

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija B. Adžić

ULOGA EKTO-5'-NUKLEOTIDAZE (CD73)
U INFLAMATORNOJ AKTIVACIJI I
MIGRACIJI ASTROCITA

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija B. Adžić

THE ROLE OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE
(CD73) IN INFLAMMATORY ASTROCYTE
ACTIVATION AND MIGRATION

Ph.D. thesis

Belgrade, 2019

Mentor:

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. dr Irena Lavrnja, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

3. dr Đorđe Miljković, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

4. dr Aleksandra Isaković, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

5. dr Danijela Laketa, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije je urađen na Institutu za fiziologiju i biohemiju „Ivan Đaja“, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, najvećim dijelom u Centru za lasersku mikroskopiju, kao i u Laboratoriji za neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Ova doktorska disertacija pripada projektu „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (projekat III41014) finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kojim rukovodi dr Sanja Peković.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Nadeždi Nedeljković, koja mi je prvenstveno ukazala bezuslovno povjerenje i pružila mogućost da počnem svoj naučni rad u oblasti neurobiologije, koja je oduvijek bila moj primarni interes tokom osnovnih studija i izrade diplomskog rada. Privilegija je sticati znanje uz mentorku koja je uvijek strpljivo ulagala svoj trud i vrijeme kako bi oblikovala moj naučni rad i razvoj. Zahvaljujem joj na nesebičnoj pomoći pri pisanju naučnih radova koji su proizašli iz ove doktorske disertacije, kao i na svakom savjetu i podršci. Dodatno, veliko hvala na pomoći i svim sugestijama u procesu izrade i oblikovanja same doktorske disertacije, tokom koje sam znanje dodatno „naoštrila“ uz ogromno iskustvo prof. dr Nedeljković. Na kraju zahvaljujem se svojoj mentorki na prijateljskoj podršci i ohrabrenju kada mi je to bilo najpotrebnije.

Dr Danijeli Laketi hvala na podršci, pomoći i ukazanom povjerenju tokom mog učestvovanja na praktičnom dijelu kursa iz Opšte fiziologije, kao i na svakom naučnom i prijateljskom savjetu tokom proteklih godina. Hvala na sugestijama pri izradi ove teze.

Zahvaljujem dr Ireni Lavrnji na svim savjetima, pomoći i podršci i posebno hvala na sugestijama vezanim za izradu i odbranu ove disertacije.

Hvala prof. dr Aleksandri Isaković i dr Đorđu Miljkoviću na korisnim komentarima i predlozima koji su doprinijeli konačnom obliku ove doktorske disertacije.

Hvala i članovima projekta dr Sanji Peković, dr Ivani Bjeobabi, dr Danijeli Savić, dr Sanji Dacić i dr Ivi Božić na podjeljenom iskustvu, prijatnim momentima zbog kojih sam se uvijek osjećala dobrodošlo. Hvala mojoj dugogodišnjoj kolegini i prijateljici Mariji Jakovljević na podršci, ohrabrenjima, podijeljenom znanju i svim prelijepim zajedničkim momentima još od osnovnih studija. Hvala mlađim kolegama Marini, Miloradu, Ani i Katarini koji su unijeli novu energiju i svježinu u svakodnevni rad.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Pavlu Anđusu, koji je omogućio da najveći eksperimentalni dio ove teze bude urađen u laboratoriji Centra za lasersku mikroskopiju, čiji je rukovodilac. Hvala na neizmjernom razumijevanju, ukazanom povjerenju i pruženoj

prilici da radim i učim kao ravnopravan član tima mladih ljudi, da imam punu slobodu korišćenja raspoložive opreme, tehnika, resursa i pomoći Centra za lasersku mikroskopiju.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem dr Mileni Milošević koja je nesebično podijelila svoja znanja o radu sa ćelijskim kulturama, ali i brojnim drugim metodama, koja me je naučila da kritički pristupam eksperimentalnom radu, da adekvatno i odgovorno vodim računa o laboratoriji, opremi i materijalima. Hvala joj na svim savjetima, povjerenju, podršci i povrh svega na prijateljstvu od prvog dana.

Neizmjerne želim da zahvalim kolegici i prijateljici Dunji Bijelić, uz koju sam učila, radila i razmišljala, koja je u svakom pogledu nesebično dijelila kreativnost, ideje i znanje sa mnom, ohrabivala me i bila snažna podrška kada god je to bilo potrebno i bez koje ne mogu da zamislim protekle godine. Zahvaljujem Mini Perić na podršci i prijateljstvu, nezaboravnim momentima i šalama, kao i svim kolegama iz Centra za lasersku mikroskopiju Veri, Stefanu, Andreju i Katarini na druženju, savjetima i fenomenalnoj atmosferi u laboratoriji i van nje.

Zahvaljujem svim kolegama sa katedre za Uporednu fiziologiju i ekofiziologiju koji su mi omogućili rad u njihovoj laboratoriji kada je to bilo potrebno. Hvala Peđi, Ivi, Nebojši, Tanji i Tamari na uvijek prijatnoj atmosferi.

Zahvaljujem i svim ostalim članovima zaposlenim na Institutu za fiziologiju i biohemiju, naročito mlađim kolegama Jovanu i Milošu, kao i kolegama sa drugih instituta kako na Biološkom fakultetu tako i u Beogradu, koji su doprinijeli da cjelokupan rad bude lakši i vedriji uz druženje i specifičan naučni humor.

Hvala mojim prijateljima iz djetinjstva Anđeli i Vuku sa kojima, od prvih naučenih slova, dijelim sve dobro i loše što se našlo na putu svih godina obrazovanja i života, i koji su uvijek imali vremena za mene, ali i strpljenja. Takođe, hvala mojim prijateljima, koje je teško sve pobrojati, na svakom divnom trenutku, riječima i optimizmu.

Neizmjerne sam zahvalna svom ocu i sestri, i svom partneru Saši, na razumijevanju, strpljenju, безусловnoj ljubavi i podršci, riječima utjehe, ohrabrenja i na najiskrenijem radovanju svim mojim uspjesima i postignućima. Hvala mojoj široj porodici, kao i onima koji nisu više sa nama, a od kojih sam potekla.

Marija Adžić

ULOGA EKTO-5'-NUKLEOTIDAZE (CD73) U INFLAMATORNOJ AKTIVACIJI I MIGRACIJI ASTROCITA

REZIME

Neuroinflamacija je urođeni akutni imunski proces u centralnom nervnom sistemu, koji ima za cilj oporavak tkivne homeostaze nakon metaboličke, mehaničke i ishemijske povrede ili infekcije patogenima. Centralnu ulogu u neuroinflamaciji imaju rezidentne ćelije CNS, astrociti i mikroglija, i veliki broj reaktivnih, signalnih i trofičkih molekula, koje štite nervno tkivo od daljih oštećenja i pokreću proces rezolucije i oporavka. Neodgovarajuća ili nedovoljno izvedena rezolucija vodi ka hroničnoj neuronflamaciji i neurodegeneraciji. Dok je karakter akutne neuroinflamacije reaktivni i zaštitni, hronična forma dovodi do glioze i autoimunske reakcije i predstavlja osnovu za razvoj brojnih neuropatologija.

Jedan od prvih fenomena u inicijalnoj fazi neuroinflamacije jeste aktivacija astrocita, koja podrazumjeva brojne morfološke i funkcionalne promjene. Te su promjene inicirane signalima opasnosti (DAMP), među kojima je jedan od najvažnijih ATP. Ovaj purinski nukleotid se oslobađa u vanćelijsku sredinu, gdje preko svojih P2 receptora, djeluje kao „nađi me“ signal za astrocite i mikrogliju. U vanćelijskoj sredini se ATP razgrađuje djelovanjem enzima ektonukleotidaza, koje sekvencijalno razgrađuju ATP do adenzina. Adenzin je takođe signalni molekul, koji djelujući na svoje P1 receptore, ostvaruje homeostatske i imunosupresivne uloge. Ektonukleotidaze svojom aktivnošću kontrolišu odnos koncentracija ATP/adenzina u vanćelijskom prostoru, a u tom smislu ključni enzim je ekto-5'-nukleotidaza (eN/CD73). Ovaj enzim katalizuje konverziju AMP u adenzin, ali i funkcioniše kao ćelijski adhezivni molekul za interakciju sa molekulima vanćelijskog matriksa. Brojna istraživanja su pokazala da u akutnoj ili hroničnoj neuroinflamaciji, naročito na reaktivnim astrocitima, dolazi do snažne ushodne regulacije *Nt5e* gena, a takođe i do posledičnih promjena na nivou količine proteina i aktivnosti eN/CD73.

Stoga je cilj ove doktorske disertacije bilo ispitivanje uloge eN/CD73, polaznog supstrata ektonukleotidaza - ATP-a, i proizvoda reakcije eN/CD73 - adenzina, u aktivaciji i migraciji astrocita. Studija je izvedena na primarnoj kulturi astrocita izolovanoj iz kore prednjeg mozga novorođenih pacova. Rezultati dobijeni tokom ovog istraživanja pokazuju da ATP dovodi do nastanka protektivnog reaktivnog fenotipa astrocita, jer ATP izaziva reorganizaciju mikrofilamenata i prelaznih filamenata, tipičnu promjenu morfologije ćelija, povećanje proliferacije i ubrzanje migracije astrocita, naročito pri višim koncentracijama (1 mM). ATP podstiče antioksidativnu zaštitu ćelija, povećanjem aktivnosti Cu/ZnSOD i MnSOD i ukupnog sadržaja glutationa, a ne dovodi do povećanja oksidativnog stresa i ne inicira oslobađanje IL-1 β . Adenzin, koji nastaje radom eN/CD73, povećava proliferaciju astrocita, ali ne utiče na organizaciju citoskeletnih elemenata i smanjuje migratorni kapacitet. Kada je riječ o njihovom uticaju na ekspresiju eN/CD73, ATP stimuliše, dok adenzin ne utiče na nivo ekspresije i aktivnosti eN/CD73.

Uloga eN/CD73 u aktivaciji i migraciji astrocita izučena je u istom *in vitro* sistemu u kojem su prisustvo i/ili funkcija ovog enzima blokirani primjenom različitih strategija: a) farmakološki, primjenom kompetitivnog inhibitora α,β -metilen-ADP (APCP), imunskom blokadom, primjenom specifičnih antitijela na eN/CD73 koja se vezuju za eN/CD73 i maskiraju i blokiraju njegovu aktivnost ili genetički, transfekcijom ćelija malom utišavajućom RNK (siCD73-RNK), koja depletira nativnu eN/CD73-iRNK i sprječava sintezu eN/CD73 proteina. Studija je pokazala da inhibicija eN/CD73 ili smanjeno prisustvo na membrani astrocita smanjuju produkciju adenzina i proliferaciju astrocita, a povećava migraciju astrocita u kulturi. Maskiranje eN/CD73 specifičnim antitijelom dovodi i do isjecanja eN/CD73 iz membrane i oslobađanja solubilne forme u medijum, kao i do aktivacije unutarćelijske kaskade aktivirane ERK1/2. Na osnovu ovih eksperimenata zaključeno je eN/CD73 podstiče adheziju astrocita za podlogu, odnosno, da uklanjanje sa membrane, koje može biti regulisano signalnim faktorima, povećava njihovu pokretljivost.

Stoga smo u daljim istraživanjima željeli da utvrdimo da li inflamatorni faktori, koji dovode do polarizacije astrocita prema inflamatornom A1 ili protektivnom, A2 fenotipu, učestvuju u regulaciji ekspresije, posttranslacionim modifikacijama i aktivnosti eN/CD73.

Rezultati su pokazali da pro-inflamatorni citokini, bilo da vode astrocite ka A1 (TNF- α , IL-1 β i LPS) ili A2 (IL-6, ATP) fenotipu, povećavaju ekspresiju eN/CD73, što navodi na zaključak da je povećanje ekspresije eN/CD73 jedan od univerzalnih aspekata reaktivne astroglioze, nezavisno od funkcionalne polarizacije astrocita.

Brojni su literaturni podaci iz oblasti biologije kancera, koji pokazuju da eN/CD73, proizvodeći adenzin, suprimira imunski nadzor, podstiče rast i metastatski potencijal tumora. Poslednjih godina su stoga sintetisani brojni kompetitivni i nekompetitivni inhibitori i specifična antitijela usmjerena ka eN/CD73. Na osnovu podataka iz ove doktorske disertacije, možemo zaključiti da je manipulacija eN/CD73 izuzetno privlačna strategija i u regulaciji neuroinflamacije, naročito ako se kombinuje sa modulacijom aktivnosti adenzinskih receptora.

KLJUČNE RIJEČI: ekto-5'-nukleotidaza, CD73, adenzin, ATP, neuroinflamacija, astrociti, reaktivna astrogliozna, migracija, ćelijska kultura

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

THE ROLE OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE (CD73) IN INFLAMMATORY ASTROCYTE ACTIVATION AND MIGRATION

ABSTRACT

Neuroinflammation is an innate and acute immune response of the central nervous system, with a physiological purpose of restoring the tissue homeostasis, endangered by a metabolic, ischemic and physical injury or pathogen invasion. Physiological significance of acute neuroinflammation is to protect the tissue from further damage and to support the recovery and restore the homeostasis. Central role in neuroinflammation is performed by resident glial cells, astrocytes, and microglia, which produce and liberate various reactive, signaling and trophic molecules, to restrict and protect the tissue from further damage and initiate the process of resolution and reparation. However, insufficient or inadequate resolution may lead to chronic neuroinflammation and neurodegeneration. While the nature of acute neuroinflammation is reactive and protective, chronic neuroinflammation leads to fibrosis and autoimmune reaction, which are the basis of many neuropathological conditions.

One of the first events in neuroinflammation is activation of astrocytes, which comprises prominent morphological and functional changes of the cells. The changes are initiated by danger signals (DAMP), among which ATP has a particularly important role. Challenged or dying cells massively release the purine nucleotide into the extracellular space, where it acts upon its P2 purinoreceptors as a „find me“ signal for astrocytes and microglia. Extracellular ATP is degraded by ectonucleotidase enzyme chain, which sequentially hydrolyzes ATP to adenosine. Nucleoside adenosine is also a very strong signal, which acts upon P1 adenosine receptors, to impose its homeostatic and immunosuppressive actions. Ectonucleotidases control the ratio of ATP/adenosine in the extracellular milieu, thus determining the inflammatory state of the tissue. As the only enzyme which produces adenosine in the extracellular space and the rate-limiting enzyme of the cascade, ecto-5'-nucleotidase (eN/CD73) plays a critical role in this matter. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 hydrolyzes conversion of AMP to adenosine, but it also functions as

cell adhesive molecule which interacts with extracellular matrix components. Numerous studies convincingly show massive upregulation of *Nt5e* and activity of eN/CD73 in reactive astrocytes, in several acute and chronic neuroinflammatory paradigms.

Therefore, the objective of this doctoral thesis was to reveal the involvement of eN/CD73, the starting substrate of ectonucleotidase chain – ATP and the product of eN/CD73 catalytic action – adenosine, in the activation and migration of astrocytes. The study was performed in primary astrocyte culture isolated from the cortex of newborn rats. The results obtained point to ATP as a signal which promotes the development of protective astrocyte phenotype, as it induces microfilament and intermediate filament reorganization, morphological changes typical for reactive astrocytes and increased migratory capacity, particularly in the presence of the highest nucleotide concentration (1 mM). ATP promotes the antioxidative system of astrocytes, by increasing the activities of Cu/ZnSOD and MnSOD and the glutathione content, but it does not increase oxidative stress, nor it induces the release of IL-1 β by astrocytes. On the other side, adenosine, produced by eN/CD73, promotes astrocytes proliferation, does not induce cytoskeletal element reorganization and decreases migration of astrocytes *in vitro*. Concerning their effect on eN/CD73, ATP stimulates, while adenosine does not affect expression nor function of eN/CD73 in cortical astrocytes *in vitro*.

The roles of eN/CD73 in astrocyte activation and migration are described in the same *in vitro* system, in which the presence and/or function of eN/CD73 has been blocked by using three different strategies: a) pharmacological blockade induced by competitive inhibitor α,β -methylene-ADP (APCP), b) immunological blockade, with specific anti-eN/CD73 antibodies, which bind to and mask the presence of eN/CD73 at the cell surface, and c) gene silencing, with siRNA-eN/CD73 which prevents eN/CD73 translation by interfering with native eN/CD73-mRNA. The study shows that inhibition of eN/CD73 or decreased exposure of the molecule at the cell surface, reduce adenosine production and astrocyte proliferation, and speed up astrocyte migration in the scratch wound assay. Anti-eN/CD73 antibodies induce shedding of the eN/CD73 molecules and their release in the culture medium and initiate ERK1/2 signaling. The results suggest that eN/CD73 promotes

adhesion of astrocytes, while its elimination from astrocyte surface, which may be induced by signaling molecules, increase migration.

We further tested whether the inflammatory cytokines which have a role in A1 vs. A2 astrocyte polarization, regulate or affect the expression of eN/CD73 in astrocytes. It was shown that both the proinflammatory cytokines which polarize astrocytes toward the A1 phenotype (TNF- α , IL-1 β and LPS) and A2 phenotype (IL-6, ATP), up-regulate expression and function of eN/CD73. These findings lead us to conclude that up-regulation of eN/CD73 is one of the universal aspects of astrocytes activation, irrespective of the functional astrocyte state.

Growing evidence accumulated in recent years link eN/CD73 and adenosine with cancer progression and immune escape, and number of novel eN/CD73-targeting drugs, competitive and non-competitive inhibitors and monoclonal antibodies have been developed. The results obtained in this doctoral thesis suggest that manipulation of eN/CD73 may be a potential strategy in the modulation of neuroinflammatory response too, particularly if it is combined with modulation of astrocyte receptor activation and modulation of the purinergic signaling system as a whole.

