi koji posreduju u nastanku i progresiji ALS. Mehanizmi koji posreduju u neurodegeneraciji koja se dešava u toku ALS su multifaktorijalni. Progresiji i nastanku bolesti doprinose glutamatna ekscitotoksičnost, oksidativni stres, citoplazmatski proteinski agregati, izmenjeni proteini usled mutacija, mitohondrijalna disfunkcija, poremećen aksonski transport i akumulacija neurofilamenata. Aktivacija mikroglije i astrocita takođe deluje štetno na preživljavanje neurona. Preuzeto i modifikovano iz Kiernan et al. (2011).

1.5.2.1. Patofiziološke promene astrocita i mikroglije u ALS

Danas je opšteprihvaćeno da su glijalne ćelije, pre svega mikroglija i astrociti, uključene u inicijaciju i progresiju propadanja motoneurona u ALS. Analiza tkiva pacijenata je nedvosmisleno pokazala aktivaciju ovih ćelija (Beers and Appel, 2019; Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994; Schiffer et al., 1996; Turner et al., 2004), a saznanja o tome na koji način doprinose smrti motoneurona i razvoju bolesti su dobijena radom na animalnom modelu bolesti (Beers et al., 2006, 2011; Liao et al., 2012), kao i u *in vitro* istraživanjima gde su korišćene glijalne ćelije diferencirane od matičnih ćelija pacijenata (Rajpurohit et al., 2020; Serio et al., 2013). Najčešće korišćen animalni model nosi mutiranu formu humanog gena koji kodira protein SOD1 (Beers et al., 2006,

2011; Liao et al., 2012), ali je sve više ispitivanja na TDP43 modelu, kao i na ćelijama koje nose ekspanziju u *C9ORF72* (Milicevic et al., 2022).

Ekspresija mutirane forme SOD1 samo u motoneuronima ne dovodi do neurodegeneracije kod miševa (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001) ili izaziva patologiju sa veoma kasnim početkom (Jaarsma et al., 2008). U himernom mišu u kom neuroni ekspimiraju mutiranu formu SOD1, dok su glijalne ćelije divljeg soja, uočeno je duže preživljavanje ovakvih neurona (Clement et al., 2003). Selektivna delecija mutantnog *SOD1* transgena samo u motoneuronima (i dalje prisutan u gliji) odlaže početak bolesti i ispoljavanje simptoma, ali ne sprečava progresiju bolesti i smrt (Boillée et al., 2006). Specifična delecija mutantnog *SOD1* transgena u ćelijama mijeloidnog porekla (mikroglia i makrofagi) ili u astrocitima ne menja početak bolesti, ali usporava njenu progresiju i produžava životni vek (Boillée et al., 2006; Yamanaka et al., 2008). Navedeno jasno demonstrira značaj glijalnih ćelija u patologiji ALS i njihov direktni doprinos smrti motoneurona.

Mikroglia ima dvojak u ulogu u patologiji ALS. Naime, u početnim fazama bolesti u hSOD1 animalnom modelu, pre pojave simptoma, ona ima neuroprotektivnu ulogu i ekspimirira molekule koji imaju ulogu u reparaciji oštećenja, dok sa napretkom bolesti postaje neurotoksična, kada ekspimirira pro-inflamatorne molekule poput citokina IL-1 β (Liao et al., 2012). U *in vitro* uslovima, mikroglia poreklom iz životinja u kasnom stadijumu bolesti dovodi do degenerativnih promena motoneurona i smrti (Liao et al., 2012). Mikroglia pokazuje znake aktivacije već u presimptomatskom stadijumu u mišjem modelu koji ekspimirira mutirano formu SOD1, pre pojave prvih kliničkih simptoma (Alexianu et al., 2001; Philips and Robberecht, 2011). U ranoj presimptomatskoj fazi bolesti je uočena povećana ekspresija CD11b u ventralnim rogovima kičmene moždine, a sa progresijom bolesti je uočena povećana ekspresija markera neuroinflamacije (Alexianu et al., 2001; Saxena et al., 2009). Zanimljivo je da smanjena ekspresija mutiranog SOD1 u mikrogliji ne utiče na početak bolesti, ali produžava preživljavanje hSOD1^{G37R} mišjeg modela (Boillée et al., 2006). Ispitivanjem transkriptoma kičmene moždine SOD1^{G93A} miša ustanovljene su promene u genskoj ekspresiji mikroglije, pre svega gena uključenih u fagocitozu i citokinsku signalizaciju, znatno pre degeneracije motoneurona i aktivacije astrocita (Maniatis et al., 2019). Bitna uloga mikroglije u progresiji ALS je pokazana u slučaju TDP43 i *C9ORF72* animalnih modela. Tretman motoneurona TDP43^{A315T} ne izaziva toksične efekte u odsustvu mikroglije, dok u ko-kulturi motoneurona i mikroglije ostvaruje toksične efekte (Zhao et al., 2015). Mikroglia fagocituje TDP43 agregate, što za posledicu ima oslobađanje pro-inflamatornog citokina IL-1 β (Leal-Lasarte et al., 2017). U slučaju ekspanzije heksanukleotidnih ponovaka u *C9ORF72*, utvrđeno je da mikroglia sadrži najveći broj ponovaka, a *post mortem* analizom CNS tkiva pacijenata koji nose *C9ORF72* ekspanziju je utvrđena aktivacija mikroglije i njenih inflamatornih puteva (Brettschneider et al., 2012). Kod pacijenata sa sALS je takođe uočena neuroinflamacija sa reaktivnom mikroglijom i astrocitima, aktiviranim perifernim monocitima i limfocitima koji se infiltriraju u CNS (Beers and Appel, 2019). Trenutno vlada konsenzus da je ekspresija gena koji nose mutacije povezane sa ALS u ćelijama mikroglije, zajedno sa primarnim oštećenjima motoneurona i oslobađanjem proteinskih agregata rezultuje u pro-inflamatornom fenotipu mikroglije (Vahsen et al., 2021).

Proizvodnja laktata u astrocitima je smanjena u ALS (Madji Hounoum et al., 2017). Osim smanjene proizvodnje, sam transport laktata između astrocita i motoneurona je poremećen (Ferraiuolo et al., 2011). Druga bitna homeostatska uloga astrocita koja je poremećena je regulacija količine glutamata u sinaptičkoj pukotini. *Post mortem* analizom tkiva fALS i sALS pacijenata je otkriveno dramatično smanjenje ekspresije glutamatnih transportera u astrocitima (Rothstein et al., 1995), a isti trend je uočen i u hSOD1 ALS mišjem i pacovskom modelu (Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002). Ca²⁺ homeostaza je narušena u ALS astrocitima usled poremećenog mehanizma punjenja depoa (Kawamata et al., 2014). Pored izmenjenih homeostatskih funkcija, aktivacija astrocita doprinosi njihovoj neurotoksičnosti. U hSOD1 modelu, astrociti oslobađaju različite solubilne faktore koji dovode do smrti neurona - i onih koji nose mutaciju i neurona divljeg soja (Di Giorgio et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007). Ablacija mutiranog gena za SOD1 u astrocitima ili mikrogliji značajno usporava progresiju bolesti i

produžava preživljavanje miševa (Abbas et al., 2014; Abbott et al., 2006; Anderson et al., 2014; Boillée et al., 2006). Transplantacija prekursornih ćelija astrocita koji nose hSOD1^{G93A} mutaciju u cervikalni region pacova divljeg soja, nakon diferencijacije, je dovoljna da izazove smrt motoneurona domaćina, reaktivnu astrogliozu i redukovanu ekspresiju GLT-1 u astrocitima divljeg soja, ali i klinički uočljive simptome - disfunkciju prednjih ekstremiteta i respiratornu disfunkciju (Papadeas et al., 2011). Sa druge strane, fokalna transplantacija prekursornih ćelija astrocita divljeg soja u cervikalni region kičmene moždine mSOD1 pacova usporava progresiju bolesti i produžava vreme preživljavanja ovih životinja (Lepore et al., 2008).

Najviše podataka o negativnom uticaju astrocita na progresiju bolesti je prikupljeno radom na transgenim SOD1 animalnim modelima, ali sve je više dokaza da je ovaj fenomen karakteristika svih oblika ALS (Yamanaka and Komine, 2018). Astrociti diferencirani iz iPSC poreklom iz fibroblasta kože ALS pacijenata sa TDP43 mutacijom brže umiru nego astrociti divljeg soja (Serio et al., 2013), dok medijum u kom su gajeni astrociti koji ekspimiraju mutiranu formu TDP43 izaziva smrt motoneurona ukazujuću na toksičnost astrocita koji ekspimiraju mutiranu formu TDP43 (Rojas et al., 2014). Sa druge strane, astrociti poreklom iz pacijenata sa sporadičnim oblikom bolesti oslobađaju pro-inflamatorne molekule poput hemokina, elemenata sistema komplementa i citokina (Yamanaka and Komine, 2018) i izazivaju smrt motoneurona u kulturi (Re et al., 2014). Transplantacija sALS astrocita u kičmenu moždinu miševa dovodi do pogoršanja motoričkih sposobnosti i neurodegeneracije koja se uočava i kod ALS miševa (Re et al., 2014).

Jasan dokaz aktivacije astrocita je uočen u SOD1, TDP43 i *C9ORF72* modelima ALS, i podržava ideju da astrociti dobijaju neurotoksični fenotip (Allen et al., 2019; Birger et al., 2019; Rojas et al., 2014; Tong et al., 2013). Ova neurotoksičnost je posredovana pro-inflamatornim faktorima i nesposobnošću astrocita da obavljaju svoje homeostatske funkcije koje za cilj imaju podržavanje funkcionisanja neurona (Vahsen et al., 2021).

1.5.2.2. Interakcija astrocita i mikroglije sa imunskim faktorima u ALS

U slično vreme kada je utvrđen doprinos aktivacije glijje patologiji ALS, po prvi put je pokazano da se T ćelije i IgG infiltriraju u parenhim CNS ALS pacijenata (Alexianu et al., 2001; Appel et al., 1991; Engelhardt and Appel, 1990; Engelhardt et al., 1993; Geer and Geer, 2002; Troost et al., 1989). Studije su pokazale povišen nivo cirkulišućih imunskih kompleksa (CIK) u serumu ALS pacijenata (Filipovic, 1991; Saleh et al., 2009). Ova otkrića su postavila osnovne pretpostavci da osim glijjalne neurotoksičnosti i periferni imunski sistem ima značajnu ulogu u patologiji ALS. Nekoliko studija je pokazalo da patogenezu ALS odlikuje oštećenje KMB, što predstavlja način na koji periferni imunski faktori mogu da prodru u nervno tkivo (Garbuzova-davis et al., 2012; Garbuzova-Davis et al., 2007a; Nicaise et al., 2009; Zlokovic, 2008).

Kod miša kome su intraperitonelano injecirani IgG izolovani iz seruma sALS pacijenata (ALS IgG) se uočavaju promene na nivou nervno-mišićne sinapse (povećano oslobađanje Ach u odnosu na nervno-mišićnu sinapsu kontrolnog miša), što ukazuje na moguće posredovanje imunskog sistema u patogenezi bolesti (Appel et al., 1991). ALS IgG ostvaruju promene u hipokampalnim neuronima u kulturi, tako što dovode do povećanja frekvencije spontanih minijaturnih ekscitatornih postsinaptičkih struja, bez promene u njihovoj amplitudi (Andjus et al., 1997), kao i do promena u Ca²⁺ tranzijentima (Andjus et al., 1996). U mešovitoj kulturi astrocita i neurona ALS IgG dovode do apoptoze neurona, dok su astrociti manje podložni ćelijskoj smrti. Smatra se da smrt neurona u kulturi može biti posledica aktivacije astrocita pod delovanjem ALS IgG (Yi et al., 2000). Eksperimenti su pokazali da ALS IgG ostvaruju akutne patofiziološke promene u kulturi astrocita izolovanih iz mozga pacova. U roku od nekoliko minuta ALS IgG dovode do povećanja mobilnosti endozoma i lizozoma, što može da ukaže na promene u endocitozi i/ili autofagiji ovih ćelija (Stenovec et al., 2011). ALS IgG dovode do prolaznog povećanja koncentracije Ca²⁺ aktivacijom IP3R na ER astrocita preko aktivacije PLC γ i fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) (Milošević et al., 2013). ALS IgG takođe ostvaruju patofiziološke promene u mikrogliji u kulturi – indukuju oksidativni stres i povećano oslobađanje pro-inflamatornih citokina (TNF α) (Milošević et al., 2017). Navedena istraživanja otkrivaju da ALS IgG ostvaruju patološke

efekte na različite ćelijske tipove u kulturi (neuroni, astrociti i mikroglia), da promovišu ekscitotoksičnost kroz stimulaciju oslobađanja neurotransmitera iz neurona i da dovode do aktivacije glije. Sve zajedno ukazuje na to da ALS IgG mogu biti potencijalni biomarkere bolesti (Bataveljic et al., 2014).

2. Ciljevi istraživanja

Dosadašnja saznanja o glijalnim ćelijama, astrocitima i mikrogliji u neurodegenerativnim procesima CNS praćenim neuroinflamacijom ukazuju na njihovu ključnu ulogu u bolestima poput MS i ALS. Sa druge strane komponente imunskog sistema takođe imaju važnu ulogu u patološkim procesima koji se odvijaju u CNS u ovim bolestima. Imajući to u vidu, cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje glijalne interakcije sa komponentama imunskog sistema kako bi se bolje razumeli neuroinflamacijski procesi koji se dešavaju u ovim bolestima. Iz opisanog su definisani sledeći pojedinačni ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati Ca^{2+} odgovor kontrolnih astrocita na prisustvo autoreaktivnih imunskih ćelija (CNS-IIĆ) infiltriranih u kičmenu moždinu pacova sa simptomima EAE.
2. Istražiti doprinos astroglijalnih $\alpha_v\beta_3$ -integrina, Cx-43 hemikanala, purinskog P2X7R i mitohondrija u ćelija-ćelija interakciji kontrolnih astrocita i CNS-IIĆ.
3. Istražiti ćelija-ćelija interakciju astrocita i infiltriranih imunskih ćelija *in vivo*, u CNS tkivu pacova sa EAE simptomima kroz ispitivanje ekspresije i distribucije astroglijalnog purinskog P2X7R i Cx-43 hemikanala u kičmenoj moždini pacova sa EAE simptomima.
4. Ispitati Ca^{2+} odgovor hSOD1^{G93A} astrocita nakon izlaganja IgG iz seruma ALS pacijenata.
5. Ispitati Ca^{2+} odgovor kontrolne mikroglije nakon izlaganja IgG iz seruma ALS pacijenata.

3. Materijal i metode

3.1. Materijali, reagensi i rastvori, antitela, blokatori i prajmeri koji su korišćeni u ovoj studiji

Tabela 1. Nazivi i proizvođači korišćenih materijala

Naziv	Proizvođač
DMEM, RPMI, FBS, FCS, Penicilin i Streptomycin, Tripan plavo	Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD
Koktel inhibitora proteaza i fosfataza	ThermoFisher Scientific, SAD
Komplet za vizuelizaciju ECL	Bio-Rad Systems, SAD
Proteinski standard (PAGE Ruler)	ThermoFisher Scientific, SAD
ATP, DMSO, PFA, PLL (Mr 70-150 kDa), EDTA, EGTA	Sigma-Aldrich, Nemačka
HEPES, Mowiol, Tripsin, Triton™ X-100, Glicerol, D-Glukoza, Glicin,	Sigma-Aldrich, Nemačka
Tris baza, Tris(hidroksimetil)-metilamin	Fisher Scientific, VB
Akrilamid/bisakrilamid	SERVA, Nemačka
NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , NaHCO ₃ , NaOH, HCl, CaCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ , SDS, β-merkapt etanol, NP40, APS, TEMED, saharoza	Sigma-Aldrich, Nemačka
Tween20	Fisher Bioreagents, SAD
Nemasno mleko u prahu	SERVA, Nemačka
DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindol)	Molecular Probes, SAD
Fluo-4 AM	Molecular Probes, SAD
Natrijum dodecil sulfat	Sigma-Aldrich, Nemačka
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	BD Medical, SAD
Kompletni Frojndov aduvans	Sigma Aldrich, Nemačka
Percoll®	Sigma-Aldrich, Nemačka
Anti-CD4 antitelo konjugovano sa biotinom	ThermoFisher Scientific, SAD
BD iMAG™ partikule obeležene streptavidinom	BD Biosciences, SAD
Na-piruvat	Sigma Aldrich, Nemačka
Albumin iz seruma govečeta (BSA)	Merck, Nemačka
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific, SAD
Fluo-4, AM	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD
HEPES	Biowest Nauillè, Francuska
ATPLite kit	PerkinElmer, SAD
Ketamin	Richter Pharma, Austrija
Ksilazid	Provet, Srbija
BCA Pierce Assay Kit	ThermoFisher Scientific, SAD
Dynabeads™ magnetske kuglice	ThermoFisher Scientific, SAD
Zečji IgG	Millipore, Nemačka

Tabela 2. Antitela korišćena u ovoj studiji

Specifičnost	Poreklo/klonalnost	Razblaženje/ primena	Proizvođač
GFAP	zec, poliklonsko	1:400 IF	Dako Agilent, SAD;
Iba1	koza, poliklonsko	1:200 IF	Abcam, UK
CNPaza	miš,	1:100 IF	Millipore, Nemačka
CD4	miš, monoklonsko	1:100 IF	Sigma Aldrich, Nemačka
P2X7R	zec, poliklonso	4 µg Co-IP 1:1000 WB 1:200 IF	Alomone Labs, Izrael
β₃-intergin	zec, poliklonsko	1:1000 WB	Synaptic Systems, Nemačka
Cx-43	zamorče, poliklonkso	1:1000 WB 1:200 IF	Alomone Labs, Izrael
GLT-1	zec, poliklonsko	1:100 IF	Frontier Institute, Japan
GS	miš, poliklonsko	1:100 IF	BD Biosciences, SAD
GAPDH	zec, poliklonkso	1:2000 WB	Dako Agilent, SAD
αvβ3-integrin	miš, monoklonsko	1:100 IF	Abcam, UK
Anti-zečje konjugovano sa HRP	koza, poliklonsko	1:5000 WB	Abcam, UK
Anti-zamorče konjugovano sa HRP	koza, poliklonsko	1:5000 WB	Santa Cruz Biotechnonology, SAD
Anti-mišje Alexa Fluor 568	magarac	1:250 IF	ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-zečje Alexa Fluor 568	magarac	2:250 IF	ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-zamorče Alexa Fluor 488	koza	1:200 IF	ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-miš Alexa Fluor 555	magarac	1:200 IF	ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-zec Alexa Fluor 647	magarac	1:200 IF	ThermoFisher Scientific, SAD

IF – imunofluorescencija; WB – Western blot, Co-IP – ko-imunoprecipitacija

Tabela 3. Blokatori koji su korišćeni u ovoj studiji

Naziv	Mesto delovanja	Koncentracija	Proizvođač
1, 6, 7, 8, 9, 11aβ, 12, 13, 14, 14αa-dekahidro-1β, 13α-dihidroksi-6β-metil-4H ciklopent(f)oksaciklotridecin-4-on (Brefeldin A)	Inhibitor vezikularnog transporta ATP	2 µg/ml	Sigma Aldrich, Nemačka
2-metil-6-(feniletinil)piridin hidrohlorid	Blokator mGluR5	50 µM	Abcam, UK

(MPEP)				
2'-deoksi-6-metiladenozin 3', 5'-bisfosfat tetranatrijumova so (MRS2179)	Blokator P2Y ₁ R	10 µM		Abcam, UK
(1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2-metil-1-penten-3-oneokism (A967079)	Blokator TRPA1	10 µM		Abcam, UK
7-(hidroksimino)ciklopropa[b]hromen-1a-karboksilat etil ester (CPCCOEt)	Blokator mGluR1	100 µM		Tocris Bioscience, UK
piridokslfosfat-6-azofenil-2', 4'-disulfonska kiselina tetranatrijumaska so (PPADS)	Blokator receptora P2	50 µM		Tocris Bioscience, UK
3-[[5-(2, 3-dihlorofenil)-1-yl]metil]piridin hidrohlorid (A438079)	Blokator P2X7R	10 µM		Tocris Bioscience, UK
2'(3')-0-(4-benzoilbenzoil)adenozin-5'-trifosfat tri(trietilamonijum) so (BzATP)	Agonist P2X7R	50 µM		Tocris Bioscience, UK
(3β,20β)-3-(3-karboksi-1-oksopropoksi)-011-oksoolean-12-en-29-oik kiselina dinatrijum (Karbenoksolon)	Blokator koneksina	50 µM		Sigma Aldrich, Nemačka
Mišje anti-αvβ3-integrin antitelo	Inhibitor αvβ3-integrina	1 µg/ml		Abcam, UK
Tapsigargin (Thg)	Inhibitor SERCA	1 µM		Tocris Bioscience, UK

Tabela 4. Sastav korišćenih medijuma, pufera i rastvora

Rastvori/medijumi/puferi	Sastav
Slani rastvor fosfatnog pufera (0,01 M PBS) pH 7,4; 270 – 280 mOsm/L	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Kompletni medijum za gajenje na bazi DMEM pH 7,4; ~300 mOsm/L	DMEM 1 mM Na-piruvat 10% FBS 1% penicilin i streptomycin
Rastvor tripsina u 0,01 M PBS	0,25% tripsin 0,02% EDTA 0,01 M PBS
4% paraformaldehid (PFA) pH 7,4	40 g PFA 500 ml dH ₂ O 500 ml 0,2 M fosfatnog pufera
Hladni pufer za liziranje (RIPA) pH 7,4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% NP 40
neposredno pre upotrebe:	0,1% SDS

koktel inhibitora proteaza i fosfataza	10 mM EDTA 10 mM EGTA 0,5% Triton X-100
Hladni pufer za liziranje (IP) pH 7,4	10 mM HEPES 200 mM NaCl 30 mM EDTA 0,5% TritonX-100
neposredno pre upotrebe: koktel inhibitora proteaza i fosfataza	
Gelovi za elektroforezu	Gel za koncentrovanje: 4% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 10% SDS 10% APS 1% TEMED Gel za razdvajanje: 12% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 1,5 M Tris pH 8,8 10% SDS 10% APS 1% TEMED
6× Lemli pufer za nalivanje	375 mM Tris-HCl pH 6,8 12% SDS 60% glicerol 0,03% bromfenol plavo
Pufer za elektroforezu	192 mM glicin 25 mM Tris pH 8,3 0,1% SDS
Pufer za transfer proteina	192 mM glicin 25 mM Tris-HCl pH 8,3 20% etanol
TBST pufer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 0,5% Tween20
Rastvor za blokiranje	10 % normalni serum govečeta 0,1 % TritonX-100 PBS
Izotonični rastvor Perkola (IPS, eng. isotonic Percoll® solution)	9 delova Percoll® pH 8,5 – 9,5 1 deo 10×PBS
Vančelijski rastvor (ECS) pH 7,4 280 – 300 mOsm/L	140 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 10 mM D-glukoza 10 mM HEPES
Vančelijski rastvor bez Ca²⁺ pH 7,4 280 – 300 mOsm/L	140 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 10 mM D-glukoza 10 mM HEPES 0,1 mM EGTA

3.2. Eksperimentalne životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćena dva soja pacova: Dark Aguti (DA) soj, za izazivanje eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE), animalnog modela MS, i transgeni Sprague-Dawley (SD) pacovi u čiji je genom ubačen veliki broj kopija humanog *SOD1* gena sa dominantnom tačkastom mutacijom G93A (hSOD1^{G93A} pacovi, Taconic, SAD) usled čega razvijaju simptome slične ALS kod ljudi (Howland et al., 2002). Korišćene su životinje oba pola. Za pripremu primarnih ćelijskih kultura korišćeni su mladunci starosti 1 do 3 dana. Životinje su gajene u uslovima 12 h svetlo/12 h mrak i imale su *ad libitum* pristup hrani i vodi. Hrana i voda slabo pokretnim i paralizovanim životinjama je bila dostupna u vidu kaše u kavezu. Etička dozvola za rad na eksperimentalnim životinjama zavedena je pod brojem 323-07-10645/2020-05, Uprava za veterinu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije.

3.2.1. hSOD1^{G93A} Sprague-Dawley soj - model ALS

U eksperimentima su korišćeni hSOD1^{G93A} SD pacovi i SD pacovi divljeg genotipa (eng. wild type, wt) iste starosti kao hSOD1^{G93A} pacovi kao kontrola. Kod transgenih životinja početak ispoljavanja bolesti je u proseku bio između 4. i 5. meseca starosti. Prvi simptomi su otežan hod i unilateralna slabost zadnjeg ekstremiteta. Bolest se brzo razvija, tako da 15 do 20 dana od pojave prvih simptoma dolazi do potpune paralize zadnjih ekstremiteta, a kasnije se javlja slabost prednjih ekstremiteta. Krajnjom fazom bolesti se smatra kada životinja nije u stanju da se ispravi duže od 30 s nakon okretanja na stranu. Napredovanje bolesti je praćeno i gubitkom telesne mase. U Tabeli 5 su prikazani parametri na osnovu kojih je procenjeno stanje životinje.

Za pripremu kultura kortikalnih astrocita i mikroglije korišćeni su transgeni hSOD1^{G93A} Sprague-Dawley pacovi ili netransgeni mladunci iz istog legla kao odgovarajuća kontrola.

Tabela 5. Kriterijumi za procenu početka i napretka ALS kod hSOD1^{G93A} pacova

Parametar	Procena parametara	Vrednost parametra
Pokretljivost u kavezu	Normalna	2
	Oslabljena	1
	Nepokretan	0
Pokretljivost na stolu	Normalna	2
	Oslabljena	1
	Nepokretan	0
Rotacija oko svoje ose	Da	1
	Ne	0
	Nema atrofije	2
Atrofija	Unilateralna	1
	Bilateralna	0

U tabeli su prikazani parametri koji su korišćeni za procenu pokretljivosti i mišićne atrofije hSOD1^{G93A} pacova. Svakom parametru je dodeljena brojčana vrednost (0, 1 ili 2). Zdrav pacov dobija u zbiru najvišu ocenu 7, dok smanjenje ocene ukazuje na pojavu simptoma. U eksperimentu su korišćeni pacovi sa ocenom 3 ili 4.

3.2.2. Genotipizacija

Provera prisustva mutiranog humanog *SOD1* gena je rađena metodom lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase chain reaction, PCR). DNK je izolovana iz tkiva repa pacova. Uzorkovano je oko 0,5 cm repa koji je inkubiran u 200 µl pufera za digestiju na 65°C 2 do 3 h, nakon čega je tkivo centrifugirano na 14000 × g 2 min. Supernatant je razblažen 20 puta u sterilnoj dejonizovanoj vodi. Razblaženi uzorci su denaturisani inkubacijom na 95°C 15 minuta. Finalna zapremina PCR smeše je iznosila 25 µl, dok su zapremine pojedinačnih komponenti bile sledeće:

PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, Nemačka)	12,5 µl
sterilna dejonizovana voda	9,5 µl
<i>SOD1 forward</i> prajmer (5'-AGC CCC TGC CTA CCT TTT CCT AAT G-3') (100 µM)	1 µl
<i>SOD1 reverse</i> prajmer (5'-CCA GCT TTA TCG GAT CCA TAA CTT CG-3') (100 µM)	1 µl
DNK, razblažena i denaturisana	1 µl

Kao pozitivna kontrola je korišćen dokazani uzorak hSOD1^{G93A} pacova, a kao negativna kontrola uzorak izolovan iz pacova divljeg soja. Kao kontrola PCR reakcije na mesto uzorka je dodat 1 µl dejonizovane vode.

Za izvođenje PCR je korišćen uređaj ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija na 95°C 300 s, 1 ciklus; 35 ciklusa denaturacije na 95°C (60 s), hibridizacije na 60 °C (60 s) i elongacije na 72°C (120 s); 1 ciklus finalne elongacije na 72°C (300 s). Uzorci su čuvani na 4°C do upotrebe. Nakon završene PCR reakcije, uzorci su naliveni na 1,7% agarozni gel sa etidijumom bromidom i razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 100 V 25 minuta. Trake na gelu su vizuelizovane ubotrebom transiluminatora.

3.2.3. Indukovanje eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)

Za potrebe pripreme emulzije za imunizaciju, životinje starosti 2 – 3 meseca su dekapitovane, kičmena moždina je istisnuta iz kičmenog kanala primenom hidrauličkog pritiska. Tkivo kičmene moždine je homogenizovano u jednakoj zapremini PBS upotrebom električnog homogenizera. Jednaka zapremina homogenata je dodata u kompletni Frojndov ađuvans sa dodatkom 4 mg/ml inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Emulzija je vorteksovana do sjedinjavanja vodene i uljane komponente. Za indukovanje EAE su korišćeni DA pacovi starosti između 2 i 3 meseca. Životinje su anestetizirane aplikacijom intraperitonealne injekcije mešavine 55 mg/kg ketamina i 5 mg/kg ksilazida, a potom imunizovane ubrizgavanjem emulzije u zadnju desnu šapu u zapremini koja odgovara 50% telesne mase (50% v/w). Životinje su merene i ocenjivane svakog dana, počevši od dana imunizacije (nulti dan). Prvi simptomi bolesti su se javljali između 7 i 9 dana u vidu blage atonije repa, 3 do 4 dana kasnije se javljala potpuna paraliza zadnjih ekstremiteta. U eksperimentima su korišćene životinje sa ocenom 3 ili 3,5. Ocene su dodeljivane prema Tabeli 6. Kao kontrola su korišćeni DA pacovi iste starosti koje su prošle istu manipulaciju, a umesto emulzije im je ubrizgan PBS.

Tabela 6. Ocenjivanje i opis simptoma EAE životinja

Ocena	Opis
0	Bez razlike u motornim funkcijama u odnosu na kontrolne životinje
0,5	Vrh rep je atoničan
1	Ceo rep je atoničan
1,5	Ceo rep je atoničan, inhibicija zadnjih ekstremiteta
2	Ceo rep je atoničan, slabost zadnjih ekstremiteta
2,5	Ceo rep je atoničan, pareza zadnjih ekstremiteta
3	Atoničan rep i skoro poptuna paraliza zadnjih ekstremiteta
3,5	Atoničan rep i poptuna paraliza zadnjih ekstremiteta
4	Atoničan rep, kompletna paraliza zadnjih ekstremiteta uz delimičnu paralizu prednjih, životinja je alertna
4,5	Atoničan rep, kompletna paraliza zadnjih ekstremiteta uz delimičnu paralizu prednjih, životinja nije alertna; životinja je eutanazirana

U tabeli su prikazani parametri koji su korišćeni za procenu stanja EAE pacova. U eksperimentu su korišćeni pacovi sa ocenom 3 ili 3,5.

3.3. Izolacija imunskih ćelija

Imunske ćelije infiltrirane u CNS (CNS-IIC) su izolovane iz kičmene moždine EAE pacova, dok su periferne imunske ćelije (periferne IC) izolovane iz cervikalnih limfnih čvorova iste životinje u saradnji sa članovima Odeljenja za imunologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Životinja je prvo anestetizirana aplikacijom intraperitonealne injekcije mešavine 100 mg/kg ketamina i 20 mg/kg ksilazida, a potom transkardijalno perfundovana hladnim PBS. Kičmena moždina je istisnuta iz kičmenog kanala primenom hidrauličkog pritiska. Tkivo kičmene moždine je homogenizovano kroz sterilno sito sa porama veličine 40 μm (BIOLOGIX, Kina) u 5 ml hladnog PBS obogaćenog sa 3% FCS ili FBS. Homogenat je centrifugiran 10 min na $100 \times g$, a talog je resuspendovan u 3 ml 30% IPS, lagano nanet preko 3 ml 70% IPS i centrifugiran 40 minuta na $850 \times g$ bez kočnica i ubrzanja. Po završenom centrifugiranju, prikupljen je sloj između 30% i 70% IPS, u kom su se nalazile imunske ćelije. Kako bi se isprao višak IPS, u izolovanu suspenziju imunskih ćelija je dodata 4 puta veća količina RPMI medijuma obogaćenog sa 5% FCS ili FBS, a potom centrifugirana 5 min na $500 \times g$. Proces centrifugiranja i ispiranja je ponovljen dva puta. Periferne IC su izolovane mehaničkom disrupcijom cervikalnih čvorova kroz sterilno sito sa porama 40 μm . Primenjen je isti protokol izolacije na gradijentu IPS kao za CNS-IIC. CD4^+ ćelije su izolovane iz kompletnog izolata upotrebom antitela specifičnog za CD4 konjugovano sa biotinom i iMag partikula obeleženih biotinom prema uputstvu proizvođača. Broj i čistoća CD4^+ ćelija je određena upotrebom protočnog citometra (CyFlow Space flow cytometer, Nemačka). U prečišćenom izolatu CD4^+ ćelije su činile više od 95% ćelija. Izolovane imunske ćelije su održavane u RPMI medijumu obogaćenom sa 5% FCS ili FBS na ledu do eksperimenata.

3.4. Izolacija IgG iz seruma ALS pacijenata

Uzorci krvi pacijenata sa klinički dijagnostikovanim ALS prema El Escorial kriterijumu (Brooks et al., 2000) su prikupljeni u Institutu za neurologiju Kliničkog centra Srbije ljubaznošću dr Zorice Stević. Uzorci su prikupljeni uz informisanu saglasnost pacijenata u skladu sa Helsinškom deklaracijom Svetske zdravstvene organizacije, a prikupljanje i upotreba humanog materijala je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (850/6). Serumi iz uzoraka krvi su izolovani u laboratoriji Instituta za biohemiju Kliničkog centra Srbije. Izolacija IgG je rađena u Institutu za virusologiju, vakcine i serume, Torlak u Beogradu, ljubaznošću dr Irene Živković. Prvo je inkubacijom seruma 30 min na 56°C inaktiviran sistem komplemента. Serumi su dva puta razblaženi u početnom puferu koji se sastojao od 1,5 M glicina i 3 M NaCl. IgG su izolovani na protein koloni A, a eluirani upotrebom 0,1 M limunske kiseline, pH 3,5. Kako bi se neutralisala pH uzorka, nakon elucije je korišćen 1 M tris pufer. SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu je dokazano da su u izolatu prisutni samo IgG. Uzorci IgG su dijalizovani naspram PBS pomoću creva za dijalizu sa porama prečnika 2,5 nm. Koncentracija IgG u uzorku je određena Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Ni u jednom od uzorka nije detektovano prisustvo endotoksina.

3.5. Priprema primarne ćelijske kulture

U ovom radu su korišćeni mladunci DA i SD pacova starosti između 1 do 3 dana za pripremu primarne kulture astrocita iz kičmene moždne i primarnih kultura astrocita i mikroglije iz korteksa.

3.5.1. Izolacija ćelija glije

Životinja je dekapitovana makazama, lobanja je izložena sečenjem kože, a zatim otvorena sečenjem od velikog otvora (lat. *foramen magnum*) ka očnim orbitama i perpendikularno kroz središnju liniju. Mozak je prebačen u posudu sa hladnim rastvorom za izolaciju, hemisfere su odvojene od ostatka mozga, a potom su nežno uklonjene ovojnice i hipokampus. Hemisfere su prebačene u tubu od 15 ml sa PBS i homogenizovane provlačenjem kroz nastavak pipete od 1 ml 10 do 15 puta. Kičmena moždina je izolovana primenom hidrauličkog pritiska. Pažljivo je očišćena od ovojnice i mehanički usitnjena u hladnom medijumu za izolaciju u sterilnim uslovima provlačenjem

kroz nastavak pipete od 1 ml 10 do 15 puta. Homogenat je centrifugiran na $500 \times g$ 5 min i resuspendovan u hladnom medijumu za izolaciju dva puta. Posle drugog centrifugiranja talog je resuspendovan u kompletnom medijumu za gajenje ćelija. Dobijena ćelijska suspenzija je 3 do 4 puta provučena kroz sterilnu iglu 21G, a zatim kroz 23G iglu. Ćelije su zasejane u Petrijevu posudu prečnika 60 mm (ThermoFisher Scientific, SAD) i gajene u inkubatoru sa vlažnom atmosferom i 5% CO₂/95% vazduhom na 37°C. Medijum je prvi put promenjen 2 dana nakon izolacije, a zatim je menjan na svaka 2 do 3 dana.

3.5.2. Gajenje primarne kulture astrocita

Za potrebe pripreme ćelijske kulture astrocita, po dostizanju konfluentnosti od 70 do 80% ćelije su pasażirane na sledeći način. Medijum je odliven i ćelijski sloj je ispran sa 5 ml toplog PBS kako bi se uklonile mrtve i slabo pričvršćene ćelije. U Petrijevu posudu je dodat 1 ml rastvora tripsina i inkubirane su 2 minuta na 37°C. Kada su ćelije počele da se odvajaju od dna suda za gajenje, tripsin je inaktiviran dodavanjem 4 ml kompletnog medijuma za gajenje; ćelije su prikupljene u tubu od 15 ml i centrifugirane 5 minuta na $500 \times g$. Supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 1 ml kompletnog medijuma za gajenje. Nakon brojanja ćelija upotrebom hemocitometra, astrociti su zasejani u Petrijevu posudu prečnika 60 mm u manjoj gustini (10^4 ćelija/cm²). Kako bi se smanjilo prisustvo drugih tipova glijalnih ćelija, od trenutka kada je ćelijski sloj dostigao 50% konfluentnosti, ispiran je tako što je medijum usisan pipetom, a potom ispušten kružnim pokretima na sloj ćelija i to je ponovljeno nekoliko puta dok cela površina suda za gajenje nije isprana. Po drugom dostizanju 70 – 80% konfluentnosti, ponovljen je proces tripsinizacije. Ukratko, astrociti su ispirani toplim PBS, tripsinizovani, centrifugirani i talog je resuspendovan. Nakon brojanja, astrociti su zasejani na stakla prečnika 6 ili 7 mm, koja su prethodno obložena poli-L-lizinom (50 µg/ml), u gustini $1 - 1,5 \times 10^4$ /cm². Ćelije su korišćene u eksperimentu 2 do 3 dana nakon zasejavanja na stakla.