KEY WORDS: ecto-5'-nucleotidases, CD73, adenosine, ATP, neuroinflammation, astrocytes, reactive astrogliosis, migration, cell culture

SCIENTIFIC FIELD: Biology

NARROWER SCIENTIFIC FIELD: Neurobiology

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etil benzo-tiazoline-6-sulfonska kiselina)

AD (*engl.* Alzheimer's disease) - Alchajmerova boleost

Ado - adenzin

ADP - natrijumova so adenzin difosfata

ALS - amiotrofična lateralna skleroza

AMP - adenzin monofosfat

AP - alkalna fosfataza

APCP - α,β -metilene ADP

ATP - adenzin trifosfat

BDNF - neurotrofni faktor porijeklom iz mozga

BSA – albumin govedeg seruma

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CNS - centralni nervni sistem

Cu/ZnSOD – bakar/cink superoksid-dizmutaza

DAMP - molekulski obrasci sopstvenih signala opasnosti

DEPC - dietil-pirokarbonat

DMEM - Dulbekova modifikacija Eaglovog medijuma

DMSO - dimetil sulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EDTA - etilen diamin tetra-sirćetna kiselina

EGTA – etilen glikol tetra-sirćetna kiselina

ERK - kinaza regulisana vanćelijskim signalima

FBS - fetalni goveđi serum

GABA - gama-aminobuterna kiselina

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GFAP - glijski fibrilarni kiseli protein
H₂O₂ – vodonik peroksid
HD (*engl.* Huntington disease) - Hantingtonova bolešt
IFN- γ - interferon gama
Ig - imunoglobulini
IL-10 - interleukin-10
IL-17 - interleukin-17
IL-1 β - interleukin 1-beta
IL-6 - interleukin-6
iRNK - informacijska RNK
JAK - janus kinaza
KMB – krvno-moždana barijera
L-15 - Lajbović medijum
LPS – bakterijski lipopolisaharid
MAPK - mitogenom aktivirana protein kinaza
MDA - malondialdehid
MnSOD - mangan superoksi-dismutaza
MS - multipla skleroza
MTT - metil-tiazolil-difenil tetrazolijum bromid
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotidfosfat
NDS - magareći serum
NF- κ B - jedarni faktor- κ B
NO - azot-monoksid
NOS - azot-monoksid sintaza
O₂^{-•} - super-oksid anjon
Opti-MEM - minimalno potrebnii medijum

PAMP - molekularni obrasci patogena

PBS - fosfatni pufer

PCA – perhlorna kiselina

PD (*engl.* Parkinson's disease) - Parkinsonova bolest

PDGF – faktor rasta porijeklom od trombocita

PFA - paraformaldehid

PLL - poli-L-lizin

PRR - receptori molekularskih motiva

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne azotne vrste

ROS - reaktivne kiseonične vrste

SDS - natrijum dodecil sulfat

STAT - proteini prenosnici signala i aktivatori transkripcionih proteina

TCA - trihlorsirćetna kiselina

TGF- β - faktor transformacije rasta beta

TLR - receptori slični Toll-u

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa

Tris - tris (hidroksi metil) aminometan

VEGF - Vaskularni endotelijalni faktor rasta

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. Neuroinflamacija	1
1.1. Imunski nadzor centralnog nervnog sistema	3
1.2. Urođeni i stečeni imunski odgovori u centralnom nervnom sistemu	3
1.3. Mikroglia	7
2. Astrociti	8
2.1. Uloga astrocita u održavanju jonske i vodene homeostaze	10
2.2. Uloga astrocita u energetsom metabolizmu	11
2.3. Uloga astrocita u metabolizmu neurotransmitera i sinaptičkoj transmisiji	12
2.4. Uloga astrocita u neurogenezi	13
2.5. Uloga astrocita u oksidativnom stresu i antioksidativnoj zaštiti	14
3. Aktivacija astrocita i uloga u neuroinflamaciji	15
3.1. Polarizacija reaktivnih astrocita u odnosu na funkcionalni fenotip A1 i A2	18
3.1.1. Signalni putevi koji polarizuju A2 fenotip astrocita	19
3.1.2. Signalni putevi koji polarizuju A1 fenotip astrocit	23
4. Purinska signalizacija	25
4.1. Adenozin i ATP kao signalni molekuli	26
4.2. Purinski receptori	28
4.3. Ektonukleotidaze	30
5. Ekto-5'-nukleotidaza (CD73)	30
5.1. Strukturno-funkcionalne karakteristike ekto-5'-nukleotidaze/CD73	31
5.1.1. Opšte odlike	31
5.1.2. Solubilna forma eN/CD73	33
5.2. Regulacija ekspresije eN/CD73	34
5.2.1. Regulacija na nivou transkripcije	34
5.2.2. Posttranslacione modifikacije	36
5.2.3. Ekspresija eN/CD73 u CNS-u	38

5.2.4. Ekspresija eN/CD73 tokom (neuro)inflamacije	38
5.2.5. Funkcionalna povezanost eN/CD73 i adenzinskih receptora	40
5.3. Promjene ekspresije i kompozicije adenzinskih receptora tokom neuroinflamacije	41
II CILJEVI.....	44
III MATERIJAL I METODE.....	46
1. Korišćeni materijali, reagensi i rastvori, tretmani, antitijela i prajmeri su navedeni u narednim tabelama (Tabela 1-5).	46
2. Eksperimentalne životinje.....	54
3. Izolacija i održavanje primarne kulture kortikalnih astrocita	54
3.1. Zasiđavanje ćelija i priprema za eksperiment	56
3.2. Određivanje čistoće primarne kulture kortikalnih astrocita	56
4. Tretmani	57
5. Procjena metaboličke aktivnosti, vijabilnosti i proliferacije astrocita	57
5.1. MTT test za procenu metaboličke aktivnosti	57
5.2. Procjena citotoksičnog efekta primenom primenom protočne citofluorimetrije aneksin/propidijum jodid bojenja.....	58
5.3. Procjena stepena proliferacije astrocita u uslovima neuroinflamacije	60
6. Imunofluorescentna bojenja.....	60
7. Morfološka karakterizacija astrocita vizuelizacijom u svjetlosnom polju: morfometrija	62
8. RNK interferencija.....	63
9. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	64
9.1. Izolacija ukupne RNK.....	64
9.2. Reverzna transkripcija.....	65
9.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-Time PCR).....	65
10. Izolovanje ukupnog proteinskog sadržaja astrocita	67
11. Imunoblot i dot blot analiza	67
11.1. Priprema uzoraka i elektroforetsko razdvajanje proteina.....	67
11.2. Prenos proteina na PVDF membranu	68
11.3. Vizuelizacija i detekcija/imunoblot analiza	68

11.4. Dot blot analiza	69
12. Enzimski imunosorbentni test.....	70
13. Analiza enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze.....	71
14. Određivanje koncentracije proteina u uzorku	73
15. Zarastanja povrede u jednosloju ćelijske kulture.....	74
16. Deglikozilacija proteina	76
17. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	77
17.1. Procjena produkcije azot-monoksida određivanjem koncentracije nitrita	78
17.2. Određivanje koncentracije superoksid anjona.....	78
17.3. Određivanje sardžaja malonaldehida	79
17.4. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa.....	79
17.5. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza: Cu/ZnSOD i MnSOD.....	80
18. Obrada i prikaz podataka	81
IV REZULTATI.....	82
1. Procjena stepena prečišćenosti primarne culture astrocita	82
2. Uticaj ATP na morfološki i funkcionalni fenotip ćelija u primarnoj kulturi astrocita..	83
2.1. Morfologija i reorganizacija citoskeletnih elemenata	83
2.2. Preživljavanje ćelija	86
2.3. Migracija	88
2.4. Indukcija oslobađanja IL-1 β	90
2.5. Antioksidativna zaštita astrocita.....	91
3. Karakterizacija ekspresije adenzinskih receptora i eN/CD73 u modelu povrede astrocita u kulturi	93
3.1. Ekspresija eN/CD73 na astrocitima u modelu povrede	93
3.2. Ekspresija adenzinskih receptora u modelu povrede astrocita u kulturi nakon farmakološke inhibicije eN/CD73.....	95
4. Uloga eN/CD73 u uspoljavanju reaktivnog fenotipa astrocita u kulturi	96
4.1. Uticaj na proliferaciju astrocita	96
4.2. Uticaj farmakološke i genetičke blokade eN/CD73 na aktivnost i ekspresiju eN/CD73 u modelu povrede astrocita u kulturi	98

4.3. Uticaj imunološke blokade eN/CD73 na distribuciju i lokalizaciju eN/CD73 na astrocitima u modelu povrede	100
4.4. Uticaj imunološke blokade eN/CD73 antitijela na isecanje eN/CD73 i oslobađanje solubilne forme u medijum	101
4.5. Uticaj blokade eN/CD73 na ERK1/2 signalizaciju	102
5. Uloga eN/CD73 u migraciji atrocita	103
5.1. Uloga eN/CD73 proteina na membrani astrocita u migraciji	103
5.2. Uticaj vanćelijskog adenzina na pokretljivost astrocita	105
6. Uloga inflamatornih medijatora u regulaciji ekspresije eN/CD73 u kulturi primarnih astrocita	108
6.1. Uticaj na gensku ekspresiju	108
6.2. Uticaj na membransku ekspresiju i lokalizaciju	109
6.3. Uticaj na proteinsku ekspresiju i posttranslacione modifikacije	112
6.4. Uticaj medijatora inflamacije na fosfohidrolaznu aktivnosti eN/CD73	114
V DISKUSIJA	115
VI ZAKLJČCI	128
LITERATURA	130
BIOGRAFIJA	153
PRILOZI	155

I UVOD

1. Neuroinflamacija

Neuroinflamacija se može definisati kao inflamatorni odgovor u okviru centralnog nervnog sistema (CNS) koji može da se javi tokom razvića i kod adultnih jedinki u gotovo svim neurološkim i neurodegenerativnim oboljenjima, pri traumatskim, metaboličkim ili toksičnim povredama moždanog tkiva, u stanjima ishemije ili neoplastičnih transformacija (DiSabato et al., 2016, Morales et al., 2016, Sofroniew, 2015). Stepenn neuroinflamacije zavisi od tipa primarnog oštećenja ili uzročnika, dužine djelovanja štetnih faktora. U akutnoj fazi, neuroinflamacija ima protektivan karakter, dok kod hroničnog toka neuroinflamacije, efekat je nepovoljan po nervno tkivo, posebno za neurone koji vremenom propadaju, što indukuje dalji tok inflamacije (DiSabato et al., 2016, Tandon, 2016). Neophodno je da inflamatorni procesi budu izbalansirani kako bi se patogeni, molekularni agregati i ćelijski debris uklonili iz nervnog tkiva, ali tako da dodatno ne narušavaju integritet zdravog tkiva, do čega može doći usled prekomjerne fagocitoze i sinteze inflamatornih medijatora sa citotoksičnim dejstvom. Da bi se postigla ovakva ravnoteža, aktivira se veliki broj ćelijskih i molekularnih mehanizama, koji doprinose početku, razvoju i okončanju inflamacije (Sofroniew, 2015).

Različiti tipovi, težina i trajanje oštećenja, kao i faze neuroinflamacije mogu se posmatrati kroz pozitivne i negativne aspekte procesa koji se odigravaju, a obuhvataju produkciju citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α), hemokina (CCL2, CCL5, CXCL1), reaktivnih kiseoničnih vrsta i sekundarnih glasnika (NO i prostaglandina). U CNS su ovi posrednici inflamacije sintetisani i oslobođeni od strane glijskih ćelija, prvenstveno astrocita i mikroglije, zatim endotelnih ćelija, ali i ćelija imenskog sistema iz krvnih sudova ili tkivnih infiltrata (DiSabato et al., 2016, Norden et al., 2016). Signalizacija između ćelija u CNS može koristiti komponente imenskog sistema u cilju autokrinog ili parakrinog dejstva, radi podsticaja biohemijskih i fizioloških procesa u zdravom sistemu ili tokom razvića. Istraživanja su pokazala da umjereno intenzivna signalizacija između T-limfocita i mirujućih glijskih ćelija ukazuje na normalne procese, kao što su učenje i formiranje

memorije (Derecki et al., 2010, Ziv et al., 2006). Aktivna mikroglia pruža podršku adekvatnom sinaptičkom grananju (Schafer and Stevens, 2013), a pokazano je i da sintetiše citokine neophodne tokom ranog razvića mozga (Salter and Beggs, 2014). Jasno je da angažovanje imunskih komponenti u ovakvim slučajevima ne predstavlja patološku neuroinflamaciju. Sa druge strane, u stanjima u kojima dolazi do značajno povećane produkcije citokina i hemokina od strane glijskih ćelija, infiltracije perifernih imunskih ćelija, otoka, povećane propustljivosti ili narušavanja krvno-moždane barijere, govori se o visoko destruktivnoj patološkoj neuroinflamaciji (DiSabato et al., 2016). U ovom slučaju mogu se okarakterisati primarna oštećenja, nastala direktno usled primarne povrede (mehanička sila, traumatska povreda mozga ili oštećenje pri infekciji), i sekundarna oštećenja koja su posledica aktivacije inflamatornih komponenti kao odgovora na primarno oštećenje (DiSabato et al., 2016). Tako u uslovima nekontrolisane ineurinflammacije dolazi do desenzitizacije imunske signalizacije i hronične aktivacije mikroglie i astrocita, pri čemu medijatori inflamacije postaju neurotoksični i dovode do dugoročne disfunkcije mitohondrija, otežanog aksonskog transporta, degradacije proteina ćelijskog matriksa i apoptoze (Amor et al., 2010, Chen et al., 2016). Istraživanja tokom poslednje decenije ukazuju da se hronična neuroinflamacija nalazi u osnovi svih neurodegenerativnih oboljenja (Amor et al., 2010, Ransohoff, 2016), uključujući Alchajmerovu bolest (AD) (Avila-Munoz and Arias, 2014, Mrak and Griffin, 2005), Parkinsonovu bolest (PD) (Brochard et al., 2009, Theodore et al., 2008), amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) (Henkel et al., 2004, McCauley and Baloh, 2018) i multiplu sklerozu (MS) (Voet et al., 2018). U slučaju traumatske povrede mozga, može doći do pretjerane i produžene aktivacije glijskih ćelija, što vodi ka dodatnom, naknadnom oštećenju tkiva u odnosu na inicijalnu povredu (Aungst et al., 2014), što prema novijim istraživanjima može da predstavlja osnovu za razvoj neurodegeneracije kasnije u životu (Cruz-Haces et al., 2017, Faden and Loane, 2015, Faden et al., 2016, Mouzon et al., 2014), ali u isto vrijeme predstavlja otvoren prozor za usmjereno kontrolisanje pozitivnih aspekata inflamacije kao potencijalne terapijske strategije nakon traumatske povrede mozga, te u zaštiti i prevenciji od daljeg razvoja patologije (Russo and McGavern, 2016).

1.1. Imunski nadzor centralnog nervnog sistema

Centralni nervni sistem angažuje komponente urođenog i stečenog imunskog odgovora, u situacijama kada je to neophodno (Amor et al., 2010, Nguyen et al., 2002). U fiziološkim uslovima komunikacija između ćelija u nervnom tkivu i komponenti imunskog sistema strogo je kontrolisana, a ova regulacija se postiže postojanjem barijera kao što je endotelska krvno-moždana/moždinska barijera (KMB) i epitelna krvno-likvorna barijera (KLB) (Engelhardt, 2018). Zbog ovakve izolovanosti dugo se smatralo da je CNS „imunski privilegovan“, međutim, razvojem naprednih tehnologija oslikavanja, u poslednjih nekoliko godina se radije govori o aktivnom imunskom nadzoru kroz regulisanu molekulska i ćelijsku komunikaciju (Negi and Das, 2018). Novoopisani glijsko-limfni sistem omogućava drenažu likvora, intersticijske tečnosti, molekula i imunskih ćelija iz CNS preko limfnih sudova koji se nalaze u tvrdoj moždanoj ovojnici, do regionalnih limfnih čvorova glave i vrata (Engelhardt et al., 2017, Louveau et al., 2017, Negi and Das, 2018). Važnu ulogu u ovom sistemu igraju astrociti, koji na krajevima svojih nastavaka, na astrocitnim stopalima, bogato eksprimiraju kanale za vodu, omogućavajući pokretljivost intersticijske tečnosti i rastvorenih molekula u njoj. Buduća istraživanja su usmjerena ka detaljnoj karakterizaciji glijsko-limfnog sistema i identifikovanju procesa koji doprinose prečišćavanja nervnog tkiva od potencijalno toksičnih vanćelijskih proteinskih agregata, ćelijskog debrisa ili medijatora inflamacije (Louveau et al., 2017).

1.2. Urođeni i stečeni imunski odgovori u centralnom nervnom sistemu

Pokretanje urođenog imunskog odgovora je najvažniji momenat na liniji odbrane CNS, kako bi primarno oštećenje bilo lokalizovano, a debris eliminisan. Urođeni imunski odgovor dalje regrutuje ćelije stečenog imunskog odgovora, tako što produkuje citokine i hemokine, koji indukuju ekspresiju adhezivnih molekula u okviru KMB sa jedne strane, dok sa druge strane aktiviraju mikrogliju i astrocite unutar nervnog tkiva (Amor et al., 2010).

Prepoznavanje stranih, sebi nesvojstvenih signala, odigrava se posredstvom receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca (*engl.* pattern-recognition receptor, PRR), koji pokreću urođeni imunski odgovor. Receptori iz ove nadporodice imaju

mogućnost prepoznavanja dvije grupe molekulskih obrazaca: a) molekulske obrasce patogena (*engl.* pathogen-associated molecular patterns, PAMP), kao što su lipopolisaharidi, ugljeni hidrati, proteini i DNK i RNK bakterija i virusa, ili b) molekulske obrasce unutrašnjih/sopstvenih signala opasnosti (*engl.* danger/damage-associated molecular pattern, DAMP) ili alarmine, koji informišu sistem o postojećem ćelijskom oštećenju. Najvažniji alarmini su oligonukleotidne sekvence DNK, RNK, visoka koncentracija adenzin trifosfata (*engl.* adenosine tri-phosphate, ATP) ili adenzina, proteini toplotnog šoka, visoka koncentracija K^+ i druge unutarćelijske komponente oslobođene iz nekrotičnih ćelija u vanćelijsku sredinu. PAMP i DAMP djeluju na PRR receptore i pokreću komponente urođenog imunskog sistema, tj. pokreću patogenu (preko PAMP) ili sterilnu (preko DAMP) inflamaciju (Amor et al., 2010, Farina et al., 2007, Hanamsagar et al., 2012, Kigerl et al., 2014). Na taj način urođeni imunski sistem će biti aktiviran i u slučajevima mehaničke povrede moždanog tkiva ili ishemije, kao i u slučaju autoimunskih, neurodegenerativnih oboljenja ili patogene infekcije. Receptori molekulskih obrazaca, PRR, klasifikuju se na osnovu specifičnosti prema ligandima, funkciji i lokalizaciji. Na osnovu ćelijske lokalizacije, PRR se dijele na membranske receptore, u koje spadaju Toll-like receptori (TLR) i lektinski receptori C tipa (CLR), i na citosolne receptore, koji obuhvataju NOD-like receptore (NLR) i RIG-I-like receptore (RLR) (Hanamsagar et al., 2012, Kigerl et al., 2014).