3.5.3. Gajenje primarne kulture mikroglije

Kako bi se promovisao rast mikroglije, po izolaciji i zasejavanju ćelija u Petrijevu posudu, ćelije su ostavljene da dostignu potpunu konfluentnost. Po pojavljivanju mikroglije na površini konfluentnog sloja astrocita (10 do 15 dana od izolacije), Petrijeva posuda je tresena na orbitalnom šejkeru 2 sata pri brzini od 220 rotacija/minuti. Zatim je izvučen medijum kako bi se uklonile mrtve i slabo pričvršćene ćelije, a mikroglija je sprana svežim toplim medijumom za gajenje tako što je medijum izvučen pipetom, a potom izbačen kružnim pokretima na sloj ćelija. Spiranje je ponovljeno nekoliko puta dok sve ćelije mikroglije nisu bile odvojene od sloja astrocita, uz konstatno nadgledanje pod mikroskopom. Medijum sa mikroglijom je aspiriran, prebačen u tubu od 15 ml i centrifugiran 5 min na $500 \times g$. Po odlivanju supernatanta, talog je resuspendovan u 1 ml kompletnog medijuma za gajenje ćelija i dodatno resuspendovan upotrebom sterilne 23G igle. Ćelije su prebrojane korišćenjem hemocitometra. Na stakla prečnika 7 mm prethodno obložena poli-L-lizinom (50 µg/ml) je zasejano 5×10^3 ćelija. Ćelije mikroglije su korišćene u eksperimentu 2 dana nakon zasejavanja.

3.6. Kalcijumsko oslikavanje

Unutarćelijska dinamika jona Ca²⁺ u astrocitima i mikrogliji u kulturi je praćena korišćenjem hemijskog fluorescentnog indikatora Fluo-4 AM koji slobodno prolazi ćelijsku membranu. U ćeliji deluju esterase i modifikuju indikator tako da više ne može izaći iz ćelije. Ovaj indikator vezuje slobodne jone Ca²⁺ u citoplazmi usled čega dolazi do fluorescencije. Sa povećanjem koncentracije Ca²⁺ dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije Fluo-4 indikatora.

Ćelije (astrociti ili mikroglija) su zasejane na kružna stakla na prethodno opisan način i korišćene su u eksperimentu 2 do 3 dana nakon zasejavanja. Neposredno pre eksperimenta kalcijumskog oslikavanja, ćelije su isprane vanćelijskim rastvorom (ECS) i inkubirane u 5 µM rastvoru Fluo-4 AM 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Ćelije su isprane 20 minuta u ECS, kako bi se omogućila deesterifikacija i ispiranje viška neesterifikovanog indikatora.

Za snimanje je korišćen sistem sastavljen od AxioObserver A1 mikroskopa opremljenim LD LCI Plan-Apochromat 25X/0.8 N.A. vodenim objektivom (Carl Zeiss, Nemačka), evolve – EM512 digitalnom kamerom (Photometrics, SAD) i VisiView softverom (Visitron Systems GmbH, Nemačka). Fluo-4 fluorofora je ekscitirana talasnom dužinom 480 nm upotrebom ksenonske lampe (Xenon Short Arc lamp, Japan) koja je povezana sa polihromatskim sistemom za osvetljavanje (VisiChrome Polychromatic Illumination System, Visitron Systems, Nemačka). Ekscitaciona i emisiona svetlost su propuštane kroz FITC set filtera (Chroma Technology Inc., SAD). Frekvencija uzorkovanja slika je bila 1 Hz. U toku eksperimenta ćelije su konstantno perfundovane vanćelijskim rastvorom brzinom 4 ml/min. Intenzitet fluorescencije je registrovan prvih 100 do 300 s kako bi se odredio osnovni nivo fluorescencije (F_0). ALS IgG, CNS-IIC ili periferne IC u radnom vanćelijskom rastvoru su aplicirani putem prilagođenog sistema za dostavljanje tečnosti sastavljenog od staklenih pipeta (0,8 mm unutrašnji prečnik) pozicioniranih pod uglom od 45°, na udaljenosti od ~350 μm i ~1 mm u odnosu na staklo sa zasejanim ćelijama čija se aktivnost registruje. Staklene pipete su bile povezane sa sistemom za izmenu tečnosti (High Speed Solution Exchange System, ALA Scientific Instruments, SAD) sa ventilima i VC3 elektronskim kontrolorom ventila. Zapremina tečnosti u komorici za registrovanje je održavana na ~1 ml tako što je konstantnom sukcijom izvlačen rastvor sa površine. Da bismo potvrdili da CNS-IIC dolaze do astrocita kroz opisani sistem aplikacije, urađen je eksperiment u kom su CNS-IIC obeležene Fluo-4 AM sa ciljem njihove vizualizacije. Primenjen je isti protokol za obeležavanje kao i za astrocite, sa dodatkom centrifugiranja na 500 \times g 5 min pre inkubacije i ispiranja, nakon čega su resuspendovane u ECS.

3.6.1. Određivanje promene unutarćelijskog Ca^{2+} astrocita i mikroglije nakon tretmana ALS IgG

Nakon određivanja osnovnog nivoa intenziteta fluorescencije prvih 300 s, protok je zaustavljen i propušten je rastvor 100 $\mu\text{g/ml}$ ALS IgG ili 1 μM Thg u kojima su ćelije inkubirane. Aktivnost ćelija na primenjeni tretman je registrovana narednih 300 s u slučaju ALS IgG, odnosno 600 s u slučaju Thg. Ćelije su ispirane narednih 180 s radnim rastvorom, a zatim je apliciran 100 μM ATP u trajanju od 5 s.

3.6.2. Određivanje promena unutarćelijskog Ca^{2+} astrocita nakon tretmana CNS-IIC

Kako bi se ispitao efekat CNS-IIC na Ca^{2+} aktivnost astrocita u kulturi, ispitana su 4 različita eksperimentalna uslova:

1. aplikacija CNS-IIC
2. aplikacija CNS-IIC-kondicioniranog medijuma
3. aplikacija perifernih IC
4. aplikacija CNS-IIC u prisustvu blokatora različitih astrocitnih proteina.

CNS IIC-kondicionirani medijum je radni rastvor u kom su limfociti bili inkubirani 1 – 4 h u koncentraciji 25×10^3 ćelija/ml, a dobijen tako što je ćelijska suspenzija centrifugirana 5 minuta na $500 \times g$, a potom je prikupljen supernatant koji je korišćen u eksperimentima.

Nakon registrovanja osnovnog nivoa intenziteta fluorescencije 100 s, imunske ćelije ili njihov medijum su aplicirani u trajanju od 20 do 30 s, a odgovor astrocita je registrovan ukupno 100 s. Astrociti su zatim ispirani radnim rastvorom 100 s, posle čega su stimulirani 200 μM ATP u trajanju od 5 s, kako bi se proverila njihova vijabilnost. CNS-IIC su aplicirane u koncentracijama od 5×10^3 , 25×10^3 i 50×10^3 ćelija/ml, što je u opsegu količine infiltriranih ćelija u CNS životinje kojoj je izazvan EAE (Schläger et al., 2016).

U eksperimentima u kojima su korišćeni blokatori, astrociti su prvo inkubirani 10 min u vanćelijskom rastvoru u kom je rastvoren blokator, a potom je blokator dodavan kroz perfuziju u toku eksperimenta. U eksperimentima u kojima je korišćen blokator vezikularnog transporta – brefeldin A (2 $\mu\text{g/ml}$, (Bowser and Khakh, 2007)) astrociti su pre eksperimenta inkubirani 60

minuta u rastvoru sa ovim blokatorom. Podaci dobijeni u prisustvu blokatora su poređeni sa kontrolnim eksperimentima bez blokatora koji su rađeni nasumičnim redosledom.

Kako bi se potvrdilo da su imunske ćelije došle do astrocita, obeležene su fluorescentnim indikatorom Fluo-4 AM radi vizualizacije u trenutku prolaska kroz katar. Za potrebe ovog eksperimenta astrociti nisu inkubirani sa Fluo-4, već su snimljeni u transparentiji.

3.6.3. Analiza Ca²⁺ signala

Intenzitet Fluo-4 fluorescentnog signala je meren računanjem srednjeg intenziteta piksela regiona od interesa (ROI) koji odgovara pojedinačnoj ćeliji. ROI ćelije je uziman u trenutku odgovora na ATP, jer su tada granice ćelije najuočljivije. Za te potrebe je korišćen Fiji ImageJ softver. U okviru ovog paketa korišćen je ROI menadžer kom je zadato da meri integrisanu gustinu signala ili srednji intenzitet signala svakog regiona od interesa. Pored pojedinačnih ćelija kao region od interesa je uzimano 5 kružnih ROI iz pozadine. Prvi korak u analizi je oduzimanje srednje vrednosti intenziteta signala pozadine od vrednosti dobijene za ROI ćelije u svakoj vremenskoj tački. Potom je zapis normalizovan po sledećoj formuli:

$$\Delta F/F = \frac{F-F_0}{F_0},$$

po kojoj se promena u intenzitetu fluorescencije Fluo-4 u datom trenutku (F) normalizuje u odnosu na osnovni nivo fluorescencije (F₀). Vrednost F₀ je izračunata kao srednja vrednost intenziteta fluorescencije u prvih 5 s zapisa. Smatrano je da je ćelija odgovorila na primenjeni tretman ukoliko je vrednost normalizovanog signala fluorescencije (ΔF/F₀) bila jednaka ili veća od 3 standardne devijacije (SD) u trajanju od 5 s. Kako bi se opisala promena usled tretmana u odnosu na kontrolne uslove, izračunate su površina ispod odgovora (ΔF/F₀·s) u trajanju od 100 s (u slučaju CNS-IIĆ), 300 s (u slučaju IgG), maksimalna amplituda (ΔF/F₀) i vreme dostizanja maksimalnog odgovora (s). Da bismo utvrdili efluks Ca²⁺ iz citoplazme astrocita odredili smo nagib silazne faze Ca²⁺ odgovora pomoću linearnog podešavanja (Palty et al., 2010; Parnis et al., 2013). Površina, maksimalna vrednost amplitude, vreme dostizanja maksimalne amplitude, trajanje uzlazne faze, trajanje silazne faze i nagib silazne faze citoplazmatskog Ca²⁺ odgovora su izračunati korišćenjem MatLab softvera, MS Excel-a i Clampfit softvera V11.0.3.

3.7. Merenje vanćelijskog ATP

Za merenje koncentracije ekstracelularnog ATP koje su oslobodile imunske ćelije ili astrociti korišćen je ATPLite™ kit (PerkinElmer, SAD). ATPLite™ kit je luminiscentni esej zasnovan na merenju emitovane svetlosti koja nastaje kao proizvod u reakciji ATP prisutnog u uzorku sa dodatim D-luciferinom i luciferazom kao katalizatorom. Emitovana svetlost je proporcionalna koncentraciji ATP-a u ispitivanom uzorku.

Da bi se uporedila količina ATP koje oslobađaju CNS-IIĆ i periferne IĆ, oba tipa IĆ su održavana u istim uslovima od trenutka izolacije do trenutka merenja količine oslobođenog ATP. Pred samo merenje su centrifugirane na 500 × g 5 min, a nakon toga resuspendovane u vanćelijskom rastvoru. U bunariće tamne ploče sa 96 bunarića je naliven jednak broj CNS-IIĆ i perifernih imunskih ćelija (50 000 ćelija po bunariću).

Da bi se izmerila količina ATP koju oslobode CNS-IIĆ i periferne IĆ, u ploču je naliveno 50 × 10³ CNS-IIĆ ili perifernih IĆ. Da bi se izmerila količina ATP koji oslobode astrociti zasejano je 3 × 10³ astrocita po bunariću. Uspostavljena su 3 eksperimentalna uslova: kontrola – astrociti u radnom vanćelijskom rastvoru, astrociti tretirani sa 50 × 10³ CNS-IIĆ, astrociti preinkubirani u 20 μM CGP37157 i tretirani sa 50 × 10³ CNS-IIĆ.

U toku izvođenja eseja u bunariće sa ćelijama je dodato po 50 μl reagensa prema uputstvu proizvođača. Ploča je inkubirana u mraku 10 minuta, a potom je merena luminiscencija. ATP standardi za određivanje koncentracije ATP koje su otpustile imunske ćelije su pripremani sveži na dan eksperimenta i korišćeni su za formiranje standardne krive na osnovu koje su izračunate apsolutne vrednosti oslobođenog ATP od strane IĆ. Korišćene koncentracije Na₂ATP kao standarda bile su u opsegu od 1 do 500 nM. U slučaju astrocita izmerene su relativne vrednosti oslobođenog

ATP u različitim eksperimentalnim uslovima i izražene kao arbitrarne vrednosti (eng. arbitrary units, A.U).

3.8. Imunofluorescentno obeležavanje tkivnih preseka i ćelija u kulturi

3.8.1. Priprema tkiva

Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom mešavine ketamina (100 mg/kg) i ksilazida (20 mg/kg), transkardijalno perfundovane 0,9% rastvorom natrijum-hlorida (NaCl) kako bi se uklonila krv iz tkiva CNS, a zatim 4% PFA u cilju fiksacije tkiva. Kičmena moždina je izolovana otvaranjem kičmenog kanala laminektomijski. Tkivo je fiksirano u rastvoru 4% PFA naredna 24 h, a zatim dehidratirano u rastvoru saharoze u 0,2 M PB rastuće koncentracije (10, 20 i 30%) kako bi se izvršila krioprotekcija. Po završenoj dehidraciji, na kriostatu (Leica, Nemačka) su isečeni transverzalni preseci kičmene moždine debljine 25 μm . Preseci su čuvani na - 20°C do upotrebe.

3.8.2. Imunohistohemija

Pre početka imunoboljenja, preseci su rehidratirani ispiranjem 2 puta u 0,01 M PBS. Kako bi se sprečilo vezivanje antitela za nespecifične epitope, preseci su inkubirani u rastvoru za blokiranje (Tabela 4) 1 sat na sobnoj temperaturi. Preseci su potom inkubirani preko noći na +4°C u rastvoru primarnih antitela (Tabela 2). Po ispiranju u PBS tri puta po 5 min na sobnoj temperaturi, preseci su inkubirani u rastvoru sekundarnih antitela (Tabela 2) 2 h u mraku. Nakon ispiranja 3 puta po 5 min preseci su pokriveni mukoadezivnim medijumom Mowiol i pokrovnim staklima. Kao negativna kontrola korišćeni su preseci koji su prošli istu manipulaciju, ali su inkubirani u rastvoru bez primarnih antitela, a potom u rastvoru prethodno navedenih sekundarnih antitela.

3.8.3. Imunocitohemija

Ćelije su zasejane na kružna stakla na prethodno opisan način. Dva dana po zasejavanju su fiksirane u 4% PFA 30 min na sobnoj temperaturi. Isprane su 3 puta po 10 min u 0,01 M PBS i inkubirane u rastvoru za blokiranje 45 min. Po završenom blokiranju, ćelije su inkubirane u rastvoru odgovarajućeg primarnog antitela preko noći na + 4°C (Tabela 2). Ćelije se isprane tri puta po 10 minuta u 0,01 M PBS, a zatim inkubirane u rastvoru odgovarajućeg sekundarnog antitela (Tabela 2) 2 h u mraku na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja 3 puta po 10 min u 0,01 M PBS, inkubirane su u rastvoru DAPI (1:4000 u 0,01 M PBS) 10 min kako bi se obojila jedra. Ćelije su isprane 5 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS i pokrivene mukoadezivnim medijumom Mowiol (Sigma Aldrich, Nemačka).

3.8.4. Konfokalna mikroskopija

Mikrografije obeleženih preseka kičmenih moždina su snimljene na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Nemačka). Konfokalni sistem se sastoji od uspravnog mikroskopa Axioskop 2 FS mot sa argonskim višelinijским i dva helijum-neonska lasera. Korišćeni su uljani objektivi Plan-Neofluar 40x N.A. 1.3 i Plan-Apochromat 63X N.A. 1.4. Ekscitacija fluorofora je postignuta laserskom linijom argonskog lasera na 488 nm ili helijum neonskih lasera na 543 ili 633 nm. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala. Razdvajanje emisione svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom (eng. band pass, BP) 505 – 530 nm, crvenog dela spektra BP filterom 585 – 615 nm, a dalekocrvenog dela spektra širokopojasnim filterom (eng. long pass, LP) preko 630 nm.

Da bi se potvrdila ekspresija Cx-43 na astrocitima i ispitala proteinska ekspresija Cx-43 i P2X7R i njihova kolokalizacija u lumbalnom regionu kičmene moždine EAE i kontrolnih pacova, snimane su z-ravni (eng. z-stack) mikrografije sa z-intervalom od 1 μm korišćenjem 63X (N.A. 1.4) objektiva sa uljanom imerzijom. Korišćeni su isti parametri akvizicije za EAE i odgovarajuće kontrolne životinje. Ukupno je snimljeno po 4 kadra ventralne bele i sive mase po preseku, dok je

po životinji ispitano 3 do 4 preseka. Upotrebom digitalnog uveličanja od $4 \times$ snimljeni su kadrovi z-ravni kako bi se ispitala distribucija astrocitnog Cx-43 i P2X7R fluorescentnog signala u neposrednoj blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija.

Da bi se ispitao broj infiltriranih CD4⁺ T ćelija i njihova interakcija sa GFAP⁺ astrocitima, mikrografije preseka lumbalnog regiona kičmene moždine EAE pacova i odgovarajućih kontrola gde su obeleženi CD4 i GFAP su snimljene upotrebom Leica DMI 6000 konfokalnog mikroskopa (TCS SP5 II, Leica Microsystems, Nemačka). Ukupno je snimljeno 3 do 4 preseka kičmene moždine po životinji. Snimane su z-ravni mikrografije sa z-intervalom od 0,9 μm ukupne debljine 6,3 μm .

3.8.5. Analiza mikrografija

Za analizu mikrografija korišćen je Fiji ImageJ softver (NIH, SAD). Broj CD4⁺ T ćelija koje su se infiltrirale u belu i sivu masu kičmene moždine EAE pacova je ručno izbrojan iz projekcije maksimalnog intenziteta. Ove ćelije su identifikovane kao CD4⁺ krugovi prečnika približno 5 μm . Kako bi se procenila interakcija između CD4⁺ T ćelija i astrocita obeleženih GFAP u beloj i sivoj masi kičmene moždine EAE pacova, analizirane su z-projekcije maksimalnog intenziteta od 7 uzastopnih optičkih ravni: tri preseka iznad i ispod i fokalne ravni CD4⁺ T ćelije. Iste ravni su korišćene za analizu GFAP signala. CD4⁺ T ćelija je obeležena kao region od interesa (eng. region of interest, ROI) u odnosu na koji je rađena analiza. Zatim je primenjena Šolova analiza u inkrementima od 0,5 μm od centra ROI do prečnika od 10 μm . Smatrano je da CD4⁺ T ćelija interaguje sa astroцитom ukoliko je kružnica koja odgovara graničnoj površini CD4⁺ T ćeliji (3 μm od centra ROI) presecala GFAP signal. Broj CD4⁺ T ćelija koje interaguju sa astroцитima je manuelno prebrojan i izražen kao procenat od ukupnog broja infiltriranih CD4⁺ T ćelija.

Intenzitet fluorescentnog signala P2X7R i Cx-43 je izražen kao integrisana gustina signala. Kako bi se odredila kolokalizacija dva fluorescentna signala korišćen je Just Another Colocalization Plugin (JACoP) (Bolte and Cordelières, 2006). Za potrebe kvantifikacije preklapanje (kolokalizacija) Cx-43 i P2X7R, Cx-43 i GLT-1 i Cx-43 i GS fluorescentnih signala izračunat je Pirsonov koeficijent korelacije (PCC). Prikazana PCC vrednost predstavlja srednju vrednost PCC izračunate za pojedinačne preseke u z-projekciji debljine 7 – 10 μm .

Intenzitet i distribucija fluorescentnog signala P2X7R i Cx-43, kao i njihova kolokalizacija, su dalje ispitani u definisanim ROI. Jedan ROI je odgovarao okruženju CD4⁺ T ćelije, dok je drugi pokrивao nasumičnu površinu bez imunske ćelije na istom preseku. Analiza je urađena za prečnik od 3 do 20 μm od centra ROI. Iz analize je isključena površina koja odgovara samoj površini CD4⁺ T ćelija koje su identifikovane kao krugovi poluprečnika 5 μm . Pozicija nasumičnih ROI je bila na 50 μm od centra ROI oko CD4⁺ T ćelije. Distribucija i intenziteta signala Cx-43 i P2X7R u okviru ROI je određena na z-projekciji maksimalnog intenziteta debljine 7 μm korišćenjem opcije „Radial Profile”. Za Šolovu analizu je prvo određena kolokalizacija Cx-43 i P2X7R signala. Napravljena je maska kolokalizovanih piksela koja je korišćena za Šolovu analizu, a analiza je rađena u inkrementima od 0,5 μm od centra ROI. Broj kolokalizovanih Cx-43 i P2X7R signala koji presecaju koncentrične kružnice je normalizovan na poluprečnik odgovarajuće kružnice, a dobijena vrednost je označena kao gustina. Analiza je urađena na svakom preseku iz z-projekcije debljine 7 μm , a zatim je izračunata srednja vrednost gustine. Ukupno je analizirano 45 CD4⁺ T ćelija i 40 nasumičnih ROI iz 3 različite EAE životinje. Ista analiza je urađena i za nasumične ROI u presecima kičmene moždine kontrolne životinje.

3.9. Izolacija proteina i određivanje koncentracije

Za izolaciju proteina izolovane su kičmene moždine EAE pacova u vrhuncu bolesti (ocena 3) i zdravih kontrolnih životinja iste starosti. Lumbalni region kičmene moždine je homogenizovan u hladnom puferu za liziranje upotrebom ručnog homogenizera. Homogenati su sonifikovani na ledu 30 s, inkubirani 15 min na ledu i centrifugirani 20 min pri brzini od $14\,000 \times g$ na $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant koji sadrži ukupnu proteinsku frakciju je odvojen za dalju upotrebu, a talog je odbačen. Za određivanje koncentracije proteina korišćen je BCA Pierce Assay Kit (ThermoFisher Scientific,

SAD). Uzorci su svedeni na istu koncentraciju od 2 mg/ml i denaturisani u Lemli puferu sa 1% β -merkaptoetanolom inkubacijom na 95°C 5 min. Uzorci su čuvani na - 80°C do upotrebe za Western blot.

Za izolaciju proteina za Western blot, astrociti su zasejani u gustini od 10^4 ćelija/cm² na Petrijeve posude prečnika 35 mm. Po dostizanju konfluentnosti od 100%, isprane su toplim PBS, a potom su upotrebom sterilne grebalice, skinute sa podloge u hladnom puferu za liziranje. Potom su inkubirani 15 min na ledu uz mehaničku homogenizaciju nastavkom pipete od 200 μ l na svakih 5 min, centrifugirani 20 min na $14000 \times g$ na + 4°C, a nakon određivanja koncentracije ukupnih proteina u supernatantu, svedeni su na 1 mg/ml i denaturisani u Lemli puferu sa 1% β -merkaptoetanolom inkubacijom na 95°C 5 min. Uzorci su čuvani na - 80°C do upotrebe.

3.10. Koimunoprecipitacija

Kičmene moždine EAE i kontrolnih pacova starosti 2 do 3 meseca su izolovane i izdvojen je lumbalni region koji je homogenizovan u IP hladnom puferu za liziranje ručnim homogenizerom na ledu, centrifugiran na 14 000 rpm 20 min na + 4°C i izdvojen je supernatant. Supernatant je inkubiran sa DynabeadsTM magnetnim kuglicama 90 min, kako bi se uklonili proteini koji nespecifično interaguju sa kuglicama. Magnetne kuglice su izdvojene, a supernatant je sadržao ukupne proteine korišćene za imunoprecipitaciju. Koncentracija proteina je određena prema uputstvima proizvođača upotrebom BCA eseja za određivanje koncentracije proteina (BCA Pierce Assay Kit, ThermoFisher Scientific, SAD), a zatim su uzorci razblaženi do koncentracije od 1 mg/ml. Za protokol imunoprecipitacije je izdvojeno 15 μ l magnetnih kuglica po tubi koje su najpre isprane 4 puta IP puferom za liziranje, a potom inkubirane u 300 μ l rastvora za blokiranje, koji sadrži 5% BSA u IP puferu za liziranje, 75 min na sobnoj temperaturi na rotatoru. Nakon uklanjanja rastvora za blokiranje magnetne kuglice su inkubirane sa 4 μ g zečjeg anti-P2X7R primanog antitela ili 1 μ g kontrolnog zečjeg IgG u IP puferu za liziranje 2 h na rotatoru na sobnoj temperaturi. Magnetne kuglice su isprane IP puferom za liziranje kako bi se uklonilo antitelo koje se nije vezalo, a potom je dodato 300 μ g ukupnih proteina po tubici i inkubirano na rotatoru na + 4°C preko noći. Proteini su eluirani u Lemli puferu tokom 15 min na rotatoru, a potom je dodat 1% β -merkaptoetanol i uzorci su denaturisani 5 min na 95°C. Uzorci su čuvani na -80°C do upotrebe.

3.11. Western blot

Za Western blot su korišćeni proteini izolovani iz lumbalnog regiona kičmene moždine EAE i kontrolnih pacova, zatim iz primarnih astrocita u kulturi ili ukupni proteini i imunoprecipitati dobijeni u IP protokolu. Jednake količine proteina (20 μ g tkivnih proteina ili 10 μ g ćelijskih proteina) su nalivene na 8% ili 10% SDS-poliakrilamidni gel i razdvojeni elektroforezom u denaturišućim uslovima. Proteini su upotrebom Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad Laboratories, SAD) polu-suvog transfera sa gela prebačeni na PVDF membranu koja je prethodno aktivirana inkubacijom u metanolu 1 min i isprana u dejonizovanoj vodi 2 min. PVDF membrana sa proteinima je blokirana u 5% nemasnom mleku u TBST 2 h na sobnoj temperaturi na klackalici. Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela u TBST sa 5% nemasnim mlekom preko noći na + 4°C (Tabela 2). Membrane su isprane 3 puta po 10 minuta u TBST i inkubirane u razblaženju sekundarnog antitela (Tabela 2) u TBST 2 h na sobnoj temperaturi na klackalici. Zatim su isprane 3 puta po 10 min u TBST i vizualizovane upotrebom eseja za hemiluminiscentnu detekciju (Western-ECL substrate) i ChemiDoc-It imager (UVP Systems, SAD). Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu.

3.12. Statistička analiza

Za analizu i prikazivanje rezultata korišćeni su *SigmaPlot V12.0* i *GraphPad Prism V6* i *V9* programi. Da bi se testirala Gausova distribucija dobijenih podataka korišćen je Kolmogorov-Smirnov test normalne raspodele. Podaci koji su pokazivali normalnu raspodelu i jednaku varijansu (eng. equal-variance test) su podvrgnuti Studentovom t testu kako bi se utvrdila značajnost između grupa, u suprotnom je korišćen neparametarski *Mann-Whitney* test ili *Wilcoxon signed-rank* test za

eksperimente koji su rađeni na istim ćelijama. Za analizu više grupa rađena je jednofaktorska analiza varijanse (eng. *one-way ANOVA*) i *Student Newman Keuls post hoc* test. Za višestuko poređenje između grupa korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (eng. *two-way ANOVA*) i *Sidak post hoc* test.

Na slikama i u opisima slika je prikazano koji je test korišćen, odgovarajući nivo značajnosti (P vrednost), i veličina uzorka. Razlike između grupa koje su poređene i smatrane statistički značajnim ukoliko je P vrednost bila manja od 0,05. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM ili SD. Grafički prikaz rezultata je urađen pomoću *Corel Draw Graphic Suite 2018*, *GraphPad Prism V6* i *Sigma Plot V12.0*.

4. Rezultati

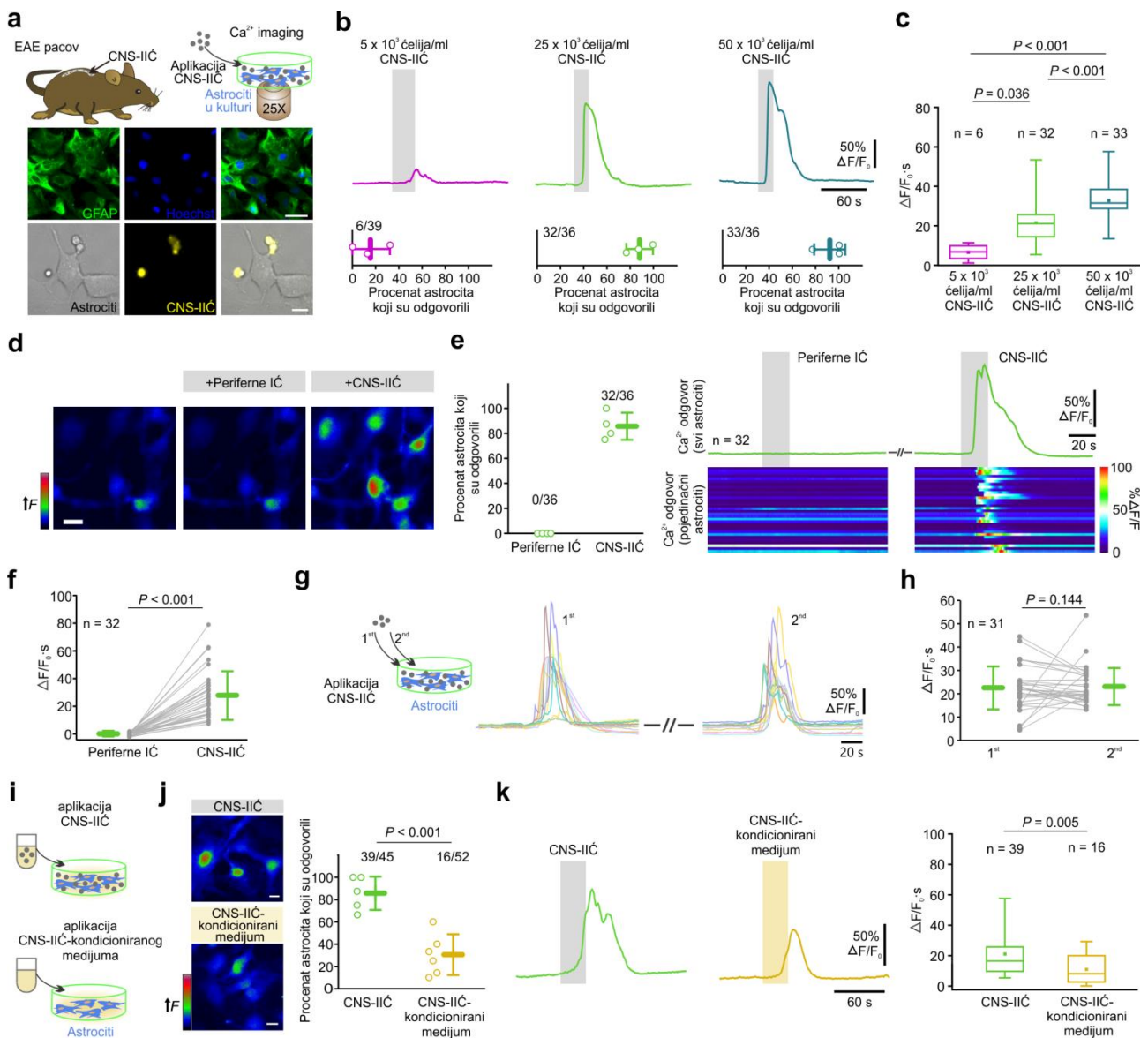
4.1. Efekat CNS-IIĆ na Ca^{2+} homeostazu i purinsku signalizaciju astrocita u kulturi

4.1.1. Uticaj CNS-IIĆ na dinamiku Ca^{2+} u astrocitima

Astroцити formiraju mrežu kroz CNS i interaguju sa brojnim ćelijskim tipovima u svom okruženju što otežava ispitivanje njihove interakcije sa samo jednim ćelijskim tipom. Da bi se na nedvosmislen način ispitala interakcija između astrocita i CNS-IIĆ, upotrebljen je eksperimentalni *in vitro* sistem koga čine astroцити u ćelijskoj kulturi i izolovane imunske ćelije. CNS-IIĆ su izolovane iz kičmene moždine pacova u vrhuncu EAE (ocena 3 – 3,5) (Miljković et al., 2011). Rezultati ovih oglеda prikazani su na Slici 9. Upotrebom fluorescentnog indikatora Fluo-4 AM je praćen nivo unutarćelijskog Ca^{2+} u astrocitima u kulturi nakon susreta sa CNS-IIĆ koje su aplicirane kroz perfuziju (Slika 9a). Testiran je efekat 5×10^3 , 25×10^3 i 50×10^3 ćelija/ml CNS-IIĆ na dinamiku Ca^{2+} odgovora astrocita. Prema literaturnim podacima testirane koncentracije su u opsegu broja infiltriranih ćelija u tkivo CNS u EAE (Schläger et al., 2016). Najniža testirana koncentracija CNS-IIĆ (5×10^3 ćelija/ml) izazvala je Ca^{2+} odgovor u svega 20% astrocita (Slika 9b). Površina Ca^{2+} odgovora astrocita koji su odreagovali na aplicirane CNS-IIĆ je bila značajno manja u odnosu na odgovor izazvan većim koncentracijama CNS-IIĆ (Slika 9b, c). Koncentracija ćelija koja je izazvala maksimalan odgovor je bila 25×10^3 ćelija/ml, i dalje povećanje koncentracije na 50×10^3 ćelija/ml nije menjalo površinu Ca^{2+} odgovora kao ni broj astrocita koji su odreagovali (Slika 9b, c). U daljim eksperimentima je korišćena koncentracija od 25×10^3 ćelija/ml. Podatak da površina Ca^{2+} odgovora zavisi od koncentracije apliciranih CNS-IIĆ ukazuje da Ca^{2+} signali posreduju u interakciji astrocita sa CNS-IIĆ (Slika 9c).

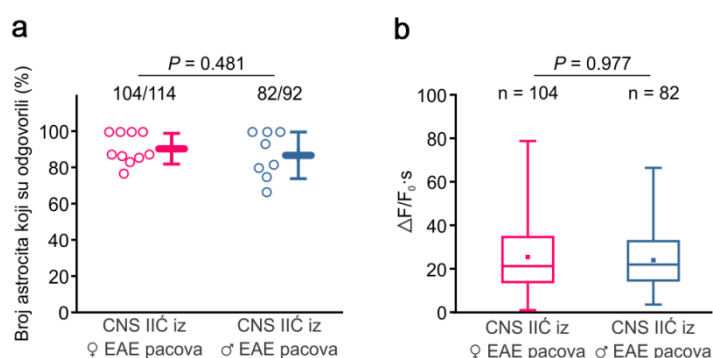
Specifičnost interakcije astrocita sa CNS-IIĆ je ispitana tako što je upoređen Ca^{2+} odgovor na CNS-IIĆ sa Ca^{2+} odgovorom astrocita u kontaktu sa imunskim ćelijama koje su izolovane iz cervikalnih limfnih čvorova EAE pacova (Periferne IĆ). Aplikacija Perifernih IĆ nije dovela do Ca^{2+} odgovora astrocita, dok je aplikacija CNS-IIĆ izazvala očekivani Ca^{2+} odgovor koji uočen $11,312 \pm 6,769$ s (srednja vrednost \pm SD, n = 32 astrocita) od trenutka aplikacije i trajao je i nakon prestanka aplikacije CNS-IIĆ (Slika 9d – f). Ca^{2+} odgovor astrocita nakon susreta sa CNS-IIĆ je bio konzistentan i ponovljiv, astroцити su reagovali Ca^{2+} odgovorom sličnih karakteristika kada se izlože CNS-IIĆ dva puta za redom u kratkom vremenskom intervalu (Slika 9g, h).

U cilju utvrđivanja da li Ca^{2+} odgovor izaziva direktna ćelija-ćelija interakcija između astrocita i CNS-IIĆ ili solubilni faktori poreklom iz imunskih ćelija (Goverman, 2009; Mayo et al., 2012), ispitan je Ca^{2+} odgovor astrocita nakon aplikacije CNS-IIĆ i CNS-IIĆ-kondicioniranog medijuma koji je dobijen uklanjanjem CNS-IIĆ centrifugiranjem. Suspenzija CNS-IIĆ i CNS-IIĆ-kondicionirani medijum su do eksperimenta održavani u istim uslovima. Primena CNS-IIĆ-kondicioniranog medijuma je izazvala 52% manji Ca^{2+} odgovor u odnosu na Ca^{2+} odgovor izazvan CNS-IIĆ (Slika 9k). Opisani rezultati ukazuju da CNS-IIĆ u neposrednoj blizini astrocita direktnom interakcijom izazivaju brze promene unutarćelijskog Ca^{2+} u astrocitima. Dodatno je ispitano da li postoji razlika u Ca^{2+} odgovoru astrocita na CNS-IIĆ poreklom iz mužjaka i ženki i ustanovljeno je da je Ca^{2+} odgovor sličan i da pol životinje iz koje su izolovane imunske ćelije nema uticaj na ovaj fenomen (Slika 10).