U nervnom tkivu, membranske PRR, konkretno TLR dominantno su eksprimirani na mikrogliji i astrocitima, a u nešto manjoj mjeri i oligodendrocitima i neuronima (Amor et al., 2010, Farina et al., 2007, Hanamsagar et al., 2012, Kigerl et al., 2014, Puntambekar et al., 2018, Sofroniew, 2014). Identifikovano je 13 varijanti TLR kod čovjeka, odnosno 10 kod miša i, uz TLR3 izuzetak, svi pokreću produkciju inflamatornih medijatora preko jedarnog faktora-kB (*engl.* nuclear factor-kB, NF-kB) i posredstvom mitogenom aktivirane protein kinaze (*engl.* mitogen-activated protein kinases, MAPK) (Hanamsagar et al., 2012). U CNS mikroglija eksprimira TLR1-9, dok astrociti eksprimiraju ili mogu biti indukovani da eksprimiraju TLR2, TLR3 i TLR4. Snažan aktivator ovih receptora je LPS, bakterijski

lipopolisaharid i agonist TLR4 (Fiebich et al., 2018, Liddelov and Barres, 2017, Liddelov et al., 2017).

Osim membranskih, PRR obuhvataju i citosolne receptore kao što su NLR. Ovi receptori na svom N-kraju posjeduju pirinski domen koji je odgovoran za interakciju sa istim domenom adaptornog ASC proteina (*engl.* Apoptosis-associated speck-like protein, ASC). Na C-kraju ASC nalazi se kaspazni aktivator i regrutujući domen (*engl.* caspase activator and recruitment domain, CARD), koji, kao što mu ime govori, regrutuje pro-kaspazu 1 i aktivira je. Ovaj inflamazomski kompleks omogućava da aktivna forma kaspaze-1 isiječe pro-IL-1 β i pro-IL-18, koji kao zreli molekuli IL-1 β i IL-18 napuštaju ćeliju (Hanamsagar et al., 2012, Lechtenberg et al., 2014). Iako NLR prepoznaju širok spektar stimulusa u odnosu na TLR, paralelnom aktivacijom ovih receptora efektorna ćelija dostiže svoj pun inflamatorni kapacitet (Kielian, 2006, Lehnardt, 2010, Martinon et al., 2009).

Navešćemo i receptor koji prepoznaje abnormalno glikozilovane krajnje proizvode, kao što su proteini ili lipidi (*engl.* receptor for advanced glycation end-products, RAGE). Povećana ekspresija ovih receptora u korelaciji je sa starenjem, ali i razvojem neurodegenerativnih oboljenja. RAGE indukuju povećanje produkcije pro-inflamatornih citokina i slobodnih kiseoničnih ili azotnih vrsta, čime pojačavaju inflamaciju i negativno doprinose razvoju bolesti. Ovi receptori su opisani na neuronima, astrocitima i oligodendrocitima, i stepen njihove ekspresije se često koristi u kontekstu određivanja stepena težine oboljenja (Amor et al., 2010).

Osnova urođenog imunskog odgovora je sistem komplementa, koji je u čitavom tijelu u svakom momentu u pripravnosti da odgovori na potencijalne prijetnje patogena. Njegova funkcija je da prepozna i obilježi nepoželjnu metu, koja zatim biva fagocitovana. Takođe, po potrebi ima mogućnost da formira kompleks koji razara membranu patogena, bakterije ili virusa (*engl.* membrane attack complex, MAC). Sa druge strane, sistem komplementa u patološkim stanjima može prepoznati sopstvene proteine kao nepoželjne, kada dolazi do oštećenja ćelija i tkiva domaćina, što doprinosi razvoju brojnih akutnih i hroničnih patoloških stanja (McGeer et al., 2017). U okviru sistema komplementa, do danas

je opisano preko 30 različitih proteina, koji su u formi zimogena, a mogu se naći na ćelijskoj membrani ili solubilni (Mathern and Heeger, 2015). Sistem komplementa može se aktivirati klasičnim, alternativnim i lektinskim putem, pri čemu im je zajednička tačka aktivacije isjecanje faktora komplementa C3 čiji fragmenti predstavljaju efektornu komponentu sistema komplementa.

Poznato je da u CNS najvećim djelom astrociti, neuroni i mikroglija, a u manjoj mjeri oligodendrociti sintetiziraju neke od članova sistema komplementa, koji su neophodni tokom razvića nervnog sistema za pravilnu polarizaciju ćelija, migraciju neurona, formiranje novih i uklanjanje nefunkcionalnih sinapsi (Coulthard et al., 2018). Današnja istraživanja se fokusiraju i na ulogu sistema komplementa u infektivnim, autoimunskim i degenerativnim oboljenjima CNS, a naročito poslednjih nekoliko godina kada se dodatna pažnja posvećuje farmakološkoj terapiji čije su mete komponente ovog sistema. Takođe, komponente sistema komplementa pokazuju značajan potencijal da budu prepoznate kao biomarkeri u raznim patologijama (Morgan, 2015).

Kao što je prethodno pomenuto, CNS se danas ne smatra imunski privilegovanim, već se govori o interakciji imunskog i nervnog sistema u okviru homeostaze. Mali broj cirkulišućih T-limfocita kao i antitijela, aktivno nadzire CNS u okviru KMB i gliko-limfnog sistema.

Gotovo sve ćelije nervnog sistema, a naročito one koje ulaze u sastav KMB i KLB imaju eksprimirane različite PRR receptore i sposobnost da otpočnu signalizaciju i reaguju na inflamatorne medijatore. U patološkim uslovima, prethodno opisani putevi aktivacije urođenog imunskog odgovora, kao i naknadne signalizacije koja obuhvata produkciju brojnih posrednika inflamacije, dovode do narušavanja integriteta KMB, što omogućava tako prodor perifernih imunskih ćelija. Rekrutacija obuhvata T-limfocite, B-limfocite, monocite i neutrofile, koji u moždani parenhim ulaze kroz fenestrirane krvne sudove subarahnoidnog prostora i horoidnog pleksusa, kao i između epitelnih i endotelnih ćelija i astrocitnih stopala u okviru kompromitovane KMB i KLB (Engelhardt et al., 2017, Klein and Hunter, 2017).

1.3. Mikroglia

Ćelije mikroglije su komponenta urođenog imunskog sistema, mijeloidne loze, koje CNS naseljavaju rano tokom razvića, nakon čega svoj broj održavaju nezavisnom proliferacijom u CNS. Mikroglia ima sličnu funkciju kao i tkivni makrofagi, mada se od njih ipak razlikuje (Colonna and Butovsky, 2017, Ransohoff and Brown, 2012). Ove ćelije detektuju i najmanja oštećenja do kojih dolazi usled invazije nervnog tkiva patogenima, mehaničke povrede tkiva ili formiranje nefizioloških agregata endogenih proteina. Aktivacija mikroglije podrazumijeva izmjenu morfologije, skraćenje nastavaka i hipertrofiju tijela, usled čega se ćelije transformišu iz ramifikovane, razgranate mikroglije u mikrogliju ameboidnog oblika, koja podsjeća na fagocitujuće makrofage. Od konkretnog patološkog konteksta zavisi i obrazac izmjenjene ekspresije gena, čime otpočinje produkcija i oslobađanje velikog broja citokina (Jha et al., 2016, Morales et al., 2016).

Profilisanjem genske ekspresije prečišćene mikroglije vršene su različite podjele u zavisnosti od regiona CNS ili pola jedinke iz koje su izolovane, ali najistaknutija je upravo podjela aktivirane mikroglije na osnovu njene funkcije (Jha et al., 2016, Morales et al., 2016). Klasifikacija mikroglije na dva tipa „M1“ i M2“ postavljena je po ugledu na sličnu klasifikaciju makrofaga i T-limfocita. Na osnovu uloge koju mikroglia ispoljava u svom aktiviranom stanju, M1 tip mikroglia sintetise velike količine pro-inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6) i hemokina, povećano eksprimira azot oksid sintazu II (*engl.* nitric oxide synthase II, NOSII) usled čega se povećano produkuje NO, i doprinosi akutnom imunskom odgovoru. Sa druge strane, M2 tip mikroglije doprinosi povećanju anti-inflamatornih citokina (TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13) čime suprimira neuroinflamaciju, povećano sintetise faktore rasta (VEGF, BDNF, PDGF), progranulin i arginazu, a smanjuje produkciju TNF- α , aktivno uklanja debris nastao usled oštećenja, pospješuje zarastanje povrede i uspostavljanje homeostaze nervnog tkiva. Ova fenotipska polarizacija mikroglije zasnovana je i na različitom mehanizmu aktivacije mikroglije. Pa tako, u prisustvu pro-inflamatornih citokina i DAMP ili ukoliko se TLR stimulišu LPS-om aktivacija se

usmjerava ka M1 fenotipu. Sa druge strane anti-inflamatorni citokini, kao i djelovi mrtvih ćelija (debris) polarizuju mikrogliju ka M2 fenotipu (Colton, 2009, Dubbelaar et al., 2018).

U poslednje vrijeme je ovakva striktna podjela mikroglije na dva tipa dovedena u pitanje usled brojnih karakteristika i pula transkripata koje u manjoj ili većoj mjeri ispoljavaju i M1 i M2 tip. Zbog toga se danas radije se govori o „kaleidoskopu“ fenotipskih razlika aktivirane mikroglije na osnovu analiza genske ekspresije u različitim fiziološkim i patološkim stanjima (Dubbelaar et al., 2018, Sousa et al., 2018).

U slučaju veće inicijalne povrede moždanog tkiva koja ne može da se neutrališe tokom dovoljno kratkog vremena, dolazi do snažnije aktivacije mikroglije, koja produkcijom inflamatornih faktora podstiče aktivaciju astrocita (Morales, Farías et al. 2016). Sve veći broj istraživanja ukazuje da pojava aktivirane mikroglije, i pojačana produkcija citokina i hemokina, prethodi aktivaciji astrocita (Liddelow and Barres, 2017, Liddelow et al., 2017).

Astrociti su druga ćelijska komponenta urođenog imunskog odgovora, o kojima će detaljno biti riječi u odeljku koji slijedi.

2. Astrociti

Astrociti su najbrojnije ćelije CNS, i dugo su smatrani običnim, pasivnim potpornim ćelijama. Tokom istorije neuronauka, i naročito tokom poslednjih dvadesetak godina, znatno su uvećana naša znanja o ulogama astrocita u normalnom funkcionisanju nervnog sistema, u razviću, metabolizmu, električnoj i hemijskoj komunikaciji i svim drugim aktivnostima CNS. Danas je poznato da su astrociti veoma heterogena grupa ćelija, ne samo u pogledu brojnih funkcija, već i raznovrsne morfologije i regionalne distribucije, koja je od suštinskog značaja za pravilan razvoj i funkcionisanje CNS. Imajući u vidu značajne uloge astrocita koje ćemo kasnije detaljno opisati, poremećaj funkcije ovih ćelija gotovo uvijek doprinosi etiologiji, prezentaciji i progresiji neurodegenerativnih oboljenja, ili leži u osnovi oporavka CNS od bolesti.

Tradicionalna klasifikacija astrocita, koja vodi porijeklo s početka XX veka, zasniva se Goldžijevom bojenju i tako dobijenim morfološkim odlikama i anatomskim lokacijama ovih ćelija. Prema ovoj podjeli, astrociti mogu biti protoplazmatski i fibrozni. Protoplazmatski astrociti se nalaze u sivoj masi mozga i kičmene moždine, posjeduju pet do deset glavnih nastavaka od kojih se svaki dalje višestruko grana i ujednačeno su raspoređeni u okviru sopstvenih domena, ne preklapajući se sa nastavcima susjednih astrocita (Sofroniew and Vinters, 2010). Često su jedan do dva nastavka u kontaktu sa krvnim sudovima i okolnim kapilarima, a najfiniji mnogobrojni nastavci se protežu do sinapsi i obavijaju ih (Molofsky et al., 2012), čime se formira tzv. „neuro-vaskularna jedinica“ (*engl.* neuro-vascular unit, NVU). Fibrozni astrociti su uglavnom zastupljeni u bijeloj masi velikog mozga, protežu se duž aksona, longitudinalno orijentisani tako da prate njihove snopove (Oberheim et al., 2012). Aksoni u snopovima bijele mase su mijelinizovani, pa astrociti u ovom regionu imaju značajnu ulogu u njihovoj mijelinizaciji. Fibrozni astrociti su jednostavnih kontura, sa manjim brojem izduženih nastavaka, zadobijajući tako više „bipolarnu“ formu (Molofsky et al., 2012). Novija istraživanja ukazuju na znatno veću i složeniju heterogenost astrocita, koja obuhvata ćelije sa sličnim karakteristikama, ali i brojnim morfološkim, funkcionalnim i metaboličkim razlikama, zavisno od dijela mozga u kojem se nalaze (Sofroniew and Vinters, 2010).

Osim „pravih“ astrocita, postoje i specijalizovane ćelije koje prema brojnim kriterijumima pripadaju grupi astrocita. Primjera radi, ćelije radijalne glije su prve diferencirane ćelije koje nastaju tokom embrionskog razvića, a služe kao potpora prethodnicima neurona, astrocita i oligodendrocita tokom migracije. Ćelije radijalne glije su prema savremenim shvatanjima i direktni prethodnici nervnih matičnih ćelija (*engl.* neural stem cells – NSC), od kojih nastaju sve ćelije adultnog nervnog sistema (osim, spomenutih mikroglialskih). U grupu specijalizovanih astrocita spadaju Bergmanove ćelije (BG) u malom mozgu i Milerove ćelije (MG) u mrežnjači (Molofsky et al., 2012). Bergmanove ćelije se kako u pogledu morfologije, tako i u pogledu genske ekspresije razlikuju od tipičnih astrocita, zbog činjenice da učestvuju u regulaciji glutamatne neurotransmisije u molekularnom sloju malog mozga (Farmer and Murai, 2017). Milerova glija se prostire

kroz sve slojeve mrežnjače, pružajući tako mehaničku i metaboličku potporu ostalim ćelijama (Farmer and Murai, 2017) MG ima posebnu ulogu u transportu tečnosti i oksidativnoj zaštiti sistema tokom fotorecepcije (Reichenbach and Bringmann, 2013). Oba tipa astrocita su funkcionalno sličniji protoplazmatičnim astrocitima, jer je jedna od njihovih osnovnih uloga u očuvanju i modulaciji funkcije sinapsi (Molofsky et al., 2012, Reichenbach and Bringmann, 2013), a o čemu će biti više govora u narednim odjeljcima o funkcijama astrocita.

Iako astrociti nisu nadražljive ćelije, oni imaju sposobnost međusobne komunikacije posredstvom Ca^{2+} kojeg oslobađaju iz sopstvenih unutrašnjih depoa, i prostiranja nastalih Ca^{2+} talasa. Pokretanje ovakve Ca^{2+} signalizacije može pak biti usled djelovanja hormona, neurotransmitera, drugih aktivnih molekula kao što je ATP, pa i mehaničkom stimulacijom. Koristeći ovakav vid signalizacije, astrociti mogu da detektuju različite promjene u svojoj okolini i da kontrolisanom reakcijom odgovaraju na zahtjeve nervnog tkiva (Guerra-Gomes et al., 2018a, Khakh and McCarthy, 2015, Rusnakova et al., 2013).

Nezavisno od morfoloških karakteristika, pa i lokalne distribucije astroglije, neke funkcije koje ispoljavaju se smatraju opštim za ovaj tip ćelija, uz koje se javljaju ostale, visoko specifične funkcije u zavisnosti od lokalnih ćelijskog i molekuskog okruženja i potreba samog funkcionisanja tog regiona.

2.1. Uloga astrocita u održavanju jonske i vodene homeostaze

U adultnom mozgu, astrocitni završeci u obliku stopala obavijaju krvne sudove, čineći tako granični sloj glije (*glia limitans*) i zajedno sa pericitima i endotelnim ćelijama krvnih sudova doprinose strukturno-funkcionalnim svojstvima krvno-moždane barijere. Strukturna jedinica je od izuzetnog značaja jer sa druge strane astrociti ostvaruju kontakt sa nervnim ćelijama i predstavljaju jednu vrstu senzora za metaboličke potrebe nervnog tkiva. Ovako, u okviru NVU astrociti utiču na kontrolisanu razmjenu molekula, jona i ćelija (Attwell et al., 2010, Molofsky et al., 2012, Takano et al., 2006). Astrociti na taj način predstavljaju sponu između ogromne energentske potrošnje usled sinaptičke transmisije sa jedne strane i dostupnosti kiseonika i glukoze u krvnim sudovima mozga sa druge strane

(Belanger and Magistretti, 2009, Howarth, 2014). Naime, neuroni tokom svoje intenzivne aktivnosti oslobađaju NO koji dovodi do otpuštanja Ca^{2+} -zavisnih vazoaktivnih molekula (npr. prostaglandin E2) od strane astrocitnih stopala koja su u kontaktu sa krvnim sudom. U glatkim mišićima krvnih sudova dolazi do aktivacije K^+ kanala, vazodilatacije i lokalnog povećanja protoka krvi u mozgu (Attwell et al., 2010, Bélanger et al., 2011, Takano et al., 2006, Zonta et al., 2003).

Produkcijom proteina koji učestvuju u formiranju čvrstih veza kao što su okludini, kladin-5 i zonula okludens-1 (ZO-1), astrociti su od suštinske važnosti za dodatno održavanje integriteta KMB (Willis et al., 2004). Astrociti učestvuju u regulaciji ove barijere na fizičkom, transportnom i metaboličkom nivou (Abbott et al., 2006). Astrociti na svojim membranama eksprimiraju različite protonske pumpe, bikarbonatne transportere, Na^+/H^+ izmjenjivače, vakuolarni tip protonske ATPaze, a posebno treba istaći da su na astrocitima specifično eksprimirani Kir4.1 kanali (*engl.* inward rectifying potassium channel, Kir) odgovorni za preuzimanje K^+ jona, kao i kanali za vodu izgrađeni od akvaporina-4 (*engl.* aquaporin-4, AQP4) (Liu et al., 2018, Sofroniew and Vinters, 2010). Zbog posjedovanja velikog broja AQP4, astrociti imaju neizostavnu ulogu u glijsko-limfnom sistemu. Uloga ovog sistema je u prečišćavanju nervnog tkiva posredstvom dvosmjernih kanala za vodu (tetramerne AQP4 strukture), koji omogućavaju odstranjivanje nepoželjnih rastvorenih proteina i metabolita, ali i optimalnu distribuciju komponenti važnih za nervno tkivo kao što su glukoza, amino kiseline, lipidi, zatim brojnih jona i puferskih sistema neophodnih za održavanje homeostaze likvora i intersticijske tečnosti (Jessen et al., 2015, Plog and Nedergaard, 2018, Sullan et al., 2018). Nakon svega navedenog, neosporna je moć ovako opremljenih astrocita u održavanju jonske, vodene i pH homeostaze u CNS.