Slika 9. Direktna aplikacija CNS-IIC izaziva kalcijumski odgovor astrocita. (a) (Gore) Shema eksperimentalnog dizajna za proučavanje dinamike Ca²⁺ odgovora u astrocitima u kulturi po izlaganju CNS-IIC izolovanim iz kičmene moždine EAE pacova. (U sredini) Primer astrocita u kulturi obeleženih markerom astrocita GFAP (zeleno) i jedara DAPI (plavo). Skala je 50 μm. (Dole) Prikaz CNS-IIC obeleženih Fluo-4 (žuto) u blizini astrocita u kulturi po njihovoj aplikaciji kroz perfuziju. Skala je 20 μm. (b) (Gore) Reprezentativni primeri zapisa Ca²⁺ odgovora astrocita na aplikaciju CNS-IIC koncentracija 5 × 10³ (levo), 25 × 10³ (u sredini) i 50 × 10³ ćelija/ml (desno). (Dole) Procenat astrocita koji su odgovorili na aplicirane CNS-IIC naznačenih koncentracija. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ± SD i broj ćelija koje su odgovorile u odnosu na ukupan broj analiziranih astrocita iz tri nezavisna eksperimenta. N = 3 EAE pacova. (c) Na grafiku su prikazani kvantifikovani Ca²⁺ odgovori astrocita koji su prikazani pod (b) (jednofaktorska ANOVA, p < 0,001 i *Dunn post hoc* test: p = 0,036 za 5 × 10³ ćelija/ml u odnosu na 25 × 10³ ćelija/ml, p < 0,001 za 25 × 10³ ćelija/ml u odnosu na 50 × 10³ ćelija/ml, p < 0,001 za 5 × 10³ ćelija/ml u odnosu na 50 × 10³ ćelija/ml). (d) Primeri mikrofografija astrocita obeleženih Fluo-4 pre (levo), u toku aplikacije perifernih IC (u sredini) i u toku aplikacije CNS-IIC (desno) iz EAE pacova (oba tipa IC su aplicirani u koncentraciji od 25 × 10³ ćelija/ml). Skala je 20 μm. (e) (Levo) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ± SD procenta astrocita koji su odgovorili na Perifерне IC, a potom i na CNS-IIC od ukupnog broja analiziranih iz 4 nezavisna eksperimenta. N = 4 EAE pacova. (Desno) Prikazani zapis predstavlja srednju vrednost svih zapisa astrocita koji su odgovorili na aplicirane ćelije. (Dole) Ca²⁺ promene individualanih astrocita kodirane bojom koja odgovara intenzitetu fluorescentnog signala. (f) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ± SD Ca²⁺ odgovora astrocita u eksperimentu prikazanom pod e (*Wilcoxon signed-rank* test, p < 0,001 (g) (Levo) Shematski prikaz dve aplikacije 25 × 10³ ćelija/ml CNS-IIC za redom. (Desno) Primeri zapisa Ca²⁺ odgovora

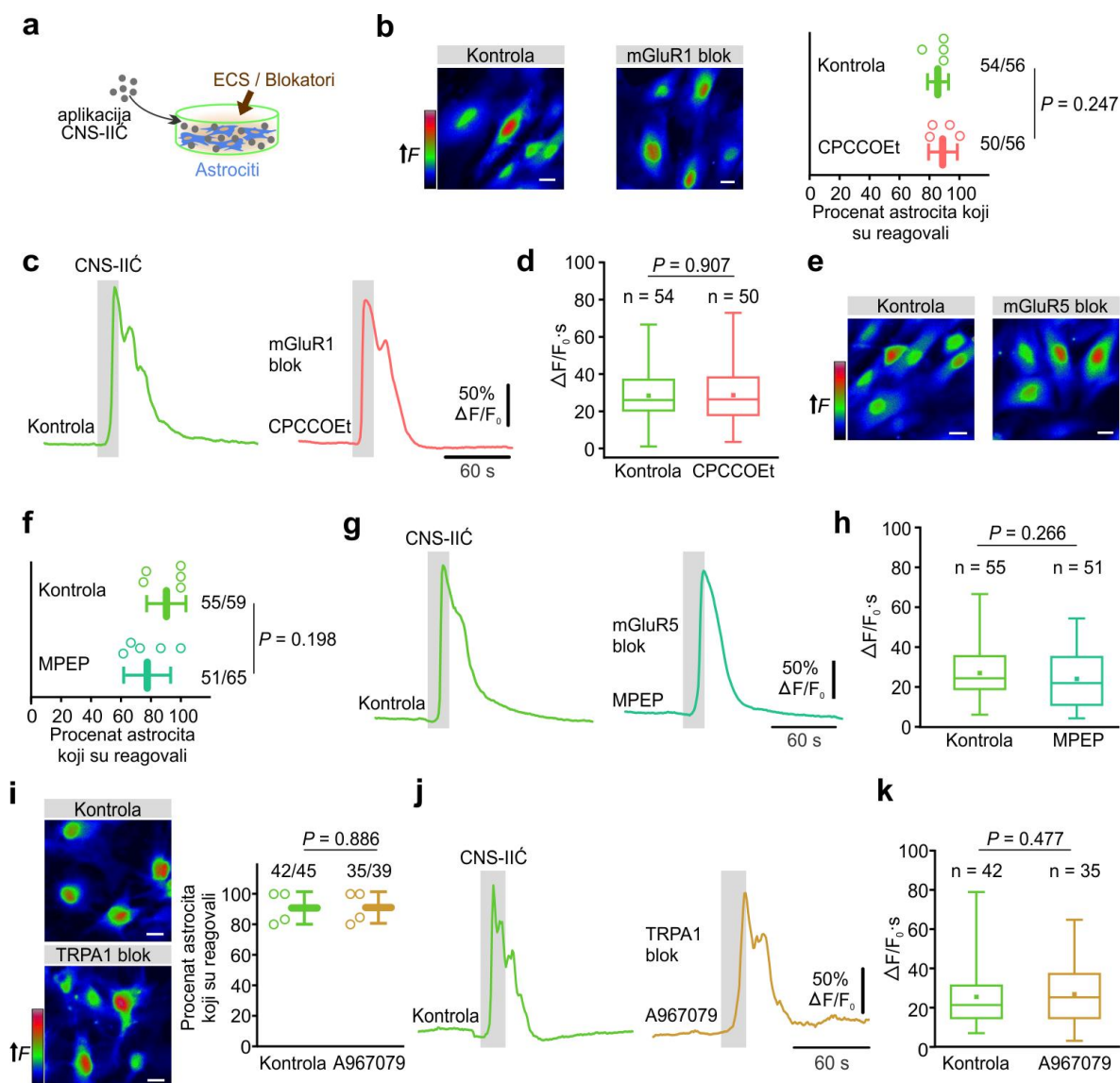
12 astrocita posle prve i druge aplikacije CNS-IIC. (h) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD Ca^{2+} odgovora astrocita iz eksperimenta pod g (*Wilcoxon signed-rank test*, $p = 0.144$) iz 3 nezavisna eksperimenta. (i) Shematski prikaz merenja Ca^{2+} odgovora astrocita u prisustvu CNS-IIC i CNS-IIC-kondicioniranog medijuma. (j) (Levo) Primeri astrocita obelezenih Fluo-4 indikatorom nakon primene CNS-IIC ili CNS-IIC-kondicioniranog medijuma. (Desno) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih iz pet ili šest nezavisnih eksperimenata (*Studentov t test* $p < 0,001$). $N = 4$ EAE pacova. Skala je $20 \mu\text{m}$. (k) (Levo) Primeri zapisa dobijenih registrovanjem Fluo-4 signala iz pojedinačnih astrocita. (Desno) Na grafiku su prikazane Ca^{2+} promene u astrocitima prouzrokovane CNS-IIC i CNS-IIC-kondicioniranim medijumom (*Mann-Whitney Rank Sum testom*, $p = 0,005$). Centralna linija na grafiku prikazuje medijanu, centralna tačka srednju vrednost, granice definišu gornji i donji kvartil, a graničnici označavaju minimalnu i maksimalnu vrednost. Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. Sivi krugovi predstavljaju astrocite. Sivi pravougaonici predstavljaju vremenski interval kada su aplicirane CNS-IIC. n je broj ćelija koje su odgovorile.



Slika 10. Kalcijumski odgovor astrocita izazvan aplikacijom CNS-IIC koje su izolovane iz kičmenih moždina ženki i mužjaka EAE pacova. (a) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili povećanjem unutarćelijskog Ca^{2+} na CNS-IIC koje su izolovane iz kičmene moždine ženke EAE pacova ($N = 8$) i na CNS-IIC koje su izolovane iz kičmene moždine mužjaka EAE pacova ($N = 6$). Predstavljen je broj astrocita koji su odgovorili u odnosu na ukupan broj analiziranih astrocita iz 8 do 10 eksperimenata za svaki prikazani uslov (*Studentov t test*, $p = 0,481$). Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. (b) Na grafiku je prikazano poređenje površine odgovora astroglialnih Ca^{2+} promena uzrokovanih CNS-IIC iz ženke ili mužjaka EAE pacova (*Mann-Whitney Rank Sum testom*, $p = 0,977$). n je broj astrocita koji su reagovali. Aplicirano je 25×10^3 ćelija/ml CNS-IIC.

4.1.2. Povećanje unutarćelijskog Ca^{2+} u astrocitima nakon susreta sa CNS-IIC ne zavisi od metabotropnih glutamatnih receptora i TRPA1 kanala

Jedan od pokretača promene unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u astrocitima mogu biti glutamatni metabotropni receptori spregnuti sa proteinom G (mGluR1 i mGluR5) čija aktivacija dovodi do oslobađanja Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa (Araque et al., 2014). Drugi čest mehanizam koji dovodi do inluksa Ca^{2+} u astrocit je aktivacija mehanosenzitivnih katjonskih kanala u osnovi prolaznog receptorskog potencijala podfamilije A, član 1 (eng. transient receptor potential A1 Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, TRPA1) (Shigetomi et al., 2013a). Stoga su primenjeni specifični blokatori ovih receptora i kanala da bi se ispitala njihova uloga u Ca^{2+} odgovoru astrocita u prisustvu CNS-IIC (Slika 11a). Blokiranje mGluR1 primenom $100 \mu\text{M}$ CPCCOEt (Slika 11b – d), mGluR5 dodavanjem $50 \mu\text{M}$ MPEP (Slika 11e – h) ili TRPA1 dodavanjem $10 \mu\text{M}$ A967079 (Slika 11i – k) nije uticalo na Ca^{2+} odgovor astrocita po aplikaciji CNS-IIC. Uočeni porast unutarćelijskog Ca^{2+} je sličnih karakteristika kao u kontrolnim uslovima bez blokatora (Slika 11d, h, k). Procenat astrocita koji su odreagovali na CNS-IIC je takođe sličan u odnosu na kontrolu (Slika 11b, f, i). Prikazani rezultati pokazuju da uočena promena Ca^{2+} odgovora usled interakcije astrocita i CNS-IIC ne zavisi od aktivacije mGluR1, mGluR5 i TRPA1, već uključuje drugi mehanizam.



Slika 11. Kalcijumski odgovor astrocita nakon aplikacije CNS-IIĀ ostaje nepromenjen u prisustvu blokatora mGluR1, mGluR5 i TRPA1. (a) Shema eksperimentalnog dizajna snimanja Ca^{2+} odgovora astrocita po apliciranju 25×10^3 CNS-IIĀ/ml bez ili u prisustvu blokatora ($100 \mu\text{M}$ CPCCOEt, $50 \mu\text{M}$ MPEP ili $10 \mu\text{M}$ A967079). (b) Primeri mikrografija astrocita obeleženih Fluo-4 Ca^{2+} indikatorom nakon aplikacije CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i u prisustvu blokatora mGluR1 (desno). Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili u kontrolnim uslovima i u prisustvu mGluR1 blokatora (CPCCOEt) (desno), $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p = 0,247$). (c) Primeri zapisa reprezentativnih Ca^{2+} odgovora astrocita izazvanih CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i u prisustvu CPCCOEt. (d) Na grafiku su upoređene Ca^{2+} promene u astrocitima izazvane CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i u prisustvu CPCCOEt (Studentov t test, $p = 0.907$). (e) Primeri mikrografija astrocita obeleženih Fluo-4 u toku primene CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i nakon blokiranja astroglijalnog mGluR5 upotrebom MPEP. (f) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili u kontrolnim uslovima i u prisustvu MPEP nakon izlaganja CNS-IIĀ, $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p = 0,198$). (g, h) Reprezentativni primeri zapisa (pod g) i grafik (pod h) na kom su prikazane Ca^{2+} promene u astrocitima nakon aplikacije CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima ili u prisustvu MPEP (*Mann-Whitney Rank Sum* testom, $p = 0.266$). (i) Primeri mikrografija astrocita obeleženih Fluo-4 Ca^{2+} indikatorom nakon izlaganja CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i u prisustvu blokatora TRPA1 A967079 (levo). Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili na prisustvo CNS-IIĀ u kontrolnim uslovima i u prisustvu blokatora A967079, $N = 4$ EAE pacova (desno) (*Mann-Whitney Rank Sum* testom, $p = 0,477$). Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. Sivi pravougaonici obeležavaju interval u kom su aplicirane CNS-IIĀ. Skala je $20 \mu\text{m}$. n je broj astrocita koji su odregovali od ukupnog broja analiziranih.

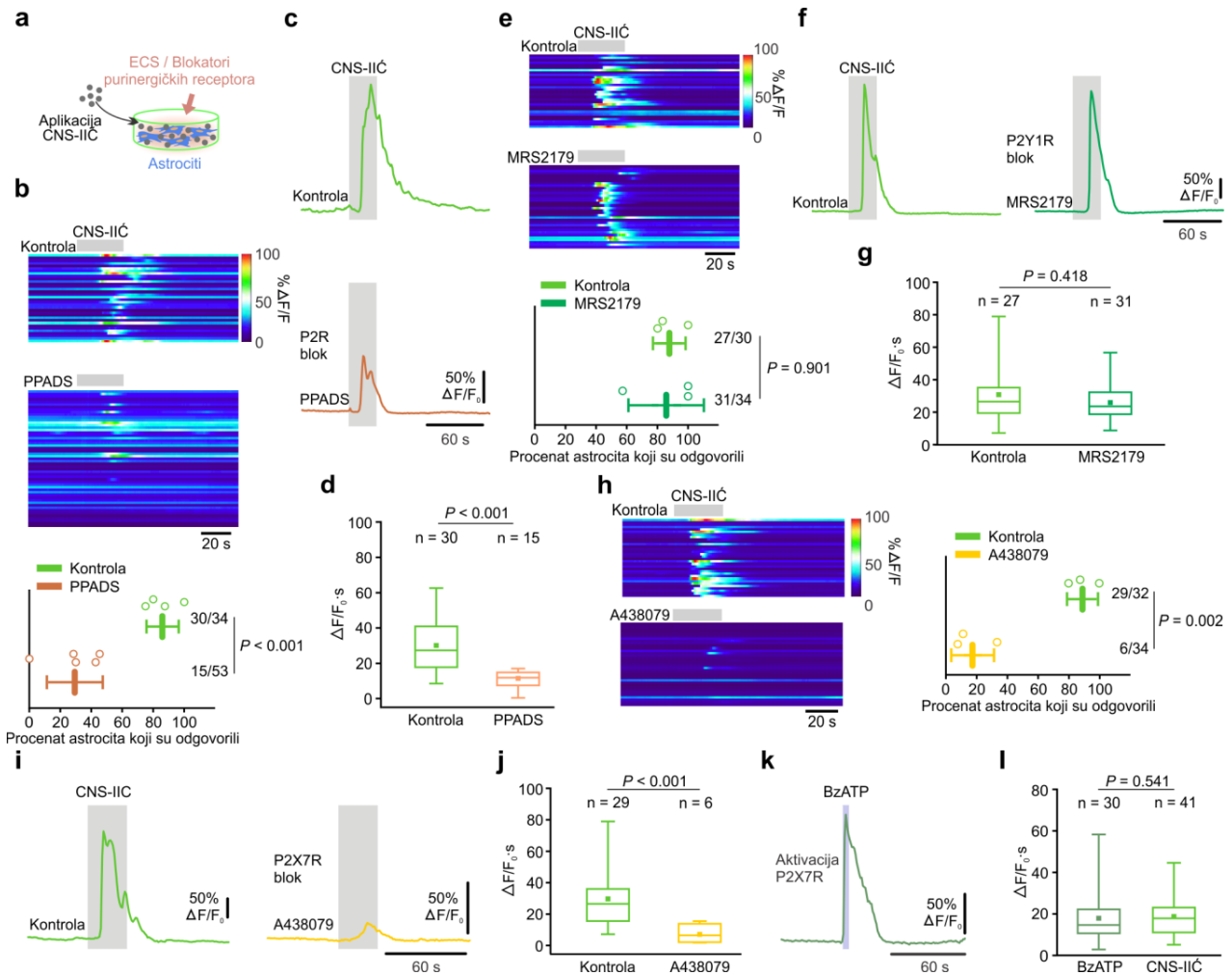
4.1.3. CNS-IIĆ izazivaju Ca²⁺ odgovor u astrocitima putem aktivacije P2X7R

P2 purinski receptori učestvuju u odgovoru astrocita na patofiziološke stimuluse, a kao posledica njihove aktivacije dolazi do povećanja unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ (Franke et al., 2012). Iz navedenih razloga je ispitano da li P2 grupa receptora posreduje u Ca²⁺ odgovoru astrocita na prisustvo CNS-IIĆ u njihovoj neposrednoj blizini primenom selektivnih blokatora ovih receptora na astrocitima (Slika 12a). Blokiranje P2 receptora neselektivnim blokatorom PPADS (50 µM) je redukovalo broj astrocita koji su odreagovali na prisustvo CNS-IIĆ za 56% (Slika 12b). Površina Ca²⁺ odgovora astrocita koji su odgovorili na prisustvo CNS-IIĆ u prisustvu PPADS je smanjena za 60% u odnosu na kontrolne uslove (Slika 12c, d). Ovaj rezultat je ukazao da purinski receptori učestvuju u Ca²⁺ promenama u astrocitima koje su uzrokovane interakcijom sa CNS-IIĆ. Da bi se odredilo koji tip P2 receptora učestvuje u ovoj interakciji testirani su efekti blokiranja P2Y₁ metabotropnih receptora koji su potentni stimulatori oslobađanja Ca²⁺ iz unutrašnjih depoa (Butt, 2011) upotrebom selektivnog blokatora MRS 2179 (10 µM). Blokiranje P2Y₁ receptora nije uticalo na Ca²⁺ odgovor astrocita na aplicirane CNS-IIĆ. Broj ćelija koje su odreagovali i intenzitet odgovora su bili slični kao u kontrolnim uslovima bez blokatora (Slika 12e – g). Jonotropni P2X7R koji dovode do povećanja unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ propuštanjem ovog jona iz vanćelijske sredine u ćeliju su uključeni u Ca²⁺ odgovor astrocita u toku inflamacije (Amadio et al., 2017; Narcisse et al., 2005). Iz tog razloga je blokiran P2X7R na astrocitima upotrebom specifičnog blokatora A438079 (10 µM). Broj astrocita koji je odgovorio na CNS-IIĆ u prisustvu A438079 je bio 72% manji u odnosu na kontrolne uslove, dok je površina Ca²⁺ odgovora u ćelijama koje su odgovorile bila 74% niži u odnosu na kontrolu (Slika 12h – j). Kratka aplikacija niske koncentracije (5 µM) BzATP, agonista P2X7R, u trajanju od 5 s je izazvala Ca²⁺ odgovor sličnih karakteristika kao porast uzrokovan CNS-IIĆ (Slika 12k, l). Ovi rezultati ukazuju da je Ca²⁺ odgovor u astrocitima do kojeg dovode CNS-IIĆ prvenstveno posledica aktivacije astrocitnog P2X7R.

4.1.4. Aktivacija astroglijalnog P2X7R i povećanje unutarćelijskog Ca²⁺ po izlaganju CNS-IIĆ je posredovano astroglijalnim hemikanalima

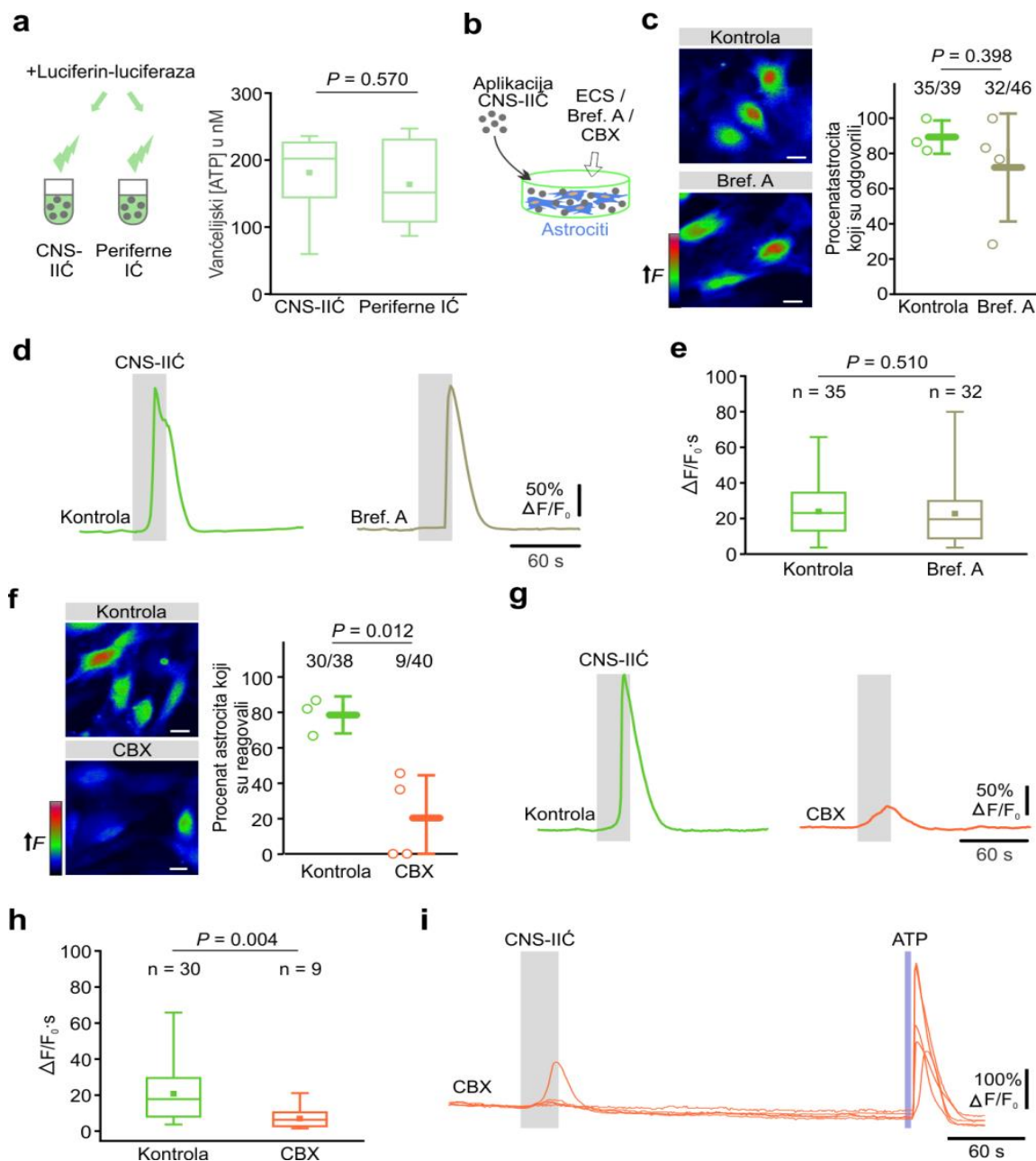
Astroцити су главни произвођачи АТФ у CNS (Franke et al., 2012), али имунске ћелије такође ослобађају овај молекул (Burnstock and Knight, 2018), што отежава расветљавање механизма активације астроглијалног P2X7R при контакту са CNS-IIĆ. Употребом хемилуминисцентног лциферин-лцифераза есеја је измерена количина ванћелијског АТФ који ослобађају CNS-IIĆ и периферне ИĆ да би се утврдило да ли АТФ ослобођен од стране CNS-IIĆ активира астроглијални P2X7R (Slika 13a). Концентрација ванћелијског АТФ ослобођена од стране CNS-IIĆ је била слична оној ослобођеној од стране периферних ИĆ (Slika 13a), што је указало да CNS-IIĆ нису извор АТФ који активира астроцитни P2X7R.

Да би се испитало да ли астроцити ослобађају АТФ при излаганју CNS-IIĆ, испитан је утицај блокаде путева његовог ослобађања (Slika 13b). Примена брeфeлдина А који спрeчава везикуларно ослобађање АТФ (Bref. A, 2 µg/ml) (Bowser and Khakh, 2007), астроцитни одговор након апликације CNS-IIĆ је био сличан као у контролним условима (Slika 13c – e). Са друге стране, примена карбеноксолонa (CBX, 50 µM) који спрeчава ослобађање АТФ кроз хемиканале (Chever et al., 2014; Delekate et al., 2014; Kang et al., 2010) је смањила пропорцију астроcita који су одреagovalи на CNS-IIĆ за 56%, као и површину самог одговора за 65% у порeђењу са одговором на присуство CNS-IIĆ у контролним условима (Slika 13f –h). CBX није спрeчио одговор астроcita на ванћелијски додат АТФ, што додатно потврђује да је Ca²⁺ одговор астроcita на CNS-IIĆ посредован АТФ ослобођеним из самих астроcita (Slika 13i). Такође, ови резултати показују да апликација CNS-IIĆ промовише ослобађање АТФ кроз астроглијалне хемиканале, који доводи до активације P2X7R и до пораста унутарћелијског Ca²⁺ у астроцитима.



Slika 12. P2X7R posreduje u Ca^{2+} odgovoru astrocита na prisustvo CNS-IIČ. (a) Shema eksperimentalnog dizajna Ca^{2+} oslikavanja astrocита u toku aplikacije 25×10^3 ćelija/ml u kontrolnim uslovima i u prisustvu blokatora purinskih receptora ($50 \mu\text{M}$ PPADS, $10 \mu\text{M}$ MRS2179 ili $10 \mu\text{M}$ A438079). (b) Ca^{2+} promene individualnih astrocита izazvane CNS-IIČ su obeležene bojom prema intenzitetu fluorescentnog signala u kontrolnim uslovima i posle primene PPADS. (Dole) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocита koji su odgovorili na prisustvo CNS-IIČ kao i broj astrocита koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih iz četiri ili pet nezavisnih eksperimenata za svaki testirani uslov, $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p < 0,001$). (c) Reprezentativni zapisi Ca^{2+} odgovora u astrocитima izazvanog CNS-IIČ u kontrolnim uslovima i u prisustvu PPADS. (d) Na grafiku je prikazana površina Ca^{2+} odgovora u astrocитima uzrokovanih CNS-IIČ u eksperimentu prikazanom pod b (*Mann-Whitney Rank Sum* test, $p < 0,001$). (e) Ca^{2+} promene individualnih astrocита izazvane CNS-IIČ kodirane bojom prema intenzitetu Fluo-4 signala u kontrolnim uslovima i posle primene MRS2179. (Dole) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD frakcije astrocита koji su odgovorili, $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p < 0,901$). (f) Reprezentativni zapisi porasta Ca^{2+} u astrocитima izazvanog CNS-IIČ u kontrolnim uslovima i u prisustvu MRS2179. (g) Na grafiku je prikazana površina Ca^{2+} odgovora u astrocитima uzrokovanih CNS-IIČ u eksperimentu prikazanom pod b (*Mann-Whitney Rank Sum* test, $p = 0,418$). (h) (Levo) Ca^{2+} promene individualnih astrocита izazvane CNS-IIČ obeležene su bojom prema intenzitetu fluorescentnog signala u kontrolnim uslovima i posle primene A438079. (Desno) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD frakcija astrocита koji su odgovorili na prisustvo CNS-IIČ u prisustvu A438079 i u kontrolnim uslovima, $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p = 0,002$). (i) Reprezentativni zapisi porasta Ca^{2+} u astrocитima koji je izazvan CNS-IIČ u kontrolnim uslovima i u prisustvu A438079. (j) Na grafiku je prikazana površina Ca^{2+} odgovora astrocита uzrokovanih CNS-IIČ u eksperimentu prikazanom pod i (*Mann-Whitney Rank Sum* testom, $p < 0,001$). (k) Reprezentativni zapis povećanja unutarćelijskog Ca^{2+} u astrocитima usled primene BzATP. (l) Na grafiku je prikazana površina Ca^{2+} odgovora astrocита na BzATP i CNS-IIČ iz tri nezavisna eksperimenta (*Mann-Whitney Rank Sum* test, $p = 0,541$), $N = 3$ EAE pacova. Grafik je objašnjen u opisu

Slike 9. Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. Sivi pravougaonici predstavljaju interval u kom su aplicirane CNS-IIC. n je broj astrocita koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih.

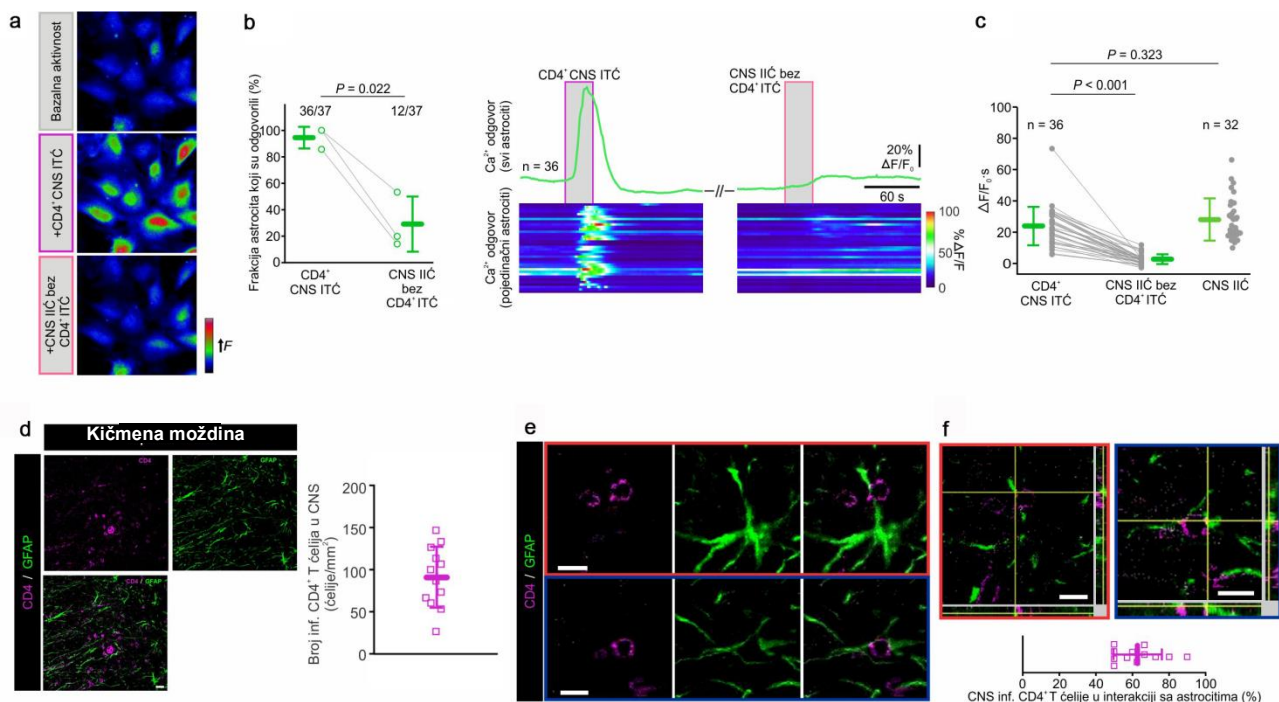


Slika 13. Aktivacija P2X7R i kalcijumski odgovor u prisustvu CNS-IIC je posredovan astroglialnim hemikanalima. (a) (Levo) Shema eksperimentalnog dizajna za merenje količine oslobođenog ATP iz CNS-IIC i Perifernih IC upotrebom luciferin-luciferaza hemiluminiscentnog bioeseja. (Desno) Na grafiku je prikazano poređenje količine oslobođenog ATP iz CNS-IIC i Perifernih IC (Studentov t test, $p = 0,570$, $N = 8$ EAE pacova; 8 nezavisnih merenja za svaku grupu). (b) Shema eksperimentalnog dizajna za praćenje Ca^{2+} odgovora astrocita u toku aplikacije CNS-IIC u kontrolnim uslovima i u prisustvu brefeldina A (2 $\mu g/ml$ Bref. A) ili karbenoksolona (50 μM CBX) koji sprečavaju oslobađanje ATP iz astrocita. (c) (Levo) Primeri mikrografija astrocita obeleženih Fluo-4 Ca^{2+} indikatora u toku aplikacije CNS-IIC u kontroli i posle tretmana Bref. A. (Desno) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocita koji su odgovorili i broj astrocita koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih iz tri ili četiri nezavisna eksperimenta za svaki ispitani uslov, $N = 3$ EAE pacova (Studentov t test, $p = 0,398$). (d) Reprezentativni zapisi Ca^{2+} odgovora astrocita izazvani CNS-IIC u kontroli ili posle tretmana Bref. A. (e) Na grafiku su prikazane Ca^{2+} promene u astroцитima uzrokovane CNS-IIC iz eksperimenta pod c (Mann-Whitney Rank Sum test, $p = 0,510$). (f) (Levo) Primeri mikrografija astrocita obeleženih Fluo-4 Ca^{2+} indikatorom u toku

aplikacije CNS-IIĆ u kontroli i u prisustvu CBX. (Desno) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenat astrocита koji su odgovorili i broj astrocита koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih iz tri ili četiri nezavisna eksperimenta za svaki ispitani uslov, N = 3 EAE pacova (Studentov t test, p = 0,012). (g) Reprеzentativni zapisi Ca²⁺ odgovora astrocита uzrokovanog CNS-IIĆ u kontroli ili posle tretmana CBX. (h) Na grafiku je prikazana površina Ca²⁺ odgovora astrocита uzrokovanog CNS-IIĆ iz eksperimenta pod f (Mann-Whitney Rank Sum test, p = 0,004). (i) Primeri zapisa Ca²⁺ odgovora pet astrocита koji prikazuju karakteristike Ca²⁺ promena izazvanih CNS-IIĆ, a potom i ATP (označen plavim pravougaonikom) u prisustvu CBX. Grafici su objašnjeni u opisu Slike 9. Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. Sivi pravougaonik označava interval CNS-IIĆ aplikacije. n je broj astrocита koji su odgovorili. Skala: 20 μ m.

4.1.5. CD4⁺ T ćelije infiltrirane u CNS interaguju sa astrocิตima i izazivaju Ca²⁺ odgovor

CD4⁺ T ćelije su najbrojnije ćelije među izolovanim CNS-IIĆ i igraju bitnu ulogu u progresiji EAE (Miljković et al., 2011) zbog čega je ispitano da li su upravo CD4⁺ T ćelije odgovorne za Ca²⁺ odgovor astrocита. CD4⁺ T ćelije (CD4⁺ CNS-ITĆ) su odvojene od ostatka CNS-IIĆ izolata (CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC), a citofluorimetrijska analiza je pokazala da čine oko polovinu ukupnih izolovanih CNS-IIĆ (40,9% \pm 11,5%, srednja vrednost \pm SD, N = 6 EAE pacova, 6 nezavisnih merenja). U eksperimentu praćenja dinamike Ca²⁺ odgovora je aplicirano 25 \times 10³ ćelija/ml CD4⁺ ITC ili CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC (Slika 9b, c). Aplicirane CD4⁺ CNS ITC izazvale su Ca²⁺ odgovor astrocита veće površine u odnosu na CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC, takođe aplikacija CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC je izazvala Ca²⁺ odgovor manjeg broja astrocита u odnosu na aplikaciju CD4⁺ ITC (Slika 14a, b). Astrogljalna Ca²⁺ promena kao odgovor na aplicirane CD4⁺ CNS ITC je bila 9,1 puta veća u odnosu na odgovor izazvan CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC (Slika 14c). Karakteristike Ca²⁺ odgovora astrocита na CD4⁺ CNS ITC su bile sličnih karakteristika kao odgovor uočen po primeni CNS-IIĆ (Slika 14c). Zajedno, ovi rezultati ukazuju da su autoreaktivne CD4⁺ T ćelije odgovorne za Ca²⁺ odgovor astrocита u kulturi.



Slika 14. CD4⁺ T ćelije infiltrirane u CNS su odgovorne za povećanje unutarćelijskog Ca²⁺ u astrocิตima u kulturi. (a) Primeri mikrografija astrocита obeleženih Fluo-4 Ca²⁺ indikatorom pre (levo), u toku aplikacije 25 \times 10³ ćelija /ml CD4⁺ CNS ITC (u sredini) i u toku aplikacije 25 \times 10³ ćelija /ml CNS-IIĆ bez CD4⁺ ITC (desno). Skala: 50 μ m. (b) (Levo) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta astrocита koji su odgovorili na aplicirane CD4⁺ CNS ITC, a potom na CNS IIĆ bez CD4⁺ ITC i broj astrocита koji su odgovorili od ukupnog broja analiziranih iz tri nezavisna eksperimenta za svaki prikazani uslov (Studentov t test, p = 0,022, N = 3 EAE pacova). (Desno) Zeleni zapis predstavlja srednju vrednost promene

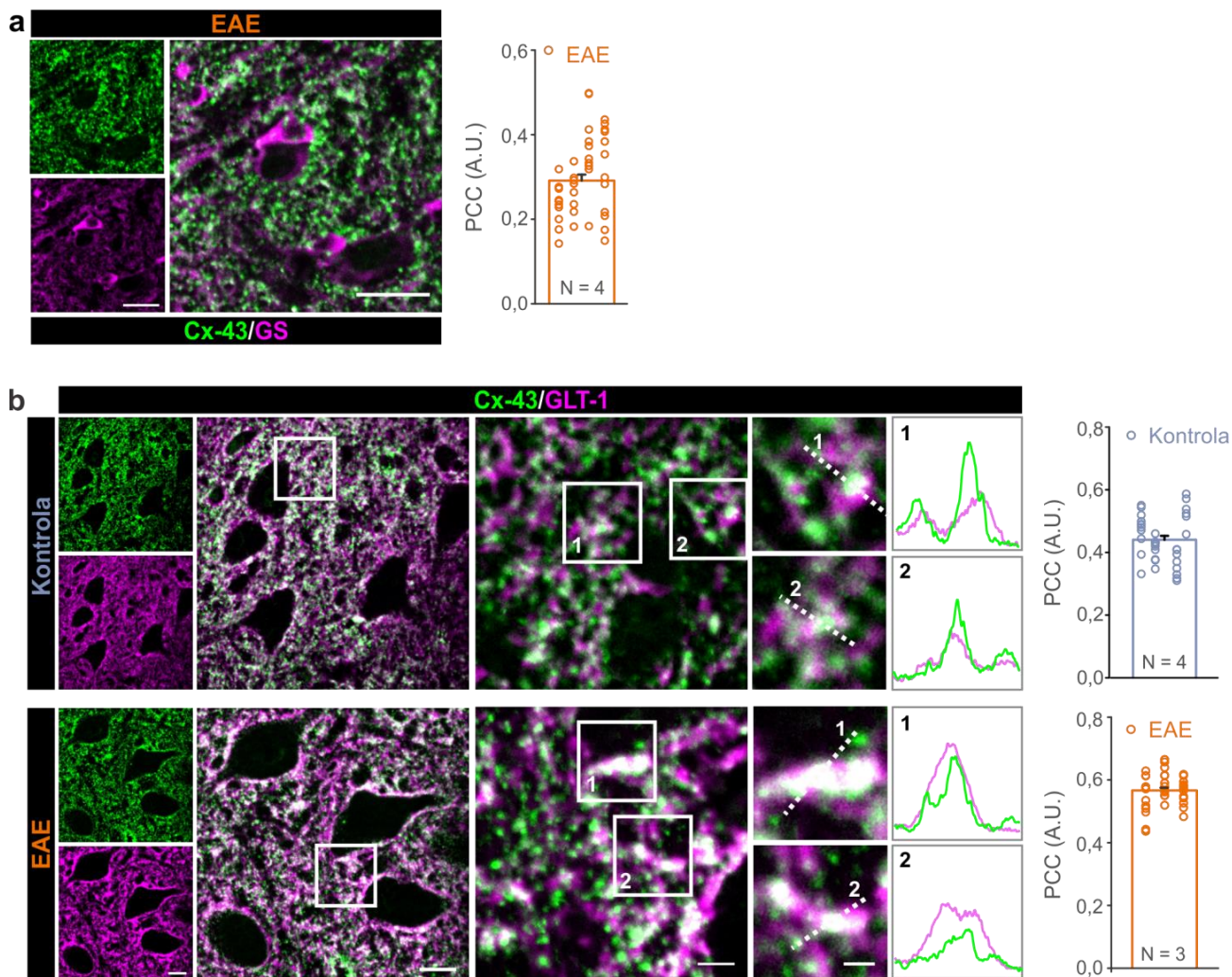
Ca²⁺ svih astrocita koji su odgovorili na CD4⁺ CNS ITC, a potom na CNS IIC bez CD4⁺ ITC. (Dole) Ca²⁺ promene individualnih astrocita obeležene su bojom koja odgovara intenzitetu Fluo-4 signala. (c) Na grafiku je prikazana površina Ca²⁺ odgovora astrocita posle aplikacije CD4⁺ CNS ITC i CNS-IIC bez CD4⁺ ITC (*Wilcoxon signed-rank test*, $p < 0,001$) i posle primene CNS-IIC (*Mann-Whitney Rank Sum test*, $p = 0,323$). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD. (d) Konfokalne slike prikazuju z-projekciju maksimalnog intenziteta preseka kičmene moždine EAE pacova gde su obeležene CD4⁺ T ćelije (anti-CD4+, magenta) i astrociti (anti-GFAP, zeleno). Infiltrirane CD4⁺ T ćelije su raspoređene u parenhimu CNS tkiva i okružene su astrocitima. Skala: 20 μ m. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD gustine infiltriranih CD4⁺ T ćelija u kičmenoj moždini EAE pacova (N = 3 EAE pacova). Analizirana su 3 do 4 preseka kičmene moždine po životinji (označeni kvadratićima). (e, f) Konfokalne mikrografije (pod d) i ortogonalne projekcije (pod e) obeleženih CD4⁺ T ćelija (magenta) i GFAP⁺ astrocita (zeleno) u sivoj (u crvenom pravougaoniku) i beloj masi (u plavom pravougaoniku) kičmene moždine EAE pacova. Slike su prikazane kao projekcije maksimalnog intenziteta debljine 6,3 μ m. Skala: 10 μ m. (Dole) Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SD procenta infiltriranih CD4⁺ T ćelija koje interaguju sa GFAP⁺ astrocitima u u beloj i sivoj masi kičmene moždine EAE pacova. N = 3 EAE pacova, analizirana su 3 do 4 preseka kičmene moždine po životinji (obeleženi kvadratom). Grafici su objašnjeni u opisu Slike 9. Prazni krugovi predstavljaju nezavisne eksperimente. Sivi pravougaonici obeležavaju interval aplikacije imunskih ćelija. Sivi krugovi predstavljaju pojedinačne astrocite. n je broj astrocita koji su odreagovali.

Infiltrirane CD4⁺ T ćelije se kreću kroz parenhim CNS (Schläger et al., 2016) i na svom putu se mogu sresti sa astrocitima. Da bi se ispitala prostorna distribucija CD4⁺ T ćelije u odnosu na astrocite u kičmenoj moždini EAE pacova, ova dva ćelijska tipa su imunohistohemijski obeleženi. Uočeno je da su CD4⁺ T ćelije u parenhimu kičmene moždine u neposrednoj blizini GFAP⁺ astrocita (analiza je pokazala da je značajan procenat CD4⁺ T ćelija infiltriranih u CNS u direktnom kontaktu sa GFAP⁺ astrocitima (Slika 14d, e, f)). Ovaj rezultat ukazuje da se interakcija između astrocita i CD4⁺ T ćelija dešava u toku inflamacije CNS koja odlikuje EAE.

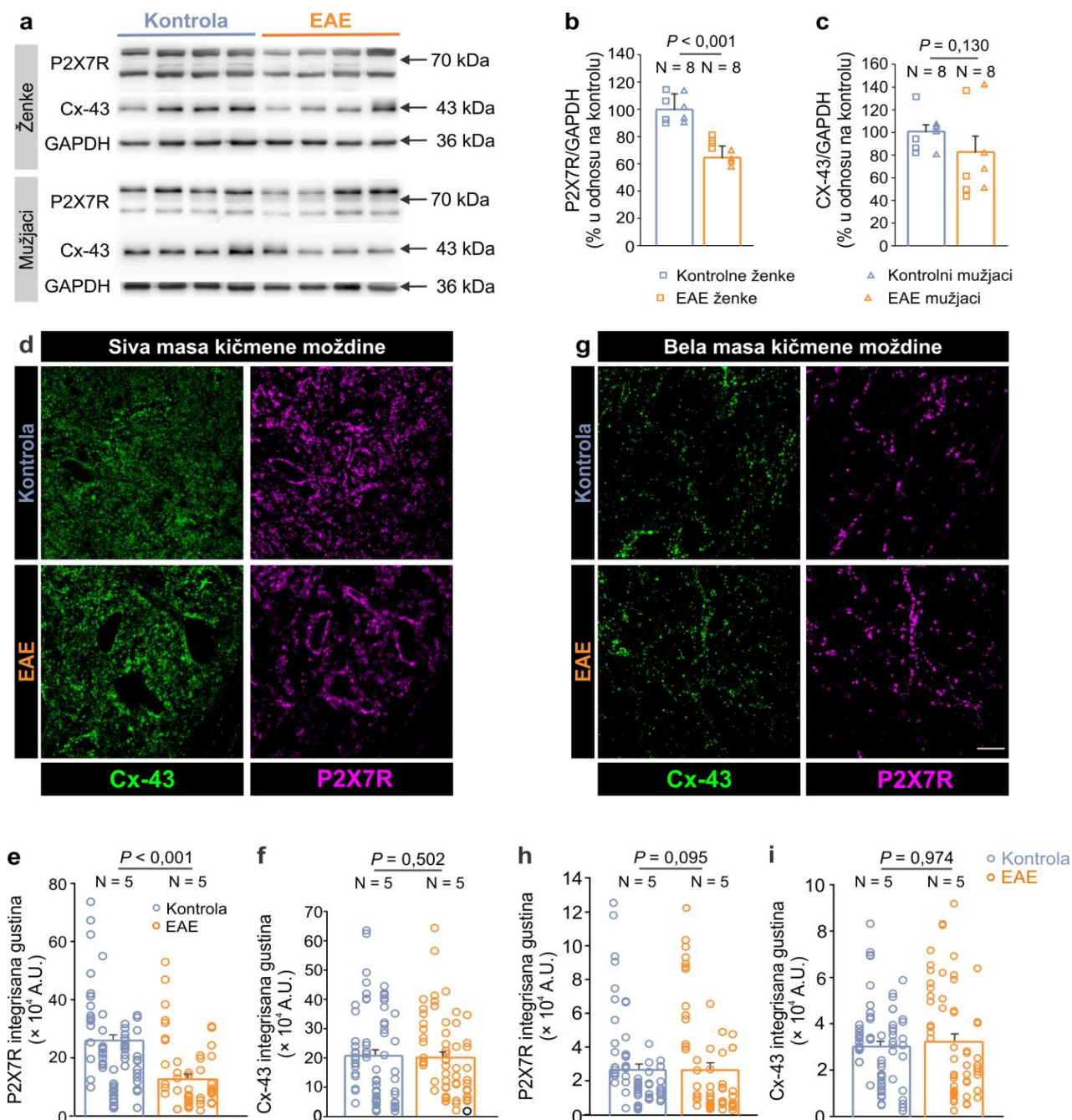
4.2. Sprega astroglijalnih P2X7 receptora, β 3-integrina i koneksina-43 posreduje u međućelijskoj interakciji astrocita sa autoreaktivnim imunskim ćelijama u EAE

4.2.1. Ekspresija P2X7R je smanjena u kičmenoj moždini EAE pacova, dok se ekspresija Cx-43 ne menja

Pošto je pokazano da P2X7R posreduje u direktnoj interakciji astrocita sa CNS-IIC u *in vitro* sistemu, kao i da njegovu aktivaciju pokreće ATP oslobođen kroz astroglijalne hemikanale, ispitana je ekspresija P2X7R i Cx-43 u kičmenoj moždini EAE pacova u odnosu na zdravu kontrolu primenom Western blot metode i imunohistohemije. Kao marker astrocita je korišćen Cx-43 jer je eksprimiran u ćelijskoj membrani astrocita (Scemes et al., 2000; Suadecani et al., 2003). Najpre je imunohistohemijskom analizom utvrđeno da je Cx-43 eksprimiran u astrocitima. U ovim eksperimentima smo pokazali da Cx-43 kolokalizuje sa glutamin sintetazom (GS) a narocito sa glutamatnim transporterom (GLT-1), koji su markeri astrocita (Slika 15).



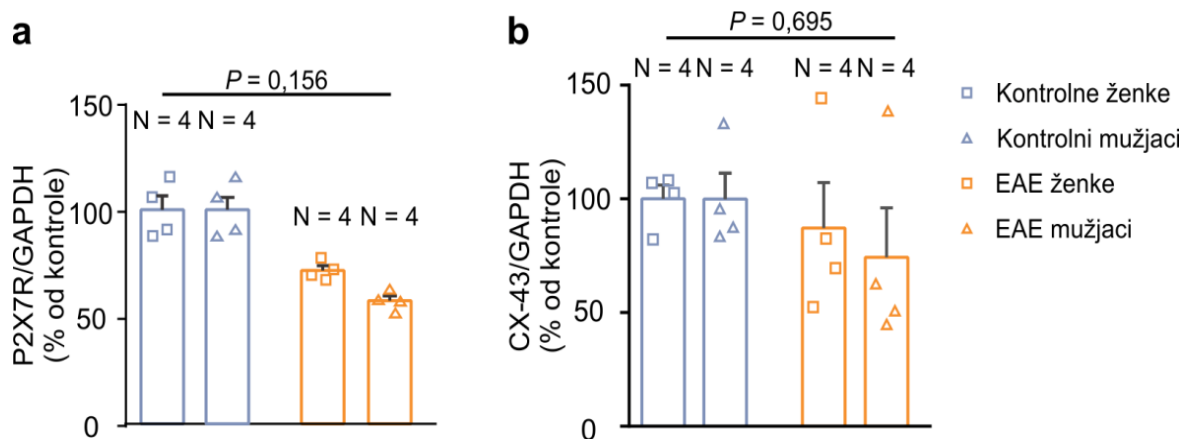
Slika 15. Koneksin-43 kolokalizuje sa astroglijalnim markerima glutamin sintetazom (GS) i glutamatnim transporterom-1 (GLT-1). (a) (Levo) Konfokalne mikrografije preseka sive mase lumbalnog regiona EAE kičmene moždine gde su obeleženi Cx-43 (zeleno) i GS (magenta). (Desno) Na grafiku je prikazan Pirsonov koeficijent kolokalizacije (PCC) za Cx-43 i GS signale. Skala je 20 μm . (b) Konfokalne mikrografije preseka sive mase lumbalnog regiona kičmene moždine gde su imunofluorescentno obeleženi Cx-43 (zeleno) i GLT-1 (magenta) u kontrolnoj i EAE životinji. Beli kvadrat odgovara uveličanom regionu koji je prikazan desno, skala je 5 μm . Kvadrati obeleženi brojevima (1, 2) odgovaraju uveličanim regionima prikazanim desno, skala je 2 μm . Linijski profil intenziteta Cx-43 i GLT-1 fluorescentnih signala koji su izmereni duž isprekidanih belih linija. Na graficima je prikazana vrednost PCC u Kontroli i EAE. N je broj analiziranih životinja. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SE.



Slika 16. U kičmenoj moždini EAE pacova ekspresija P2X7 receptora se smanjuje, a ekspresija Cx-43 se ne menja. (a) Reprezentativni imunoblotovi prikazuju ekspresiju P2X7R i Cx-43 u lumbalnom regionu kičmene moždine ženki i mužjaka kontrolnih i EAE pacova. GAPDH je korišćen kao kontrola nalivanja uzoraka. (b, c) Na grafiku je prikazano poređenje proteinske ekspresije P2X7R (pod b) i Cx-43 (pod c) u lumbalnom regionu kičmene moždine zdravih kontrolnih ($N = 8$) i EAE životinja ($N = 8$) ($P < 0,001$ za P2X7R, $P = 0,130$ za Cx-43, *Mann Whitney Rank Sum* test). Kvadrati predstavljaju vrednosti dobijene za pojedinačne mužjake, a trouglovi za pojedinačne ženke. (d) Reprezentativne konfokalne mikrografije preseka sive mase lumbalnog regiona kičmene moždine gde su fluorescentno obeleženi P2X7R (magenta) i Cx-43 (zeleno) u kontroli i EAE. (e, f) Na graficima su prikazane vrednosti intenziteta fluorescentnog signala Cx-43 (pod e) i P2X7R (pod f) kontrolnih ($N = 5$) i EAE pacova ($N = 5$) ($P = 0,974$ za Cx-43 i $P < 0,001$ za P2X7R, *Mann Whitney Rank Sum* test). (g) Reprezentativne konfokalne mikrografije preseka bele mase kičmene moždine kontrolnih i EAE pacova gde su obeleženi Cx-43 (zeleno) i P2X7R (magenta). Skala: 20 μm . (h, i) Na graficima su prikazani intenziteti fluorescentnih signala Cx-43 (pod h) i P2X7R (pod i) u beloj masi kičmene moždine kontrole ($N = 5$) i EAE pacova ($N = 5$) ($P = 0,974$ za Cx-43 i $P = 0,095$ za P2X7R, *Mann Whitney Rank Sum* test). Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm SE. Vertikalni niz krugova predstavlja vrednosti dobijene za individualne životinje, dok krugovi odgovaraju vrednostima dobijenim za individualne kadrove.

Analiza Western blot rezultata je pokazala da je ekspresija P2X7R smanjena u ukupnom homogenatu lumbalnog regiona kičmene moždine EAE pacova u odnosu na kontrolu (Slika 16a, b, $P < 0,001$, Studentov t test). Ekspresija Cx-43 nije bila promenjena u kičmenoj moždini EAE pacova u odnosu na kontrolu (Slika 16a, c, $P = 0,130$, *Mann-Whitney Rank Sum* test). Uočeno je da su promene ekspresije ova dva proteina nezavisne od pola eksperimentalnih životinja i da je ekspresija P2X7R smanjena kod ženki i kod mužjaka (Slika 17a, $P = 0,156$, dvofaktorska ANOVA), dok je ekspresija Cx-43 nepromenjena (Slika 17b, $p = 0,695$, dvofaktorska ANOVA) u kičmenoj moždini EAE pacova u odnosu na kontrolu.

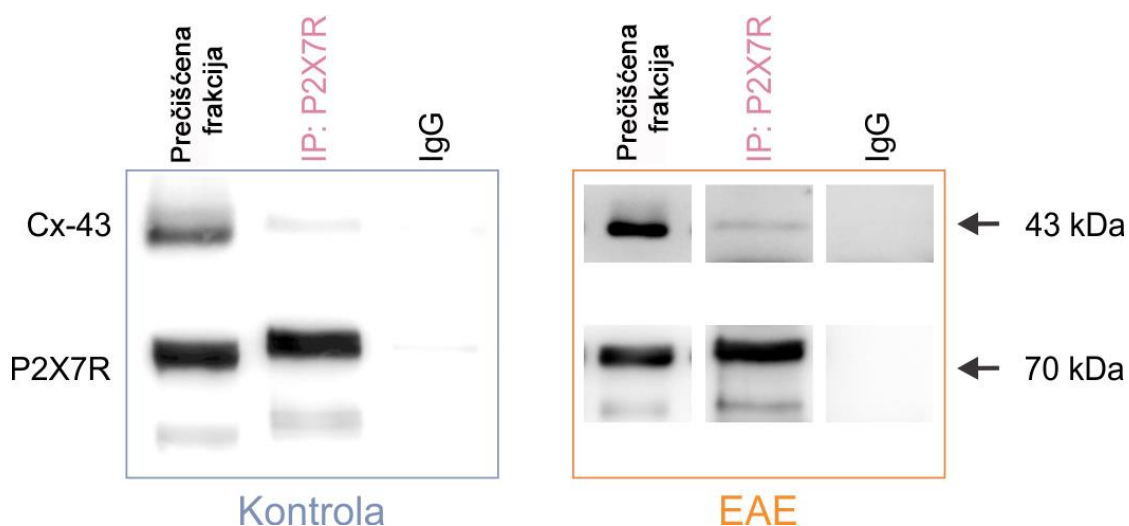
Kako bi se ispitala ekspresija P2X7R i Cx-43 specifično u sivoj i u beloj masi kičmene moždine EAE pacova, imunofluorescentno su obeleženi ovi proteini (Slika 16d, g). Uočeno je značajno smanjenje ekspresije P2X7R u sivoj masi kičmene moždine EAE pacova u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija Cx-43 bila nepromenjena (Slika 16e, f; $P = 0,095$ za P2X7R i $P = 0,974$ za Cx-43, *Mann-Whitney Rank Sum* test). U beloj masi kičmene moždine EAE pacova nije uočena promena ekspresije P2X7R i Cx-43 u odnosu na kontrolu (Slika 16h, i; $P = 0,095$ za P2X7R i $P = 0,974$ za Cx-43, *Mann-Whitney Rank Sum* test). Ovi rezultati pokazuju da je ekspresija P2X7R smanjena u lumbalnom regionu kičmene moždine pre svega u sivoj masi pacova u vrhuncu EAE, dok se ekspresija Cx-43 ne menja.



Slika 17. P2X7R i Cx-43 ekspresija kod EAE ženki i mužjaka. (a, b) Na grafiku je prikazano poređenje ekspresije P2X7R (pod a) i Cx-43 (pod b) u lumbalnom regionu kičmene moždine ženki i mužjaka kontrolnih i EAE pacova (dvofaktorska ANOVA, $p = 0,156$ za P2X7R i $p = 0,695$ za Cx-43). Prikazane su srednje vrednosti \pm SE. Trouglovi predstavljaju vrednosti dobijene za individualne ženke, a kvadrati za mužjake. Broj životinja po grupi je prikazan na grafiku.

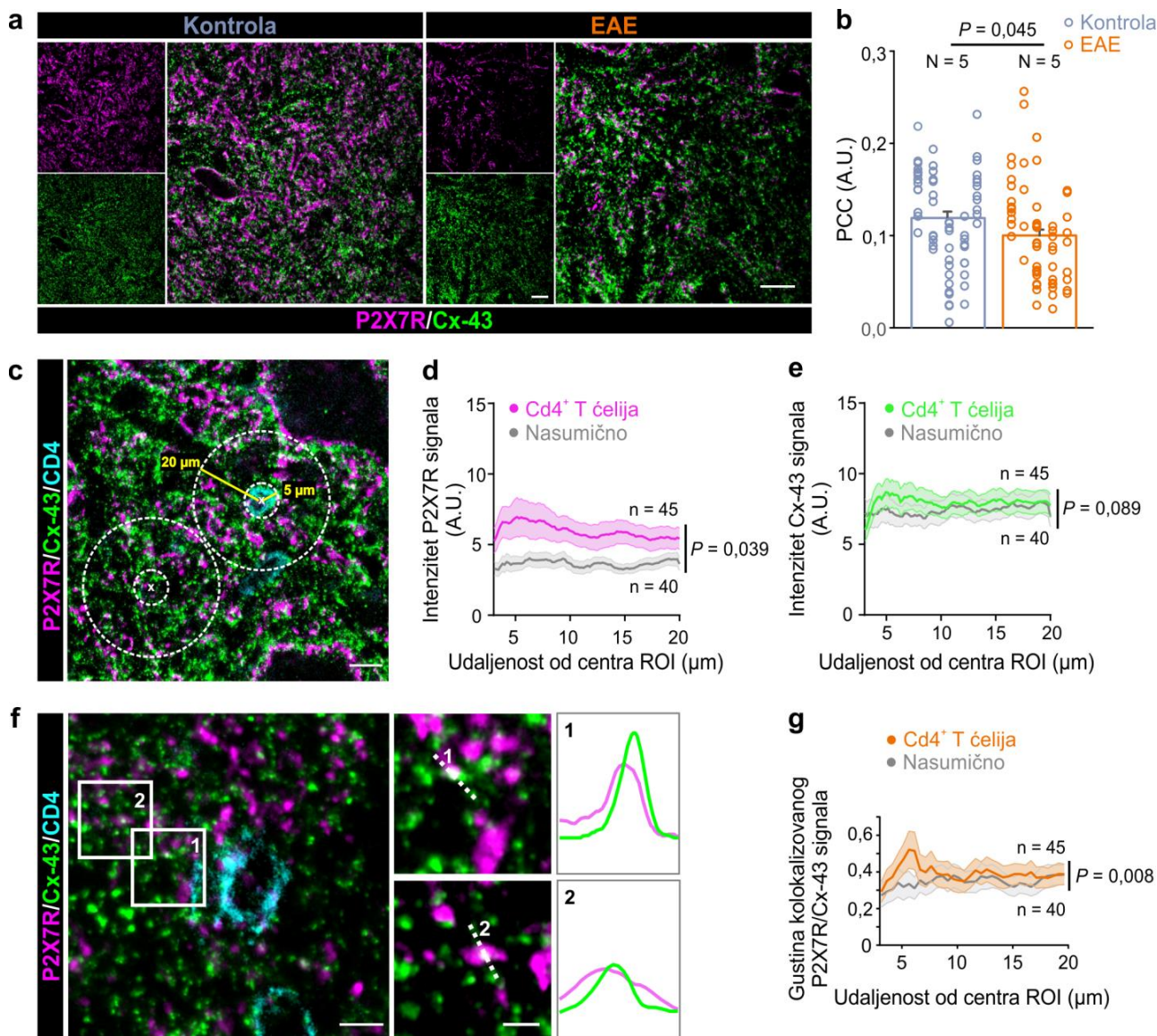
4.2.2. Astrogljalni Cx-43 i P2X7R interaguju i koncentrišu u neposrednoj blizini infiltriranih CD4⁺ ćelija u kičmenoj moždini EAE pacova

U cilju ispitivanja interakcije P2X7R i astrogljalnog Cx-43 u lumbalnom regionu kičmene moždine EAE i kontrolnih pacova, primenjena je ko-immunoprecipitacija uz pomoć magnetnih kuglica koje su obeležene anti-P2X7R antitelom. Na ovaj način su od ukupnih proteina izolovanih iz kičmene moždine izdvojeni proteini koji su u kompleksu sa P2X7R. Primenom Western blota je ispitano prisustvo Cx-43 u ko-immunoprecipitatu sa P2X7R. Signal za Cx-43 je bio prisutan u Prečišćenju frakciji i IP:P2X7R trakama, dok je u traci sa kontrolnim IgG signal bio odsutan (Slika 18), što ukazuje da P2X7R interaguje sa Cx-43. Zatim su imunofluorescentno obeleženi P2X7R i Cx-43 u kičmenoj moždini EAE i kontrolnih pacova i ispitana je kolokalizacija ova dva proteina (Slika 19a). Kvantifikacija kolokalizacije između P2X7R i Cx-43 fluorescentnih signala je pokazala smanjenje PCC u sivoj masi kičmene moždine EAE pacova u poređenju sa kontrolom (Slika 19b, $P = 0,032$, Studentov t test). U beloj masi je takođe uočeno smanjenje PCC u EAE kičmenoj moždini u poređenju sa kontrolom (Slika 20a, b, $P < 0,001$, *Mann-Whitney Rank Sum* test). Opisani rezultati pokazuju postojanje interakcije Cx-43 i P2X7R u lumbalnom regionu kičmene moždine, ali i njihovu smanjenu kolokalizaciju u kičmenoj moždini EAE pacova.

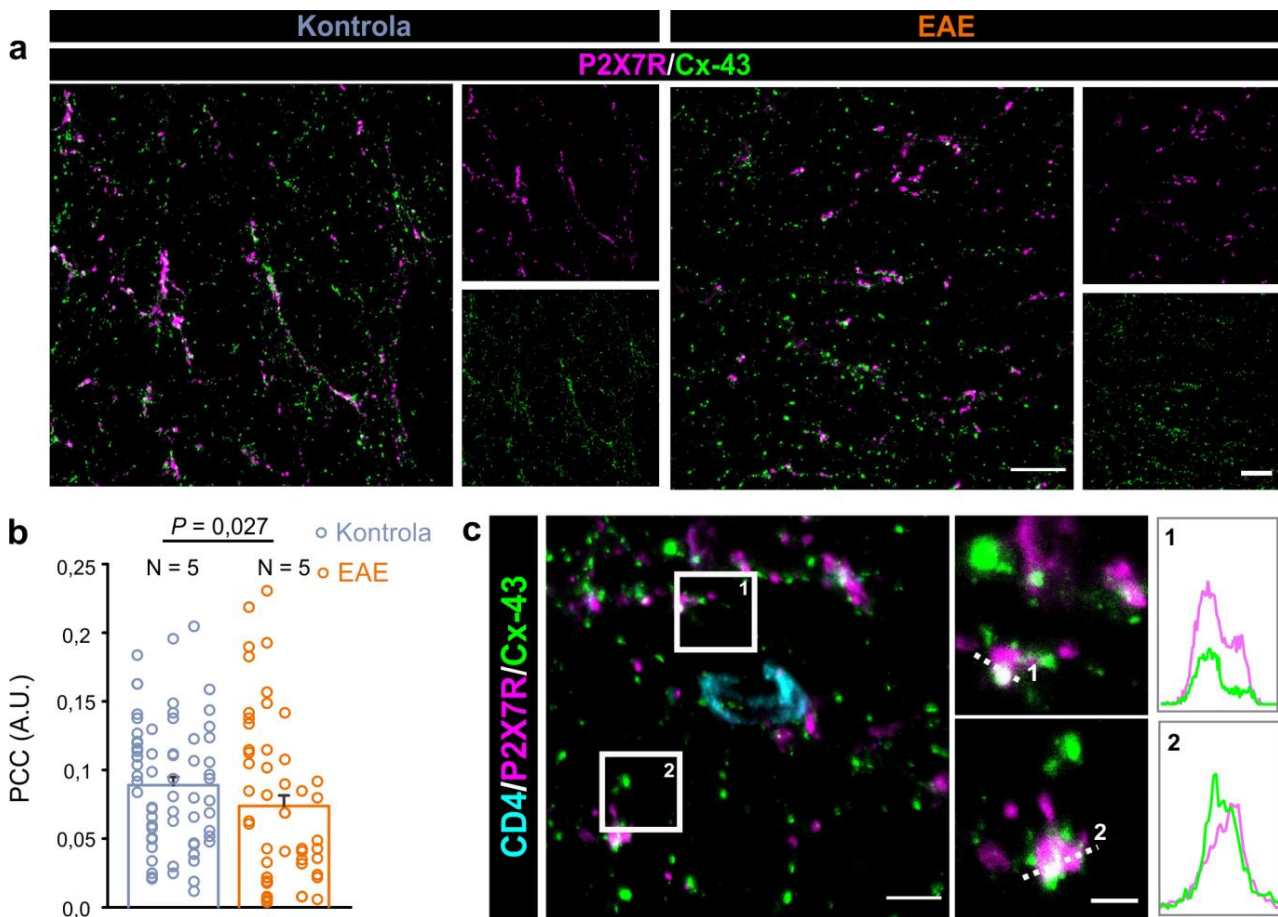


Slika 18. P2X7R interaguje sa astroglijalnim Cx-43 u kičmenoj moždini EAE i kontrolnih pacova. Reprezentativni Western blotovi koji prikazuju da je Cx-43 prisutan u Prečišćenoj frakciji i IP:P2X7R frakciji, ali ne i frakciji kontrolnog IgG u kontroli i EAE. Trake koje odgovaraju P2X7R su prisutne u Prečišćenoj frakciji i IP traci, ali ne u kontrolnoj IgG traci.

CD4⁺ T ćelije se infiltriraju u CNS i kreću kroz parenhim u toku EAE, a na tom putu stupaju u kontakt sa astrocitima (Slika 14). Da bi se utvrdilo da li blizina infiltriranih CD4⁺ T ćelija utiče na zastupljenost P2X7R i Cx-43 u kičmenoj moždini EAE pacova, analizirana je distribucija fluorescentnih signala Cx-43 i P2X7R unutar kruga radijusa 20 μm od centra CD4⁺ T ćelije kao i gustinu njihovog kolokalizovanog signala (Slika 19c). Intenzitet P2X7R fluorescentnog signala je bio povećan u neposrednoj blizini CD4⁺ fluorescentnog signala, sa maksimalnom vrednošću ($6,9 \pm 1,4$ A. U.) na 5,14 μm od centra CD4⁺ T ćelije, što ujedno predstavlja graničnu površinu CD4⁺ T ćelije. Kada je na isti način analizirana distribucija P2X7R fluorescentnog signala od centra nasumično odabranog ROI udaljenog 50 μm od centra CD4⁺ T ćelije, dobijen je značajno smanjen intenzitet P2X7R fluorescentnog signala (Slika 19d), što ukazuje na specifičnu vezu ovog purinskog receptora i pozicije CD4⁺ T ćelije. Distribucija fluorescentnog signala Cx-43 je slična oko infiltriranih CD4⁺ T ćelija i nasumično odabranih ROI (Slika 19e). Maksimalna gustina Cx-43 signala ($8,6 \pm 1,0$ A.U.) je uočena na 5,14 μm , što odgovara graničnoj površini CD4⁺ T ćelije. Šolovom analizom distribucije kolokalizovanih signala Cx-43 i P2X7R unutar kruga radijusa 20 μm od centra CD4⁺ T ćelije u inkrementima od 0,5 μm je pokazano da ova dva signala kolokalizuju u blizini CD4⁺ T ćelije (Slika 19f,g). Uočena je slična povezanost ova dva proteina i u beloj masi kičmene moždine EAE pacova (Slika 20). Pokazano je da je gustina kolokalizovanih P2X7R i Cx-43 signala značajno povećana u okolini infiltriranih CD4⁺ T ćelija u odnosu na nasumično izabran ROI (Slika 19g) i da ima maksimalnu vrednost na udaljenosti od 5,14 μm (kontaktna površina CD4⁺ T ćelije). Ovi podaci ukazuju da su astroglijalni Cx-43 i P2X7R specifično povezani i koncentrisani na kontaktnoj površini CNS-IIC u kičmenoj moždini EAE pacova.



Slika 19. P2X7R kolokalizuje sa astroglijalnim Cx-43 u blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija u sivoj masi kičmene mozđine EAE pacova. (a) Reprerativne konfokalne mikrografije sive mase kičmene mozđine gde su imunohistemijski obeleženi Cx-43 (zeleno) i P2X7R (magenta) u kontrolnom i EAE pacovu. Skala je 20 μm . (b) Na grafiku je prikazano poređenje Pirsonovog koeficijenta korelacije (PCC) između Cx-43 i P2X7R u sivoj masi kičmene mozđine kontrolnog i EAE pacova ($P = 0,045$, Studentov t test). N je broj životinja po grupi. Vertikalni niz krugova prikazuje vrednosti dobijene za individualne životinje, dok same tačke predstavljaju vrednosti pojedinačnih kadrova. (c) Reprerativne konfokalne mikrografije imunobojenja P2X7R (magenta), Cx-43 (zeleno) i CD4⁺ (cijan) sa obeleženim regionima od interesa (ROI) koji odgovaraju CD4⁺ T ćelijama i nasumično odabranim ROI. Žute isprekidane linije obeležavaju radijalnu udaljenost od 5 μm i 20 μm od centra odabranog ROI. Skala je 10 μm . (d) Na grafiku je prikazana radijalna distribucija intenziteta P2X7R fluorescentnog signala u krugu radijusa 20 μm od centra ROI koji odgovara CD4⁺ T ćeliji (magenta) i nasumičnog ROI (siva) ($P = 0,039$, dvofaktorska ANOVA). (e) Na grafiku je prikazana radijalna distribucija intenziteta Cx-43 fluorescentnog signala u radijusu od 20 μm od centra ROI koji odgovara CD4⁺ T ćeliji (zeleno) i nasumičnog ROI (siva) ($P = 0,089$, dvofaktorska ANOVA). (f) Reprerativne konfokalne mikrografije Cx-43 i P2X7R fluorescentnih signala u blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija u sivoj masi kičmene mozđine EAE pacova. Skala je 5 μm . Pravougaonici obeleženi brojevima odgovaraju uveličanim regionima prikazanim sa desne strane. Skala je 2 μm . Linijski profili Cx-43 i P2X7R fluorescentnih signala su mereni duž isprekidane bele linije. (g) Na grafiku je prikazana gustina kolokalizovanog signala P2X7R sa Cx-43 u radijusu 20 μm od centra CD4⁺ T ćelije (narandžasta) i nasumičnog ROI (siva) ($P = 0,008$, dvofaktorska ANOVA). n je broj analiziranih ROI. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE.



Slika 20. P2X7R kolokalizuje sa Cx-43 u beloj masi kičmene moždine EAE pacova. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije bele mase kičmene moždine kontrolnih i EAE pacova gde su fluorescentno obeleženi Cx-43 (zeleno) i P2X7R (magenta). Skala je 20 μm . (b) Na grafiku je prikazano poređenje kolokalizacije P2X7R i Cx-43 fluorescentnog signala u beloj masi kičmene moždine kontrolnih i EAE pacova ($P < 0,001$, *Mann Whitney Rank Sum* test). N je broj životinja po grupi. Svaki vertikalni niz krugova prikazuje vrednosti dobijene za individualne životinje, dok krugovi predstavljaju vrednosti pojedinačnih kadrova. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE. (c) Konfokalne mikrografije Cx-43 (zeleno) i P2X7R (magenta) fluorescentnog signala u blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija (cijan) u beloj masi kičmene moždine EAE pacova. Skala je 5 μm . U sredini su prikazani uveličani regioni obeleženi belim kvadratima na mikrografiji levo. Skala je 2 μm . Linijski profili Cx-43 i P2X7R fluorescentnih signala izmereni u okviru izdvojenih regiona u sredini.