2.2. Uloga astrocita u energetsom metabolizmu

Mozak zahtjeva ogromne količine energije i procjenjeno je da troši oko 20% kiseonika i 25% glukoze od ukupne potrošnje čitavog organizma (Bélanger et al., 2011). Od toga na neurone odlazi 80% cjelokupne utrošene energije od strane mozga (Nortley and Attwell, 2017). Uloga neuro-vaskularne jedinice je da odgovori na ovako visoke energetske

zahtjeve. Astrociti kontrolišu lokalni protok krvi utičući na vazokonstrikciju i vazodilataciju arteriola u mozgu. Ovakva regulacija dovodi do manjeg ili većeg lokalnog dopremanja glukoze i kiseonika. Glukoza napušta krvni sud preko glukoznih transportera 1 (GLUT1), a u ćelije glije, prvenstveno astrocite ulazi posredstvom GLUT1, a u neurone posredstvom GLUT3. U ćelijama glukoza ulazi u ciklus glikolize, generišući piruvat, ATP i NADH. U astrocitima glukoza može biti sačuvana kao energetska depo u vidu glikogena. Piruvat u ćelijama biva uključen u proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijama i geneze dodatnog ATP. Piruvat takođe može biti konvertovan u laktat i transportovan van ćelije gdje ga ili preuzimaju druge ćelije (npr. neuroni) za produkciju piruvata ponovo ili biva odstranjen iz nervnog tkiva. Astrociti u najvećoj mjeri energiju dobijaju u procesu glikolize, dok neuroni uglavnom obezbjeđuju ATP oksidativnom fosforilacijom piruvata u mitohondrijama. Međutim ovo nisu i jedini izvori energije za ova dva tipa ćelija (Mergenthaler et al., 2013, Nortley and Attwell, 2017). Istraživanja su pokazala da neuroni usled velike aktivnosti i sami obezbjeđuju energiju direktnim preuzimanjem glukoze i glikozilacijom (Lundgaard et al., 2015).

2.3. Uloga astrocita u metabolizmu neurotransmitera i sinaptičkoj transmisiji

Tokom neurotransmisije i oslobađanja glutamata, astrociti preuzimaju glutamat iz sinaptičke pukotine i konvertuju ga u glutamin, ali tada paralelno pokreću i proces glikolize. Generisani laktat astrociti usmjeravaju ka neuronima u kojima je došlo do povećane energetske potražnje. Recikliranjem glutamata astrociti štede energiju i vrijeme u poređenju sa *de novo* sintezom glutamata (Nortley and Attwell, 2017). Astrociti su i ekskluzivni „proizvođači“ glutamina, jer jedino oni posjeduju enzime neophodne za njegovu sintezu: piruvat karboksilaza i glutamin sintetaza (Schousboe et al., 2014). Preuzimanje glutamata astrociti vrše radom glutamatnog transportera 1 visokog afiniteta (GLT-1) i glutamat/aspartat transportera (GLAST, ekvivalent oznaka za ove humane transportere je EAAT2 i EAAT1, redom) (Nedergaard et al., 2002, Oberheim et al., 2012). Neuroni pak preuzimaju glutamin od astrocita i konvertuju ga u glutamat. Takođe, glutamin je prekusorni molekul za sintezu γ -aminobuterne kiseline (GABA) (Schousboe et al., 2014).

Osim glutamat-glutaminskog ciklusa, astrociti su sposobni da uklone i druge neurotransmitere oslobođene u sinapsu kao što su GABA ili glicin, posredstvom specifičnih transportera. Na taj način astrociti različitom brzinom uklanjanja neurotransmitera utiče na aktivaciju receptora postsinaptičke membrane (Sofroniew and Vinters, 2010).

Najfiniji nastavci astrocita učestvuju u formiranju trodjelne (*engl.* tripartite synapse) funkcionalne jedinice zajedno sa presinaptičkim i postsinaptičkim nervnim završecima. Astrociti na ovaj način učestvuju u regulaciji stabilizacije, dinamike i sazrijevanja dendritskih nastavaka, a naročito u nadzoru i kontroli sinaptičke transmisije i plastičnosti (Araque et al., 1999, Liu et al., 2018, Ullian et al., 2001). Sinaptičku aktivnost astrociti detektuju prisustvom jonotropnih i metabotropnih receptora za različite neurotransmitere koje oslobađaju neuroni u njihovom okruženju (Verkhratsky and Nedergaard, 2014). Neurotransmiteri oslobođeni iz presinaptičkog nervnog završetka aktiviraju receptore na membranama astrocita i pokreću oslobađanje Ca^{2+} iz unutrašnjih depoa astrocita. Intenzitet sinaptičke aktivnosti u najvećoj mjeri određuje tip kalcijumskog odgovora i vrstu modulatora koji će astrociti osloboditi u sinaptičku pukotinu npr. ATP, glutamat ili D-serin. Spontano Ca^{2+} oscilovanje, osobina određenog tipa astrocita, iako je nezavisno od aktivnosti neurona može da dovede do izmjena u neurotransmisiji (Araque et al., 1999, Dani et al., 1992, Guerra-Gomes et al., 2018b, Khakh and McCarthy, 2015, Pasti et al., 1997, Rusakov, 2015).

2.4. Uloga astrocita u neurogenezi

Adultna neurogeneza se odigrava u veoma specifičnim regionima mozga, a kod ljudi su to subgranularna zona (SGZ) zubate vijuge hipokampusa i subventrikularna zona (SVZ) bočnih komora. Istraživanja su pokazala da su u ovim neurogenim nišama u adultnom mozgu prisutne nervne matične ćelije (NSC), zatim nezreli neuroni (Boldrini et al., 2018) i u velikom broju astrociti kao potporne, ali i regulatorne ćelije. Mirujuće adultne NSC tipa 1 ekspimiraju brojne markere karakteristične za matične ćelije (nestin, SOX2, Hes5), ali i neke koji su karakteristični za astrocite kao što su glijski fibrilarni kiseli protein (*engl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP), zatim GLAST, GLT-1 (Cassé et al., 2018). Preživljavanju nervnih matičnih ćelija, kao i regulaciji proliferacije prekusornih ćelija

porijeklom od NSC u velikoj mjeri doprinosi njihov direktni kontakt sa astrocitima. Astrociti promovišu diferencijaciju NSC signalizacijom preko efrina-B i njegovog receptora EphB4 koji se nalazi na matičnim ćelijama. Ovakva signalizacija zahtjeva direktan kontakt između ćelija (juktakrina signalizacija) (Ashton et al., 2012). Sa druge strane astrociti negativno regulišu neurogenezu, takođe direktnim kontaktom sa NSC, preko Notch signalizacije. Ova signalizacija je zavisna od intermedijernih filamenata GFAP i vimentina (Wilhelmsson et al., 2012). Astrociti se smatraju sekretornim ćelijama koje oslobađaju različite neuroaktivne molekule putem kanala, transportera ili regulisanom egzocitozom. Kontrolisanim oslobađanjem ATP astrociti indukuju proliferaciju nervnih matičnih ćelija aktivacijom P2Y₁ purinskog receptora (detaljnije o purinskoj signalizaciji u odjeljku 4) (Cao et al., 2013). Produkcijom faktora rasta fibroblasta 2 astrociti takođe mogu da indukuju proliferaciju NSC (Kirby et al., 2013). Osim uticaja na proliferaciju NSC, astrociti regulišu i ostale faze adultne neurogeneze kao što su migracije i diferencijacija prethodnika neurona, uspostavljanje i sazrijevanje sinapsi i funkcionalno osposobljavanje novih neurona (Cassé et al., 2018).

2.5. Uloga astrocita u oksidativnom stresu i antioksidativnoj zaštiti

CNS je veoma osjetljiv na oksidativni stres. Oksidativnom stresu doprinosi visoka stopa oksidativnog metabolizma u cilju proizvodnje energije pri čemu se formiraju reaktivne kiseonične (ROS) i azotne (RNS) vrste, zatim visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina podložnih peroksidaciji i relativno nizak kapacitet antioksidativne zaštite. Interesantno je da uprkos ogromnih energetskehtjeva i oksidativnog metabolizma, neuroni nemaju odgovarajuće mehanizme zaštite od oksidativnog stresa. Astrociti sa druge strane imaju sposobnost produkcije raličitih antioksidativnih molekula i enzima koji vrše detoksifikaciju ROS, kao što su glutation, hem-oksigenaza 1, glutation peroksidaza, glutation S-transferaza, katalaza i tioredoksin reduktaza. Astrociti su veoma otporni na oštećenja koja nastaju usled prisustva pro-oksidujućih komponenti kao što su H₂O₂, NO, peroksinitriti ili 6-hidroksi-dopamin (Belanger and Magistretti, 2009, Dringen, 2000, Wilson, 1997). Istraživanja na ko-kulturama astrocita i neurona ukazuju da preživljavanje neurona zavisi od antioksidativne zaštite astrocita (Chen et al., 2001).

Redukcija peroksida je katalizovana od strane enzima glutation peroksidaze, koja pri tom procesu produkuje glutation disulfid (GSSG). Ovim procesom se glutation (GSH) oksiduje. Glutation takođe može biti konvertovan od GSSG pomoću glutation reduktaze i NADPH kao donora elektrona. Ovaj proces je neophodan za održavanje GSH u njegovoj redukovanoj formi kada je on dostupan za detoksifikaciju ROS (Dringen, 2000). Produkcija NADPH je zavisna od pentoznog puta razgradnje glukoze, a astrociti pokazuju najveći kapacitet da stimulišu metabolizam glukoze kao odgovor na oksidativni stres. Na ovaj način su povezani putevi recikliranja glutaciona i energetske glukoze metabolizma.

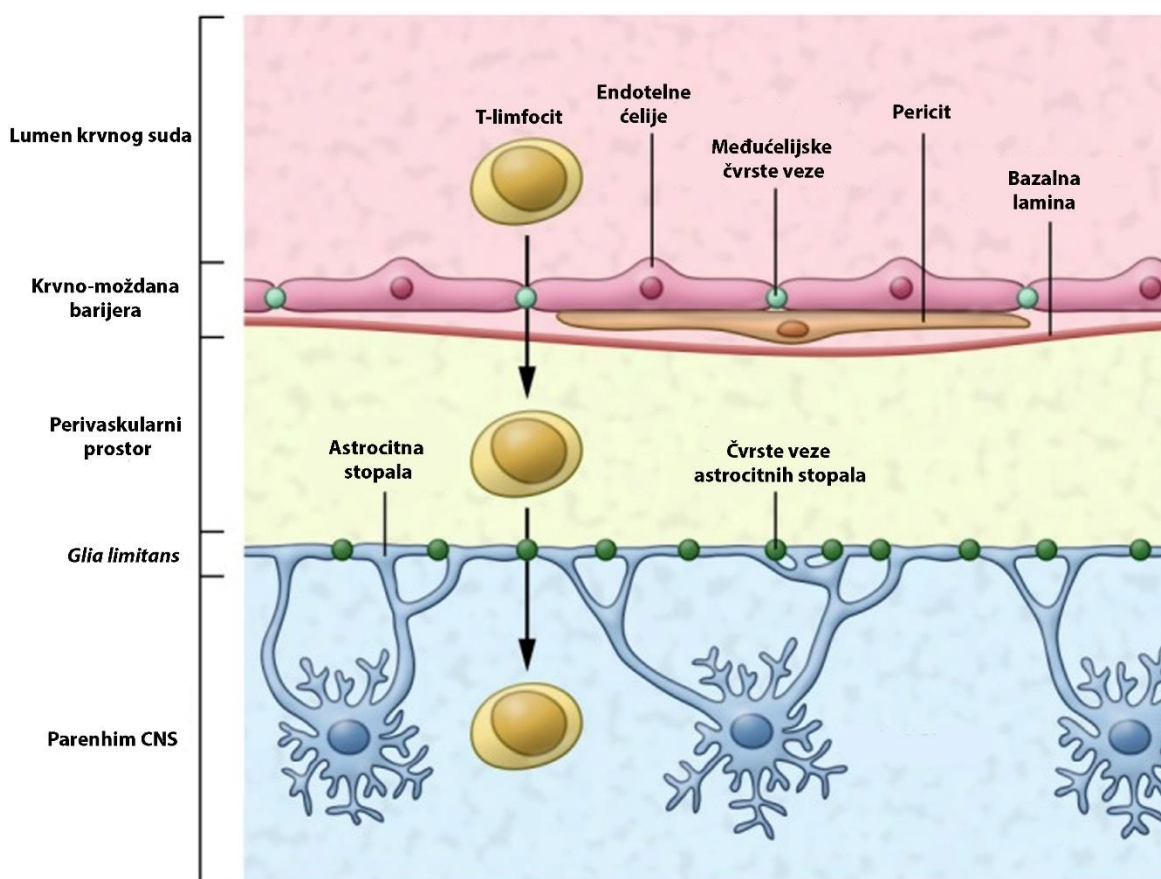
Na kraju ovog uvoda o različitim morfološkim karakteristikama i funkcijama astrocita, pozabavićemo se ništa manje važnim doprinosom astrocita u neuroinflamaciji, što je centralna tema ove teze. Kao najbrojnije ćelije nervnog sistema, astrociti su sklони radikalnim promjenama po potrebi i u fiziološkim uslovima za održavanje ravnoteže sistema, ali naročito u patološkim stanjima nervnog tkiva kada prelaze u reaktivni fenotip, tako da imaju ogroman uticaj na ishod akutne ili hronične neuroinflamacije i neurodegenerativnih oboljenja. Astrocite u patološkim stanjima ne možemo okarakterisati ni kao potpuno protektivne ćelije, ali ni kao ćelije koje isključivo doprinose oštećenju nervnog tkiva, već u zavisnosti od drugih ćelijskih komponenti i vanćelijske sredine, astroglia obuhvata spektar različitih morfološko-funkcionalnih stanja, koja pružaju veliku mogućnost za primjenu adekvatne terapije (Liddelov and Barres, 2017).

3. Aktivacija astrocita i uloga u neuroinflamaciji

Kao što je već pomenuto, mikroglia nije jedina koja doprinosi imunskom odgovoru u nervnom tkivu, iako je najčešće prva u liniji odbrane. Astrociti joj pariraju u toj ulozi pošto uz KMB astrocitna stopala formiraju *glia limitans* barijeru (Slika 1) i tako na neki način ipak prvi prepoznaju obrasce patogena ili reaguju na inflamatorne medijatore (Quintana, 2017).

Astrociti imaju značajnu ulogu u kontroli permeabilnosti KMB, jer utiču na ekspresiju komponenti koje formiraju čvrste međućelijske veze (Quintana, 2017). Astrociti doprinose prepoznavanju oštećenja i infekcije, unakrsnoj signalizaciji sa mikroglijom i

ostalim tipovima ćelija, pokretanjem inflamatornih signalnih puteva. Zavisno od specifičnog konteksta i polarizovanosti, astrociti doprinose krajnjem ishodu neuroinflamatornog stanja u smjeru pogoršanja i daljeg oštećenja nervnog tkiva, ili doprinose razriješenju, popravci nastalih oštećenja i uspostavljanju homeostaze. Kompleksnosti dodatno doprinosi činjenica da su *in vitro* istraživanja pokazala da heterogenost astrocita utiče na način njihovog odgovora na patogene ili oštećenja (Daniels et al., 2017). Značaj postojanja različitih fenotipova astrocita u razvoju neurodegenerativnih oboljenja i generalno u neuroinflamaciji tek treba da bude značajnije istražen.



Slika 1. Uprošćeni prikaz KMB i *glia limitans* barijere. Endotelne ćelije krvnog suda su međusobno povezane čvrstim međucelijskim vezama, dok im potporu pruža bazalna lamina, sa umetnutim pericitima koji obavijaju endotelne ćelije. *Glia limitans* predstavlja dodatnu barijeru koju formiraju stopala astrocitnih nastavaka koja su takođe uvezana čvrstim vezama. Neuroinflamacija je signal astrocitima da ojačaju čvrste veze čime dodatno ograničavaju infiltraciju T-limfocita u CNS parenhim. Modifikovano iz Quintana et al. (2017).

Kao odgovor na različite patološke stimulse ili usled oštećenja tkiva i ćelija, astrociti podliježu brojnim, drastičnim promjenama u pogledu svoje morfologije i funkcije. Tipične promjene koje se dešavaju su hipertrofija i prekomjerna ekspresija citoplazmatskih intermedijarnih citoskeletnih filamenata kao što je GFAP. Pokazano je da reaktivni astrociti re-eksprimiraju obilježja nezrelih astrocita, kao što su nestin i vimentin, dok su novija istraživanja na prečišćenim populacijama reaktivnih astrocita otkrila da oni ekspresiraju i markere zrelih astrocita kao što su GLT-1, AQP4, Ca²⁺-vezujući protein S100β, koneksin 30 i aldehyd dehidrogenaza 1 tip (Rossi, 2015). Osim navedenih markera, danas je identifikovan veliki broj molekula koji se sintetišu *de novo*, ili je njihova ekspresija značajno izmjenjena tokom procesa aktivacije astrocita (Eddleston and Mucke, 1993, Ridet et al., 1997, Rossi, 2015, Sofroniew and Vinters, 2010, Zamanian et al., 2012). Sve te promjene koje dovode do različitih fenotipskih karakteristika astrocita na veoma dinamičan način predstavljaju fenomen koji sveobuhvatno možemo nazvati „reaktivna astroglioza“ (Rossi, 2015).

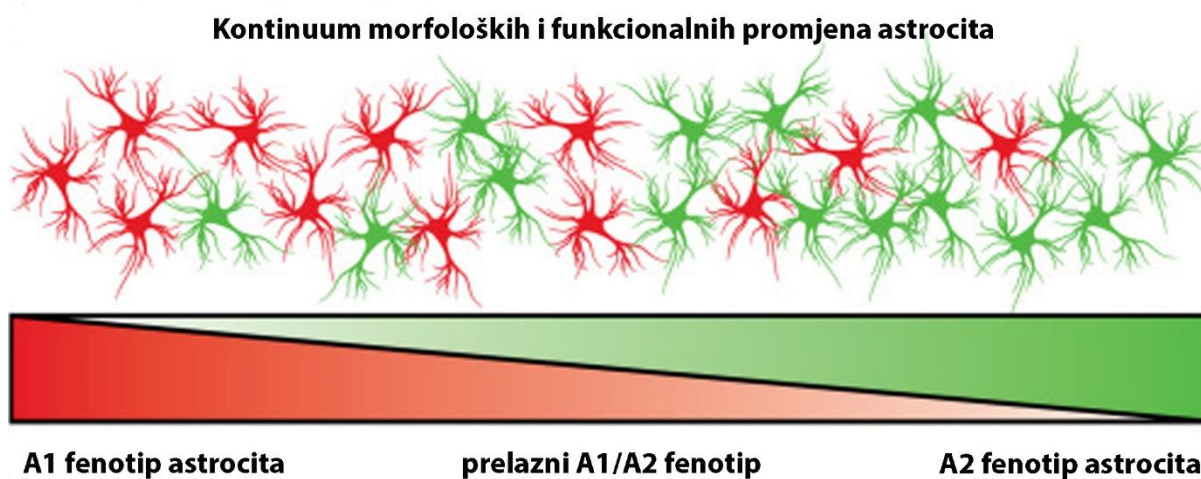
Na osnovu morfoloških kriterijuma, astroglioza može biti izomorfna i anizomorfna. Izomorfna astroglioza podrazumjeva nepromjenjenu morfologiju astrocita, čiji nastavci, uobičajene orijentacije, zadržavaju normalnu arhitekturu u tkivu. Ovakva astroglioza je karakteristična za regione koji su udaljeniji od inicijalnog mjesta oštećenja nervnog tkiva i karakteriše je reverzibilnost. Anizomorfna astroglioza se javlja pri težim oštećenjima tkiva, koje prati i narušavanje krvno-moždane barijere. Astrociti koji podliježu značajnim morfološkim promjenama locirani su neposredno uz oštećenje i karakterišu se izmjenjenom prostornom orijentacijom, prekomjernom produkcijom molekula vanćelijskog matriksa (*engl.* extracellular matrix molecules, ECM), kao što su hondroitin sulfat, laminin i fibronektin (Yuan and He, 2013), što za krajnju posledicu ima formiranje glijskog ožiljka (Fernaund-Espinosa et al., 1993, Sofroniew, 2015). Ovakva podjela je danas revidirana i može se reći da se astroglioza karakteriše širokim opsegom prelaznih morfološki i funkcionalno izmijenjenih stanja astrocita, zavisno od udaljenosti od inicijalnog mjesta povrede nervnog tkiva (Burda and Sofroniew, 2014).

Morfološke promjene astrocita su odraz i neodvojivi dio njihovih promjenjenih funkcija. Astrociti odgovaraju na brojne signalne molekule koji se oslobađaju u patološkim stanjima, kako iz mikroglije, tako i iz neurona, oligodendrocita i infiltriranih ćelija imunskog sistema. Među signalnim molekulima, citokini su svakako najvažniji medijatori inflamacije (Sofroniew, 2009). Prekomjerna ekspresija citokina, ali i drugih medijatora, kao što su eikozanoidi, ROS i NOS, pojačano oslobađanje glutamata, kao i promjene ekspresije ECM, dovode do drastične izmjene ćelijske komunikacije u oštećenom ili oboljelom tkivu (Rossi, 2015), što utiče na funkciju ćelija, na regulaciju homeostatskih procesa, kompletan promet imunskih i inflamatornih ćelijskih i molekulskih komponenti. Hiperplazija i hipertrofija astrocita neminovno utiču na sinapse, koje ostaju bez adekvatne funkcionalne pratnje i potpore tokom reaktivne astroglioze. U patološkim inflamatornim stanjima dolazi do gubitka spontanih oscilacija Ca^{2+} kod astrocita, što utiče na oslobađanje astrocitnih gliotransmitera, ali i na sinhroizaciju nervne aktivnosti, na ciklus glutamata, a to posledično mijenja funkcionisanje sinapsi (Shigetomi et al., 2013, Shigetomi et al., 2010, Sofroniew, 2009). Izmjenjena morfologija i funkcija astrocita jasno utiču na supramolekulsku organizaciju i orijentaciju AQP4, što je od suštinskog značaja za adekvatno prečišćavanje likvora i intersticijske tečnosti moždanog tkiva. Dugoročno pretjerano nakupljanje nepoželjnih proizvoda usled neadekvatne funkcije glijsko-limfnog sistema može dovesti do neurodegenerativnih procesa, kao što su AD ili hronična traumatska encefalopatija (Plog and Nedergaard, 2018).

3.1. Polarizacija reaktivnih astrocita u odnosu na funkcionalni fenotip A1 i A2

Različita kombinacija signala pokrenutih inflamatornim stanjima može dovesti do različitog odgovora astrocita, ne samo u smjeru daljeg narušavanja homeostaze, već i u protektivnom kontekstu (Sofroniew and Vinters, 2010). Astrociti koji oslikavaju krajnje karakteristike ova dva tipa odgovora nose oznake „A1“ i „A2“, kao analogiju na reaktivnu polarizaciju mikroglije/makrofaga (M1/M2). A1 reaktivni tip astrocita karakteriše se kao toksičan, jer takve ćelije oslobađaju brojne pro-inflamatorne molekule, koji dodatno narušavaju KMB i olakšavaju prodiranje leukocita u CNS, doprinoseći daljem propadanju neurona i održavanju neuroinflamacije. A2 reaktivni tip odlikuje produkcija anti-

inflamatornih agenasa i molekula, koji učestvuju u popravci oštećenja tkiva i KMB, ograničavaju ulazak i migraciju leukocita, djeluju umirujuće na mikrogliju. Faktori koje oslobađaju A2 astrociti pospješuju preživljavanje neurona, funkciju sinapsi i omogućavaju uspostavljanje homeostaze u nervnom tkivu (Liddelw and Barres, 2017, Sofroniew, 2015). Analiza transkriptoma reaktivnih astrocita aktiviranih u različitim obrascima povrede mozga, na primjer LPS-om izazvana inflamacija ili hipoksija, ukazala je na značajne razlike funkcionalnih stanja ova dva tipa astrocita, što će svakako omogućiti bolje razumijevanje njihove uloge u neuropatološkim stanjima koja se karakterišu neuroinflamacijom. Međutim, uprkos značajnim razlikama, detaljne analize ukazuju da proces aktivacije astrocita nije dihotoman proces (A1 ili A2), već je kontinuum promjena u morfologiji i funkciji astrocita (Slika 2) (Liddelw and Barres, 2017).



Slika 2. Predlog modela distribucije dva tipa reaktivnih astrocita: A1 i A2 fenotip. Smatra se da između ove dvije populacije postoji prelazni kontinuum morfoloških i funkcionalnih promjena od A1 (toksičnog) do A2 (zaštitnog) fenotipa astrocita. Modifikovano iz Liddelw i Barres (2017).

3.1.1. Signalni putevi koji polarizuju A2 fenotip astrocita

Protektivni ili zaštitnički astrociti koji podstiču oporavak i popravku nervnog tkiva su često opisivani u modelima ishemijske (Gao et al., 2005, Liddelw et al., 2017, Zador et al., 2009), ali i mehaničke povrede, pa i autoimunskih stanja (Sofroniew, 2015). U jednoj studiji u modelu povrede kičmene moždine pokazano je da ablacija reaktivnih astrocita ima

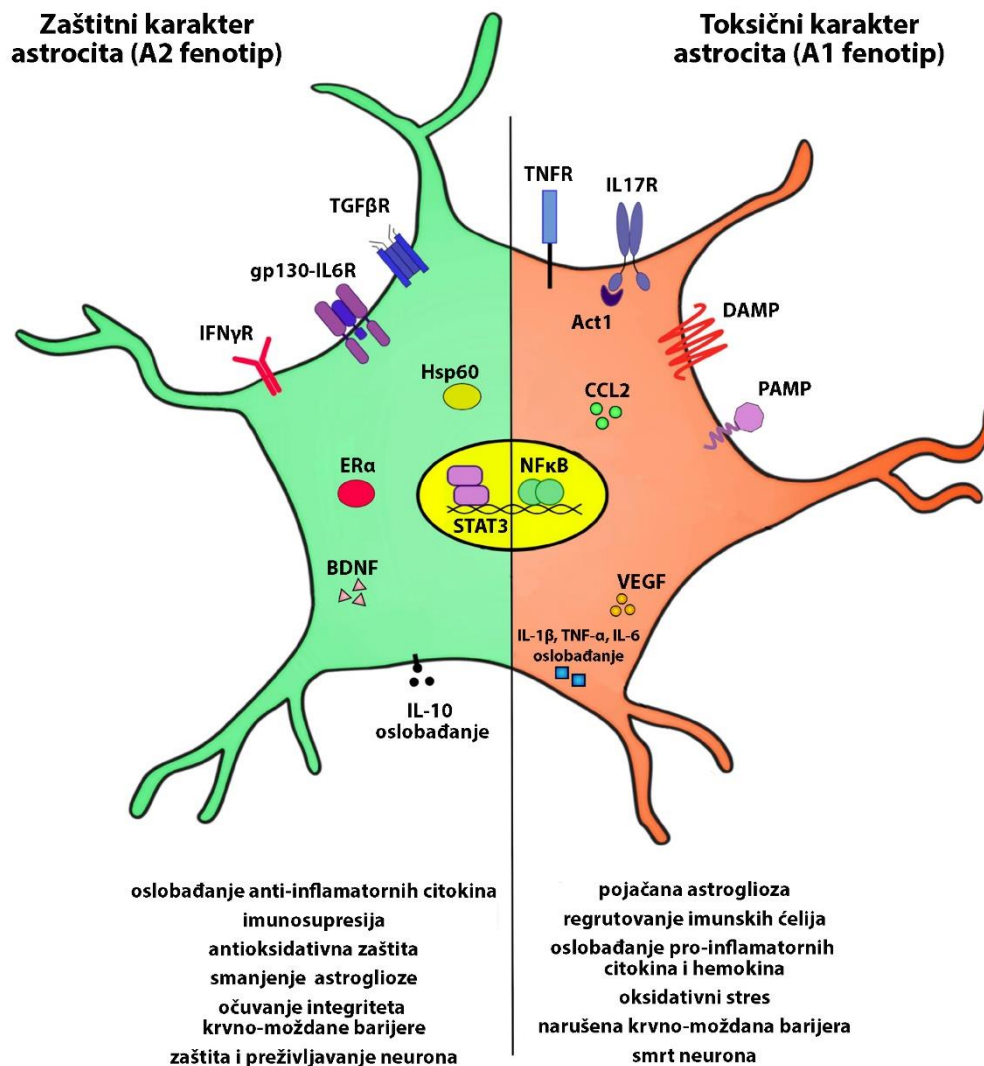
nepovoljan uticaj na oporavak, te da nedostatak reaktivnih astrocita u ranim fazama povrede uslovljava dezorganizaciju glijskog ožiljka, veću infiltraciju i rasprostranjenje ćelija imunskog sistema, izmjene u provodljivosti KMB i veću smrt neurona (Bush et al., 1999, Liddelw and Barres, 2017, Sofroniew, 2009).

Signalni put koji polarizuje astrocite prema A2 tipu otpočinje aktivacijom membranskog receptorskog glikoproteina gp130 (npr. interleukinom 6, IL-6) i pokreće JAK-STAT3 signalni put (Colombo and Farina, 2016, Liddelw and Barres, 2017, Sofroniew, 2009). Ovaj signalni put indukuje anti-inflamatorne funkcije astrocita, ali je sa druge strane odgovoran i za regulaciju brojnih drugih ćelijskih procesa, uključujući proliferaciju i diferencijaciju ćelija, kao i inhibiciju apoptoze. Važno je reći da ovaj signalni put nije aktiviran u normalnom, fiziološkom stanju CNS, ali je sa druge strane usko povezan sa procesima tumorogeneze i imunosupresije (Liddelw and Barres, 2017). Ovaj signalni put dovodi do snažne aktivacije astrocita, ali u kontekstu regulacije inflamatornih procesa, neuroprotekcije i pospješivanja oporavka oštećenja u slučaju povrede kičmene moždine (Okada et al., 2006). Vezivanje liganda IL-6 za gp130 takođe dovodi i do aktivacije mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK ili SHP2/Ras/ERK). Ova dva signalna puta, SHP2/Ras/ERK i JAK-STAT3, međusobno su negativno regulisana, a pokazano je da ko-aktivacija SHP2/Ras/ERK ograničava autoimunsku reakciju u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE) (Haroon et al., 2011). Stoga su ovi signalni putevi značajna potencijalna meta u terapiji i kontroli neuroinflamatornih procesa (Slika 3).

Smatra se da osim članova IL-6 familije, brojni drugi medijatori dovode do usmjeravanja astrocita ka A2 tipu, a među njima je prema nekim istraživanjima i transformišući faktor rasta β (*engl.* transforming growth factor β , TGF- β). Pokazano je da ovaj citokin negativno reguliše signalni put NF-kB, koji će biti opisan u narednom odjeljku. Inhibicija ovog puta dovodi do smanjenja akutnog neuroinflamatornog stanja (Cekanaviciute and Buckwalter, 2016, Cekanaviciute et al., 2014, Colombo and Farina, 2016).

Jedan od detaljnije ispitivanih anti-inflamatornih citokina je interleukin 10 (IL-10), koji i kod astrocita djeluje tako što onemogućava translokaciju NF- κ B faktora, čime se spriječava masovna produkcija pro-inflamatornih medijatora. U humanim astrocitima je pokazano da IL-10 dovodi do pozitivne regulacije proteina toplotnog stresa 60 (*engl.* heat shock protein 60, Hsp60), i pokretanja zaštitnih mehanizama u astrocitima (Rothhammer and Quintana, 2015). Kod životinja oboljelih od EAE sa transplantiranim nervnim matičnim ćelijama, koje pojačano ekspimiraju IL-10, dolazi do značajne remijelinizacije, diferencijacije oligodendrocita i smanjenja astroglioze (Yang et al., 2009). Važno je istaći da nakon stimulacije pro-inflamatornim medijatorima astrociti mogu da produkuju IL-10, kao regulator koji se suprotstavlja stanjima hronične inflamacije (Rothhammer and Quintana, 2015).

Citokin interferon γ (IFN- γ) takođe ima važnu ulogu u regulaciji inflamacije, na šta su ukazali eksperimenti na miševima deficitarnim za receptor za IFN- γ . Kod ovakvih miševa dolazi do povećanja demijelinizacije u akutnoj i hroničnoj fazi EAE, do povećanja infiltracije leukocita, pozitivne regulacije ekspresije inflamatornih medijatora (CCL2, CCL5, CXCL10, iNOS i TNF- α), dok je prisustvo anti-inflamatornih citokina IL-10 i IL-27 smanjeno (Hindinger et al., 2012). Astrociti, za razliku od mikroglije i oligodendrocita, bogato ekspimiraju receptor za IFN- γ (IFN γ R) (Slika 3). IFN- γ se smatra tipičnim pro-inflamatornim citokinom aktiviranih T-limfocita, i ćelija ubica (NK ćelije) (Colombo and Farina, 2016), a kod astrocita dovodi do pokretanja JAK-STAT3 signalnog puta (Nicolas et al., 2013). U nekim *in vivo* studijama je pokazano da IFN- γ uspješno indukuje produkciju IL-27 u astrocitima, što posledično dovodi i do pospješene produkcije IL-10 koji reguliše i pozitivno utiče na razrješenje inflamacije (Rothhammer and Quintana, 2015).



Slika 3. Uprošćen prikaz signalnih puteva koji karakterišu zaštitni (A2 fenotip) odnosno toksični (A1 fenotip) karakter astrocита. Prikazani su neki od transmembranskih receptora, citoplazmatskih proteina, transkripcijskih faktora i sintetisanih/osloodeh medijatora uključenih u aktivaciju astrocита kao i neki od njihovih efekata u neuroinflamaciji. Sve skraćenice su navedene u spisku skraćenica ili u tekstu. Modifikovano iz Colombo i Farina (2016).

Usmjeravanju astrocита ka protektivnom fenotipu (Slika 3) doprinosi i prisustvo estradiola koji preko svojih receptora za estradiol tipa α (ER α), ali ne i preko receptora ER β , smanjuje negativne efekte inflamacije, smanjuje demijelinizaciju u EAE modelu kao i gubitak aksona (Colombo and Farina, 2016).

3.1.2. Signalni putevi koji polarizuju A1 fenotip astrocit

Pokretanje NF-kB signalnog puta dovodi do masovne produkcije citokina, hemokina i metaloproteinaza, i snažno korelira sa neuroinflamacijom, reaktivnošću astrocita i mikroglije. Signalne puteve koji vode prema A1 fenotipu pokreću bakterijski i virusni antigeni, slobodni radikali, kao i brojni molekularni obrasci opasnosti (Slika 3). Najnovija istraživanja sugeriraju da je za aktivaciju A1 tipa reaktivnih astrocita nužna aktivacija NF-kB signalnog puta, iako je i dalje sporno da li je njegova aktivacija esencijalna ili predstavlja prelaznu fazu u aktivaciji astrocita (Liddelow and Barres, 2017). Istraživanja su pokazala da je NF-kB signalni put snažno aktiviran u mikrogliji u neuroinflamatornim uslovima (Carrero et al., 2012, Lian et al., 2015, Liddelow et al., 2017), u astrocitima u glodarskim modelima AD (Carrero et al., 2012, Lian et al., 2015), HD (Hsiao et al., 2013), kao i u ALS (Migheli et al., 1997). Ono što NF-kB signalni put čini nepovoljnom metom terapije je činjenica da, osim što se aktivira u patološkim stanjima, on je neophodan za pravilno formiranje sinapsi i za sinaptičku plastičnost, pa je još uvijek nepoznato kakav efekat u neuroinflamaciji ima inhibicija NF-kB signalnog puta (Liddelow and Barres, 2017).