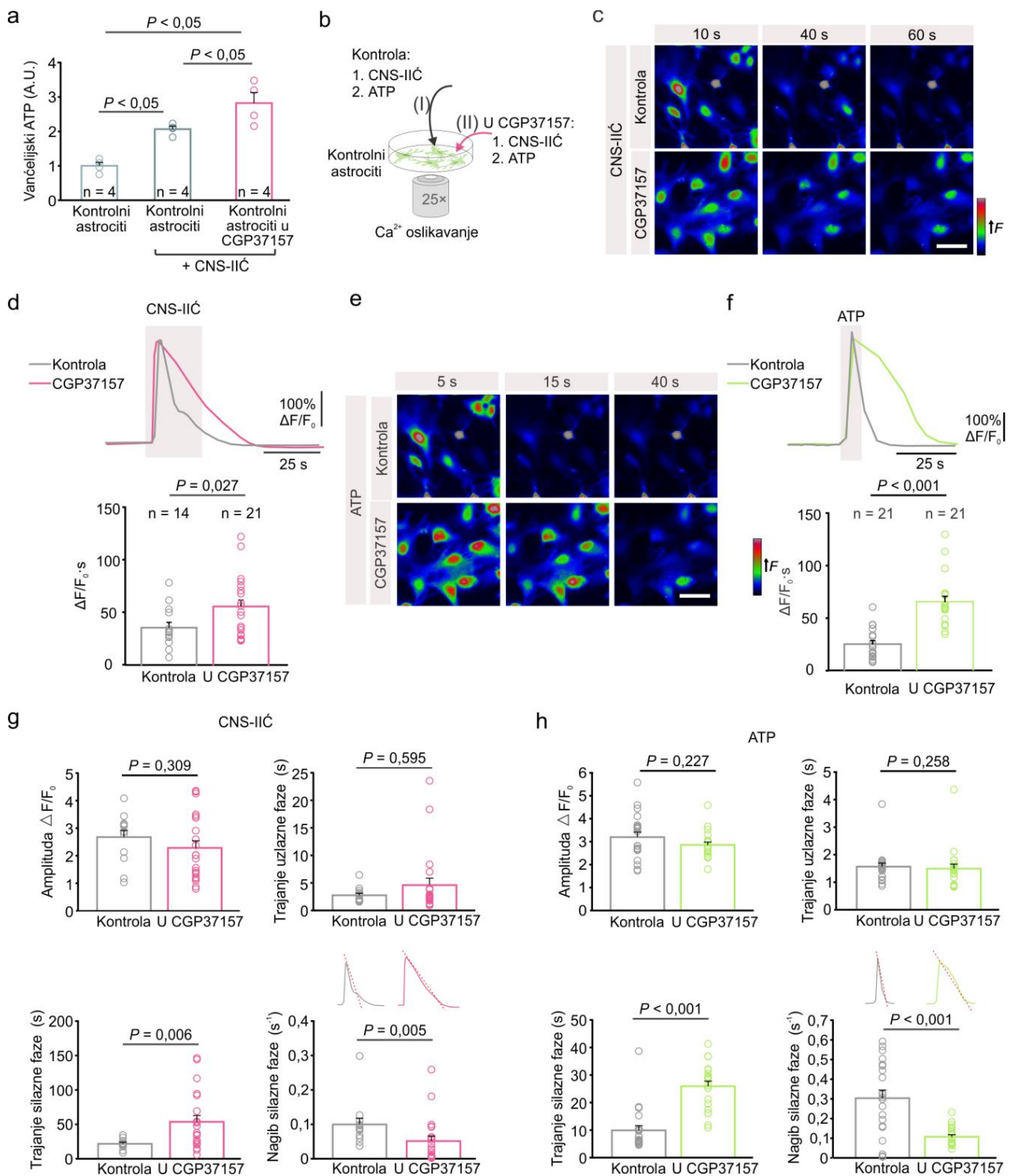
4.2.3. Mitohondrije su uključene u direktnu interakciju između astrocita i CNS-IIC

Da bi se ispitalo kako mitohondrije doprinose Ca²⁺ odgovoru astrocita u toku interakcije sa CNS-IIC blokiran je NCLX koji kontroliše efluks i mHCX koji kontroliše influks Ca²⁺ (Gunter et al., 2000; Santo-Domingo and Demareux, 2010) upotrebom selektivnog blokatora CGP37157 (20 μm , Slika 21a). Upotrebom luciferin-luciferaza hemiluminiscentnog bioeseja ispitana je količina vanćelijskog ATP koje astrociti oslobađaju u prisustvu CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon tretmana CGP37157. Aplikacija CNS-IIC je izazvala značajan porast vanćelijske koncentracije ATP u poređenju sa kontrolnim astrocitima (Slika 21a). Nakon blokade mitohondrijalnih Ca²⁺ izmenjivača u astrocitima, povećanje vanćelijske koncentracije ATP nakon dodavanja CNS-IIC je bilo izraženije (Slika 21a, $P < 0,001$, jednofaktorska ANOVA; $P = 0,0217$ za CNS-IIC vs CGP37157 + CNS IIC, Holm-Sidak test). U cilju nedvosmislenog ispitivanja prirode ove međucelijske interakcije, primenili smo *in vitro* eksperimentalni sistem za praćenje Ca²⁺ odgovora astrocita koji je prethodno opisan (Slika 21b). Površina Ca²⁺ odgovora nakon izlaganja astrocita CNS-IIC je bila značajno veća u uslovima kada su blokirani astrogljalni NCLX i mHCX u odnosu

na kontrolne uslove (Slika 21c, d). Površina Ca^{2+} odgovora astrocita koji su tretirani CGP37157 je bila 57% veća u odnosu na kontrolne uslove, što je pokazatelj doprinosa mitohondrija u regulaciji astrocitnog Ca^{2+} odgovora na prisustvo CNS-IIC (Slika 21d). Površina Ca^{2+} odgovora astrocita nakon stimulacije ATP u uslovima kada su blokirani NCLX i mHCX je takođe bila veća u odnosu na kontrolne uslove (Slika 21e, f), što dodatno podržava zaključak da je sposobnost mitohondrija da regulišu unutarćelijsku koncentraciju Ca^{2+} izmenjena nakon blokiranja ova dva izmenjivača. Blokiranje NCLX i mHCX je dovelo do promena u trajanju i nagibu silazne faze astroglijalnog Ca^{2+} odgovora nakon izlaganja CNS-IIC ili ATP, dok su trajanje i nagib uzlazne faze odgovora ostali nepromenjeni (Slika 21g). Citoplazmatski efluks Ca^{2+} u uslovima sa CGP37157, izračunat iz nagiba silazne faze (Slika 21h), je bio redukovano za 52% nakon izlaganja CNS-IIC, odnosno za 65% nakon izlaganja ATP u odnosu na stopu u kontrolnim uslovima bez blokatora. Prikazani podaci ukazuju da mitohondrije imaju aktivnu ulogu u oblikovanju astroglijalnog Ca^{2+} odgovora nakon direktne interakcije astrocita sa CNS-IIC, kao i da je aktivnost NCLX i mHCX važna za završetak astroglijalnog Ca^{2+} odgovora koji je izazvan prisustvom imunskih ćelija.

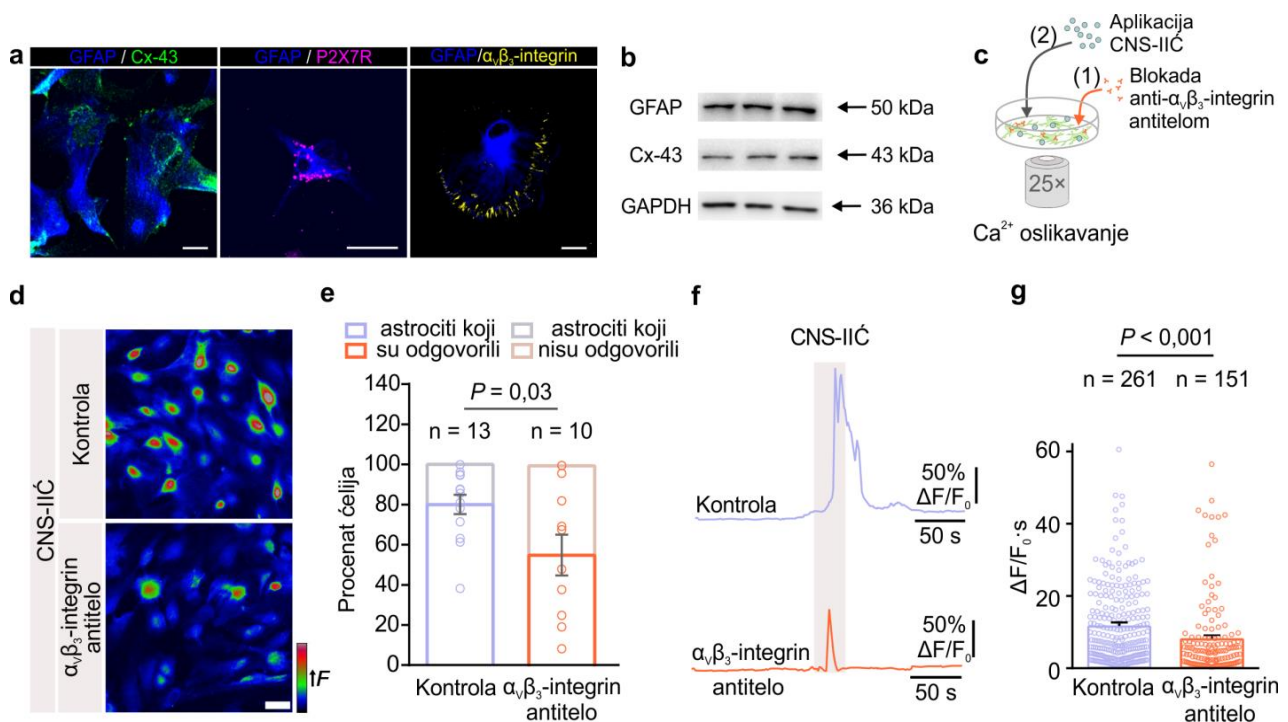
4.2.4. $\alpha_v\beta_3$ -integin je neophodan za direktnu interakciju astrocita sa CNS-IIC i nizvodnu signalizaciju u astrocitima

Integrini su transmembranski proteini sačinjeni od α i β subjedinice, a zaduženi su za međućelijsku komunikaciju i interakciju (Slack et al., 2022). Stoga je ispitana njihova uloga u ostvarivanju ćelija-ćelija interakcije između astrocita i CNS-IIC. Poznato je da mnogi integrini pokazuju povećanu ekspresiju u MS, a inhibitori integrina se uspešno primenjuju kao terapija za ovu bolest (Archelos et al., 1999; Slack et al., 2022). Integrine eksprimiraju i astrociti i imunske ćelije, što ukazuje da mogu biti medijatori njihove interakcije. Poznato je da $\alpha_v\beta_3$ -integin ima ulogu u aktivaciji P2X7R preko oslobađanja ATP kroz hemikanale (Alvarez et al., 2016; Henríquez et al., 2011), zbog čega je ispitan doprinos ovog integrina u interakciji astrocita sa CNS-IIC. Imunocitohemijskim obeležavanjem $\alpha_v\beta_3$ -integrina i GFAP je potvrđena ekspresija ovog integrina u primarnoj kulturi astrocita (Slika 22a). Potvrđena je i ekspresija Cx-43 i P2X7R u astrocitima u kulturi (Slika 22a, b). Ispitano je da li se menja Ca^{2+} odgovor astrocita na aplikaciju CNS-IIC nakon blokiranja $\alpha_v\beta_3$ -integrina na astrocitima upotrebom odgovarajućeg primarnog antitela (1 $\mu\text{g/ml}$) (Slika 22c). Blokada ovog integrina na astrocitima je dovela do smanjenja Ca^{2+} odgovora u kontaktu sa CNS-IIC (Slika 22d, f, g), kao i ukupnog broja astrocita koji su odreagovali (Slika 22e). U kontrolnim uslovima je odreagovalo $80 \pm 7\%$, dok je u prisustvu blokatora odgovorilo $56 \pm 15\%$ (Slika 22e, $P < 0,001$, Studentov t test). Ovaj rezultat ukazuje da astroglijalni $\alpha_v\beta_3$ -integin deluje uzvodno od P2X7R i uključen je u prve korake ostvarivanja direktne interakcije između astrocita i CNS-IIC.



Slika 21. Interakcija između astrocита poreklom iz kičmene moždine i CNS-IIC zavisi od ATP i mitohondrija. (a) Na grafiku su prikazane vrednosti dobijene merenjem oslobođenog ATP iz astrocита u kontrolnim uslovima, astrocита nakon inkubiranja sa CNS-IIC i astrocита tretiranih CGP37157, a potom inkubiranih sa CNS-IIC iz 4 nezavisna eksperimenta (n = 4) ($P < 0,001$, jednofaktorska ANOVA; $P < 0,05$ za Astroцити vs Astroцити + CGP37157+CNS-IIC, $p < 0,05$ za Astroцит + CNS-IIC vs Astroцит + CGP37157+CNS-IIC, *Student Newman Keuls* test), N = 3 EAE pacova. (b) Na shemi je prikazan eksperimentalni pristup praćenja unutarčeljskog Ca²⁺ u astroцитima u toku aplikacije najpre CNS-IIC (1) a potom ATP-a (2) u kontrolnim uslovima (I) i u prisustvu 20 μ M CGP37157 (II). (c) Reprеzentativne mikrografije astrocита obeleženih Fluo-4 Ca²⁺ indikatorom u toku aplikacije CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon tretmana CGP37157. Skala je 50 μ m. (d) (Gore) Primeri zapisa povećanja unutarčeljskog Ca²⁺ u astroцитima nakon apliciranja CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon primene CGP37157. Sivi pravougaonik obeležava interval aplikacije CNS-IIC. (Dole) Na grafiku je prikazana razlika u površini Ca²⁺ odgovora astrocита

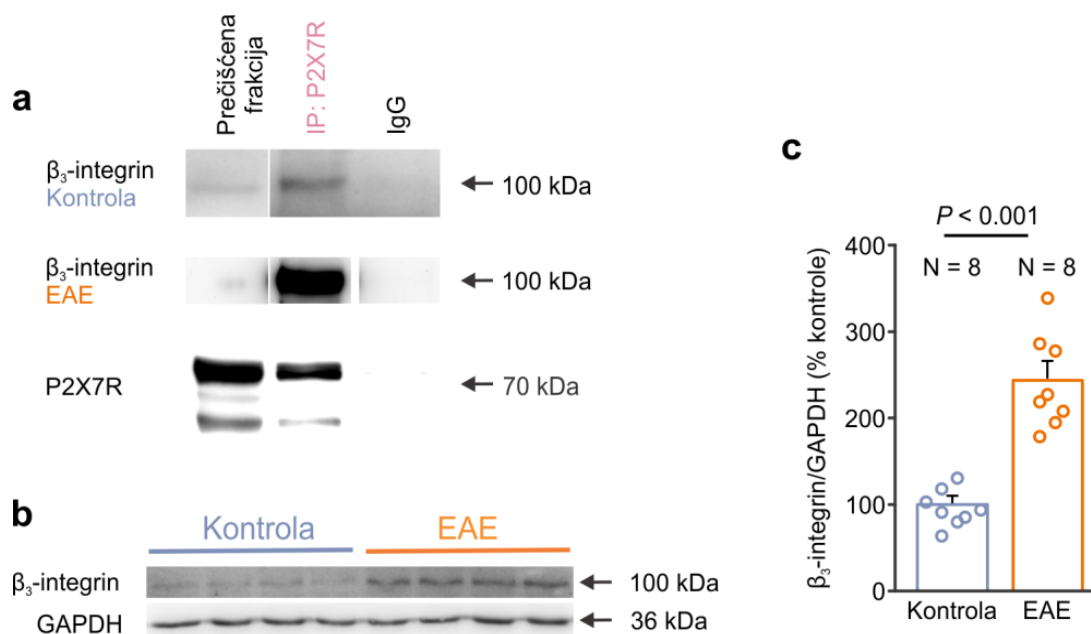
nakon CNS-IIC u kontrolnim uslovima i pri pretretmanu CGP37157 ($P = 0,027$, *Mann Whitney Rank Sum test*). n je broj analiziranih ćelija iz tri nezavisna eksperimenta. $N = 3$ EAE pacova. **(e)** Reprezentativne mikrografije astrocита obeleženih Fluo-4 u toku aplikacije ATP u kontrolnim uslovima i nakon tretmana CGP37157. Skala je $50 \mu\text{m}$. **(f)** (Gore) Reprezentativni zapisi koji prikazuju Ca^{2+} odgovor astrocита izazvan dodavanjem ATP u kontrolnim uslovima i u prisustvu CGP37157. (Dole) Na grafiku je prikazano poređenje astrogljalnog Ca^{2+} odgovora na ATP u kontrolnim uslovima i nakon blokade astrocитnih NCLX i mHCX ($P < 0,001$, *Mann Whitney Rank Sum test*) iz 3 nezavisna eksperimenta. **(g)** Na graficima su prikazani amplituda, trajanje uzlazne faze, trajanje silazne faze i nagib silazne faze astrogljalnog Ca^{2+} odgovora nakon aplikacije CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon tretmana CGP37157 ($P = 0,595$ za trajanje uzlazne faze, $P = 0,006$ za trajanje silazne faze, $P = 0,005$ za nagib silazne faze, *Mann Whitney Rank Sum test*; $P = 0,309$ za amplitudu, Studentov t test). **(h)** Na graficima su prikazani amplituda, trajanje uzlazne faze, trajanje silazne faze i nagib silazne faze astrogljalnog Ca^{2+} odgovora u nakon aplikacije ATP u kontrolnim uslovima i nakon tretmana CGP37157 ($P = 0,227$ za amplitudu, $P = 0,258$ za trajanje uzlazne faze, $P < 0,001$ za trajanje silazne faze, $P < 0,001$ za nagib silazne faze, *Mann Whitney Rank Sum test*). Na graficima su prikazane srednje vrednosti \pm SE. Prazni krugovi predstavljaju odgovor pojedinačnih ćelija.



Slika 22. $\alpha_v\beta_3$ -integin ekspresiran na astrocیتima posreduje u njihovoj direktnoj interakciji sa CNS-IIC i nizvodnoj kalcijumskoj signalizaciji. **(a)** Reprezentativne konfokalne mikrografije GFAP^+ astrocита koji ekspresiraju Cx-43 (zeleni), P2X7R (magenta) i $\alpha_v\beta_3$ -integin (žuti). Skala je $20 \mu\text{m}$. **(b)** Reprezentativni Western blotovi koji pokazuju ekspresiju Cx-43 i GFAP u primarnoj kulturi astrocита izolovanih iz kičmene moždine. GAPDH je korišćen kao kontrola nalivanja uzoraka. **(c)** Na shemi je prikazan eksperimentalni dizajn praćenja unutarćelijskog Ca^{2+} u astrocیتima pri kontaktu sa CNS-IIC u kontrolnim uslovima i kada su blokirani $\alpha_v\beta_3$ -integriini. **(d)** Primer mikrografije astrocита obeleženih Fluo-4 Ca^{2+} indikatorom u toku aplikacije CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon blokade astrogljalnog $\alpha_v\beta_3$ -integrina. Skala je $50 \mu\text{m}$. **(e)** Na grafiku je prikazan procenat astrocита koji su odgovorili kao i onih koji nisu odgovorili na prisustvo CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon blokiranja $\alpha_v\beta_3$ -integrina ($P = 0,03$, Studentov t test). Prazni krugovi predstavljaju procenat ćelija koje su odgovorile u pojedinačnim eksperimentima. **(f)** Reprezentativni zapisi promene unutarćelijskog Ca^{2+} nakon primene CNS-IIC u kontrolnim uslovima i nakon blokiranja integrina. Sivi pravougaonik označava interval aplikacije CNS-IIC. **(g)** Na grafiku je prikazana razlika u porastu Ca^{2+} u eksperimentu prikazanom pod f ($P < 0,001$, *Mann Whitney Rank Sum test*). Prazni krugovi predstavljaju odgovor pojedinačnih astrocита. n je broj astrocита koji su odgovorili u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE iz 13 ili 10 nezavisnih eksperimenata u kontrolnim uslovima ili nakon blokiranja $\alpha_v\beta_3$ -integrina. $N = 5$ EAE pacova.

4.2.5. β_3 -integrin interaguje sa P2X7R i pokazuje povećanu ekspresiju u EAE

Imajući u vidu prethodno opisane rezultate ispitano je postojanje interakcije β_3 -integrina i P2X7R u tkivu CNS. U tu svrhu je primenom ko-imunoprecipitacije izolovan P2X7R sa asociiranim proteinima iz homogenata lumbalnog regiona kičmene moždine EAE i zdravih kontrolnih pacova. Ustanovljeno je prisustvo β_3 -integrina u ko-imunoprecipitatu sa P2X7R (IP:P2X7R) i ukupnoj prečišćenoj proteinskoj frakciji (Prečišćena frakcija), dok je signal u traci koja je negativna kontrola (IgG) bio odsutan (Slika 23a). Ispitivanjem nivoa proteinske ekspresije u homogenatu lumbalnog regiona kičmene moždine zdrave kontrole i EAE pacova, pokazali smo da je ekspresija β_3 -integrina značajno povećana u EAE (Slika 23b, c, $P < 0,001$, Studentov t test). Dobijeni rezultati ukazuju da β_3 -integrin interaguje sa P2X7R i u EAE i u kontrolnom tkivu kičmene moždine, što pruža dodatnu podršku za uočeni fenomen funkcionalne sprege ova dva proteina u kulturi astrocita. Analiza proteinske ekspresije takođe ukazuje da je β_3 -integrin povezan sa patološkim procesima u EAE.

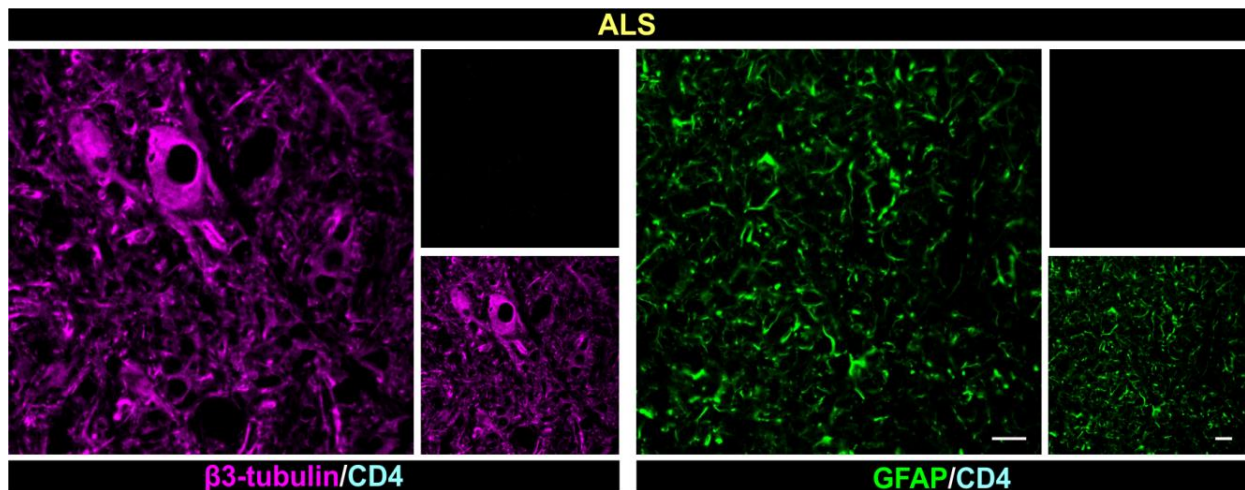


Slika 23. β_3 -integrin interaguje sa P2X7R i pokazuje povećanu ekspresiju u kičmenoj moždini EAE pacova. (a) Reprezentativni Western blotovi prikazuju prisustvo β_3 -integrina u ko-imunoprecipitatu sa P2X7R u Prečišćenoj frakciji i IP:P2X7R, ali ne u IgG traci. (b) Reprezentativni Western blotovi prikazuju povećanu ekspresiju β_3 -integrina u lumbalnom regionu kičmene moždine kontrolnih i EAE pacova. GAPDH je korišćen kao kontrola nalivanja. (c) Na grafiku su prikazani nivoi proteinske ekspresije β_3 -integrina u lumbalnom regionu kičmene moždine zdrave kontrole (N = 8) i EAE pacova (N = 8) ($P < 0,001$, Studentov t test). Prazni krugovi predstavljaju vrednosti dobijene za pojedinačne životinje. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE.

4.3. Upotreba primarne kulture astrocita i mikroglije u ispitivanju glijalne interakcije sa imunskim faktorima u ALS

4.3.1. U kičmenoj moždini ALS hSOD1^{G93A} pacova nisu detektovene CD4⁺ T ćelije

Kako bi se ispitalo da li postoje infiltrati imunskih ćelija u kičmenoj moždini ALS tkiva, imunohistohemijski smo obeležili GFAP (marker astrocita), β_3 -tubulin (marker neurona) i CD4 (marker T ćelija) u kičmenoj moždini hSOD1^{G93A} pacova u kasnom stadijumu bolesti. Analizirano je po 3 preseka iz 2 ALS životinje i nije potvrđeno postojanje infiltriranih CD4⁺ T ćelija u kičmenoj moždini ALS pacova (Slika 24).

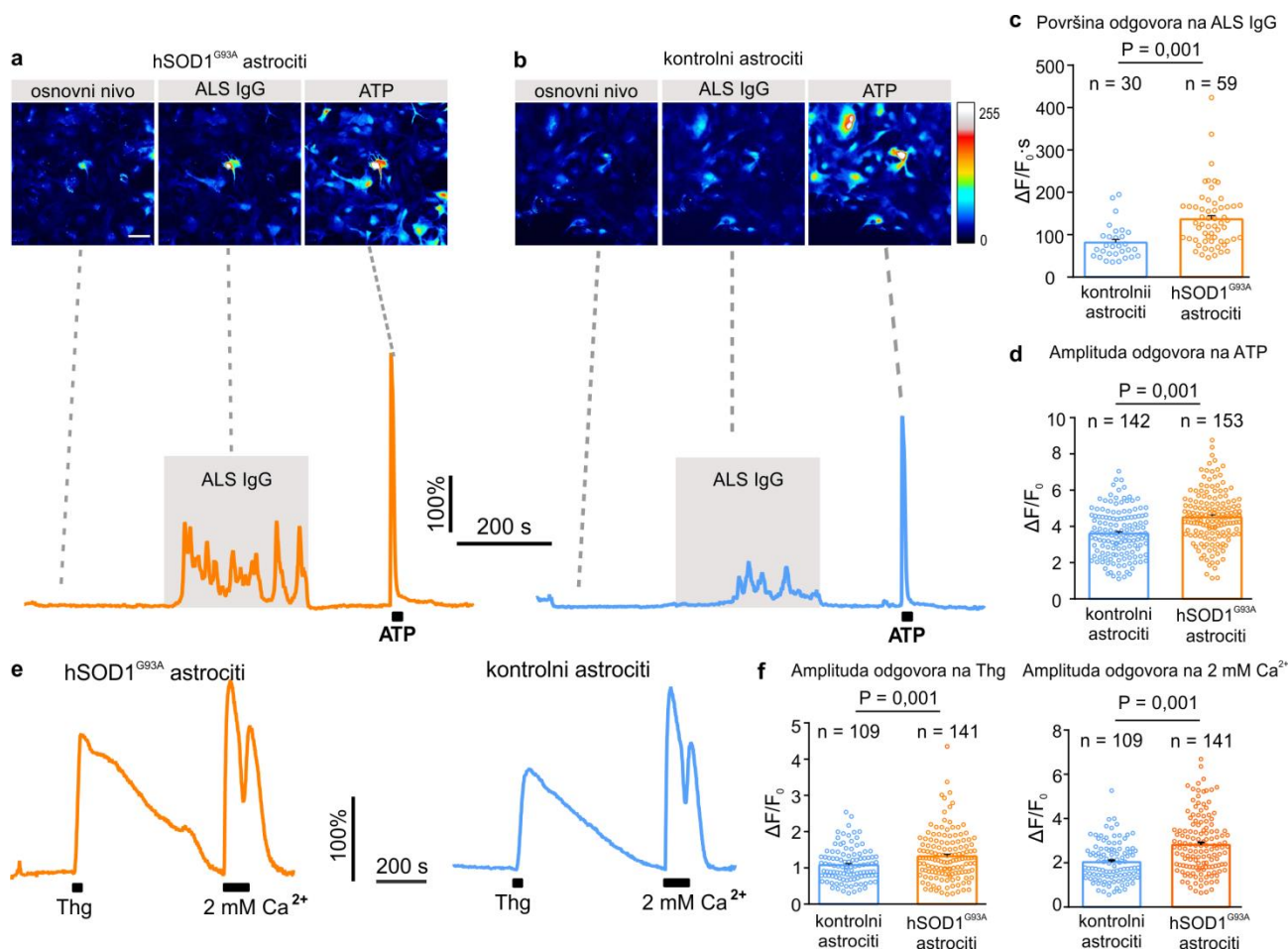


Slika 24. U kičmenoj moždini hSOD1^{G93A} pacova nisu uočene infiltrirane CD4⁺ T ćelije. (Levo) Reprezentativna konfokalna mikrografija preseka kičmene moždine hSOD1^{G93A} pacova gde su fluorescentno obeleženi β3-tubulin (magenta; marker neruona) i CD4 (cijan). (Desno) Reprezentativna konfokalna mikrografija preseka kičmene moždine hSOD1^{G93A} pacova gde su fluorescentno obeleženi GFAP (zeleni; marker astrocita) i CD4 (cijan). Skala je 20 μm.

4.3.2. Povećan Ca²⁺ odgovor hSOD1^{G93A} astrocita na ALS IgG je usled izmenjenog mehanizma regulacije unutarćelijskog Ca²⁺

IgG izolovani iz seruma pacijenata sa dijagnostikovanim ALS (ALS IgG) utiču na mobilizaciju Ca²⁺ iz vanćelijske sredine i unutarćelijskih depoa u citoplazmu i povećanu pokretljivost kiselih vezikula u astrocitima divljeg soja u *in vitro* uslovima (Milošević et al., 2013; Stenovec et al., 2011). Cilj ovog rada je bio ispitati da li postoje razlike u Ca²⁺ tranzijentima u hSOD1^{G93A} i kontrolnim astrocitima nakon izlaganja ALS IgG u *in vitro* eksperimentalnom sistemu kakav je korišćen za ispitivanje interakcije astrocita i CNS-IIC (Slika 9a). Aplikacija 100 μg/ml ALS IgG je izazvala Ca²⁺ odgovor i hSOD1^{G93A} i kontrolnih astrocita (Slika 25a, b sivi pravougaonik). Analiza promene površine odgovora je pokazala da je Ca²⁺ odgovor hSOD1^{G93A} astrocita na aplicirani ALS IgG bio veći za 67% u odnosu na odgovor kontrolnih astrocita (Slika 25c). U cilju ispitivanja postojanja razlike u aktivnosti hSOD1^{G93A} i kontrolnih astrocita upoređen je njihov odgovor na 100 μM ATP. Poređenjem Ca²⁺ odgovora na ATP je utvrđeno da hSOD1^{G93A} astrociti pokazuju Ca²⁺ odgovor koji je za 25% veće amplitude u odnosu na Ca²⁺ odgovor kontrolnih astrocita (Slika 25d).

Da bi se ispitao uzrok razlika u Ca²⁺ odgovoru hSOD1^{G93A} i kontrolnih astrocita, primenjen je 1 μM Thg koji je neselektivni inhibitor SERCA pumpe (Treiman et al., 1998) u trajanju od 600 s, što je dovelo do pojave Ca²⁺ tranzijenta (Slika 25e). Zatim su astrociti perfundovani ECS sa Ca²⁺ kako bi se izazvalo punjenje depoa posredstvom SOCE mehanizma (Pick et al., 2023). Na osnovu toga da je amplituda Ca²⁺ odgovora na ATP hSOD1^{G93A} astrocita 25% u odnosu na kontrolne (Slika 25d) i da je amplituda Ca²⁺ odgovora hSOD1^{G93A} astrocita na Thg 22% veća u odnosu na kontrolne (Slika 25e, f) utvrđeno je da hSOD1^{G93A} astrociti inicijalno imaju više Ca²⁺ u ER u odnosu na kontrolne astrocite (Slika 25d, e). Amplituda Ca²⁺ odgovora hSOD1^{G93A} astrocita na vanćelijski rastvor sa 2 mM Ca²⁺ je bila 35% veća u odnosu na kontrolne (Slika 25e, f). Uočena razlika u promeni unutarćelijskog Ca²⁺ nakon prelaska na ECS sa 2 mM Ca²⁺ ukazuje na izmenjen mehanizam punjenja depoa kod hSOD1^{G93A} astrocita u odnosu na kontrolne. Iz navedenog se može pretpostaviti da hSOD1^{G93A} astrociti pokazuju povećan Ca²⁺ odgovor na ALS IgG i ATP u odnosu na kontrolne astrocite usled povećanog kapaciteta ER da skladišti Ca²⁺.



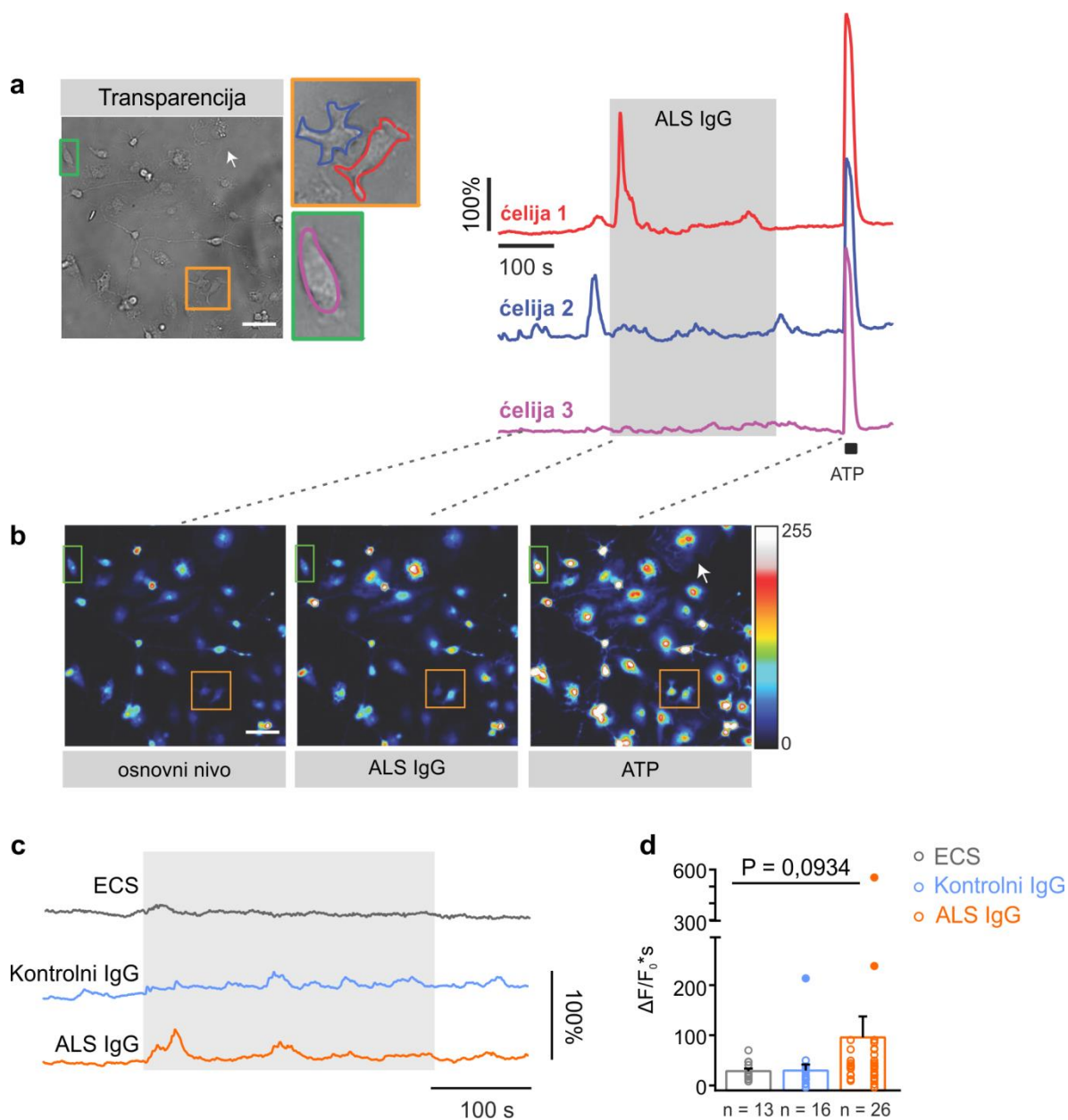
Slika 25. hSOD1^{G93A} astrociti pokazuju izmenjen Ca²⁺ odgovor na ALS IgG (a, b) (Gore) Primer mikrografije hSOD1^{G93A} (levo) i kontrolnih astrocita (desno) astrocita obeleženih Fluo-4 Ca²⁺ indikatorom u toku aplikacije ALS IgG i ATP. (Dole) Reprezentativni zapis Ca²⁺ odgovora hSOD1^{G93A} (levo) i kontrolnih astrocita (desno). Isprekidanim linijama su obeležene vremenske tačke na zapisu u kojima su izdvojene mikrografije na slikama iznad. (c) Na grafiku je prikazano poređenje površine Ca²⁺ odgovora izazvanog ALS IgG u hSOD1G93A astrocitima u odnosu na kontrolne (P < 0,001, Mann Whitney rank sum test). (d) Na grafiku je prikazano poređenje amplitude Ca²⁺ odgovora izazvanog 100 μM ATP u hSOD1^{G93A} astrocitima u odnosu na kontrolne (P < 0,001, Mann Whitney Rank Sum test). (e) Reprezentativni zapis Ca²⁺ odgovora u rastvoru bez Ca²⁺ nakon blokade SERCA pumpe neselektivnim blokatorom 1 μM Thg i primene ECS sa 2 mM Ca²⁺ u slučaju hSOD1^{G93A} (levo) i kontrolnih astrocita (desno). (f) Na grafiku levo je prikazano poređenje amplitude Ca²⁺ odgovora nakon primene 1 μM Thg kod hSOD1^{G93A} i kontrolnih astrocita (P < 0,001, Mann Whitney Rank Sum test). Na grafiku desno je prikazano poređenje amplitude Ca²⁺ odgovora nakon primene ECS sa 2 mM Ca²⁺ kod hSOD1^{G93A} i kontrolnih astrocita (P < 0,001, Mann Whitney Rank Sum test). Prikazane su srednje vrednosti ± SE, n je broj analiziranih astrocita.