Jedan od ključnih aktivatora reaktivne astroglioze posredstvom NF-kB signalnog puta je pro-inflamatorni citokin interleukin 17 (IL-17) kojeg oslobađaju T-limfociti. Astroцити posjeduju receptore za IL-17, IL-17RA (Slika 3) spregnute sa aktivatorom NF-kB signalnog puta (Act1). Istraživanje na miševima kod kojih je utišan Act1 samo u astrocitima, dovelo je do slabijeg razvoja simptoma u EAE modelu. Ovo istraživanje ukazuje na značaj IL-17 u aktivaciji astrocita, što ga čini potencijalnom važnom metom u kontroli aktivacije astrocita (Colombo and Farina, 2016), imajući u vidu da ovaj interleukin indukuje oslobađanje brojnih inflamatornih citokina i hemokina od strane astrocita (uključujući IL-6, TNF- α). Treba naglasiti da osim IL-17, Act1 mogu da pokrenu i drugi aktivatori (Rothhammer and Quintana, 2015).

Astroцити експримирају рецепторе за brojne druge citokine i pro-inflamatorne medijatore koje oslobađaju druge ćelije, a čiji uticaj može da se ispolji autokrino, parakrino ili endokrino. Neki od ovih citokina su interleukin 1 β (IL-1 β), TNF- α , IFN- γ , TGF- β i IL-6,

a od hemokina CCL2, CCL5, CXCL9, CCL12, trombin, endotelin-1, sfingolipidi, neurotrofni faktori (npr. BDNF), zatim proteini sistema komplementa, kiseonični i azotni radikali koji u nekim patološkim kontekstima mogu indukovati izrazito pro-inflamatorne efekte (Puntambekar et al., 2018, Sofroniew, 2015).

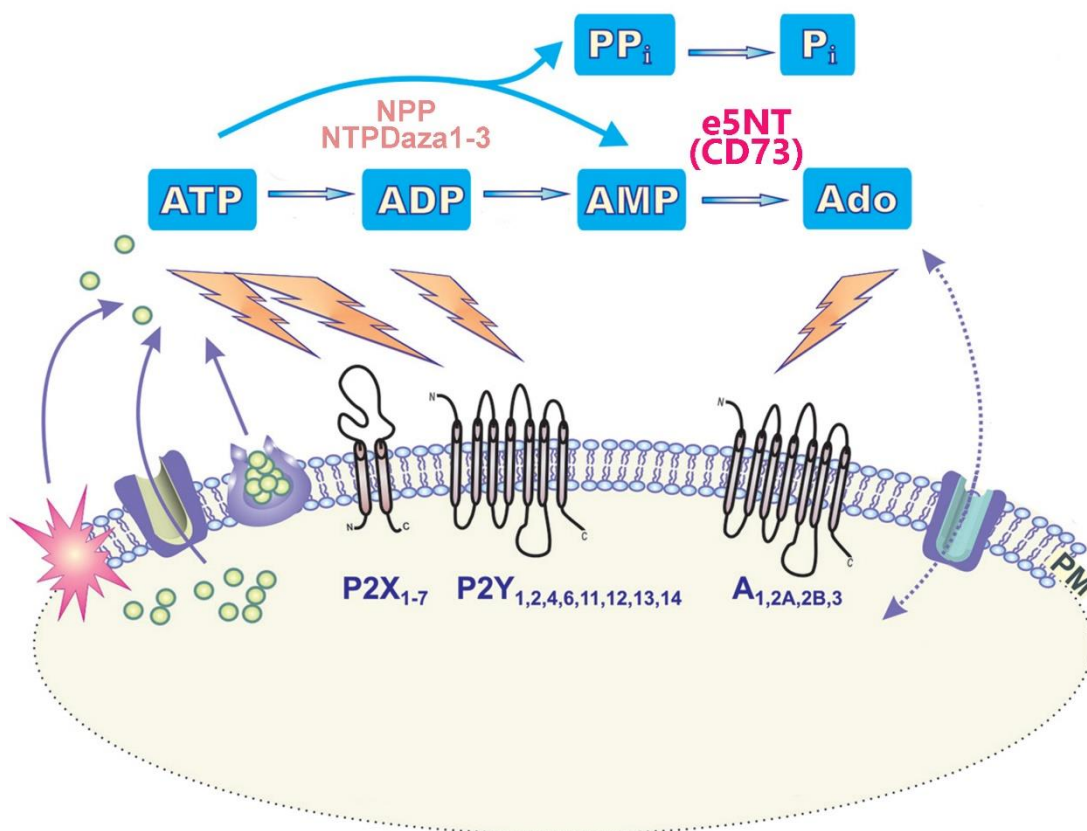
Interleukin 1 β (IL-1 β) član je IL-1 familije citokina, a u mozgu ga proizvode makrofagi, monociti, mikroglia i endotelne ćelije. Karakterističan odgovor astrocita na IL-1 β je produkcija vazoaktivnog endotelnog faktora rasta (*engl.* vasoactive endothelial growth factor, VEGF), koji povećava propustljivost krvno-moždane barijere za leukocite. Ovaj faktor takođe indukuje produkciju hemokina CCL2, CCL20 i CXCL2 od strane astrocita, preko NF- κ B signalnog puta. U prisustvu IL-1 β astrociti povećavaju ekspresiju P2X₇ purinskog receptora osjetljivog na visoke vanćelijske koncentracije ATP i ADP, koji je povezan sa aktivacijom inflamazomskih kompleksa. IL-1 β snažno aktivira astrocite u uslovima akutne neuroinflamacije, a doprinosi i nastanku hronične neuroinflamacije, budući da i sami astrociti proizvode zrelu formu IL-1 β (Rothhammer and Quintana, 2015).

TNF- α je pro-inflamatorni citokin koji ima značajne uloge kako tokom inflamacije, tako i u fiziološkim uslovima. Glavni izvor TNF- α u patološkim uslovima je aktivirana mikroglia, koja sintetiše velike količine ovog citokina. TNF- α djeluje na svoje receptore TNFR, od kojih je TNFR1 (p55) konstitutivno eksprimiran na astrocitima, dok je ekspresija TNFR2 (p75) na astrocitima uglavnom na donjim granicama detekcije (Ohtori et al., 2004, Olmos et al., 2014, Silva et al., 2017, Wang et al., 2015). TNF- α je intenzivno proučavan u razvoju neuroinflamatornog stanja i ekscitotoksičnosti, a njegovi brojni efekti su okarakterisani u modelima traumatske povrede mozga, ishemije, MS, AD, PD, ALS (Olmos et al., 2014, Tuttolomondo et al., 2014, Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013). Iako se smatralo da ovaj citokin isključivo doprinosi pogoršanju neuroinflamacije i propadanju neurona i glijskih ćelija, danas se pretpostavlja da bi on mogao imati ulogu u prekondicioniranju CNS i astrocita u cilju poboljšanja ishoda ishemije ili inflamacije usled infekcije (Silva et al., 2017). Kratkoročno izlaganje CNS-a umjerenim koncentracijama ovog citokina ostvaruje protektivan uticaj na neurone tako što indukuje povećanje ekspresije GLT-1/EAAT2 na astrocitima, čime se smanjuje glutamatna ekscitotoksičnost

(Ding et al., 2014). Zavisno od signalnog puta koji se aktivira posredstvom TNF- α donosi se „odluka“ o ćelijskoj smrti ili preživljavanju (Marques-Fernandez et al., 2013). Imajući i u vidu činjenicu da TNF- α ima ulogu u homeostatskim procesima neophodnim tokom razvića CNS-a, formiranja sinapsi i u održavanju urođenog imunskog odgovora (McCoy and Tansey, 2008, Perry et al., 2002), uz prethodno iznijete oprečne efekte ovog citokina, dalja istraživanja su usmjerena na jasniju karakterizaciju funkcije TNF- α u patologijama CNS u cilju spriječavanja smrti neurona (Kim et al., 2003, Livne-Bar et al., 2016, McCoy and Tansey, 2008).

4. Purinska signalizacija

Sistem purinske signalizacije je jedan od evolutivno najstarijih vidova međućelijske komunikacije koji se javio kod prokariota, jednoćelijskih eukariota, protozoa i algi. U eukariotskim ćelijama sistem purinske signalizacije obuhvata dvije osnovne komponente: a) signalne molekule (purinski nukleotidi ATP i ADP i nukleozid adenzin) i b) purinske receptore – P1 za adenzin i P2 za ATP i ADP (Verkhatsky and Burnstock, 2014). Osim osnovnih komponenti potrebnih za signalizaciju, ovaj purinski sistem obuhvata transport nukleozida i nukleotida kroz ćelijsku membranu i ektonukleotidazne enzime, koji razgrađuju purinske nucleotide u vanćelijskom prostoru (Slika 4). Purinski sistem signalizacije je karakterističan za gotovo sve tipove ćelija i tkiva, omogućavajući osnovne fiziološke i homeostatske reakcije, ali i za patološki odgovor usled oboljenja ili oštećenja tkiva (Verkhatsky and Burnstock, 2014).



Slika 4. Djelimičan šematski prikaz sistema purinske signalizacije posredovane purinskim molekulima. Oslobođanje ATP iz ćelije može biti usled mehaničkog oštećenja i odvija se posredsvom kanala, transportera ili vezikularnim transportom. Vanćelijski ATP i njegov metabolit ADP aktiviraju dvije klase P2 purinskih receptora: P2X ligand-zavisne jonske kanale ($P2X_{1-7}$) i P2Y receptore spregnute sa proteinom G ($P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$). NTPDaze 1-3 i NPP hidrolizuju ATP i ADP do AMP, koji je hidrolizovan od strane eN/CD73 do adenzina. Adenzin aktivira P1 purinske receptore spregnute sa proteinom G ($A_{1,2A,2B,3}$) i može biti transportovan kroz ćeliju membranu pomoću svojih transportera. Modifikovano iz Yegutkin (2014).

4.1. Adenzin i ATP kao signalni molekuli

U fiziološkim uslovima adenzin pretežno nastaje unutar ćelije, katalitičkim delovanjem *S*-adenozil homocistein hidrolaze koja konvertuje *S*-adenozil-L-homocistein u adenzin i homocistein (Antonioli et al., 2019). Unutarćelijska koncentracija adenzina je uravnotežena sa vanćelijskom koncentracijom usled postojanja ekvibrativnih nukleozidnih transpotera (ENT1-4), koji obavljaju olakšanu difuziju adenzina niz koncentracioni

gradijent. Adenozin može da se transportuje kroz ćelijske membrane i posredstvom koncentrativnih transportera (CNT1–3), koji u fiziološkim uslovima transportuju adenozin u ćeliju (Slika 4). Stoga, pod fiziološkim uslovima je koncentracija adenozina iznosi 25 do 30 nmol/L kako unutar tako i van ćelije.

Adenozin je polazni molekul za sintezu ostalih adeninskih nukleotida. Zahvaljujući enzimu adenozin kinazi (AK) iz adenozina nastaje AMP, a od njega nastaje ADP zahvaljujući enzimu adenilat kinazi (ADK), koji katalizuje reakcije interkonverzije adeninskih nukleotida. Konačno, ATP nastaje u nekoliko metaboličkih ćelijskih procesa, od kojih je najvažniji proces oksidativne fosforilacije koji se odigrava u mitohondrijama. U fiziološkim uslovima koncentracija ATP unutar ćelija kreće se u opsegu od 1 do 10 mmol/L, uz odnos ATP prema ADP oko 1000 prema 1 (Zimmermann, 2011) dok je koncentracija ATP u vanćelijskom prostoru oko sto hiljada puta manja i kreće se oko 1-3 nmol/L.

Kada se ćelija suoči sa disbalansom između produkcije ATP i njegove potrošnje, nivo adenozina u ćeliji prolazno raste. S obzirom na to da je adenozin glavni konstituent ATP, koji je glavni donor energije u ćeliji i jedan od četiri nukleotida u sastavu informacionih RNK, adenozin ima idealnu poziciju da uskladi sintetske procese u ćeliji sa dostupnom energijom, usled čega se još naziva “kontrolni metabolit”. Kada se koncentracija adenozina unutar ćelije poveća, ENT transporteri transportuju adenozin u vanćelijski prostor, kako bi izjednačili nivo adenozina unutar i van ćelije. Oslobođeni adenozin djeluje na P1 receptore prisutne na okolnim ćelijama. Adenozin ima ulogu u povećanju odnosa snabdjevanja/potrošnje kiseonika, prekondicioniranju, regulaciji imunskog odgovora kao i u angiogenezi, a konkretno u CNS adenozin utiče na neurotransmisiju (Fredholm, 2007, Gomes et al., 2011, Linden, 2005).

Svaka povreda tkiva, mehanička ili metabolička, dovodi do dramatičnog povećanja koncentracije adenozina u vanćelijskom prostoru. Povećanje vanćelijske koncentracije adenozina može nastati usled pojačanog oslobađanja adenozina porijeklom iz ćelije, ili usled pojačane degradacije ATP u vanćelijskoj sredini. Naime, u uslovima povrede ATP se pojačano oslobađa iz ćelija i djeluje kao signal opasnosti (Melani et al., 2006, Melani et al.,

2012). Tako oslobođeni ATP postaje supstrat ektonukleotidaza koje pojačano razgrađuju ATP do adenzina (Slika 4). Stoga, u neuroinflamatornim uslovima, vanćelijske koncentracije ATP i adenzina dostižu mikromolarne nivoe (During and Spencer, 1992). Signalna uloga adenzina i ATP danas je opštepoznata i prihvaćena zahvaljujući pionirskim istraživanjima dr. Džefrija Burnstoka (Goeffrey Burnstock).

4.2. Purinski receptori

ATP u vanćelijskom prostoru ostvaruje biološke efekte djelujući na P2 receptore, dok adenzin aktivira P1 receptore (Slika 4).

P2 receptori obuhvataju dvije klase receptora za nukleotide: P2X ligand-zavisne jonske kanale (P2X₁₋₇) i P2Y receptore spregnute sa proteinom G (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}). P2X receptori su veoma raznovrsni, jer je funkcionalni receptor homomerni ili heteromerni trimer nastao kombinovanjem navedenih subjedinica (Burnstock et al., 2011). Vezivanje ATP za P2X dovodi do otvaranja pore za prolazak jona Na⁺, K⁺ and Ca²⁺. Afinitet P2X receptora prema ATP kreće se u opsegu 1 – 10 μM, dok je za homomerni reseptor P2X₇ potrebna koncentracija i do 1 mM ATP (Abbracchio et al., 2009). U zavisnosti od specifične sprege sa G-proteinom i tipa liganda koji ih aktivira (ATP, ADP UDP), P2Y receptori su podjeljeni u dvije grupe: prva obuhvata P2Y_{1,2,4,6,11} koji preko G_q/G₁₁ dovode do oslobađanja Ca²⁺ iz unutrašnjih depoa, dok druga grupa obuhvata P2Y_{12,13,14} koji posredstvom G_{i/o} inhibiraju adenil ciklazu i mijenjaju otvorenost jonskih kanala. P2Y receptori takođe mogu biti heteromerne ili homomultimerne građe kao i P2X receptori (Abbracchio and Ceruti, 2006, Burnstock, 2007, Verkhratsky and Burnstock, 2014).

Glijske ćelije ekspimiraju gotovo sve purinske receptore, pa je tako na astrocitima pokazano prisustvo P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ i P2X₇, iako se funkcionalnim smatraju samo P2X₁/P2X₅ i P2X₇ receptori (Lalo et al., 2008). Takođe, astrociti ekspimiraju P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₂ i P2Y₁₄ receptore (Fischer et al., 2009). Mikroglia ekspimirira funkcionalne P2X₄ i P2X₇ receptore, kao i više članova P2Y klase purinoreceptora od kojih funkcionalno najvažnije P2Y₆ i P2Y₁₂. Na oligodendrocitnim prekusornim ćelijama je utvrđena ekspresija P2X₇ i većine P2Y receptora. Što se tiče neurona, najzastupljeniji su

P2X₂ i P2X₄, zatim P2X₇ za koji se smatra da je uključen u aktivnost neurona. Najzastupljeniji receptor iz P2Y klase na neuronima je P2Y₁, pa zatim P2Y₂, dok su ostali znatno manje prisutni (Del Puerto et al., 2013). Svi pomenuti receptori purinskog sistema signalizacije imaju brojne uloge u održavanju fiziološke komunikacije među ćelijama tokom neurogeneze, migracije ćelija, rasta aksona, aktivnosti neurona i jasno je da narušavanje ovako kompleksne signalizacije ima ogroman značaj u različitim patološkim stanjima CNS.

P1 receptori pripadaju klasi receptora spregnutih sa proteinom G, a obuhvataju četiri receptora A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (Fredholm et al., 2011, Rodrigues et al., 2018). U zavisnosti od koncentracije vanćelijskog adenzina pokreće se signalni put ili preko funkcionalno inhibitornih receptora A₁ i A₃, ili preko stimulatornih receptora A_{2A} i A_{2B} (Chen et al., 2014, Cieślak et al., 2008, Fredholm et al., 2011, Rodrigues et al., 2018). Adeozinski A₁ receptori su u velikoj mjeri zastupljeni u CNS, posebno na neuronima korteksa, hipokampusa, malog mozga i dorzalnim rogovima sive mase kičmene moždine, a umjerenije u ostalim regionima mozga (Chen et al., 2014). Stimulacija ovog receptora usmjerava signalizaciju, preko smanjenja citosolnog cAMP, ka boljoj kontroli oslobađanja neurotransmitera i neuropeptida, održavajući ekscitabilnost neurona naročito smanjenjem oslobađanja glutamata (Cunha, 2005). A_{2A} receptori su bogato eksprimirani na neuronima dorzalnog i ventralnog strijatuma, a u znatno manjoj mjeri na neuronima hipokampusa i korteksa. U sadejstvu sa A₁ receptorom, A_{2A} doprinosi kontroli oslobađanja glutamata i ukupnom bazalnom neuroprotektivnom tonu u fiziološkim stanjima CNS. Ovaj receptor je pak karakterističan po odgovoru na različita oštećenja ili patologije nervnog tkiva, kada njegova ekspresija dramatično raste na različitim tipovima ćelija, dominantno na glijskim i imunskim ćelijama (Chen et al., 2014, Cunha, 2005). Ostali adenzinski receptori, A_{2B} i A₃ su u znatno manjoj mjeri zastupljeni, ali prisutni u različitim regionima CNS (Fredholm et al., 2000), dok su sva četiri tipa adenzinskih receptora okarakterisana na astrocitima (Del Puerto et al., 2013).

4.3. Ektonukleotidaze

Vanćelijsku koncentraciju, kao i poluživot nukleotida, regulišu ektonukleotidaze, enzimi locirani na spoljašnjoj strani ćelijske membrane. Ekto-nukleozidtrifosfat difosfohidrolaze (NTPDaze) i ektonukleotid pirofosfataze/fosfohidrolaze (NPP) hidrolizuju ATP i ADP do AMP. Podaci govore da se u CNS eksprimiraju tri forme NTPDaza koje se razlikuju afinitetom prema ATP i ADP. NTPDaza1, koja se pretežno eksprimira na mikrogliji i vaskularnim endotelnim ćelijama, ispoljava sličan afinitet prema ATP i ADP i razgrađuje ih do AMP. S obzirom na brojne uloge ovog enzima na imunskim ćelijama on nosi oznaku klastera diferencijacije 39 (CD39). NTPDaza 2 i NTPDaza 3 imaju znatno veći afinitet prema ATP u odnosu na ADP. Alkalne fosfataze razgrađuju nukleozid 5'-tri-, di- i monofosfate do odgovarajućeg nukleozida, dok ekto-5'-nukleotidaza (eN/CD73) hidrolizuje nukleozid monofosfate do nukleozida (Yegutkin, 2014, Zimmermann et al., 2012) u najvećoj mjeri adenozin monofosfat do adenzina (Slika 4).

5. Ekto-5'-nukleotidaza (CD73)

Ekto-5'-nukleotidaza (eN/CD73; E.C. 3.1.3.5) je membranski enzim, čiji je aktivni domen okrenut ka vanćelijskoj sredini, a katalitička aktivnost zavisi od prisustva dva Zn^{+} jona (DePierre and Karnovsky, 1974, Pilz et al., 1982, Zimmermann, 1992, Zimmermann et al., 2012). Ovaj enzim pripada klasteru diferencijacije limfocita 73, pa stoga nosi oznaku CD73. Ovaj enzim ima sposobnost da defosforiliše nekoliko ribo- i dezoksiribonukleotid 5'-monofosfata do njihovih odgovarajućih nukleozida (Zimmermann et al., 2012), međutim najefikasnije hidrolizuje 5'-adenozin monofosfat (AMP) (Bianchi and Sychala, 2003).

Fosfohidroliza 5'-AMP molekula je opisana kod bakterija i biljaka, a eN/CD73 je uspješno kloniran i okarakterisan u brojnim tkivima beskičmenjaka i kičmenjaka (Bianchi and Sychala, 2003, Hunsucker et al., 2005, Misumi et al., 1990a, Misumi et al., 1990b, Volkandt et al., 1991, Zimmermann, 1992, Zimmermann et al., 2012). Sekvenca klonirane DNK gena koji kodira eN/CD73 kod ljudi pokazuje 86% homologije sa mišjom, odnosno 92% homologije sa pacovskom sekvencom. Gen *NT5E* koji kodira za eN/CD73 kod čovjeka je lociran na dugom kraku hromozoma 6 (Boyle et al., 1989) i procjenjeno je da se

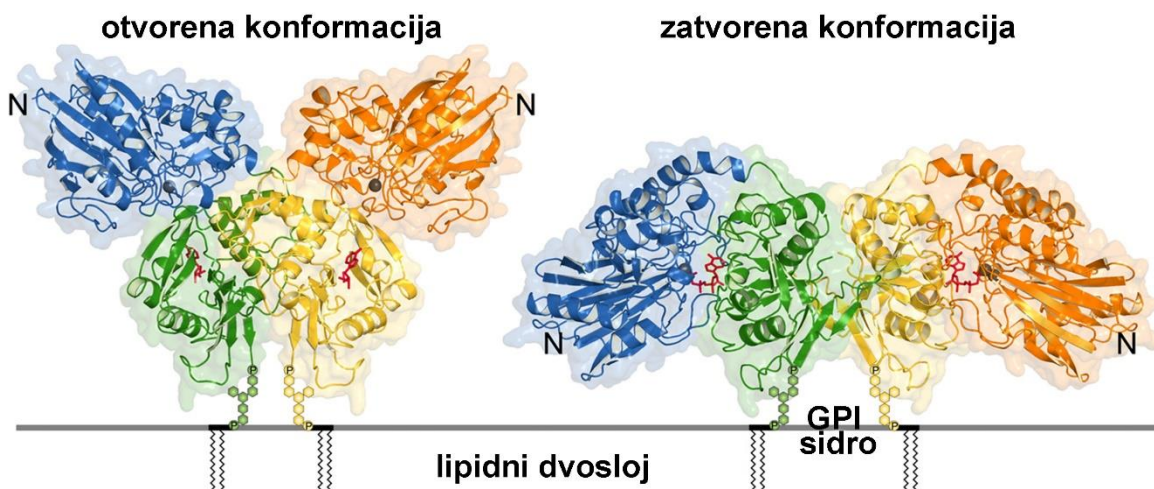
prepisuje kao protein izgrađen od 576 amino-kiselina u punoj dužini (Misumi et al., 1990b). Kod pacova, ovaj gen je lociran na hromozomu 8, a kod miševa na hromozomu 9 (Zimmermann, 1992, Zimmermann et al., 2012).

Ekspresija eN/CD73 varira u različitim tipovima ćelija (Resta et al., 1993). Takođe, ekspresija varira u zavisnosti od stadijuma u razviću (Bailly et al., 1990, Schoen et al., 1988, Schoen et al., 1991, Schoen et al., 1990) i nivoa diferenciranosti ćelija (Thompson and Ruedi, 1988, Thomson et al., 1990), ali i između polova (Kovacs et al., 2011).

5.1. Strukturno-funkcionalne karakteristike ekto-5'-nukleotidaze/CD73

5.1.1. Opšte odlike

Primarna struktura ekto-5'-nukleotidaze je određena iz više različitih životinjskih vrsta uključujući i čovjeka, na osnovu koje je zaključeno da se ovaj enzim sastoji iz 549 amino-kiselina (Strater, 2006). Funkcionalni molekul eN/CD73 prikačen je za ćelijsku membranu preko glikozil fosfatidil-inozitolnog sidra (*engl.* glycosyl phosphoinositol, GPI), preko Ser523 ostatka koji vezuje kompleksne oligoglikanske i sfingolipid-inozitolske grupe. Na ovaj način, nijedan dio proteina ne zalazi u membranu ćelije već je u potpunosti u vanćelijskoj sredini (Fini et al., 1990, Ogata et al., 1990). Na osnovu analize kristalne strukture zaključeno je da eN/CD73 formira homodimer, pri čemu monomeri ne grade disulfidne mostove već je veza nekovalentne prirode (Martinez-Martinez et al., 2000). Monomer je izgrađen iz dva glavna strukturna domena: veliki domen N-kraja (27-317 ak.) koji sadrži mjesto za vezivanje dva dvovalentna jona metala, i mali domen C-kraja (337-549 ak.) koji obuhvata vezujuće mjesto za supstrat, a predstavlja i interfejs za dimerizaciju. Ova dva domena su međusobno spojena α -heliksom (318-336 ak.), koji omogućava fleksibilnost i izmjenu relativnog odnosa između domena što enzimu omogućava prelazak iz otvorene u zatvorenu konformaciju. Aktivno mjesto enzima formiraju oba domena u zatvorenoj konformaciji (Slika 5) (Knapp et al., 2012, Knofel and Strater, 2001).



Slika 5. Model kristalne strukture zrele eN/CD73 porijeklom od čovjeka. Sa lijeve strane je prikazana otvorena konformacija eN/CD73, dok je sa desne strane njena zatvorena konformacija. N- i C-kraj proteina jedne subjedinice su predstavljeni plavom i zelenom bojom (redom), odnosno narandžastom i žutom bojom u okviru druge subjedinice (redom). Adenozin u otvorenoj konformaciji odnosno APCP u zatvorenoj konformaciji su prikazani crvenom bojom. Dvovalentni joni metala su predstavljeni sivim kuglicama. eN/CD73 je ukotvljena u lipidni dvosloj ćelijske membrane posredstvom GPI sidra. Modifikovano iz Knapp et al. (2012).

Zreli molekul eN/CD73 je glikoprotein, koji sadrži glikanske molekule različite kompleksnosti. U ćelijama čovjeka i miša, eN/CD73 posjeduje četiri, dok pacovski protein pojeduje pet potencijalnih mjesta glikozilacije (Navarro et al., 1998, Olmo et al., 1992, Turnay et al., 1989, Zimmermann, 1992). Poznato je da glikozilacija utiče na adekvatno savijanje proteina, unutarćelijsko sortiranje i ugradnju u membranu ćelije, stabilnost molekula, sposobnost interakcije sa ostalim proteinima, formiranje dimera, adhezivne karakteristike i svakako na katalitičku aktivnost kada govorimo o eN/CD73, iako sam mehanizam i danas ostaje nepoznat (Fini et al., 2003, Strater, 2006). Takođe, ostaje nejasna regulacija veoma kompleksnog procesa glikozilacije u endoplazminom retikulumu, koja očigledno dovodi do produkcije specifičnih glikoizoforni eN/CD73 u određenim tkivima, ćelijama ili u određeno vrijeme tokom razvića ili tokom razvoja patologije.

Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 je 5'-fosfohidrolaza sa najvećim afinitetom prema 5'-AMP. Isti enzim hidrolizuje i druge nukleozid 5'-monofosfate sa manjom efikasnošću, dok

ne pokazuje afinitet prema nukleozid 2'- ili 3'-monofosfatima. Procijenjena K_m vrijednost prema AMP keće se od 1 do 50 μM (Hunsucker et al., 2005, Zimmermann, 1992). Aktivnost eN/CD73 je kompetitivno inhibirana mikromolarnim koncentracijama ADP, dok je najpotentniji inhibitor sintetički analog ADP-a, α,β -metilen ADP (APCP) (Cunha et al., 2000, Naito and Lowenstein, 1985, Vieira et al., 2014). S obzirom na višestruku ulogu eN/CD73 u fiziološkim uslovima, ali i u etiologiji inflamacije i kancera, postoji veliki interes za razvoj malih molekula koji bi inhibitorno djelovali na aktivnost enzima, kao i terapije pomoću anti-eN/CD73 antitijela (Allard et al., 2017, Antonioli et al., 2016a, Antonioli et al., 2017, Antonioli et al., 2016b), što bi dovelo do smanjenja aktivnosti ovog enzima.

Osim enzimske uloge, eN/CD73 ima ulogu ćelijskog adhezivnog molekula, koji utiče na interakciju između ćelija, kao i između ćelije i vanćelijskog matriksa (Zimmermann, 1992). Brojne studije su pokazale da eN/CD73 stupa u interakciju sa nekoliko proteina vanćelijskog matriksa između ostalih sa tenascinom C, lamininom i fibronektinom. Ove interakcije mjenjaju aktivnost eN/CD73, ali i ukupno ponašanje ćelija, morfolofiju, proliferaciju i adhezivnost (Mehul et al., 1993, Olmo et al., 1992, Sadej et al., 2008, Stochaj et al., 1990).

5.1.2. Solubilna forma eN/CD73

Ekto-5'-nukleotidaza posjeduje karakteristike slične drugim ekto-membranskim proteinima sa GPI sidrom, kao što je grupisanje unutar membranskih lipidnih splavova, lateralnu pokretljivost u membrani, kao i oslobađanje solubilne forme nakon enzimskog isjecanja GPI sidra (Kinoshita, 2016). Solubilne forme eN/CD73 zadržavaju enzimsku aktivnost, što je važna odlika u regulaciji homeostaze nukleotida u vaćelijskom prostoru, kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima. Nisu primjećene razlike u aktivnosti solubilne eN/CD73 u odnosu na membransku (Heuts et al., 2012, Laketa et al., 2015, Yegutkin, 2008).

U literaturi su okarakterisana dva načina isjecanja eN/CD73 u nivou GPI sidra. Prvi podrazumjeva interakciju eN/CD73 sa ligandom, kao što je neki od proteina vanćelijskog matriksa. Ova interakcija se može simulirati u eksperimentalnim uslovima specifičnim

antitijelima na eN/CD73. Mehanizam isjecanja eN/CD73 na ovaj način još uvijek nije jasan, a istraživanja pokazuju da pri istim interakcijama može doći i do internalizacije eN/CD73, do promjene enzimske aktivnosti, do izmenjene adhezivnosti ćelija, a u nekim slučajevima do odustva promjene (Airas et al., 2000, Airas et al., 1997, Geoghegan et al., 2016, Sadej and Skladanowski, 2012, Sadej et al., 2006a, Terp et al., 2013). Specifična interakcija eN/CD73 sa ligandom najverovatnije dovodi do aktivacije enzima koji ima sposobnost isecanja GPI sidra. Pokazano je na primjer, da fosfatidil-inozitol specifična fosfolipaza C (*engl.* phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC), čija aktivacija može biti pokrenuta citokinima, hemokinima i interakcijom sa proteinima vanćelijskog matriksa i sintetičkim aktivatorima, dovodi do isjecanja GPI i oslobađanja eN/CD73 u vanćelijski prostor (Clifford et al., 1997, Kalsi et al., 2002, Kitakaze et al., 2000, Lehto and Sharom, 1998, Sharom et al., 1996, Spsychala et al., 1997). Solubilna forma eN/CD73 je od izuzetnog značaja u kontekstu neuroinflamacije, s obzirom na to da inflamatorni citokini, kao što je TNF- α , aktiviraju PI-PLC i dovode do oslobađanja aktivne forme ovog enzima.

5.2. Regulacija ekspresije eN/CD73

5.2.1. Regulacija na nivou transkripcije

Ekspresija eN/CD73 primarno je regulisana na nivou transkripcije. Promotorski region humanog *NT5E* i pacovskog *Nt5e* gena obuhvata nekoliko regulatornih elemenata organizovanih u četiri grupe koje se klasifikuju kao opšti, limfocit-specifični, makrofag-specifični i razvojno-specifični regulatorni elementi (Hansen et al., 1995, Resta et al., 1993, Spsychala et al., 1999). Bazalna ekspresija *NT5E* gena regulisana je aktivacijom CRE sekvenci u promotorskom regionu ovog gena, za koje se vezuju CREB (*engl.* cAMP response elements binding factor) i ATF (*engl.* activating transcription factor) (Spsychala et al., 1999). S obzirom na to da su svi adozinski receptori spregnuti sa G proteinom koji inhibira (A_1 , A_3) ili stimuliše (A_{2A} , A_{2B}) adenil ciklazu i time modulišu nivo cAMP u citosolu, jasno je da je ekspresija eN/CD73 primarno regulisana vanćelijskim adozinom. Pri niskim, fiziološkim koncentracijama adozin aktivira dominantno eksprimirane A_1 i A_{2A} receptore koji ispoljavaju i najveći afinitet prema adozinu, dok pri višim

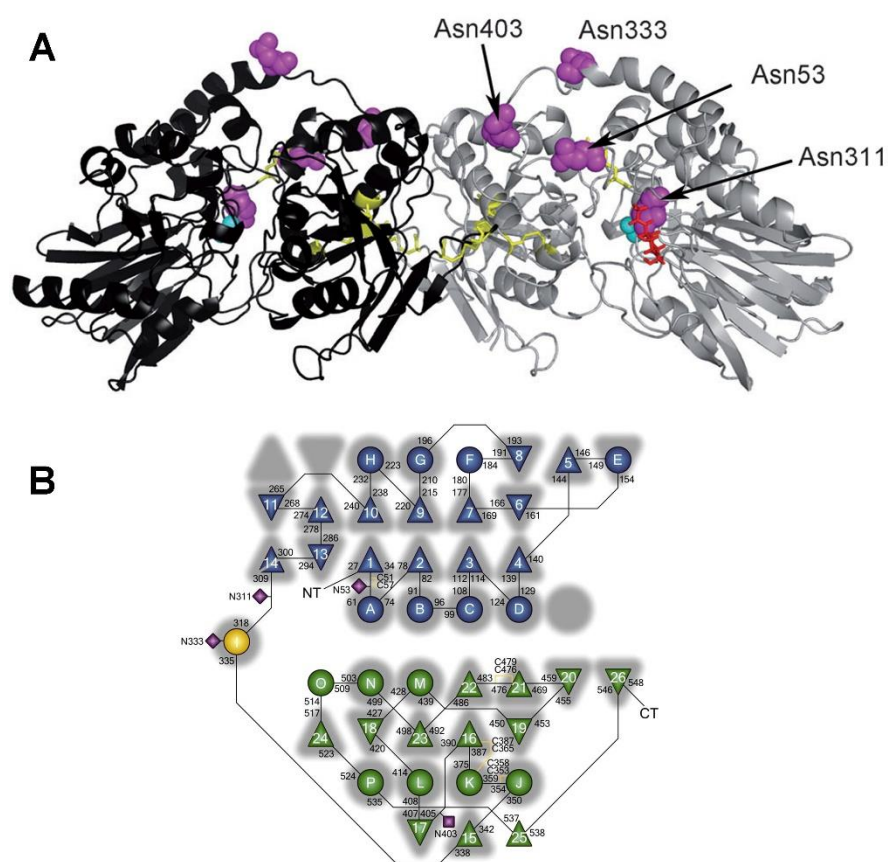
koncentracijama adenzin pokreće signalne puteve preko A_{2B} i A_3 receptora (Savic et al., 1991).