4.3.3. Mikroglia ne pokazuje promene u Ca²⁺ odgovoru nakon izlaganja ALS IgG

U prethodnoj studiji je utvrđeno da mikroglia akutno reaguje povećanjem citosolne pH vrednosti i povećanjem proizvodnje H₂O₂ na 33% testiranih uzoraka ALS IgG poreklom iz različitih pacijenata (Milošević et al., 2017). Da bi se ispitalo da li ALS IgG izaziva Ca²⁺ odgovor kontrolne mikroglije u kulturi, primenjen je prethodno opisan protokol (Slika 9a). U kulturi mikroglije su bili prisutni i astrociti koji su se jasno morfološki razlikovali kao veće ćelije poligonalnog oblika, dok su ćelije mikroglije bile manjeg ćelijskog tela nepravilnog oblika (Slika 26a). Za razliku od astrocita, većina ćelija mikroglije nije odgovorila na ALS IgG, Ca²⁺ tranzijenti su registrovani u nekoliko ćelija (Slika 26a i d), dok su na ATP reagovali na sličan način kao astrociti (Slika 26a).

U ćelijama mikroglije su uočeni sporadični Ca²⁺ tranzijenti koji nisu bili posledica delovanja ALS IgG, primer takve ćelije je prikazan na Slici 26a, ćelija 2. Testirana su dva ALS IgG poreklom

iz seruma pacijenata sa sporadičnom formom bolesti. Pored ALS IgG, Ca^{2+} odgovor mikroglije je praćen nakon aplikacije kontrolnog IgG (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, izolovan iz seruma zdrave osobe), kao i nakon aplikacije ECS (Slika 26c). Analizom površine Ca^{2+} odgovora nakon aplikacije ALS IgG, kontrolnog IgG i ECS nije utvrđena statistički značajna razlika, iako je Ca^{2+} odgovor detektovan u dve ćelije (od 13 analiziranih) u tretmanu kontrolnim IgG i u 3 ćelije (od 26 analiziranih) tretiranih ALS IgG (Slika 26d). Ovaj rezultat ukazuje da ALS IgG ne dovodi do Ca^{2+} odgovora mikroglije u kulturi.



Slika 26. ALS IgG ne utiču na dinamiku Ca^{2+} u mikrogliji u kulturi. (a) (Levo) Mikrografija mikroglije u kulturi. Astroцитi su takođe prisutni u kulturi, prepoznaju se kao veće ćelije poligonalnog oblika (obeleženo strelicom). (Sredina) Uveličani žuti i zeleni pravougaonici prikazani levo. Crvena, plava i ljubičasta linija uokviruju analizirane ROI koji odgovaraju ćelijama mikroglije. (Desno) Zapisi Ca^{2+} aktivnosti 3 ćelije mikroglije prikazane na panelu u sredini. Boja zapisa odgovara boji linije odgovarajućeg ROI. Sivi pravougaonik predstavlja interval aplikacije ALS IgG. Crni pravougaonik obeležava trenutak aplikacije ATP. (b) Reprezentativne mikrografije koje prikazuju intenzitet fluorescentnog Fluo-4 signala mikroglije u toku registrovanja bazne linije, odgovora na ALS IgG i ATP, gde isprekidane linije obeležavaju specifične trenutke na prikazanom Ca^{2+} zapisu (a, desni panel). Zeleni i narandžasti pravougaonici obeležavaju mikrogliju. (c) Reprezentativni zapisi Ca^{2+} aktivnosti ćelija mikroglije nakon aplikacije samo ECS,

kontrolnog IgG (100 µg/ml) i ALS IgG (100 µg/ml). **(d)** Na grafiku je prikazana razlika u površini Ca²⁺ odgovora mikroglije u eksperimentu prikazanom pod c (P = 0,0934, jednofaktorska ANOVA). Vertikalni niz krugova predstavljaju odgovor na pojedinačni ALS IgG, kontrolni IgG i ECS. Krugovi predstavljaju odgovor pojedinačnih ćelija. n je broj analiziranih ćelija. Prikazane su srednje vrednosti ± SE.

5. Diskusija

U toku neuroinflamacije koja odlikuje MS, interakcija infiltriranih autoreaktivnih imunskih ćelija sa drugim ćelijama CNS stvara inflamatornu sredinu koja vodi demijelinizaciji i čini neurone podložne degeneraciji. Poznato je da imunske ćelije interaguju sa glijalnim ćelijama, uključujući astrocite (Kang et al., 2010; Mayo et al., 2014, 2016), mikrogliju (Carson, 2002; Heppner et al., 2005) i OPC (Kirby et al., 2019). Sa druge strane, astrociti istovremeno interaguju sa mikroglijom i OPC u MS, na taj način promovisu ili inhibiraju remijelinizaciju (Kirby et al., 2019) i izazivaju smrt neurona (Liddel and Barres, 2017). Upravo ovako kompleksne interakcije astrocita sa brojnim ćelijskim tipovima u CNS otežavaju ispitivanje konkretnih efekata interakcije astrocita i infiltriranih autoreaktivnih ćelija na same astrocite i njihov dalji uticaj na tok bolesti. Smatra se da ova interakcija ima bitnu ulogu u ranim fazama MS i EAE (McFarland and Martin, 2007). Radi prevazilaženja navedenih prepreka primenjen je *in vitro* eksperimentalni model za izučavanje interakcije astrocita u kulturi i infiltriranih imunskih ćelija izolovanih iz parenhima kičmene moždine EAE pacova praćenjem brzih promena unutarćelijskog Ca^{2+} astrocita, odnosno registrovanjem obrasca astroglijalne aktivnosti u vremenskim razmacima od 1 s.

ALS je bolest u kojoj primarno propadaju motoneuroni, a neuroinflamacija je, kao i u MS, prepoznatljiva karakteristika ove bolesti (Kiernan et al., 2011). Karakterišu je aktivacija glijalnih ćelija, astrocita i mikroglije i aktivacija imunskog sistema (Béland et al., 2020). Uloga imunskog sistema u ALS je i dalje meta brojnih istraživanja, i smatra se sekundarnom u odnosu na druge mehanizme poput proteinskih agregata, mitohondrijalne disfunkcije i glutamatne ekscitotoksičnosti (Béland et al., 2020). Stoga smo u ovoj studiji želeli da ispitamo na koji način imunski faktori interaguju sa astrocitima i mikroglijom, koristeći prethodno opisani eksperimentalni *in vitro* pristup.

U ovoj doktorskoj disertaciji su prikazani rezultati istraživanja interakcije glijalnih ćelija sa imunskim faktorima u dva životinjska modela neurodegenerativnih bolesti - EAE, koji je model MS i hSOD1^{G93A} koji je model ALS. U *in vitro* sistemu je pokazano da astrociti reaguju brzim Ca^{2+} odgovorom na prisustvo CNS-IIC u neposrednoj blizini. Ovaj odgovor je posredovan ATP oslobođenim kroz astroglijalne hemikanale koji na autokrini/parakrini način aktivira P2X7R. Inicijacija interakcije između astrocita i CNS-IIC se ostvaruje posredstvom $\alpha_v\beta_3$ -integrina, dok mitohondrije učestvuju u terminaciji odgovora. Ekspresija P2X7R je smanjena na astrocitima u kičmenoj moždini EAE pacova, ali astroglijalni P2X7R i Cx-43 kolokalizuju u većoj meri na kontaktnoj površini sa CD4⁺ T ćelijama. P2X7R formira komplekse sa Cx-43 i β_3 -integrinom u kičmenoj moždini EAE pacova ukazujući na spregu ova tri proteina. Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da hSOD1^{G93A} astrociti imaju narušenu homeostazu jona Ca^{2+} (povećan nivo skladištenog Ca^{2+} u ER) usled čega je njihov Ca^{2+} odgovor na IgG iz seruma ALS pacijenata izraženiji u odnosu na kontrolne astrocite, dok mikroglija ne reaguje Ca^{2+} odgovorom na prisustvo ALS IgG.

5.1. Interakcija astrocita i imunskih ćelija je posredovana ATP i aktivacijom astroglijalnog P2X7R

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u interakciji astrocita sa infiltriranim autoreaktivnim imunskim ćelijama posreduju astroglijalni Ca^{2+} signali. Kratkotrajna aplikacija CNS-IIC koje su izolovane iz kičmene moždine EAE pacova uzrokuju brzi unutarćelijski porast Ca^{2+} koji je posredovan aktivacijom purinskog P2X7R u kontrolnim astrocitima u kulturi.

Astrociti pokazuju dinamičke promene aktivnosti na vremenskoj skali od nekoliko milisekundi do dana, što im omogućava da na odgovarajući način odgovore na promene koje se dešavaju u njihovom okruženju, bilo da su fiziološke ili patološke (Anderson et al., 2014; Nimmerjahn and Bergles, 2015). Poznato je da u EAE modelu inflamatorni faktori koje oslobađaju infiltrirane imunske ćelije utiču na dugotrajne promene u astrocitima, poput hipertrofije ćelijskog tela i proliferacije (Anderson et al., 2014). Sa druge strane, u akutnoj fazi EAE kortikalni astrociti

pokazuju Ca^{2+} hiperaktivnost i izmenjen Ca^{2+} odgovor na agoniste glutamatnih, purinskih i kanabinoidinih receptora kao posledica neuroinflamatornog okruženja (Baraibar et al., 2023). U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put pokazan obrazac Ca^{2+} aktivnosti kontrolnih astrocita pri prvom kontaktu sa CNS-IIC. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da kontakt sa imunskim ćelijama indukuje brze promene u Ca^{2+} signalizaciji u astrocitima. Autoreaktivne imunske ćelije izazivaju brzi odgovor u roku od nekoliko sekundi i prolazan porast unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u astrocitima. Specifičnost ove reakcije je potvrđena time da periferne IC ne izazivaju Ca^{2+} odgovor astrocita, jer se nakon transendotelijalne migracije T ćelije adaptiraju na novu mikrosredinu promenom ekspresije površinskih molekula i stanja aktivacije (Archelos et al., 1999; Khaw et al., 2021; Romanic et al., 1997). Interakcija astrocita i imunskih ćelija je konzistentna, jer ponovljena aplikacija CNS-IIC dovodi do identičnog Ca^{2+} odgovora astrocita kao nakon prvog izlaganja. Ca^{2+} odgovor astrocita izazivaju CD4^+ T ćelije, jer kada se apliciraju samo CD4^+ izolovane iz ukupne frakcije CNS-IIC izazivaju isti odgovor astrocita kao i ukupna frakcija. Ostatak frakcije CNS-IIC izaziva odgovor značajno manjeg broja astrocita, a Ca^{2+} promena koju izazivaju je značajno manjeg intenziteta. Ovaj rezultat je u skladu sa postojećim znanjem da CD4^+ T ćelije imaju ključnu ulogu u patogenezi CNS autoimunosti (Goverman, 2009). Na osnovu analize GFAP i CD4 fluorescentnog signala u obeleženim presecima kičmene moždine EAE pacova je ustanovljeno da se direktna interakcija astrocita i CD4^+ T ćelija dešava u samoj kičmenoj moždini EAE pacova. Dakle, pored dugotrajnih efekata koje imunske ćelije imaju na fenotip astrocita u EAE modelu (Brambilla, 2019), autoreaktivne imunske ćelije mogu izazvati brze i prolazne promene u Ca^{2+} signalizaciji u astrocitima koja je njihovo osnovno fiziološko svojstvo (Verkhatsky et al., 2012).

Astrociti eksprimiraju veliki broj ligand-zavisnih kanala propustljivih za Ca^{2+} (Verkhatsky and Nedergaard, 2018; Verkhatsky et al., 2012). Primenom različitih farmakoloških agenasa koji specifično blokiraju različite kanale, ispitali smo poreklo Ca^{2+} odgovora astrocita nakon izlaganja CNS-IIC. Astrociti imaju značajnu ulogu u regulaciji prisustva glutamata u vanćelijskoj sredini, zbog čega su opremljeni glutamatnim transporterima i glutamatnim receptorima (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). Metabotropni receptori tipa I (mGluR1 i mGluR5) su prepoznati kao bitan mehanizam porasta unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u astrocitima putem oslobađanja iz unutarćelijskih depoa (Araque et al., 2014). Blokada ovih receptora nije uticala na Ca^{2+} odgovor astrocita, ukazujući da glutamat i glutamatni receptori nisu uključeni u interakciju astrocita i imunskih ćelija.

Aktivacija neselektivnih katjonskih TRPA1 kanala je jedan od puteva koji dovodi do unutarćelijskog Ca^{2+} porasta putem influksa Ca^{2+} iz vanćelijske sredine (Shigetomi et al., 2013b). Selektivna blokada ovih kanala nije dovela do promene Ca^{2+} odgovora astrocita na CNS-IIC, ukazujući da ovi kanali nisu uključeni u opisano interakciju.

Pored glutamata, drugi bitan molekul u Ca^{2+} signalizaciji astrocita je ATP. Astrociti su opremljeni metabotropnim P2Y i jonotropnim P2X receptorima (Verkhatsky et al., 2012) i oni imaju veliki značaj u patofiziologiji astrocita (Franke et al., 2012). Neselektivna blokada purinskih receptora astrocita je dovela do smanjenja Ca^{2+} odgovora astrocita nakon izlaganja CNS-IIC, ukazujući da je purinski sistem odgovoran za ovu interakciju. Kalcijumski porast u astrocitima uzrokovan izlaganjem CNS-IIC je bio smanjen kada su prethodno specifično blokirani P2X7R astrocita. Pokazali smo da je ovaj odgovor sličnih karakteristika kao kada se primeni agonist P2X7R u niskoj koncentraciji, što je dodatno potvrdilo da je interakcija astrocita sa CNS-IIC posredovana signalizacijom zavisnom od aktivacije P2X7R. Aktivacija P2X7R je regulisana od strane samih astrocita, jer blokada oslobađanja ATP kroz astroglijalne hemikanale značajno smanjuje kalcijumski porast u astrocitima nakon izlaganja CNS-IIC. Kalcijumski odgovor astrocita nakon izlaganja CNS-IIC je usledio sa zakašnjenjem, oko 10 s nakon aplikacije, što ukazuje na postojanje koraka koji se dešavaju pre povećanja unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} . Prikazani podaci nedvosmisleno ukazuju da signalizacija zavisna od P2X7R dominira u Ca^{2+} odgovoru astrocita na prisutvo CNS-IIC što može doprineti oslobađanju signalnih molekula iz astrocita i dodatno promovisati neurodegenerativne i neuroinflamacijske procese u autoimunskom poremećaju

CNS. Ovo je dodatno podržano činjenicom da nishodno od aktivacije glijalnog P2X7R dolazi do pokretanja signalnih puteva na čijem kraju se oslobađaju citokini, glutamat i reaktivne kiseonične vrste iz astrocita koji promovišu inflamaciju i oštećenje neurona (Burnstock and Knight, 2018).

Imajući u vidu poznatu činjenicu da aktivirane imunske ćelije oslobađaju ATP (Dosch et al., 2019; Ledderose et al., 2018; Schenk et al., 2008) i prethodno opisani rezultat da astrociti ne reaguju u prisustvu perifernih IĆ, ispitali smo da li su CNS-IIC izvor ovog purina i aktivatori astroglijalnog P2X7R. Merenje oslobođenog ATP iz CNS-IIC i perifernih IĆ je pokazalo da nema razlike, ukazujući da CNS-IIC nisu izvor ATP koji dovodi do Ca^{2+} odgovora astrocita. Pored imunskih ćelija, astrociti su glavni izvor ATP u CNS (Burnstock and Boeynaems, 2014). ATP koji oslobađaju astrociti može delovati na autokrin ili parakrin način (Figueiredo et al., 2014; Nikolic et al., 2018; Shen et al., 2017) zbog čega je ispitana mogućnost da astroglijalni ATP autokrino aktivira P2X7R. Astrociti oslobađaju ATP vezikularnim putem ili kroz hemikanale (Coco et al., 2003; Cotrina et al., 1998; Xiong et al., 2018). Specifična blokada vezikularnog oslobađanja ATP iz astrocita nije dovela do promene Ca^{2+} odgovora, dok je blokada oslobađanja kroz hemikanale značajno izmenila Ca^{2+} odgovor astrocita nakon izlaganja CNS-IIC. Ovaj podatak potvrđuje da interakcija astrocita sa CNS-IIC dovodi do otvaranja hemikanala, oslobađanja ATP i autokrine/parakrine aktivacije P2X7R što za posledicu ima ulazak Ca^{2+} u astrocite. Ovi podaci ukazuju da interakcija astrocita sa imunskim ćelijama deli slične osnove sa načinom na koji astrociti interaguju sa rezidentnim ćelijama u CNS, pre svega unutarćelijskim povećanjem Ca^{2+} koje je regulisano aktivacijom purinskih receptora. Signalizacija posredovana purinskim receptorima je dominantan način međućelijske komunikacije astrocita, oni oslobađaju ATP koji moduliše aktivnost neurona, njihovu međusobnu komunikaciju kao i interakciju sa drugim glijalnim ćelijama (Butt, 2011; Fields and Burnstock, 2006). Astroglijalna signalizacija posredovana purinima ima značajno mesto i u patološim stanjima CNS poput epilepsije (Álvarez-Ferradas et al., 2015), Alchajmerove bolesti (Delekate et al., 2014), ALS (Apolloni et al., 2021) i cerebralne ishemije (Kuboyama et al., 2011). Uočeno je da je ekspresija P2X7R izražena u hipertrofiranim astrocitima u frontalnom korteksu MS pacijenata (Amadio et al., 2017), a dobijeni podaci dodatno podržavaju ulogu ovog receptora u međućelijskoj komunikaciji sa autoreaktivnim imunskim ćelijama u okruženju.

Esencijalni aspekti unutarćelijske signalizacije Ca^{2+} koji su opisani u astrocitima u kulturi (Cornell-Bell et al., 1990) su potvrđeni u akutnim moždanim presecima (Porter and McCarthy, 1996), kao i *in vivo* (Hirase et al., 2004; Wang et al., 2006). Ali i pored toga, potrebno je oprezno ekstrapolirati rezultate dobijene u *in vitro* modelu na ono što se dešava u EAE ili MS tkivu. U ovom radu je pokazano da kontakt astrocita i CNS-IIC u *in vitro* uslovima uzrokuje brze i prolazne promene unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u astrocitima što navodi na pretpostavku da se ovo ponavlja i u tkivu CNS u susretu astrocita sa infiltriranim autoimunskim ćelijama koje se kreću kroz parenhim i da se ovaj tip interakcije dešava pri svakom susretu. Deo astroglijalnog odgovora je verovatno delom uzrokovan inflamatornim faktorima koje oslobađaju CNS-IIC i zaista, kada se naivni astrociti izlože CNS IIC-kondicioniranom medijumu odgovaraju povećanjem količine unutarćelijskog Ca^{2+} , ali značajno manji broj astrocita reaguje, pri čemu je i sama promena u ćelijama koje su odreagovale manja u odnosu na odgovor na CNS-IIC. Prethodne studije su pokazale da inflamatorni citokini izazivaju porast unutarćelijske koncentracije kalcijuma u astrocitima (Domercq et al., 2006; Nikolic et al., 2018). Ali, u ovim studijama nije do kraja ispitano da li je interakcija astrocita i imunskih ćelija oblikovana aktiviranom mikrogljom. Ono što je poznato je da pro-inflamatorni citokini koje oslobađa aktivirana mikroglja deluju na odgovor infiltriranih $CD4^+$ T ćelija u EAE (Dong and Yong, 2019; Li et al., 2003) i na promovisanje neurotoksične astroglijalne aktivnosti u MS (Liddelov and Barres, 2017). Imajući u vidu sve načine delovanja mikroglje, teško je utvrditi zbirni efekat signala koji su poreklom od mikroglje na interakciju astrocita i imunskih ćelija. Buduća istraživanja usmerena na selektivnu manipulaciju aktivnosti individualnih ćelijskih tipova će pomoći u rasvetljavanju ove međućelijske komunikacije na kalcijumsku signalizaciju astrocita indukovane imunskim ćelijama.

5.2. Promena ekspresije P2X7R i interakcija sa Cx-43 u neposrednoj blizini CD4⁺ T ćelija karakteriše EAE

Interakcije astrocita sa drugim ćelijama se dešavaju u nervnom sistemu u fiziološkim uslovima i uključuju interakcije astrocita sa neuronima, mikroglijom, oligodendrocitima, drugim astrocitima i endotelnim ćelijama krvnih sudova, što im omogućava da obavljaju svoje homeostatske funkcije (Araque et al., 2014; Ishibashi et al., 2006; Parpura et al., 2012). Ove interakcije se menjaju u toku neuron inflamacije i utiču na dalji razvoj patološkog procesa u zavisnosti od inflamatornih stimulusa u okruženju (Araque et al., 2014; Colombo and Farina, 2016; Ishibashi et al., 2006; Nobili et al., 2022; Parpura et al., 2012). Poznato je da astrociti i CNS-IIC komuniciraju posredstvom inflamatornih faktora, kao što su citokini i hemokini (Butt, 2011; Franke et al., 2012). Ova interakcija se odvija u oba smera, astrociti deluju na CNS-IIC, ali i CNS-IIC deluju na astrocitate posredstvom ovih faktora (Butt, 2011; Franke et al., 2012). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je ova interakcija posredovana i direktnim ćelijskim kontaktom (Lemaître et al., 2021; Prajeeth et al., 2017; Rothhammer et al., 2011) i da direktan kontakt CNS-IIC sa astrocitima pokreće Ca²⁺ signalizaciju ovih glijalnih ćelija. Signalizacija koja je posredovana purinima se odvija na vremenskoj skali od nekoliko sekundi, što omogućava brzu komunikaciju između astrocita i drugih ćelija u njihovoj blizini. Smatra se da ATP koji oslobode astrociti deluje kao gliotransmiter (Santello et al., 2012; Vardjan et al., 2019), ali da u patološkim procesima ovaj molekul ima i ulogu signala opasnosti (Franke et al., 2012). ATP aktivira purinske receptore koji nizvodno dovode do Ca²⁺ signala u astrocitima. Astrogljalna purinska signalizacija je karakteristika mnogih bolesti CNS, između ostalih i MS (Amadio et al., 2017; Butt, 2011; Franke et al., 2012; Narcisse et al., 2005), što dodatno naglašava neophodnost razumevanja konteksta u kom su purinski receptori uključeni u mehanizme koji kontrolišu ove signale.

Purinski P2X7R doprinose patološkim procesima CNS u toku progresije različitih bolesti poput epilepsije, Alchajmerove bolesti, MS (Beltran-Lobo et al., 2022; Nobili et al., 2022; Sidoryk-Węgrzynowicz and Strużyńska, 2021). Ovi receptori su povezani sa dugotrajnim promenama u osobinama astrocita koji vode njihovom remodelovanju ka reaktivnom fenotipu (Franke et al., 2012). U animalnom EAE modelu, blokada P2X7R primenom BBG, smanjuje astrogliozu u prednjem mozgu pacova i ublažava neurološke simptome bolesti (Grygorowicz et al., 2016). U drugoj studiji gde su korišćeni miševi koji ne ekspimiraju P2X7R, pokazano je da P2X7R deficijencija redukuje incidencu razvoja EAE, aktivaciju astrocita i oštećenje aksona, ali ne utiče na infiltraciju imunskih ćelija (Sharp et al., 2008). MS se smatra bolešću bele mase kičmene moždine, ali lezije se uočavaju i u sivoj masi (Frohman et al., 2006). Prethodne studije su pokazale da astrociti u blizini hronično aktivnih i neaktivnih lezija ekspimiraju P2X7R i u beloj i u sivoj masi frontalnog korteksa pacijenata obolelih od MS (Amadio et al., 2017). Ekspresija P2X7R u hipertrofiranim astrocitima koji okružuju perivaskularne infiltrate u mozgu MS pacijenata je povećana (Narcisse et al., 2005), što ukazuje da je ovaj purinski receptor kritična komponenta interakcije astrocita sa imunskim ćelijama koje su se infiltrirale u CNS. Ispitivanje ekspresije P2X7R u kičmenoj moždini EAE pacova u vrhuncu bolesti je pokazalo da astrogljalni P2X7R koncentriše u blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija u sivoj masi. Nije uočena izražena ekspresija P2X7R na astrocitima ni u kontroli ni u EAE kičmenoj moždini što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje pokazuju da je P2X7R u manjoj meri prisutan na astrocitima (Illes, 2020). Dodatno, pored analize u blizini CD4⁺ T ćelija, kolokalizacija Cx-43 i P2X7R pokazuje smanjenje u EAE. Ovi rezultati ukazuju da je P2X7R ekspresija povećana i da se održava u astrocitima u blizini autoreaktivnih imunskih ćelija u toku neuroinflamacije u CNS, što može doprineti međućelijskoj interakciji astrocita i autoreaktivnih imunskih ćelija.

Ekspresija P2X7R je do sad ispitana i u MS i u najčešće korišćenom animalnom modelu EAE. U korteksu MS pacijenata je uočena povećana ekspresija ovog purinskog receptora (Amadio et al., 2017). Rezultati ove studije su pokazali smanjenje ekspresije P2X7R u kičmenoj moždini oba pola u vrhuncu bolesti, dok je ranije pokazano povećanje ekspresije u prednjem mozgu EAE pacova u ranom stadijumu bolesti (Grygorowicz et al., 2016). Promene u ekspresiji P2X7R podržavaju

hipotezu da je ovaj purinski receptor uključen u patološke procese koji se dešavaju u MS i animalnom modelu EAE. Aktivacija P2X7R u astrocitima pokreće signalne puteve koji promovišu inflamaciju i dovode do oslobađanja gliotransmitera koji mogu modulirati aktivnost neurona (Franke et al., 2012). Astroglialni receptor P2X7R se aktivira u direktnom kontaktu astrocita i imunskih ćelija što može predstavljati objašnjenje za očuvanu ekspresiju ovog receptora u astrocitima u neposrednoj blizini CD4⁺ T ćelija.

5.3. Astroglialni $\alpha_V\beta_3$ -integrin je inicijator, dok su mitohondrije zadužene za okončanje Ca²⁺ odgovora nakon kontakta sa CNS-IIC

Pretpostavili smo da inicijalni koraci interakcije astrocita i CNS-IIC mogu biti posredovani integrinima, adhezivnim molekulima koji posreduju u interćelijskoj komunikaciji. Poznato je da integrini imaju značajnu ulogu u MS i da je njihova ekspresija izmenjena pre svega na T ćelijama koji su ujedno i glavna meta različitih terapija (Archelos et al., 1999; Slack et al., 2022), ali i na drugim ćelijama CNS (Archelos et al., 1999). Sa druge strane, poznato je da su integrini uključeni u aktivaciju astroglialnog P2X7R posredstvom ATP oslobođenog kroz hemikanale (Henríquez et al., 2011). Aktivacija ovog puta za posledicu ima povećanje unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ u astrocitima (Alvarez et al., 2016). Kao što smo pokazali, kontakt između CNS-IIC i astrocita dovodi do Ca²⁺ odgovora ovih glialnih ćelija aktivacijom hemikanali-ATP-P2X7R ose. Astroцити oslobađaju ATP putem različitih mehanizama, a jedan od njih je oslobađanje kroz Cx-43 hemikanale (Volterra and Meldolesi, 2005). Oslobođeni ATP aktivira astroglialne purinske receptore i do sada je pokazano da se upravo na ovaj način aktivira astroglialni P2Y₁R što je uzrok astroglialne hiperaktivnosti u animalnom modelu AD (Delekate et al., 2014). Rezultati proizašli iz ove doktorske disertacije pokazuju da nakon susreta astrocita sa CNS-IIC dolazi do oslobađanja ATP kroz hemikanale i posledične aktivacije astroglialnog P2X7R. Pokazali smo da β_3 -integrin interaguje sa P2X7R i da blokada $\alpha_V\beta_3$ -integrina sprečava direktnu interakciju astrocita sa CNS-IIC koje su izolovane iz kičmene moždine EAE pacova. Ovaj signalni put je okarakterisan u astrocitima i uključen je u pokretanje migracije u kulturi. Naime, aktivacija $\alpha_V\beta_3$ -integrina dovodi do oslobađanja ATP kroz hemikanale i aktivacije P2X7R, a ovaj receptor daljom signalizacijom posreduje u migraciji astrocita u kulturi (Alvarez et al., 2016). Naši rezultati ukazuju da ovaj signalni put učestvuje u Ca²⁺ odgovoru astrocita izazvan CNS-IIC. Integrini ekspimirani na T ćelijama su odgovorni za dijapedezu, prolazak KMB i kasniju interakciju sa ćelijama CNS i vanćelijskim matriksom (Archelos et al., 1999; Du et al., 2016; Prajeeth et al., 2017), a naši podaci otkrivaju da su integrini ekspimirani na membrani astrocita uključeni u ostvarivanje interakcije astrocita i infiltriranih imunskih ćelija i potencijalno implicirani u MS. Ekspresija mnogih integrina je promenjena u MS u CNS (Archelos et al., 1999) i imunskim ćelijama u krvi i CSF (Elovaara et al., 2000), a mi smo uočili povećanje ekspresije β_3 -integrina u kičmenoj moždini pacova u vrhuncu EAE. Dobijeni podaci o interakciji P2X7R sa $\alpha_V\beta_3$ -integrinima i Cx-43, kao i ekspresija P2X7R u blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija, sugerisu da se ovo povećanje ekspresije integrina dešava u astrocitima u vrhuncu bolesti. Treba naglasiti da je ciljanje integrina strategija za lečenje mnogih patoloških stanja uključujući i MS (Slack et al., 2022). Blokatori $\alpha_4\beta_7$ - i $\alpha_4\beta_1$ -integrina se koriste u terapiji MS, a ciljaju se imunske ćelije kako bi se kontrolisala njihova infiltracija u CNS (Slack et al., 2022).

Poznato je da je učestalost MS dva puta veća kod žena, nego kod muškaraca (Voskuhl and Gold, 2012). Pokazano je da u EAE modelu postoje regionalne razlike u ekspresionom profilu astrocita (Itoh et al., 2018). Takođe, uočeno je i postojanje polno specifičnog odgovora astrocita na oštećenje u EAE modelu (Tassoni et al., 2019). Naime, kod ženki je uočena povećana ekspresija C3 u astrocitima u optičkom nervu, dok je u astrocitima mužjaka uočena povećana ekspresija THBS1, ukazujući na različit stepen aktivacije astrocita između polova. U kičmenoj moždini nisu uočene ovakve promene (Tassoni et al., 2019) što je u skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji da je isti trend promene ekspresije P2X7R i β_3 -integrina uočen kod oba pola. Sa druge strane, pokazano je da XX hromozomski par doprinosi povećanoj osetljivosti na razvoj EAE

(Smith-Bouvier et al., 2008), dok XY hromozomski par kod SJL miša dovodi do razvoja bolesti sa većim stepenom neurodegeneracije (Du et al., 2014). Potrebno je imati u vidu oba aspekta u razvoju terapije i u skladu sa dobrom istraživačkom praksom koristiti oba pola u ispitivanju mehanizama nastanka ovog autoimunskog oboljenja (Clayton and Collins, 2014).

Pokazano je da astrociti oslobađaju ATP otvaranjem hemikanala nakon susreta sa imunskim ćelijama. Poznato je da su mitohondrije glavni proizvođači ATP i da imaju važnu ulogu u kontroli unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (Duchen, 2000; Rizzuto et al., 2012). Ova dva procesa su usko povezana kako bi se obezbedila sinteza ATP prema trenutnim potrebama ćelija (Tarasov et al., 2012). Ca^{2+} homeostaza mitohondrija je ostvarena kroz aktivnost kompleksne transportne mašinerije na membrani ovih organela. Blokada NCLX- i mHCX-zavisnog mitohondrijalnog transporta Ca^{2+} povećava oslobađanje ATP iz astrocita i značajno produžava trajanje Ca^{2+} odgovora astrocita izazvanog kontaktom sa CNS-IIC. Pored izvora ATP, mitohondrije imaju ulogu u sekvestriranju unutarćelijskog Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2012). Ova uloga mitohondrija je izražena i u drugim ćelijama poput kardiomiocita i β ćelijama Langerhansovih ostrvaca (Duchen, 2000; Tarasov et al., 2012), što ukazuje na ključnu ulogu mitohondrija u regulaciji koncentracije Ca^{2+} i u održanju ćelijskog metabolizma. Frekvencija Ca^{2+} tranzijenata regulisanih mitohondrijama u astrocitima se povećava u modelu ALS koji prekomerno ekspimiraju SOD1 (Agarwal et al., 2017), što ukazuje da su Ca^{2+} signali koji su regulisani mitohondrijama narušeni u patološkim procesima CNS. Rezultati ovog istraživanja su pokazala da mitohondrije regulišu Ca^{2+} signale astrocita u toku interakcije sa CNS-IIC, odnosno da je mitohondrijalna mašinerija neophodna za završetak astrogljalnog Ca^{2+} odgovora uzrokovanog CNS-IIC kroz sekvestriranje unutarćelijskog Ca^{2+} . Aplikacija ATP nakon blokiranja NCLX- i mHCX-mitohondrijalnog Ca^{2+} transporta izaziva Ca^{2+} odgovor produženog trajanja u astrocitima. Dakle, mitohondrije su uključene u regulaciju citosolnog Ca^{2+} nakon astrogljalnog odgovora na ATP. Dobijeni rezultati zajedno pokazuju da su mitohondrije uključene u regulaciju trajanja Ca^{2+} odgovora nakon aktivacije P2X7R izazvane prisustvom CNS-IIC. Ovaj fenomen može uticati na različite ćelijske procese astrocita kao što su oslobađanje gliotransmitera i aktivacija inflamatornih signalnih puteva što može imati implikacije za samu patologiju MS. Prikazani rezultati su u saglasnosti sa postojećim rezultatima o značaju aktivacije P2X7R u ovoj patologiji, jer blokada upravo ovog receptora smanjuje astroglizu karakterističnu za EAE i usporava progresiju same bolesti (Grygorowicz et al., 2016).

Ova doktorska disertacija je prvenstveno fokusirana na efekat CNS-IIC na obrazac aktivnosti astrocita koji je bitan za razumevanje na koji način astrociti reaguju na autoreaktivne imunske ćelije prisutne u njihovoj neposrednoj blizini u CNS. Opisali smo sekvencu događaja koji kontrolišu brzi Ca^{2+} odgovor astrocita na prisustvo CNS-IIC, što pruža novi konceptualni okvir za izučavanje interakcije astrocita i imunskih ćelija u autoimunskom poremećaju CNS. Dodatne studije su neophodne kako bi se definisale uloge ovih astrogljalnih promena u ranim fazama neurodegenerativnih procesa koji se dešavaju u EAE modelu. Dalje studije treba da definišu potencijal astrogljalnog $\alpha_v\beta_3$ -integrina u regulaciji progresije EAE preko kontrole P2X7R-zavisne interakcije astrocita sa imunskim ćelijama koje se infiltriraju u CNS. Ovo istraživanje može pomoći u razvoju novih terapijskih strategija za MS koje će ciljati astrocite. Kako su astrociti uključeni u svaki segment pravilnog funkcionisanja neurona, ovakve strategije bi pomogle u razvoju terapija koje štite neurone od oštećenja koje se dešava u toku MS.

5.4. Interakcija astrocita i mikroglije sa perifernim imunskim faktorima u hSOD1^{G93A} ALS modelu

U *post mortem* tkivu ALS pacijenata je uočeno prisustvo CD4^+ i CD8^+ T ćelija u ventralnim rogovima kičmene moždine i CD4^+ T ćelija u kortikospinalnim traktovima (Engelhardt et al., 1993; Troost et al., 1989). U hSOD1^{G93A} mišjem modelu, i u ranom i u kasnom simptomatskom stadijumu, je utvrđeno oštećenje KMB u nivou cervikalnog i lumbalnog regiona kičmene moždine i moždanog stabla na mestima gde dolazi do degeneracije motoneurona (Garbuzova-Davis et al., 2007b, 2007a). Transplantacija progenitorskih endotelijalnih ćelija poreklom iz humane kostne srži

dovodi do restauracije kapilarnog integriteta u hSOD1^{G93A} mišu, redukuje permeabilnost KMB i usporava progresiju bolesti (Garbuzova-Davis et al., 2017, 2019). Magnetnom rezonancom je ustanovljeno proširenje lateralnih ventrikula i cerebralnog akvadukta kod hSOD1^{G93A} pacova (Andjus et al., 2009; Bataveljić et al., 2009). Uvećane ventrikule su uočene i u hSOD1^{G93A} mišjem modelu (Zang et al., 2004). Promene na nivou ventrikula su uočene i kod pacova pre ispoljavanja prvih simptoma bolesti, što je značajno sa aspekta trenutka kada počinje infiltracija imunskih faktora (Andjus et al., 2009; Zhong et al., 2008). Infiltracije imunskih ćelija su uočene upravo oko lateralnih ventrikula (Andjus et al., 2009), u nivou srednjeg mozga, međumozga i u moždanom stablu (Bataveljić et al., 2011). U ovoj doktorskoj disertaciji u analiziranom uzorku nije otkriveno postojanje infiltriranih CD4⁺ T ćelija u tkivu kičmene moždine hSOD1^{G93A} ALS pacova u kasnoj fazi bolesti. Pošto je pokazano da su infiltrati manje brojni nego u drugim bolestima poput meningitisa, encefalomijelitisa, poliomijelitisa i MS (Engelhardt et al., 1993), potrebno je ispitati serijske preseke tkiva kičmene moždine jedne životinje i analizirati različite regione. Drugi pristup bi bio aplikacija Evans plavo indikatora pre eutanazije i izolacije CNS tkiva (Garbuzova-Davis et al., 2007b), kako bi bilo moguće ustanoviti gde su oštećenja KMB i u tim nivoima ispitati da li postoje infiltrirane imunске ćelije. Studije su pokazale da se kod transgenih miševa koji nose mutiranu formu hSOD1^{G93A} broj infiltriranih CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija u kičmenu moždinu povećava sa progresijom bolesti (Beers et al., 2008; Chiu et al., 2008). Do infiltracije T ćelija u kičmenu moždinu mSOD1^{G93A} miša ne dolazi kada je izbrisan RAG2 gen (eng. recombination-activating gene 2) zadužen za formiranje funkcionalnih T ćelija. Nakon transplantacije kostne srži ovim životinjama dolazi do infiltracije CD4⁺ T ćelija u istoj razmeri kao u mišu koji nosi mSOD1^{G93A} (Beers et al., 2008). Infiltrati T ćelija su uočeni u kičmenoj moždini ALS životinja još u presimptomatskoj fazi bolesti, a njihov broj se povećava sa daljom progresijom bolesti (Chiu et al., 2008). Analiza broja infiltriranih CD3⁺ T ćelija (marker svih T ćelija) u različitim regionima kičmene moždine je pokazala prisustvo i u lumbalnom i u cervikalnom regionu kičmene moždine ALS miševa, ali je zanimljivo da je u cervikalnom regionu manji broj i u početnoj i u kasnoj fazi bolesti (Beers et al., 2011). Imajući u vidu opisane podatke iz literature, kao i naše podatke, pre *in vitro* eksperimenata ispitivanja interakcije glijalnih ćelija sa imunskim ćelijama je neophodno uraditi detaljan profil infiltriranih imunskih ćelija protočnom citometrijom koristeći markere CD11b, CD4, CD8, His48, CD161 i TCR (Miljković et al., 2011).

Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na postojanje specifičnosti ALS IgG (Bataveljić et al., 2014). Uočena je akumulacija IgG u motoneuronima (Engelhardt and Appel, 1990) koji mogu imati antigen-specifične i Fc-posredovane efekte (Béland et al., 2020). Uloga B ćelija i IgG u ALS je i dalje nedovoljno poznata i od velikog značaja za dalja istraživanja (Béland et al., 2020). Prethodne studije su pokazale da kontrolni astrociti u kulturi reaguju na IgG izolovane iz seruma obolelih od ALS prolaznim kalcijumskim tranzijentima koji su posredovani PI3K-IP3R signalnim putem (Milošević et al., 2013). Dodatno, akutno izlaganje astrocita ALS IgG izaziva povećanje pokretljivosti kiselih vezikula što ukazuje na povećanu aktivnost endocitotskih puteva (Stenovec et al., 2011). U ovoj studiji je pokazano da astrociti izolovani iz korteksa hSOD1^{G93A} ALS pacova akutno odgovaraju na ALS IgG karakterističnim Ca²⁺ tranzijentima, koji su značajno veći od tranzijenata u kontrolnim. Utvrđeno je da uočena razlika potiče usled povećane akumulacije Ca²⁺ u ER astrocita poreklom iz korteksa hSOD1^{G93A} pacova, a što je u skladu sa studijom u kojoj je pokazano da astrociti poreklom iz kičmene moždine SOD1^{G93A} miša imaju poremećenu homeostazu Ca²⁺ i da je abnormalna akumulacija Ca²⁺ u ER posledica nepravilnog SOCE mehanizma (Kawamata et al., 2014). Naime, mehanizam SOCE podrazumeva kompleksnu koordinaciju između ER i ćelijske membrane i potvrđen je u astrocitima (Li et al., 2009; Pivneva et al., 2008; Smyth et al., 2010). U ER se nalazi senzor za Ca²⁺, protein STIM1 (eng. Stromal interaction protein 1) koji detektuje smanjenu količinu Ca²⁺ u lumenu ER. Samnjena količina Ca²⁺ u ER pokreće oligomerizaciju ovog proteina čiji citoplazmatski domen interaguje sa Oral Ca²⁺ kanalom u ćelijskoj membrani i dovodi do ulaska ekstraćelijskog Ca²⁺ u citoplazmu, a potom delovanjem SERCA pumpe u ER (Smyth et al., 2010). U hSOD1^{G93A} mišjim astrocitima je otkriveno da je STIM1 protein glutationilovan, a ova posttranslaciona modifikacija uzrokuje konstitutivno aktivan

SOCE mehanizam što dovodi do prekomerne količine Ca^{2+} u lumenu ER (Kawamata et al., 2014). Mutirana forma SOD1 proteina indukuju oksidativni stres, a S-glutationilacija je odgovor ćelije koji za cilj ima zaštitu proteina od oksidativnog oštećenja (Cassina et al., 2002; Poon et al., 2005). Ovo može objasniti veću osetljivost hSOD1^{G93A} astrocita na ALS IgG, a koja može pospešiti progresiju patologije. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je korišćenje *in vitro* eksperimentalnog pristupa studiranja efekata imunskih faktora na glijalne ćelije pogodan alat za ispitivanje patofiziologije punjenja depoa Ca^{2+} , koji su narušeni u ALS modelu.

Poznato je da se mikroglia aktivira u toku progresije ALS (Alexianu et al., 2001; Gerber et al., 2012; Stamenković et al., 2017b), kao i da dolazi do mikroglione (Kawamata et al., 1992; Wu et al., 2006). Intraperitonealno injeciranje ALS IgG dovodi do aktivacije mikroglije u kičmenoj moždini miševa (Obál et al., 2001). Primenom istog tretmana, ustanovljeno je i povećano oslobađanje TNF- α u kičmenoj moždini (Obál et al., 2016). ALS IgG izazivaju oksidativni stres mikroglije (BV2 mikroglijalne linije) i oslobađanje pro-inflamatornih citokina nakon 24 h (Milošević et al., 2017) što ukazuje da bi bilo značajno nastaviti ispitivanja efekata ALS IgG na mikrogliju. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazao da ALS IgG ne izazivaju Ca^{2+} odgovor mikroglije nakon akutnog tretmana, tako da je od značaja istražiti signalni put kojim ALS IgG aktiviraju ćelije mikroglije i dovode do oslobađanja pro-inflamatornih citokina, imajući u vidu značaj aktivacije mikroglije u progresiji ALS (Liao et al., 2012). Odsustvo Ca^{2+} odgovora mikroglije na aplikaciju dva uzorka ALS IgG poreklom iz seruma različitih pacijenata i prethodne studije gde je svega 30% uzoraka ALS IgG uzrokovalo akutnu proizvodnju ROS u BV-2 mikroglijalnoj ćelijskoj liniji (Milošević et al., 2017) i 45% uzoraka ALS IgG dovelo do povećane sinaptičke aktivnosti u nervno-mišićnoj sinapsi (Pagani et al., 2006) ukazuje na mogućnost da se reakcije na ALS IgG razlikuju u *in vitro* sistemima i da samo mali procenat ALS IgG uzoraka može izazvati promenu. Razlike u reakcijama različitih *in vitro* sistema se mogu upotrebiti za karakterizaciju specifičnih ALS IgG i korelaciju sa parametrima bolesti.

Ova doktorska disertacija je bila fokusirana na ispitivanje akutnih efekata ALS IgG na Ca^{2+} odgovor hSOD1^{G93A} astrocita u poređenju sa kontrolnim i na Ca^{2+} odgovor kontrolne mikroglije. Dodatne studije su neophodne kako bi se definisao i razumeo specifičan otisak Ca^{2+} signalizacije u glijalnim ćelijama nakon izlaganja ALS IgG, kao i uticaj produženom izlaganju, a koji bi imao implikacije na progresiju bolesti.

6. Zaključak

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Astrociti u kontaktu sa infiltriranim imunskim ćelijama reaguju brzim i prolaznim kalcijumskim odgovorom koji je posredovan ATP oslobođenim kroz hemikanale i posledičnom aktivacijom purinskog P2X7 receptora.
2. U kičmenoj moždini EAE i kontrolnih pacova P2X7 receptor gradi komplekse sa Cx-43. Ekspresija P2X7 receptora je smanjena u kičmenoj moždini EAE pacova, ali je njegova distribucija takva da kolokalizuje sa koneksinom-43 u neposrednoj blizini infiltriranih CD4⁺ T ćelija.
3. Direktan kontakt između astrocita i autoreaktivnih imunskih ćelija je posredovan astroglijalnim $\alpha_v\beta_3$ -integrinom. P2X7R takođe formira komplekse sa β_3 -integrinom u kičmenoj moždini kontrolnih i EAE pacova, a ekspresija β_3 -integrina se povećava u EAE.
4. Mitohondrije, kao unutarćelijski depo kalcijuma, učestvuju u terminaciji astroglijalnog kalcijumskog odgovora po kontaktu sa autoreaktivnim imunskim ćelijama.
5. hSOD1^{G93A} astrociti pokazuju izmenjen kalcijumski odgovor na IgG izolovane iz seruma ALS pacijenata usled poremećene sposobnosti unutarćelijskog skladištenja jona kalcijuma.
6. Ćelije mikroglije ne pokazuju kalcijumski odgovor na IgG izolovane iz seruma ALS pacijenata, ukazujući na drugačiji obrazac aktivacije ovog glijalnog ćelijskog tipa.

Na osnovu pojedinačnih zaključaka se može izvesti opšti zaključak:

Astrociti reaguju brzim Ca²⁺ odgovorom na prisustvo imunskih faktora u svojoj neposrednoj blizini. Ovaj fenomen je uočen u dve različite CNS patologije – EAE, animalni model MS, i ALS. Ova studija produbljuje znanje o interakciji astrocita sa imunskim faktorima, autoreaktivnim imunskim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine EAE pacova i imunoglobulinom G iz seruma ALS pacijenata. Ovo znanje se može iskoristiti za razvoj novih terapijskih pravaca u lečenju CNS bolesti sa neuroinflamacijskom osnovom, a koji će se fokusirati upravo na direktnu interakciju astrocita sa imunskim faktorima.

Literatura

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2014). Cellular and molecular immunology E-book (Elsevier Health Sciences).
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Abbracchio, M.P., and Ceruti, S. (2006). Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal.* 2, 595–604.
- Abbracchio, M.P., Saffrey, M.J., Höpker, V., and Burnstock, G. (1994). Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 59, 67–76.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19–29.
- Adzic Bukvic, M., Laketa, D., Dragic, M., Lavrnja, I., and Nedeljkovic, N. (2023). Expression of functionally distinct ecto-5'-nucleotidase/CD73 glycovariants in reactive astrocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis and neuroinflammatory conditions in vitro. *Glia*.
- Agarwal, A., Wu, P.-H., Hughes, E.G., Fukaya, M., Tischfield, M.A., Langseth, A.J., Wirtz, D., and Bergles, D.E. (2017). Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. *Neuron* 93, 587-605.e7.
- Agostinho, P., Madeira, D., Dias, L., Simões, A.P., Cunha, R.A., and Canas, P.M. (2020). Purinergic signaling orchestrating neuron-glia communication. *Pharmacol. Res.* 162, 105253.
- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Serafini, B., Franchini, L., Volonté, C., Aloisi, F., and Visentin, S. (2005). Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development. *Glia* 50, 132–144.
- Ahmadpour, N., Kantroo, M., and Stobart, J.L. (2021). Extracellular Calcium Influx Pathways in Astrocyte Calcium Microdomain Physiology. *Biomolecules* 11.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57, 1282–1289.
- Allen, N.J., and Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697–708.
- Allen, S.P., Hall, B., Woof, R., Francis, L., Gatto, N., Shaw, A.C., Myszczyńska, M., Hemingway, J., Coldicott, I., Willcock, A., et al. (2019). C9orf72 expansion within astrocytes reduces metabolic flexibility in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 142, 3771–3790.
- Álvarez-Ferradas, C., Morales, J.C., Wellmann, M., Nualart, F., Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., and Bonansco, C. (2015). Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia* 63, 1507–1521.
- Alvarez, A., Lagos-Cabré, R., Kong, M., Cárdenas, A., Burgos-Bravo, F., Schneider, P., Quest, A.F.G., and Leyton, L. (2016). Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2175–2188.
- Amadio, S., Parisi, C., Piras, E., Fabbriozzi, P., Apolloni, S., Montilli, C., Luchetti, S., Ruggieri, S., Gasperini, C., Laghi-Pasini, F., et al. (2017). Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 8, 1529.
- Amen, T., and Kaganovich, D. (2021). Stress granules inhibit fatty acid oxidation by modulating mitochondrial permeability. *Cell Rep.* 35, 109237.
- Anderson, C.M., Bergher, J.P., and Swanson, R.A. (2004). ATP-induced ATP release from astrocytes. *J. Neurochem.* 88, 246–256.
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M. V (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes.

- Neurosci. Lett. 565, 23–29.
- Andjus, P.R., Khiroug, L., Nistri, A., and Cherubini, E. (1996). ALS IgGs suppress $[Ca^{2+}]_i$ rise through P/Q-type calcium channels in central neurones in culture. *Neuroreport* 7, 1914–1916.
- Andjus, P.R., Stevic-Marinkovic, Z., and Cherubini, E. (1997). Immunoglobulins from motoneuron disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurones in culture. *J. Physiol.* 504 (Pt 1), 103–112.
- Andjus, P.R., Bataveljić, D., Vanhoutte, G., Mitrecic, D., Pizzolante, F., Djogo, N., Nicaise, C., Gankam Kengne, F., Gangitano, C., Michetti, F., et al. (2009). In vivo morphological changes in animal models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer’s-like disease: MRI approach. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 292, 1882–1892.
- Apolloni, S., Fabbrizio, P., Amadio, S., Napoli, G., Freschi, M., Sironi, F., Pevarello, P., Tarroni, P., Liberati, C., Bendotti, C., et al. (2021). Novel P2X7 Antagonist Ameliorates the Early Phase of ALS Disease and Decreases Inflammation and Autophagy in SOD1-G93A Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* 22.
- Appel, S.H., Engelhardt, J.I., García, J., and Stefani, E. (1991). Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 647–651.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.
- Archelos, J.J., Previtali, S.C., and Hartung, H.P. (1999). The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 22, 30–38.
- Arizono, M., Inavalli, V.V.G.K., Panatier, A., Pfeiffer, T., Angibaud, J., Levet, F., Ter Veer, M.J.T., Stobart, J., Bellocchio, L., Mikoshiba, K., et al. (2020). Structural basis of astrocytic Ca^{2+} signals at tripartite synapses. *Nat. Commun.* 11, 1906.
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., and Weiner, H.L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97, 742–768.
- Bal-Price, A., Moneer, Z., and Brown, G.C. (2002). Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40, 312–323.
- Baldwin, K.T., Murai, K.K., and Khakh, B.S. (2023). Astrocyte morphology. *Trends Cell Biol.* xx, 1–19.
- Baradaran-Heravi, Y., Van Broeckhoven, C., and van der Zee, J. (2020). Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiol. Dis.* 134, 104639.
- Baraibar, A.M., Colomer, T., Moreno-García, A., Bernal-Chico, A., Sánchez, E., Utrilla, C., Serrat, R., Soria-Gómez, E., Rodríguez-Antigüedad, A., Araque, A., et al. (2023). Autoimmune inflammation triggers aberrant astrocytic calcium signaling to impair synaptic plasticity. *BioRxiv* 2023.08.01.551248.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 524, 3865–3895.
- Bataveljic, D., Milosevic, M., Radenovic, L., and Andjus, P. (2014). Novel molecular biomarkers at the blood-brain barrier in ALS. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Bataveljić, D., Djogo, N., Zupunski, L., Bajić, A., Nicaise, C., Pochet, R., Bacić, G., and Andjus, P.R. (2009). Live monitoring of brain damage in the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Gen. Physiol. Biophys.* 28 Spec No, 212–218.
- Bataveljić, D., Stamenković, S., Bačić, G., and Andjus, P.R. (2011). Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Physiol. Hung.* 98, 27–31.
- Bataveljić, D., Nikolić, L., Milosević, M., Todorović, N., and Andjus, P.R. (2012). Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of

- the amyotrophic lateral sclerosis SOD1 G93A rat model. *Glia* 60, 1991–2003.
- Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kemppinen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 45, 1353–1362.
- Beers, D.R., and Appel, S.H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet. Neurol.* 18, 211–220.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16021–16026.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J., and Appel, S.H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15558–15563.
- Beers, D.R., Zhao, W., Liao, B., Kano, O., Wang, J., Huang, A., Appel, S.H., and Henkel, J.S. (2011). Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain. Behav. Immun.* 25, 1025–1035.
- Bekar, L.K., He, W., and Nedergaard, M. (2008). Locus coeruleus alpha-adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cereb. Cortex* 18, 2789–2795.
- Béland, L.-C., Markovinovic, A., Jakovac, H., de Marchi, F., Bilic, E., Mazzini, L., Kriz, J., and Munitic, I. (2020). Immunity in amyotrophic lateral sclerosis: blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses. *Brain Commun.* 2, fcaa124.
- Beltran-Lobo, P., Reid, M.J., Jimenez-Sanchez, M., Verkhratsky, A., Perez-Nievas, B.G., and Noble, W. (2022). Astrocyte adaptation in Alzheimer’s disease: a focus on astrocytic P2X7R. *Essays Biochem.* 67, 119–130.
- Bergami, M., Santi, S., Formaggio, E., Cagnoli, C., Verderio, C., Blum, R., Berninger, B., Matteoli, M., and Canossa, M. (2008). Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J. Cell Biol.* 183, 213–221.
- Bernardinelli, Y., Muller, D., and Nikonenko, I. (2014). Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plast.* 2014, 232105.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387–394.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., et al. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4, 702–710.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613–620.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol.* 174, 7268–7277.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., et al. (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5803–5808.
- Bilimoria, P.M., and Stevens, B. (2015). Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 1617, 7–17.
- Birger, A., Ben-Dor, I., Ottolenghi, M., Turetsky, T., Gil, Y., Sweetat, S., Perez, L., Belzer, V.,

- Casden, N., Steiner, D., et al. (2019). Human iPSC-derived astrocytes from ALS patients with mutated C9ORF72 show increased oxidative stress and neurotoxicity. *EBioMedicine* 50, 274–289.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69.
- Blum, A.E., Joseph, S.M., Przybylski, R.J., and Dubyak, G.R. (2008). Rho-family GTPases modulate Ca(2+) -dependent ATP release from astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C231-41.
- Bohmbach, K., Schwarz, M.K., Schoch, S., and Henneberger, C. (2018). The structural and functional evidence for vesicular release from astrocytes in situ. *Brain Res. Bull.* 136, 65–75.
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389–1392.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J. Gen. Physiol.* 129, 485–491.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brambilla, R. (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 137, 757–783.
- Brambilla, R., and Abbracchio, M.P. (2001). Modulation of cyclooxygenase-2 and brain reactive astrogliosis by purinergic P2 receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 939, 54–62.
- Brettschneider, J., Toledo, J.B., Van Deerlin, V.M., Elman, L., McCluskey, L., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2012). Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e39216.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J.B., Robinson, J.L., Irwin, D.J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Wood, E.M., Baek, Y., et al. (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 74, 20–38.
- Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., and Munsat, T.L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Gr. Mot. Neuron Dis.* 1, 293–299.
- Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 377, 162–172.
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., et al. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327–338.
- Burnstock, G. (2016). Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 371.
- Burnstock, G., and Boeynaems, J.-M. (2014). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.* 10, 529–564.
- Burnstock, G., and Knight, G.E. (2018). The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal.* 14, 1–18.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 183–192.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004). Maturation of astrocyte morphology

- and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *22*, 73–86.
- Butt, A.M. (2011). ATP: A ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 205–213.
- Carson, M.J. (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia* *40*, 218–231.
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressler, A., Beckman, J.S., Estévez, A.G., and Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J. Neurosci. Res.* *67*, 21–29.
- de Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D.G., Lind, B.L., Carriero, G., Latagliata, E.C., Bindocci, E., Di Castro, M.A., Savtchouk, I., Vitali, I., et al. (2023). Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. *Nature* *622*.
- Cencioni, M.T., Mattosio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A., and Muraro, P.A. (2021). B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat. Rev. Neurol.* *17*, 399–414.
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., et al. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* *95*, 531–549.e9.
- Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.-L.G. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS One* *3*, e2849.
- Charabati, M., Wheeler, M.A., Weiner, H.L., and Quintana, F.J. (2023). Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting. *Cell* *186*, 1309–1327.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* *6*, 983–992.
- Cheli, V.T., Santiago González, D.A., Smith, J., Spreuer, V., Murphy, G.G., and Paez, P.M. (2016). L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation *In vitro*. *Glia* *64*, 1396–1415.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* *11*, 1–15.
- Chisari, C.G., Sgarlata, E., Arena, S., Toscano, S., Luca, M., and Patti, F. (2022). Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review. *J. Neurol.* *269*, 159–183.
- Chiu, I.M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S.A., Vartanian, T.K., Brown, R.H.J., and Carroll, M.C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17913–17918.
- Choi, C., Park, J.Y., Lee, J., Lim, J.H., Shin, E.C., Ahn, Y.S., Kim, C.H., Kim, S.J., Kim, J.D., Choi, I.S., et al. (1999). Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J. Immunol.* *162*, 1889–1895.
- Clavreul, S., Abdeladim, L., Hernández-Garzón, E., Niculescu, D., Durand, J., Ieng, S.-H., Barry, R., Bonvento, G., Beaurepaire, E., Livet, J., et al. (2019). Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels. *Nat. Commun.* *10*, 4884.
- Clayton, J.A., and Collins, F.S. (2014). Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* *509*, 282–283.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., et al. (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* *302*, 113–117.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., and Verderio, C. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* *278*, 1354–

- Codarri, L., Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* *12*, 560–567.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* *63*, 641–683.
- Colombo, E., and Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* *37*, 608–620.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* *372*, 1502–1517.
- Coppedè, F. (2011). An overview of DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis. *ScientificWorldJournal.* *11*, 1679–1691.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* *247*, 470–473.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H.C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C.G., and Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15735–15740.
- Crippa, D., Schenk, U., Francolini, M., Rosa, P., Verderio, C., Zonta, M., Pozzan, T., Matteoli, M., and Carmignoto, G. (2006). Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J. Physiol.* *570*, 567–582.
- Cuellar-Santoyo, A.O., Ruiz-Rodríguez, V.M., Mares-Barbosa, T.B., Patrón-Soberano, A., Howe, A.G., Portales-Pérez, D.P., Miquelajáuregui Graf, A., and Estrada-Sánchez, A.M. (2022). Revealing the contribution of astrocytes to glutamatergic neuronal transmission. *Front. Cell. Neurosci.* *16*, 1037641.
- Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P.J., and Silva, F.S.G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2020*, 5021694.
- D’Amelio, F.E., Smith, M.E., and Eng, L.F. (1990). Sequence of tissue responses in the early stages of experimental allergic encephalomyelitis (EAE): immunohistochemical, light microscopic, and ultrastructural observations in the spinal cord. *Glia* *3*, 229–240.
- Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* *96*, 1349–1361.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* *72*, 245–256.
- Delekate, A., Fächtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddiss, M., and Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y₁ receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer’s disease mouse model. *Nat. Commun.* *5*, 5422.
- Dematteis, G., Vydmantaitė, G., Ruffinatti, F.A., Chahin, M., Farruggio, S., Barberis, E., Ferrari, E., Marengo, E., Distasi, C., Morkūnienė, R., et al. (2020). Proteomic analysis links alterations of bioenergetics, mitochondria-ER interactions and proteostasis in hippocampal astrocytes from 3xTg-AD mice. *Cell Death Dis.* *11*, 645.
- Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 545–558.
- Ding, F., O’Donnell, J., Thrane, A.S., Zeppenfeld, D., Kang, H., Xie, L., Wang, F., and Nedergaard, M. (2013). α 1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical

- astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium* 54, 387–394.
- DiSabato, D.J., Quan, N., and Godbout, J.P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* 139 *Suppl*, 136–153.
- Distéfano-Gagné, F., Bitarafan, S., Lacroix, S., and Gosselin, D. (2023). Roles and regulation of microglia activity in multiple sclerosis: insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.*
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., and Bezzi, P. (2006). P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor- α and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281, 30684–30696.
- Domingues, H.S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2010). Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5, e15531.
- Dong, Y., and Yong, V.W. (2019). When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 704–717.
- Doolen, S., Cook, J., Riedl, M., Kitto, K., Kohsaka, S., Honda, C.N., Fairbanks, C.A., Taylor, B.K., and Vulchanova, L. (2017). Complement 3a receptor in dorsal horn microglia mediates pronociceptive neuropeptide signaling. *Glia* 65, 1976–1989.
- Dosch, M., Zindel, J., Jebbawi, F., Melin, N., Sanchez-Taltavull, D., Stroka, D., Candinas, D., and Beldi, G. (2019). Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis. *Elife* 8.
- Du, F., Garg, A. V., Kosar, K., Majumder, S., Kugler, D.G., Mir, G.H., Maggio, M., Henkel, M., Lacy-Hulbert, A., and McGeachy, M.J. (2016). Inflammatory Th17 Cells Express Integrin $\alpha\beta 3$ for Pathogenic Function. *Cell Rep.* 16, 1339–1351.
- Du, S., Itoh, N., Askarinam, S., Hill, H., Arnold, A.P., and Voskuhl, R.R. (2014). XY sex chromosome complement, compared with XX, in the CNS confers greater neurodegeneration during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2806–2811.
- Duchen, M.R. (2000). Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death. *J. Physiol.* 529, 57–68.
- Duffy, S., and MacVicar, B.A. (1995). Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5535–5550.
- Elovaara, I., Ukkonen, M., Leppäkynnäs, M., Lehtimäki, T., Luomala, M., Peltola, J., and Dastidar, P. (2000). Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch. Neurol.* 57, 546–551.
- Engelhardt, J.I., and Appel, S.H. (1990). IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 47, 1210–1216.
- Engelhardt, J.I., Tajti, J., and Appel, S.H. (1993). Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 50, 30–36.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C.I., and Weisman, G.A. (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452, 552–562.
- Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231.
- Escartin, C., Guillemaud, O., and Carrillo-de Sauvage, M.-A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247.
- Falzoni, S., Munerati, M., Ferrari, D., Spisani, S., Moretti, S., and Di Virgilio, F. (1995). The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J. Clin. Invest.* 95, 1207–1216.
- Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P.R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2011). Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 2627–2641.
- Ferreira, R., and Schlichter, L.C. (2013). Selective activation of KCa3.1 and CRAC channels by P2Y2 receptors promotes Ca²⁺ signaling, store refilling and migration of rat microglial cells. *PLoS One* 8, e62345.

- Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436.
- Figueiredo, M., Lane, S., Stout, R.F.J., Liu, B., Parpura, V., Teschemacher, A.G., and Kasparov, S. (2014). Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium* 56, 208–214.
- Filipovic, S. (1991). Serum and CSF immunological findings in. 96–98.
- Franke, H., Krügel, U., and Illes, P. (1999). P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28, 190–200.
- Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., and Illes, P. (2012). Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* 8, 629–657.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., and Raine, C.S. (2006). Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 354, 942–955.
- Fujii, Y., Maekawa, S., and Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci. Rep.* 7, 13115.
- Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57, 244–257.
- Garbuzova-davis, S., Hernandez-ontiveros, D.G., Rodrigues, M.C.O., Haller, E., Frisina-deyo, A., Mirtyl, S., Sallot, S., Saporta, S., Borlongan, C. V., and Sanberg, P.R. (2012). Impaired blood – brain / spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res.* 1469, 114–128.
- Garbuzova-Davis, S., Haller, E., Saporta, S., Kolomey, I., Nicosia, S. V., and Sanberg, P.R. (2007a). Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res.* 1157, 126–137.
- Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S.P., Potter, H., and Sanberg, P.R. (2007b). Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One* 2, e1205.
- Garbuzova-Davis, S., Kurien, C., Thomson, A., Falco, D., Ahmad, S., Staffetti, J., Steiner, G., Abraham, S., James, G., Mahendrasah, A., et al. (2017). Endothelial and Astrocytic Support by Human Bone Marrow Stem Cell Grafts into Symptomatic ALS Mice towards Blood-Spinal Cord Barrier Repair. *Sci. Rep.* 7, 884.
- Garbuzova-Davis, S., Kurien, C., Haller, E., Eve, D.J., Navarro, S., Steiner, G., Mahendrasah, A., Hailu, S., Khatib, M., Boccio, K.J., et al. (2019). Human Bone Marrow Endothelial Progenitor Cell Transplantation into Symptomatic ALS Mice Delays Disease Progression and Increases Motor Neuron Survival by Repairing Blood-Spinal Cord Barrier. *Sci. Rep.* 9, 5280.
- Ge, W.-P., Miyawaki, A., Gage, F.H., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* 484, 376–380.
- Geer, P.L.M.C., and Geer, E.G.M.C. (2002). INFLAMMATORY PROCESSES IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. 459–470.
- Gerber, Y.N., Sabourin, J.-C., Rabano, M., Vivanco, M. d M., and Perrin, F.E. (2012). Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e36000.
- Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., and Eggan, K.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3, 637–648.
- Gitcho, M.A., Baloh, R.H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J.B., Levitch, D., Hatanpaa, K.J., White, C.L. 3rd, Bigio, E.H., Caselli, R., et al. (2008). TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 63, 535–538.
- Goenaga, J., Araque, A., Kofuji, P., and Herrera Moro Chao, D. (2023). Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Front. Synaptic Neurosci.* 15, 1–11.
- Golovina, V.A. (2005). Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes.

- Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 564, 737–749.
- Golovina, V.A., and Blaustein, M.P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca²⁺ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science* 275, 1643–1648.
- Gordon, G.R.J., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C.R., and MacVicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–749.
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–575.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 393–407.
- Grygorowicz, T., Wełniak-Kamińska, M., and Strużyńska, L. (2016). Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Cell. Neurosci.* 74, 1–9.
- Gunter, T.E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., and Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: Mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28, 285–296.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V, Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 520–528.
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* 29, 824–828.
- Haj-Yasein, N.N., Vindedal, G.F., Eilert-Olsen, M., Gundersen, G.A., Skare, Ø., Laake, P., Klungland, A., Thorén, A.E., Burkhardt, J.M., Ottersen, O.P., et al. (2011). Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17815–17820.
- Hamilton, N., Vayro, S., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., Robbins, J., Gorecki, D.C., and Butt, A.M. (2008). Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia* 56, 734–749.
- Hamilton, N., Vayro, S., Wigley, R., and Butt, A.M. (2010). Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia. *Glia* 58, 66–79.
- Hamilton, N.B., Clarke, L.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., Whiteley, L., Bergersen, L.H., Richardson, W.D., and Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia* 65, 309–321.
- Haraguchi, Y., Mizoguchi, Y., Ohgidani, M., Imamura, Y., Murakawa-Hirachi, T., Nabeta, H., Tateishi, H., Kato, T.A., and Monji, A. (2017). Donepezil suppresses intracellular Ca(2+) mobilization through the PI3K pathway in rodent microglia. *J. Neuroinflammation* 14, 258.
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., and Van Den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3.
- Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009–1031.
- Helmut, K., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.
- Henríquez, M., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Alvarez, A., Kong, M., Muñoz, N., Eisner, V., Jaimovich, E., Schneider, P., Quest, A.F.G., et al. (2011). ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* 124, 1581–1588.
- Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A., Rüllicke, T., Prinz, M., Priller, J., et al. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis

- repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* *11*, 146–152.
- Hermosilla, T., Muñoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Muñoz, N., Nham, S.-U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F.G., and Leyton, L. (2008). Direct Thy-1/ α V β 3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 1111–1120.
- Herrera-Molina, R., Frischknecht, R., Maldonado, H., Seidenbecher, C.I., Gundelfinger, E.D., Hetz, C., Aylwin, M. de la L., Schneider, P., Quest, A.F.G., and Leyton, L. (2012). Astrocytic α V β 3 integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1. *PLoS One* *7*, e34295.
- Hindley, S., Herman, M.A., and Rathbone, M.P. (1994). Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist. *J. Neurosci. Res.* *38*, 399–406.
- Hirase, H., Qian, L., Barthó, P., and Buzsáki, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol.* *2*, E96.
- Höfer, T., Venance, L., and Giaume, C. (2002). Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 4850–4859.
- Hofman, F.M., Hinton, D.R., Johnson, K., and Merrill, J.E. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* *170*, 607–612.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2016). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet. Neurol.* *15*, 198–209.
- Horvat, A., Zorec, R., and Vardjan, N. (2016). Adrenergic stimulation of single rat astrocytes results in distinct temporal changes in intracellular Ca(2+) and cAMP-dependent PKA responses. *Cell Calcium* *59*, 156–163.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1604–1609.
- Hulshof, S., Montagne, L., De Groot, C.J.A., and Van Der Valk, P. (2002). Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* *38*, 24–35.
- Hussy, N., Deleuze, C., Desarménien, M.G., and Moos, F.C. (2000). Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog. Neurobiol.* *62*, 113–134.
- Illes, P. (2020). P2x7 receptors amplify CNS damage in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1–31.
- Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S. V., Stewart, C.L., and Fields, R.D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* *49*, 823–832.
- Itoh, N., Itoh, Y., Tassoni, A., Ren, E., Kaito, M., Ohno, A., Ao, Y., Farkhondeh, V., Johnsonbaugh, H., Burda, J., et al. (2018). Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E302–E309.
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 2075–2088.
- Jaiswal, M.K. (2019). Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med. Res. Rev.* *39*, 733–748.
- Jakovljevic, M., Lavrња, I., Bozic, I., Savic, D., Bjelobaba, I., Pekovic, S., Sévigny, J., Nedeljkovic, N., and Laketa, D. (2017). Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 333.
- Jha, M.K., Jo, M., Kim, J.-H., and Suk, K. (2019). Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neurosci. a Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *25*, 227–240.
- Jiang, H., Galtés, D., Wang, J., and Rockman, H.A. (2022). G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *323*, C731–C748.
- Jonsson, P.A., Bergemalm, D., Andersen, P.M., Gredal, O., Brännström, T., and Marklund, S.L. (2008). Inclusions of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase in ventral horns, liver, and kidney. *Ann. Neurol.* *63*, 671–675.
- Kabba, J.A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J.M., and Pang, T. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* *38*, 53–71.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* *1*, 683–692.
- Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* *16*, 571–579.
- Kang, Z., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Liu, C., Giltiy, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R.M., Bergmann, C., et al. (2010). Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. *Immunity* *32*, 414–425.
- Kawamata, H., Ng, S.K., Diaz, N., Burstein, S., Morel, L., Osgood, A., Sider, B., Higashimori, H., Haydon, P.G., Manfredi, G., et al. (2014). Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* *34*, 2331–2348.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., and McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* *140*, 691–707.
- Keaney, J., and Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* *282*, 4067–4079.
- Khadra, A., Tomić, M., Yan, Z., Zemkova, H., Sherman, A., and Stojilkovic, S.S. (2013). Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. *Biophys. J.* *104*, 2612–2621.
- Khan, Z.U., Koulen, P., Rubinstein, M., Grandy, D.K., and Goldman-Rakic, P.S. (2001). An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1964–1969.
- Khaw, Y.M., Tierney, A., Cunningham, C., Soto-Díaz, K., Kang, E., Steelman, A.J., and Inoue, M. (2021). Astrocytes lure CXCR2-expressing CD4⁺ T cells to gray matter via TAK1-mediated chemokine production in a mouse model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *118*, e2017213118.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)* *377*, 942–955.
- Kim, G., Gautier, O., Tassoni-Tsuchida, E., Ma, X.R., and Gitler, A.D. (2020). ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron* *108*, 822–842.
- Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* *20*, 6347–6358.
- Kim, R.Y., Hoffman, A.S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M. V., and Voskuhl, R.R. (2014). Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *274*, 53–61.
- Kirby, L., Jin, J., Cardona, J.G., Smith, M.D., Martin, K.A., Wang, J., Strasburger, H., Herbst, L., Alexis, M., Karnell, J., et al. (2019). Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat. Commun.* *10*, 3887.
- Klotz, L., Eschborn, M., Lindner, M., Liebmann, M., Herold, M., Janoschka, C., Torres Garrido, B., Schulte-Mecklenbeck, A., Gross, C.C., Breuer, J., et al. (2019). Teriflunomide treatment for

- multiple sclerosis modulates T cell mitochondrial respiration with affinity-dependent effects. *Sci. Transl. Med.* *11*.
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* *446*, 1091–1095.
- Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., and Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kral.)* *53*, 73–77.
- Kuboyama, K., Harada, H., Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Ushijima, K., and Inoue, K. (2011). Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *31*, 1930–1941.
- Kushner, P.D., Stephenson, D.T., and Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *50*, 263–277.
- Kwak, H., Koh, W., Kim, S., Song, K., Shin, J.-I., Lee, J.M., Lee, E.H., Bae, J.Y., Ha, G.E., Oh, J.-E., et al. (2020). Astrocytes Control Sensory Acuity via Tonic Inhibition in the Thalamus. *Neuron* *108*, 691-706.e10.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 5473–5480.
- Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G., and Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol.* *12*, e1001747.
- Langfelder, A., Okonji, E., Deca, D., Wei, W.-C., and Glitsch, M.D. (2015). Extracellular acidosis impairs P2Y receptor-mediated Ca(2+) signalling and migration of microglia. *Cell Calcium* *57*, 247–256.
- Leal-Lasarte, M.M., Franco, J.M., Labrador-Garrido, A., Pozo, D., and Roodveldt, C. (2017). Extracellular TDP-43 aggregates target MAPK/MAK/MRK overlapping kinase (MOK) and trigger caspase-3/IL-18 signaling in microglia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *31*, 2797–2816.
- Ledderose, C., Liu, K., Kondo, Y., Slubowski, C.J., Dertnig, T., Denicoló, S., Arbab, M., Hubner, J., Konrad, K., Fakhari, M., et al. (2018). Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J. Clin. Invest.* *128*, 3583–3594.
- Lee, D.S.W., Rojas, O.L., and Gommerman, J.L. (2021). B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat. Rev. Drug Discov.* *20*, 179–199.
- Lemaître, F., Carmena Moratalla, A., Farzam-kia, N., Carpentier Solorio, Y., Tastet, O., Cleret-Buhot, A., Guimond, J.V., Haddad, E., and Arbour, N. (2021). Capturing T Lymphocytes' Dynamic Interactions With Human Neural Cells Using Time-Lapse Microscopy. *Front. Immunol.* *12*, 1–16.
- Lencesova, L., O'Neill, A., Resneck, W.G., Bloch, R.J., and Blaustein, M.P. (2004). Plasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* *279*, 2885–2893.
- Leng, F., and Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* *17*, 157–172.
- Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2008). Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat. Neurosci.* *11*, 1294–1301.
- Letellier, M., Park, Y.K., Chater, T.E., Chipman, P.H., Gautam, S.G., Oshima-Takago, T., and Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E2685-94.
- Li, D., Héroult, K., Oheim, M., and Ropert, N. (2009). FM dyes enter via a store-operated calcium

- channel and modify calcium signaling of cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21960–21965.
- Li, J., Gran, B., Zhang, G.X., Ventura, E.S., Siglienti, I., Rostami, A., and Kamoun, M. (2003). Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J. Neurol. Sci.* *215*, 95–103.
- Li, R., Rezk, A., Ghadiri, M., Luessi, F., Zipp, F., Li, H., Giacomini, P.S., Antel, J., and Bar-Or, A. (2017). Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* *198*, 691–698.
- Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J., and Gitler, A.D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* *201*, 361–372.
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* *237*, 147–152.
- Liao, Y.C., Fernandopulle, M.S., Wang, G., Choi, H., Hao, L., Drerup, C.M., Patel, R., Qamar, S., Nixon-Abell, J., Shen, Y., et al. (2019). RNA Granules Hitchhike on Lysosomes for Long-Distance Transport, Using Annexin A11 as a Molecular Tether. *Cell* *179*, 147–164.e20.
- Liddelov, S.A., and Barres, B.A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* *46*, 957–967.
- 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., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* *541*, 481–487.
- Lim, D., Semyanov, A., Genazzani, A., and Verkhratsky, A. (2021). Calcium signaling in neuroglia (Elsevier Inc.).
- Linnerbauer, M., Wheeler, M.A., and Quintana, F.J. (2020). II Review Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron* 1–15.
- Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 4825–4832.
- Liscic, R.M., Alberici, A., Cairns, N.J., Romano, M., and Buratti, E. (2020). From basic research to the clinic: innovative therapies for ALS and FTD in the pipeline. *Mol. Neurodegener.* *15*, 31.
- Loewenstein, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* *61*, 829–913.
- Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., and Beghi, E. (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *81*, 385–390.
- Ludewig, P., Winneberger, J., and Magnus, T. (2019). The cerebral endothelial cell as a key regulator of inflammatory processes in sterile inflammation. *J. Neuroimmunol.* *326*, 38–44.
- Lundgaard, I., Osório, M.J., Kress, B.T., Sanggaard, S., and Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* *276*, 161–173.
- Lutz, S.E., González-Fernández, E., Ventura, J.C.C., Pérez-Samartín, A., Tarassishin, L., Negoro, H., Patel, N.K., Suadicani, S.O., Lee, S.C., Matute, C., et al. (2013). Contribution of pannexin1 to experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* *8*, e66657.
- Mackenzie, I.R., Rademakers, R., and Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet. Neurol.* *9*, 995–1007.
- Mackenzie, I.R.A., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., et al. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann. Neurol.* *61*, 427–434.
- MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*.
- Madji Hounoum, B., Mavel, S., Coque, E., Patin, F., Vourc'h, P., Marouillat, S., Nadal-Desbarats,

- L., Emond, P., Corcia, P., Andres, C.R., et al. (2017). Wildtype motoneurons, ALS-Linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocyte metabolism and lactate shuttling. *Glia* 65, 592–605.
- Madry, C., and Attwell, D. (2015). Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. *J. Biol. Chem.* 290, 12443–12450.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 235–249.
- Magistretti, P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L., and Shulman, R.G. (1999). Energy on demand. *Science* 283, 496–497.
- Majcher, V., Goode, A., James, V., and Layfield, R. (2015). Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol. Cell. Neurosci.* 66, 43–52.
- Maniatis, S., Äijö, T., Vickovic, S., Braine, C., Kang, K., Mollbrink, A., Fagegaltier, D., Andrusivová, Ž., Saarenpää, S., Saiz-Castro, G., et al. (2019). Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 364, 89–93.
- Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 649–657.
- Martin, E., Aigrot, M.-S., Grenningloh, R., Stankoff, B., Lubetzki, C., Boschert, U., and Zalc, B. (2020). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition Promotes Myelin Repair. *Brain Plast. (Amsterdam, Netherlands)* 5, 123–133.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 277, 29626–29633.
- Matyash, M., Matyash, V., Nolte, C., Sorrentino, V., and Kettenmann, H. (2002). Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 84–86.
- Mayo, L., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2012). The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol. Rev.* 248, 170–187.
- Mayo, L., Trauger, S.A., Blain, M., Nadeau, M., Patel, B., Alvarez, J.I., Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Kivisäkk, P., Kallas, K., et al. (2014). Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat. Med.* 20, 1147–1156.
- Mayo, L., Cunha, A.P. Da, Madi, A., Beynon, V., Yang, Z., Alvarez, J.I., Prat, A., Sobel, R.A., Kobzik, L., Lassmann, H., et al. (2016). IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation. *Brain* 139, 1939–1957.
- McCarty, J.H., Lacy-Hulbert, A., Charest, A., Bronson, R.T., Crowley, D., Housman, D., Savill, J., Roes, J., and Hynes, R.O. (2005). Selective ablation of alpha v integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development* 132, 165–176.
- McFarland, H.F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8, 913–919.
- Meier, S.D., Kafitz, K.W., and Rose, C.R. (2008). Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56, 1127–1137.
- Merlini, M., Meyer, E.P., Ulmann-Schuler, A., and Nitsch, R.M. (2011). Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta Neuropathol.* 122, 293–311.
- Milicevic, K., Rankovic, B., Andjus, P.R., Bataveljic, D., and Milovanovic, D. (2022). Emerging Roles for Phase Separation of RNA-Binding Proteins in Cellular Pathology of ALS. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 1–12.
- Miljković, D., Momčilović, M., Stanojević, Z., Rašić, D., and Mostarica-Stojković, M. (2011). It is still not for the old iron: adjuvant effects of carbonyl iron in experimental autoimmune encephalomyelitis induction. *J. Neurochem.* 118, 205–214.

- Miller, D.H., and Leary, S.M. (2007). Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* *6*, 903–912.
- Mills Ko, E., Ma, J.H., Guo, F., Miers, L., Lee, E., Bannerman, P., Burns, T., Ko, D., Sohn, J., Soulika, A.M., et al. (2014). Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J. Neuroinflammation* *11*, 1–11.
- Milošević, M., Stenovec, M., Kreft, M., Petrušić, V., Stević, Z., Trkov, S., Andjus, P.R., and Zorec, R. (2013). Immunoglobulins G from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis affects cytosolic Ca²⁺ homeostasis in cultured rat astrocytes. *Cell Calcium* *54*, 17–25.
- Milošević, M., Milicević, K., Božić, I., Lavrnja, I., Stevanović, I., Bijelić, D., Dubaić, M., Ivković, I., Stević, Z., Giniatullin, R., et al. (2017). Immunoglobulins G from sera of amyotrophic lateral sclerosis patients induce oxidative stress and upregulation of antioxidative system in BV-2 microglial cell line. *Front. Immunol.* *8*.
- Mitsumoto, H., Santella, R.M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.-C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., et al. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Gr. Mot. Neuron Dis.* *9*, 177–183.
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X., and Parpura, V. (2004). Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2633–2642.
- Moore, C.S., Cui, Q.-L., Warsi, N.M., Durafourt, B.A., Zorko, N., Owen, D.R., Antel, J.P., and Bar-Or, A. (2015). Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J. Immunol.* *194*, 761–772.
- Morita, M., and Kudo, Y. (2010). Growth factors upregulate astrocyte [Ca²⁺]_i oscillation by increasing SERCA2b expression. *Glia* *58*, 1988–1995.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* *431*, 195–199.
- Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A., and Mills, K.H.G. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 641–651.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* *10*, 615–622.
- Nagy, D., Kato, T., and Kushner, P.D. (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* *38*, 336–347.
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S.C., and Brosnan, C.F. (2005). The cytokine IL-1β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* *49*, 245–258.
- Neher, J.J., Neniskyte, U., Hornik, T., and Brown, G.C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia* *62*, 1463–1475.
- das Neves, S.P., Sousa, J.C., Sousa, N., Cerqueira, J.J., and Marques, F. (2020). Altered astrocytic function in experimental neuroinflammation and multiple sclerosis. *Glia*.
- Nicaise, C., Mitrecic, D., Demetter, P., De Decker, R., Authélet, M., Boom, A., and Pochet, R. (2009). Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Res.* *1301*, 152–162.
- Nikolic, L., Shen, W., Nobili, P., Virenque, A., Ulmann, L., and Audinat, E. (2018). Blocking TNFα-driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. *Glia* *66*, 2673–2683.
- Nimmerjahn, A., and Bergles, D.E. (2015). Large-scale recording of astrocyte activity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *32*, 95–106.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly

- dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.
- Nobili, P., Shen, W., Milicevic, K., Bogdanovic Pristov, J., Audinat, E., and Nikolic, L. (2022). Therapeutic Potential of Astrocyte Purinergic Signalling in Epilepsy and Multiple Sclerosis. *Front. Pharmacol.* 13, 900337.
- Nolte, C., Möller, T., Walter, T., and Kettenmann, H. (1996). Complement 5a controls motility of murine microglial cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience* 73, 1091–1107.
- Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N., and Furukawa, Y. (2014). Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 289, 1192–1202.
- Norden, D.M., Trojanowski, P.J., Villanueva, E., Navarro, E., and Godbout, J.P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 64, 300–316.
- Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 122, 1180–1188.
- Obál, I., Jakab, J.S., Siklós, L., and Engelhardt, J.I. (2001). Recruitment of activated microglia cells in the spinal cord of mice by ALS IgG. *Neuroreport* 12, 2449–2452.
- Obál, I., Klausz, G., Mándi, Y., Deli, M., Siklós, L., and Engelhardt, J.I. (2016). Intraperitoneally administered IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis or from an immune-mediated goat model increase the levels of TNF- α , IL-6, and IL-10 in the spinal cord and serum of mice. *J. Neuroinflammation* 13, 121.
- Oikawa, H., Nakamichi, N., Kambe, Y., Ogura, M., and Yoneda, Y. (2005). An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J. Neurosci. Res.* 79, 535–544.
- Okada, M., Fukuyama, K., Shiroyama, T., and Ueda, Y. (2021). Brivaracetam prevents astroglial l-glutamate release associated with hemichannel through modulation of synaptic vesicle protein. *Biomed. Pharmacother.* 138, 111462.
- Oliveira, J.F., Riedel, T., Leichsenring, A., Heine, C., Franke, H., Krügel, U., Nörenberg, W., and Illes, P. (2011). Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X7 receptors sensing pathologically high ATP concentrations. *Cereb. Cortex* 21, 806–820.
- Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D. (2006). Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 26, 2661–2672.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 436–441.
- Palygin, O., Lalo, U., and Pankratov, Y. (2011). Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1755–1766.
- Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17803–17808.
- Pardo, A.C., Wong, V., Benson, L.M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2006). Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1G93A mice. *Exp. Neurol.* 201, 120–130.
- Parnis, J., Montana, V., Delgado-Martinez, I., Matyash, V., Parpura, V., Kettenmann, H., Sekler, I., and Nolte, C. (2013). Mitochondrial Exchanger NCLX Plays a Major Role in the Intracellular Ca²⁺ Signaling, Gliotransmission, and Proliferation of Astrocytes. *J. Neurosci.* 33, 7206–7219.
- Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121, 4–27.
- Patrushev, I., Gavrilov, N., Turlapov, V., and Semyanov, A. (2013). Subcellular location of

- astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication. *Cell Calcium* *54*, 343–349.
- Paul, D., Ge, S., Lemire, Y., Jellison, E.R., Serwanski, D.R., Ruddle, N.H., and Pachter, J.S. (2014). Cell-selective knockout and 3D confocal image analysis reveals separate roles for astrocyte- and endothelial-derived CCL2 in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* *11*, 10.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10625–10629.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* *32*, 421–431.
- Peric, M., Nikolic, L., Andjus, P.R., and Bataveljic, D. (2021). Dysfunction of oligodendrocyte inwardly rectifying potassium channel in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* *54*, 6339–6354.
- Pham, H., Ramp, A.A., Klonis, N., Ng, S.W., Klopstein, A., Ayers, M.M., and Orian, J.M. (2009). The astrocytic response in early experimental autoimmune encephalomyelitis occurs across both the grey and white matter compartments. *J. Neuroimmunol.* *208*, 30–39.
- Philips, T., and Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet. Neurol.* *10*, 253–263.
- Pick, T., Gamayun, I., Tinschert, R., and Cavalié, A. (2023). Kinetics of the thapsigargin-induced Ca(2+) mobilisation: A quantitative analysis in the HEK-293 cell line. *Front. Physiol.* *14*, 1127545.
- Piovesana, R., Salazar Intriago, M.S., Dini, L., and Tata, A.M. (2021). Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* *22*.
- Pivneva, T., Haas, B., Reyes-Haro, D., Laube, G., Veh, R.W., Nolte, C., Skibo, G., and Kettenmann, H. (2008). Store-operated Ca²⁺ entry in astrocytes: different spatial arrangement of endoplasmic reticulum explains functional diversity in vitro and in situ. *Cell Calcium* *43*, 591–601.
- Plog, B.A., and Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Pathol.* *13*, 379–394.
- Polyzos, A.A., Lee, D.Y., Datta, R., Hauser, M., Budworth, H., Holt, A., Mihalik, S., Goldschmidt, P., Frankel, K., Trego, K., et al. (2019). Metabolic Reprogramming in Astrocytes Distinguishes Region-Specific Neuronal Susceptibility in Huntington Mice. *Cell Metab.* *29*, 1258-1273.e11.
- Poon, H.F., Hensley, K., Thongboonkerd, V., Merchant, M.L., Lynn, B.C., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., and Butterfield, D.A. (2005). Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice--a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 453–462.
- Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 5073–5081.
- Prajeeth, C.K., Kronisch, J., Khoroshi, R., Knier, B., Toft-Hansen, H., Gudi, V., Floess, S., Huehn, J., Owens, T., Korn, T., et al. (2017). Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J. Neuroinflammation* *14*, 1–14.
- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3369–3374.
- Prins, M., Dutta, R., Baselmans, B., Brevé, J.J.P., Bol, J.G.J.M., Deckard, S.A., van der Valk, P., Amor, S., Trapp, B.D., de Vries, H.E., et al. (2014). Discrepancy in CCL2 and CCR2 expression in white versus grey matter hippocampal lesions of Multiple Sclerosis patients. *Acta Neuropathol. Commun.* *2*, 98.
- Proctor, J.M., Zang, K., Wang, D., Wang, R., and Reichardt, L.F. (2005). Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *J. Neurosci. Off. J.*

- Soc. Neurosci. 25, 9940–9948.
- Rajpurohit, C.S., Kumar, V., Cheffer, A., Oliveira, D., Ulrich, H., Okamoto, O.K., Zatz, M., Ansari, U.A., Khanna, V.K., and Pant, A.B. (2020). Mechanistic Insights of Astrocyte-Mediated Hyperactive Autophagy and Loss of Motor Neuron Function in SOD1(L39R) Linked Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 57, 4117–4133.
- Ransom, C.B., Ye, Z., Spain, W.J., and Richerson, G.B. (2017). Modulation of Tonic GABA Currents by Anion Channel and Connexin Hemichannel Antagonists. *Neurochem. Res.* 42, 2551–2559.
- Re, D.B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M.W., Politi, K.A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., et al. (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81, 1001–1008.
- Reichenbach, N., Delekate, A., Breithausen, B., Keppler, K., Poll, S., Schulte, T., Peter, J., Plescher, M., Hansen, J.N., Blank, N., et al. (2018). P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer’s disease model. *J. Exp. Med.* 215, 1649–1663.
- Reuss, B., and Unsicker, K. (2001). Atypical neuroleptic drugs downregulate dopamine sensitivity in rat cortical and striatal astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 197–209.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 566–578.
- Robinson, W.H., and Steinman, L. (2022). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science* 375, 264–265.
- Rodrigues, R.J., Marques, J.M., and Cunha, R.A. (2019). Purinergic signalling and brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 95, 34–41.
- Rojas, F., Cortes, N., Abarzua, S., Dyrda, A., and van Zundert, B. (2014). Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 24.
- Rojo, A.I., McBean, G., Cindric, M., Egea, J., López, M.G., Rada, P., Zarkovic, N., and Cuadrado, A. (2014). Redox control of microglial function: Molecular mechanisms and functional significance. *Antioxidants Redox Signal.* 21, 1766–1801.
- Romanic, A.M., Graesser, D., Baron, J.L., Visintin, I., Janeway, C.A.J., and Madri, J.A. (1997). T cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix is modulated upon transendothelial cell migration. *Lab. Invest.* 76, 11–23.
- Rose, C.R., Ziemens, D., and Verkhratsky, A. (2020). On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na(+)-transients into intracellular Ca(2+) signals. *Cell Calcium* 86, 102154.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O’Regan, J.P., Deng, H.-X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rothhammer, V., Heink, S., Petermann, F., Srivastava, R., Claussen, M.C., Hemmer, B., and Korn, T. (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of α 4 integrin expression during EAE. *J. Exp. Med.* 208, 2465–2476.
- Rothhammer, V., Kenison, J.E., Tjon, E., Takenaka, M.C., de Lima, K.A., Borucki, D.M., Chao, C.-C., Wilz, A., Blain, M., Healy, L., et al. (2017). Sphingosine 1-phosphate receptor modulation suppresses pathogenic astrocyte activation and chronic progressive CNS inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 2012–2017.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73–84.
- Sabirov, R.Z., Dutta, A.K., and Okada, Y. (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* 118, 251–266.
- Saleh, I.A., Zesiewicz, T., Xie, Y., Sullivan, K.L., Miller, A.M., Kuzmin-Nichols, N., Sanberg, P.R., and Garbuzova-Davis, S. (2009). Evaluation of humoral immune response in adaptive

- immunity in ALS patients during disease progression. *J. Neuroimmunol.* *215*, 96–101.
- Santello, M., Cali, C., and Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* *970*, 307–331.
- Santo-Domingo, J., and Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 907–912.
- Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* *12*, 627–636.
- Scemes, E., and Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* *54*, 716–725.
- Scemes, E., Suadicani, S.O., and Spray, D.C. (2000). Intercellular communication in spinal cord astrocytes: Fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J. Neurosci.* *20*, 1435–1445.
- Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., and Grassi, F. (2008). Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.* *1*, ra6.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., and Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *139 Suppl*, 27–33.
- Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., and Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1270–1272.
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (2002). Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 255–257.
- Schläger, C., Körner, H., Krueger, M., Vidoli, S., Haberl, M., Mielke, D., Brylla, E., Issekutz, T., Cabañas, C., Nelson, P.J., et al. (2016). Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature* *530*, 349–353.
- Schönrock, L.M., Gawlowski, G., and Brück, W. (2000). Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. *Neurosci. Lett.* *294*, 45–48.
- Seifert, G., and Steinhäuser, C. (1995). Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur. J. Neurosci.* *7*, 1872–1881.
- Sénécal, V., Deblois, G., Beauseigle, D., Schneider, R., Brandenburg, J., Newcombe, J., Moore, C.S., Prat, A., Antel, J., and Arbour, N. (2016). Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses. *Glia* *64*, 553–569.
- Serio, A., Bilican, B., Barmada, S.J., Ando, D.M., Zhao, C., Siller, R., Burr, K., Haggi, G., Story, D., Nishimura, A.L., et al. (2013). Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4697–4702.
- Sharp, A.J., Polak, P.E., Simonini, V., Lin, S.X., Richardson, J.C., Bongarzone, E.R., and Feinstein, D.L. (2008). P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* *5*, 1–13.
- Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G., and Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann. Neurol.* *38*, 691–695.
- Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieder, F., and Audinat, E. (2017). An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Sci. Rep.* *7*, 11280.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., and Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* *917*, 97–104.
- Shideman, C.R., Hu, S., Peterson, P.K., and Thayer, S.A. (2006). CCL5 evokes calcium signals in microglia through a kinase-, phosphoinositide-, and nucleotide-dependent mechanism. *J. Neurosci. Res.* *83*, 1471–1484.

- Shigetomi, E., Kracun, S., Sofroniew, M. V, and Khakh, B.S. (2010). A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nat. Neurosci.* *13*, 759–766.
- Shigetomi, E., Bushong, E.A., Haustein, M.D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., Xu, J., Sofroniew, M. V, Ellisman, M.H., and Khakh, B.S. (2013a). Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J. Gen. Physiol.* *141*, 633–647.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O’Dell, T.J., and Khakh, B.S. (2013b). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 10143–10153.
- Sidoryk-Węgrzynowicz, M., and Strużyńska, L. (2021). Astroglial and Microglial Purinergic P2X7 Receptor as a Major Contributor to Neuroinflammation during the Course of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* *22*.
- Sierra, A., Paolicelli, R.C., and Kettenmann, H. (2019). Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research Trends in Neurosciences. *Trends Neurosci.* *42*, 778–792.
- Siffrin, V., Radbruch, H., Glumm, R., Niesner, R., Paterka, M., Herz, J., Leuenberger, T., Lehmann, S.M., Luenstedt, S., Rinnenthal, J.L., et al. (2010). In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* *33*, 424–436.
- Siklós, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joó, F., and Appel, S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *39*, 203–216.
- Silverman, W.R., de Rivero Vaccari, J.P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S.K., Scemes, E., Keane, R.W., and Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* *284*, 18143–18151.
- Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* *129*, 877–896.
- Simões, A.P., Silva, C.G., Marques, J.M., Pochmann, D., Porciúncula, L.O., Ferreira, S., Oses, J.P., Beleza, R.O., Real, J.I., Köfalvi, A., et al. (2018). Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell Death Dis.* *9*, 297.
- Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* *62*, 1758–1765.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroffe, M.N. (2000). Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *26*, 133–142.
- Slack, R.J., Macdonald, S.J.F., Roper, J.A., Jenkins, R.G., and Hatley, R.J.D. (2022). Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *21*, 60–78.
- Smith-Bouvier, D.L., Divekar, A.A., Sasidhar, M., Du, S., Tiwari-Woodruff, S.K., King, J.K., Arnold, A.P., Singh, R.R., and Voskuhl, R.R. (2008). A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J. Exp. Med.* *205*, 1099–1108.
- Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., and Appel, S.H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *44*, 696–699.
- Smyth, J.T., Hwang, S.-Y., Tomita, T., DeHaven, W.I., Mercer, J.C., and Putney, J.W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 2337–2349.
- Snyder, S.H., and Kim, P.M. (2000). D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine. *Neurochem. Res.* *25*, 553–560.
- Sofroniew, M. V (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638–647.
- Sofroniew, M. V (2015a). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*,

- Sofroniew, M. V (2015b). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, a020420.
- Sofroniew, M. V (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol.* 41, 758–770.
- Sperlágh, B., and Illes, P. (2014). P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 537–547.
- Stamenković, S., Pavićević, A., Mojović, M., Popović-Bijelić, A., Selaković, V., Andjus, P., and Bačić, G. (2017a). In vivo EPR pharmacokinetic evaluation of the redox status and the blood brain barrier permeability in the SOD1(G93A) ALS rat model. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 258–269.
- Stamenković, S., Dučić, T., Stamenković, V., Kranz, A., and Andjus, P.R. (2017b). Imaging of glial cell morphology, SOD1 distribution and elemental composition in the brainstem and hippocampus of the ALS hSOD1(G93A) rat. *Neuroscience* 357, 37–55.
- Steinman, L., Fox, E., Hartung, H.-P., Alvarez, E., Qian, P., Wray, S., Robertson, D., Huang, D., Selmaj, K., Wynn, D., et al. (2022). Ublituximab versus Teriflunomide in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 387, 704–714.
- Stenovec, M., Milošević, M., Petrušić, V., Potokar, M., Stević, Z., Prebil, M., Kreft, M., Trkov, S., Andjus, P.R., and Zorec, R. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins G enhance the mobility of Lysotracker-labelled vesicles in cultured rat astrocytes. *Acta Physiol. (Oxf).* 203, 457–471.
- Suadicani, S.O., De Pina-Benabou, M.H., Urban-Maldonado, M., Spray, D.C., and Scemes, E. (2003). Acute downregulation of Cx43 alters P2Y receptor expression levels in mouse spinal cord astrocytes. *Glia* 42, 160–171.
- Sun, J.-J., Liu, Y., and Ye, Z.-R. (2008). Effects of P2Y1 receptor on glial fibrillary acidic protein and glial cell line-derived neurotrophic factor production of astrocytes under ischemic condition and the related signaling pathways. *Neurosci. Bull.* 24, 231–243.
- Tan, C.-F., Eguchi, H., Tagawa, A., Onodera, O., Iwasaki, T., Tsujino, A., Nishizawa, M., Kakita, A., and Takahashi, H. (2007). TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol.* 113, 535–542.
- Tanigami, H., Okamoto, T., Yasue, Y., and Shimaoka, M. (2012). Astroglial integrins in the development and regulation of neurovascular units. *Pain Res. Treat.* 2012, 964652.
- Tarasov, A.I., Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca²⁺. *Cell Calcium* 52, 28–35.
- Tassoni, A., Farkhondeh, V., Itoh, Y., Itoh, N., Sofroniew, M. V, and Voskuhl, R.R. (2019). The astrocyte transcriptome in EAE optic neuritis shows complement activation and reveals a sex difference in astrocytic C3 expression. *Sci. Rep.* 9, 10010.
- Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., and Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 223, 87–113.
- Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487, 88–98.
- Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., Li, F., Zhou, H., and Xia, X.-G. (2013). Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO J.* 32, 1917–1926.
- Traaseth, N., Elfering, S., Solien, J., Haynes, V., and Giulivi, C. (2004). Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 64–71.
- Tran, M.D., Wanner, I.B., and Neary, J.T. (2008). Purinergic receptor signaling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 105, 272–286.
- Treiman, M., Caspersen, C., and Christensen, S.B. (1998). A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 131–135.

- Trnka, F., Hoffmann, C., Wang, H., Sansevrino, R., Rankovic, B., Rost, B.R., Schmitz, D., Schmidt, H.B., and Milovanovic, D. (2021). Aberrant Phase Separation of FUS Leads to Lysosome Sequestering and Acidification. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 716919.
- Troost, D., van den Oord, J.J., de Jong, J.M., and Swaab, D.F. (1989). Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neuropathol.* 8, 289–294.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C.J., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.* 15, 601–609.
- Vahsen, B.F., Gray, E., Thompson, A.G., Ansorge, O., Anthony, D.C., Cowley, S.A., Talbot, K., and Turner, M.R. (2021). Non-neuronal cells in amyotrophic lateral sclerosis — from pathogenesis to biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* 17, 333–348.
- Vainchtein, I.D., and Molofsky, A. V. (2020). Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* 43, 144–154.
- Vardjan, N., Parpura, V., Verkhratsky, A., and Zorec, R. (2019). Gliocrine system: Astroglia as secretory cells of the CNS. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1175, 93–115.
- Vélez-Fort, M., Audinat, E., and Angulo, M.C. (2012). Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neurosci. a Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 18, 237–250.
- Verkhratsky, A., and Burnstock, G. (2014). Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *Bioessays* 36, 697–705.
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389.
- Verkhratsky, A., and Parpura, V. (2014). Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neurosci. Bull.* 30, 125–133.
- Verkhratsky, A., Rodríguez, J.J., and Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 45–56.
- Verkhratsky, A., Parpura, V., Vardjan, N., and Zorec, R. (2019). Physiology of Astroglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1175, 45–91.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A.C., Giuliani, A.L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31.
- Volonté, C., and Amadio, S. (2022). Rethinking purinergic concepts and updating the emerging role of P2X7 and P2X4 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 221.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 327–335.
- Van Der Voorn, P., Tekstra, J., Beelen, R.H., Tensen, C.P., Van Der Valk, P., and De Groot, C.J. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 154, 45–51.
- Voskuhl, R.R., and Gold, S.M. (2012). Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 255–263.
- Voskuhl, R.R., Peterson, R.S., Song, B., Ao, Y., Morales, L.B.J., Tiwari-Woodruff, S., and Sofroniew, M. V (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11511–11522.
- Walsh, C., Barrow, S., Voronina, S., Chvanov, M., Petersen, O.H., and Tepikin, A. (2009). Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1374–1382.
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., et al. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler. J.* 26, 1816–1821.

- Wang, A., Yang, T., Zhang, L., Jia, L., Wu, Q., Yao, S., Xu, J., and Yang, H. (2018). IP3-Mediated Calcium Signaling Is Involved in the Mechanism of Fractalkine-Induced Hyperalgesia Response. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *24*, 8804–8811.
- Wang, D., Ayers, M.M., Catmull, D. V, Hazelwood, L.J., Bernard, C.C.A., and Orian, J.M. (2005). Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* *51*, 235–240.
- Wang, S., Wang, B., Shang, D., Zhang, K., Yan, X., and Zhang, X. (2022). Ion Channel Dysfunction in Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Front. Physiol.* *13*, 814285.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.-F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* *9*, 816–823.
- Wang, X., Haroon, F., Karray, S., Deckert, M., and Schlüter, D. (2013). Astrocytic Fas ligand expression is required to induce T-cell apoptosis and recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *43*, 115–124.
- Wheeler, M.A., Clark, I.C., Tjon, E.C., Li, Z., Zandee, S.E.J., Couturier, C.P., Watson, B.R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., et al. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature* *578*, 593–599.
- Woo, D.H., Han, K.-S., Shim, J.W., Yoon, B.-E., Kim, E., Bae, J.Y., Oh, S.-J., Hwang, E.M., Marmorstein, A.D., Bae, Y.C., et al. (2012). TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell* *151*, 25–40.
- Wu, D.-C., Ré, D.B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12132–12137.
- Xiong, Y., Sun, S., Teng, S., Jin, M., and Zhou, Z. (2018). Ca(2+)-Dependent and Ca(2+)-Independent ATP Release in Astrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 224.
- Yamanaka, K., and Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci. Res.* *126*, 31–38.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* *11*, 251–253.
- Yang, J., Vitery, M.D.C., Chen, J., Osei-Owusu, J., Chu, J., and Qiu, Z. (2019). Glutamate-Releasing SWELL1 Channel in Astrocytes Modulates Synaptic Transmission and Promotes Brain Damage in Stroke. *Neuron* *102*, 813-827.e6.
- Yi, F.H., Lautrette, C., Vermot-desroches, C., Bordessoule, D., Couratier, P., and Wijdenes, J. (2000). In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *109*, 211–220.
- Young, S.Z., Platel, J.-C., Nielsen, J. V, Jensen, N.A., and Bordey, A. (2010). GABA(A) Increases Calcium in Subventricular Zone Astrocyte-Like Cells Through L- and T-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Front. Cell. Neurosci.* *4*, 8.
- Yu, Y., Schürpf, T., and Springer, T.A. (2013). How natalizumab binds and antagonizes α 4 integrins. *J. Biol. Chem.* *288*, 32314–32325.
- Zang, D.W., Yang, Q., Wang, H.X., Egan, G., Lopes, E.C., and Cheema, S.S. (2004). Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 1745–1751.
- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., and Haydon, P.G. (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9441–9446.
- Zhang, W., Xiao, D., Mao, Q., and Xia, H. (2023). Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduct. Target. Ther.* *8*, 267.
- Zhao, W., Beers, D.R., Bell, S., Wang, J., Wen, S., Baloh, R.H., and Appel, S.H. (2015). TDP-43 activates microglia through NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Exp. Neurol.* *273*, 24–35.
- Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M.K., Stojanovic, K., Sagare,

- A., Boillee, S., Cleveland, D.W., et al. (2008). ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat. Neurosci.* *11*, 420–422.
- Zlokovic, B. V (2008). Review The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *2*, 178–201.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* *6*, 43–50.

BIOGRAFIJA AUTORA

Katarina D. Milićević je rođena 22. 12. 1993. u Čačku gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, je upisala 2012. godine, a diplomirala 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,90. Iste godine je upisala master akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a završila je 2017. sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranom master rada „Efekat imunoglobulina G iz seruma obolelih od amiotrofične lateralne skleroze i aktivacija BV-2 ćelijske linije”. Doktorske studije je upisala 2017. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, modul Neurofiziologija: od ćelije do ponašanja.

Od januara 2018. godine je zaposlena u Centru za lasersku mikroskopiju na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske teze. Bila je angažovana na jednom nacionalnom projektu, 4 međunarodna projekta i dve COST akcije u okviru kojih je bila na naučnom usavršavanju na Univerzitetu Istočne Finske, Kuopio, Finska, Jeditepe Univerzitetu, Istanbul, Turska, Univerzitetu u Konektikatu, Framington, Konektikat, SAD i u Nemačkom Centru za Neurodegenerativne bolesti (DZNE), Berlin, Nemačka.

Katarina Milićević je član Društva za Neuronauke Srbije, Evropske federacije društava za neuronauke (FENS), Evropskog društva za neurohemiju (ESN) i Internaconalnog društva za neurohemiju (ISN). Koautor je 9 naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima M20 kategorije (8 kategorije M21 i 1 kategorije M23). Koautor je 15 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 2 saopštenja na nacionalnim skupovima.

Rezultati predstavljeni u doktroskoj disertaciji publikovani su u radovima:

- Bijelić, D., **Milićević, K.**, Lazarević, M, Miljković, D., Bogdanović Pristov, J., Savić, D., Petković, B., Andjus, P., Momčilović, M., Nikolić., L. (2020) Central nervous system-infiltrated immune cells, induce calcium increase in astrocytes via astroglial purinergic signaling. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.24699> M21 (58/272 Neurosciences), IF2019 4,699

- **Milićević, K.**, Korenić, A., Milošević, M., Andjus, P. (2022). Primary Cultures of Rat Astrocytes and Microglia and Their Use in the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. <https://doi.org/10.3791/63483> M23 (52/74 Multidisciplinary Scinces), IF2021 1,424

- **Milicevic, K.**, Bataveljic, D., Bogdanovic Pristov, J., Andjus, P., Nikolic, L. (2023). Astroglial Cell-to-Cell Interaction with Autoreactive Immune Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Involves P2X7 Receptor, β 3-Integrin, and Connexin-43. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells12131786> M21 (51/195 Cell Biology) IF2021 7,666

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Катарина Д. Милићевић

број индекса Б3001/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Катарина Д. Милићевић

Број индекса Б3001/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у
инфламацијским процесима централног нервног система

Ментор Др Љиљана Николић

Др Милена Милошевић

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољаваће 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 прераде. Дозвољаваће 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. Дозвољаваће 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 прераде. Дозвољаваће 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. Дозвољаваће 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.