Promotorski region *NT5E* sadži nekoliko vezujućih mesta za transkripcione faktore koji modulišu aktivnost CRE mesta, što uslovljava tkivno-specifičnu ekspresiju u ćelijama limfoidne i mijeloidne loze (Airas et al., 1997, Hansen et al., 1995, Sychala et al., 1999). U ćelijama mijeloidne loze, transkripcija *NT5E* nije pod kontrolom cAMP, već je pod kontrolom protein kinaze C (PKC). U limfoidnim ćelijama, u koje spadaju NK ćelije i T- i B- limfociti, vezivanje ATF1 i/ili ATF2 za CRE mjesta prekida aktivnost promotora i uslovljava nisku bazalnu aktivnost. Za istu sekvencu vezuju se i SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5 i SP1, pri čemu su SMAD5 i SP1 najefikasniji. Represija transkripcije zavisi i od vezivanja ATF/c-Jun za ushodni negativni regulatorni element promotorskog regiona (Clifford et al., 1997, Hansen et al., 1995, Sychala et al., 1999). Ovi nalazi ukazuju da je ćelijski-specifična regulacija promotora *NT5E* gena uslovljena složenim interakcijama faktora koji deluju na CRE elementima i na ushodnim regulatornim elementima. Ushodni regulatorni regioni obuhvataju i TCF/LEF regulatorne sekvence koje su mete djelovanja Wnt signalnog puta, koji je zadužen za kontrolu ekspresije gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i razvića (npr. *C-myc* i ciklin D1) (Humphries and Mlodzik, 2018, Shtutman et al., 1999, Sychala and Kitajewski, 2004). U fiziološkim uslovima, pri niskoj ekspresiji *NT5E* gena, TCF/LEF vezujuće mjesto je suprimirano, dok je u nekim tumorskim ćelijskim linijama povećana aktivnost ovog regulatornog elementa što korelira sa povećanjem ekspresije gena za eN/CD73 (Sychala and Kitajewski, 2004, Sychala et al., 1999). Ovakva regulacija *NT5E* gena nam ukazuje da je učešće Wnt signalnog puta vjerovatno odgovorno za suprimiranje ćelijske proliferacije paralelno sa suprimiranjem ekspresije eN/CD73 molekula, što ovaj signalni put čini dvostruko interesantnim u razvoju tumorskih terapijskih strategija (Antonioli et al., 2016a, Antonioli et al., 2016b, Bavaresco et al., 2008).

5.2.2. *Posttranslacione modifikacije*

U nekim fiziološkim i patološkim uslovima uočeno je nepodudaranje ekspresije eN/CD73 na nivou transkripta, proteina i enzimske aktivnosti (Airas et al., 1997, Cunha et al., 2000, Morote-Garcia et al., 2006, Resta et al., 1993). Takva je situacija uočena u modelu traumatske povrede mozga (Nedeljkovic et al., 2006) i tokom različitih faza razvića (Stanojevic et al., 2011). Nepodudaranje nivoa enzimske aktivnosti i ekspresije eN/CD73 u ranim fazama razvića mogu se pripisati ekspresiji različitih izoformi ovog proteina (Grkovic et al., 2014), pri čemu je izoforma molekulske težine ~65 kDa bazična forma prisutna tokom svih uzrasta pacova, dok se izoforma od ~68 kDa javlja korelativno sa porastom zabilježene aktivnosti ovog enzima. Pokazano je takođe da su različite izoforme eN/CD73 ekspimiraju tokom različitih faza EAE (Lavrnja et al., 2015). Tako se u membranskoj frakciji izolovanoj iz kičmene moždine izoforma ~71 kDa ujednačeno ekspimirira tokom svih faza bolesti, dok se izoforma od ~75 kDa javlja od vrhunca simptomatske faze bolesti i zadržava se i u postsimptomatskoj fazi. Vogel i saradnici su okarakterisali postojanje čak 13 izoformi eN/CD73 (Vogel et al., 1991) koje su posledica post-translacionih modifikacija ovog proteina i različitog sadržaja ugljenih-hidrata. Danas je poznato da zreli protein ekto-5'-nukleotidaza ima četiri (kod čovjeka i miša, Slika 6), odnosno pet (kod pacova) pozicija za N-glikolizaciju, od kojih svaka može biti potpuno ili djelimično okupirana glikanima različite složenosti (Navarro et al., 1998, Olmo et al., 1992, Turnay et al., 1989, Zimmermann, 1992). Određivanjem tipova zastupljenih ugljenih-hidrata možemo klasifikovati eN/CD73 kao tip sa visokim sadržajem manoze, tip sa kompleksnim glikanima ili kombinovano sa sijalinskom kiselinom (Baron and Luzio, 1987, Meflah et al., 1984, van den Bosch et al., 1986, van den Bosch et al., 1988, Wada et al., 1986). Procjenjeno je da ukoliko je glikozilovana na npr. tri pozicije za N-glikozilaciju, kombinacijom manoze i kompleksnih glikana, molekulska težina eN/CD73 može biti izmjenjena i za 6 kDa (Strater, 2006). U zavisnosti od sadržaja negativno naelektrisane sijalinske kiseline značajno se mijenja ukupno naelektrisanje proteina što utiče na kretanje domena eN/CD73, iako se pozicije N-glikozilacije ne nalaze u blizini katalitičkog centra

enzima (Fini et al., 2003, Meflah et al., 1984, Strater, 2006). Promjena naelektrisanja proteina na ćelijskoj membrani dovodi i do promjene naelektrisanja same membrane, a samim tim i do promjene interakcije ćelija sa drugim ćelijama ili sa proteinima ECM. Stepenn glikozilacije eN/CD73 zavisi od fiziološkog konteksta i tipa ćelija. Ove brojne varijacije u sadržaju ugljenih-hidrata na eN/CD73 proteinu su vjerovatno uzrok različitim zabilježenim molekulskim težinama (Lavrnja et al., 2015, Navarro et al., 1998, Olmo et al., 1992, Turnay et al., 1989, Zimmermann, 1992).



Slika 6. Model kristalne strukture solubilnog dimera eN/CD73. porijeklom od čovjeka **A:** Subjedinice su u potpunosti prikazane jednobojno (crno i sivo). Žutom bojom su označeni disulfidni mostovi unutar svake od subjedinica. Pozicije za N-glikozilaciju (Asn) su označene ljubičastom bojom, raspoređene na spoljnim regionima subjedinica i okrenute su suprotno od C-kraja. Primjer N-acetil-glukozamina (GlcNAc) je prikazan crvenom strukturom, a dvovalentni metalni jon plavim kuglicama. Modifikovano iz Heutes et al. (2012). **B:** Topološki dijagram ljudske eN/CD73. β -ploče su prikazane trouglastim simbolima, dok su α -zavojnice predstavljene krugovima. Žuti krug

predstavlja vezujuću α -zavojnica. C-kraj je označen zelenom, a N-kraj plavom bojom. Ljubičasti kvadratići označavaju pozicije za N-glikozilaciju (N53, N311, N333, N403). Modifikovano iz Knapp et al. (2012).

5.2.3. Ekspresija eN/CD73 u CNS-u

Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 ispoljava izrazite razlike u pogledu tkivne ekspresije. Najveća ekspresija detektovana je u debelom crijevu, nakon čega slijedi upola manja ekspresija u bubrežima i mozgu, a zatim u jetri, plućima, srcu i mišićima (Colgan et al., 2006). Ovaj enzim je različito distribuiran i u CNS, pa je tako kod glodara najniža ekspresija u bazalnim uslovima uočena u kori prednjeg mozga, zatim u limbičkom sistemu, uključujući entorinalnu koru, subikulum i hipokampus, u hipotalamusu i kičmenoj moždini, dok najveću ekspresiju pokazuju bazalne ganglije, mali mozak, talamus i gornje i donje kvrčice srednjeg mozga (Bjelobaba et al., 2009, Kovacs et al., 2013, Langer et al., 2008, Nedeljkovic et al., 2006). Ukoliko posmatramo ćelijsku distribuciju eN/CD73 u CNS, onda je enzim u najvećoj mjeri prisutan na glijskim ćelijama, prvenstveno na fibroznim astrocitima, nastavcima astrocita koji formiraju *glia limitans*, perivaskularnim stopalima astrocita i Bergmanovoj gliji malog mozga. Takođe, eN/CD73 je eksprimiran na endodimskim ćelijama i ćelijama horoidnog pleksusa, ali i u nešto manjoj mjeri na endotelnim ćelijama moždanih krvnih sudova. Oligodendrociti, mijelinizovana vlakna, ali i Švanove ćelije perifernog nervnog sistema pokazuju određen nivo ekspresije eN/CD73. U manjoj mjeri eN/CD73 je eksprimirana na tijelima nervnih ćelija, njihovim nastavcima, zatim na protoplazmatičnim astrocitima, endotelnim limfatičnim ćelijama, dok je gotovo potpuno odsutna na mirujućoj, ramifikovanoj mikrogliji (Bjelobaba et al., 2009, Kovacs et al., 2013, Langer et al., 2008, Schoen and Kreutzberg, 1994, Zimmermann, 1992, Zimmermann et al., 2012).

5.2.4. Ekspresija eN/CD73 tokom (neuro)inflamacije

S obzirom na to da je ekto-5'-nukleotidaza glavni izvor vanćelijskog adenzina, koji je modulator imunskog odgovora, urođena zaštitna i obnavljajuća strategija signalnih puteva jeste da poveća koncentraciju adenzina tako što će povećati ekspresiju eN/CD73. U brojnim neurološkim oboljenjima, u čijoj je osnovi akutna ili hronična neuroinflamacija,

pokazano je da dolazi do snažne ushodne regulacije *Nt5e* gena, a takođe i do posledičnih promjena na nivou količine proteina i aktivnosti eN/CD73 (Eltzschig et al., 2003, Nedeljkovic, 2019, Synnestvedt et al., 2002, Thompson et al., 2004, Zhang et al., 2012).

Značajne promjene ekspresije eN/CD73 tokom neuroinflamacije uočene su na astrocitima. Ove ćelije eksprimiraju NTPDazu2 i eN/CD73, te tako aktivno učestvuju u hidrolizi vanćelijskog ATP (Brisevac et al., 2015, Chu et al., 2014, Jakovljevic et al., 2017, Wink et al., 2006). Značajno povećanje ekspresije eN/CD73 na reaktivnim astrocitima *in vivo* pokazano je u nekoliko eksperimentalnih modela neuroloških bolesti, kao što su ishemija (Braun et al., 1998), epilepsija (Bonan, 2012, Bonan et al., 2000), traumatska povreda mozga (Bjelobaba et al., 2011, Nedeljkovic et al., 2006), povreda kičmene moždine (Xu et al., 2013), EAE (Jakovljevic et al., 2017, Lavrnja et al., 2009, Lavrnja et al., 2015) i glioblastom (Xu et al., 2013). Ushodna regulacija eN/CD73 na astrocitima pokazana je i u *in vitro* uslovima neuroinflamacije (Brisevac et al., 2015, Brisevac et al., 2012).

Promjena ekspresije eN/CD73 u patološkim uslovima nije trenutna. Naime, u studiji ubodne lezije kore prednjeg mozga pacova, broj GFAP pozitivnih astrocita koji su eksprimirali eN/CD73 postepeno raste tokom vremena, dostižući maksimum 14. dana nakon povrede (Bjelobaba et al., 2011). Sličan trend naknadne ekspresije eN/CD73 je uočen u EAE, gdje se veliki broj eN/CD73⁺ reaktivnih astrocita uočava tek na vrhuncu bolesti (Lavrnja et al., 2015). Lokalno povećanje produkcije adenzina utiče na dalji razvoj inflamacije u patologiji, ali za razliku od fiziološkog djelovanja na A₁ receptore, adenzin djeluje na A_{2A} receptore koji su u patologiji najčešće povećano eksprimirani (Borrotto-Escuela et al., 2018, Jakovljevic et al., 2017, Orr et al., 2015), što posledično dovodi do ispoljavanja ekscitotoksičnog karaktera adenzina i pogoršanja statusa inflamacije (Dare et al., 2007).

Patofiziološki značaj eN/CD73 se ogleda i kroz njegovo delovanje kao ćelijskog adhezivnog molekula. Povećanje ekspresije eN/CD73 mjenja adhezivne i migratorne sposobnosti astrocita, što je jedna od ključnih odlika reaktivnih astrocita (Andrade et al., 2011, Wang et al., 2008, Zhi et al., 2007).

Ekspresija odnosno prisustvo funkcionalnog eN/CD73 veoma strogo regulisana u okviru KMB, ali i drugih barijera u mozgu u fiziološkim uslovima. Tokom oštećenja ili inflamacije sve komponente barijera imaju sposobnost da odgovore na prijetnju koordinišući imunsku reakciju i prodor T-limfocita u parenhim CNS. Pomjene u lokalnoj produkciji adenozina i adhezivnim sposobnostima eN/CD73, kako na astrocitnim stopalima, tako i na endotelnim ćelijama, ali i T-limfocitima ukazuju na kompleksnu koordinaciju ne samo ekspresije ovog enzima, već i stepena njegove glikozilacije i solubilizacije. Pokazano je da kod eN/CD73^{-/-} miševa dolazi do narušavanja KMB u velikom stepenu, pri čemu se povećava broj T-limfocitnih infiltrata i makrofaga u parenhimu ishemičnog mozga, uz povećanje ekspresije pro-inflamatornih citokina kao što su IL-6, IL-1 β i TNF- α (Airas et al., 1995, Airas et al., 2007, Alvarez et al., 2013, Braun et al., 1995, Daneman and Prat, 2015, Petrovic-Djergovic et al., 2012, Schenk et al., 2008, Thompson et al., 2004). Nekoliko istraživanja ukazuje da prisustvo eN/CD73 na površini endotelnih ćelija odnosno limfocita onemogućuje njihovo aktivno prodiranje kroz KMB (Niemela et al., 2008, Petrovic-Djergovic et al., 2012). Postavlja se pitanje na koji način prisustvo ovog proteina na membranama stopala astrocita, i astrocita uopšte doprinosi zaštiti parenhima CNS od masovne invazije limfocitima i makrofagima, odnosno pogoršanju inflamatornog stanja i daljim oštećenjima moždanog tkiva.

5.2.5. Funkcionalna povezanost eN/CD73 i adenzinskih receptora

Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 proizvodi ligand za aktivaciju adenzinskih receptora, a od stepena aktivacije ovih receptora zavise biološki efekti adenozina. Brojni eksperimentalni dokazi idu u prilog činjenice da adenzin ispoljava veoma značajne efekte tokom neuroinflamacije. Pokazalo se, međutim, da adenzin koji se oslobađa kao takav iz ćelije indukuje drugačije ćelijske odgovore od adenozina koji nastaje razgradnjom vanćelijskog ATP. Naime, adenzin oslobođen iz unutarćelijskih izvora prevashodno djeluje na A₁ receptore, dok adenzin generisan vanćelijski aktivira ekscitatorne A_{2A} (Barros-Barbosa et al., 2016, Cunha et al., 2008, Cunha et al., 1996, Orr et al., 2009, Rebola et al., 2008). Preferencija vanćelijski generisanog adenozina prema A_{2A} receptorima nedavno je objašnjena nalazima o kolokalizaciji A_{2A} i eN/CD73 unutar istih membranskih

mikrodomena (Barros-Barbosa et al., 2016, Rebola et al., 2008). Prostorna bliskost eN/CD73 koja proizvodi adenzin i A_{2A} receptora omogućava neposrednu isporuku adenozina na mjesto gde će on djelovati. Osim prostorne bliskosti, prikupljeni su podaci o paralelnoj regulaciji *Nt5e* i *Adora2a* gena, ali ne i *Adora1* u nekoliko neuropatoloških stanja (Augusto et al., 2013, Barros-Barbosa et al., 2016, Ng et al., 2015, Orr et al., 2009). Smatra se da je eN/CD73 ključni regulator signalizacije posredovane A_{2A} receptorom (Augusto et al., 2013). Stoga ćemo na kraju ovog uvoda razmotriti promjene nivoa ekspresije i kompozicije adenozinskih receptora i posebno A_{2A} receptora u uslovima akutne i hronične neuroinflamacije.

5.3. Promjene ekspresije i kompozicije adenozinskih receptora tokom neuroinflamacije

Vanćelijski adenzin učestvuje u regulaciji homeostaze, ekscitabilnosti neurona, oslobađanju neurotransmitera i sinaptičke plastičnosti. Efekti koje adenzin ispoljava zavise od nivoa ekspresije određenog P1 receptora u CNS na koji će adenzin da djeluje. Generalno se smatra da A_1 receptori imaju neuroprotektivnu i homeostatsku funkciju, dok povećana ekspresija A_{2A} receptora učestvuje u razrješenju ili pak uspostavljanju hronične neuroinflamacije i u krajnjoj mjeri neurodegeneraciji (Nedeljkovic, 2019). Osnova ovakve podjele je u razlici signalnog puta ova dva receptora (A_1 pokreće inhibitorni, a A_{2A} ekscitatorni signalni put) (Stockwell et al., 2017).

U patofiziološkim uslovima, kao što je prethodno objašnjeno, koncentracija adenozina u međućelijskom prostoru raste (Cunha, 2016). Lokalna signalizacija inflamatornim medijatorima usled oštećenja CNS dovode do odloženih, ali značajnih i konzistentnih promjena u ekspresiji adenozinskih receptora (Linden, 2011). Produkcijom snažnih pro-inflamatornih citokina kao što su IL-1 β i TNF- α se pokreće NF- κ B signalni put, koji pozitivno utiče na transkripciju i A_{2A} receptora. Paralelno, razgradnjom velikih količina ATP do adenozina dolazi i do pojačane cAMP signalizacije, u sve većoj mjeri aktivirajući stimulatorne A_{2A} receptore. Adenzin na taj način služi i kao lokator opasnosti, koji ima zadatak da suprimira inflamaciju i u idealnom slučaju ima potencijal da dovede do razrješenja patoloških procesa (Chen et al., 2014). Međutim, situacija tokom

neuroinflamacije nije tako jednostavna, već brojna istraživanja opisuju kompleksne i naizgled paradoksalne rezultate o ulogama adenzinskih receptora u različitim patološkim stanjima CNS (Chen et al., 2014, Stockwell et al., 2017). Sve veća koncentracija i dugotrajno djelovanje adenzina dovode do desenzitizacije inhibitornih A₁ receptora i dominantne aktivacije A_{2A} receptora. Ovaj fenomen je razlog inverznih efekata agonista A₁ receptora u podmaklim fazama neuroinflamatornih procesa nakon oštećenja CNS (Cunha, 2016). Zbog toga je terapijski fokus preusmjeren na regulaciju aktivacije A_{2A} receptora. Sa jedne strane je pokazano da aktivacija A_{2A} receptora štiti nervno tkivo nakon lezija, povrede kičmene moždine, ishemije i krvarenja u mozgu tako što inhibira inflamatorne procese na nivou neuro-vasikularne jedinice. Sa druge strane inaktivacijom A_{2A} receptora takođe se indukuje protekcija CNS nakon različitih oštećenja kao što su i u ovom slučaju ishemija ili ekscitotoksičnost, suprimiranjem produkcije pro-inflamatornih citokina i oslobađanja glutamata (Chen et al., 2014).

Ovakvi rezultati se mogu opravdati ekspresijom A_{2A} receptora na različitim tipu ćelija: neuronima, ćelijama glije, endotelnim ćelijama ili u različitim fazama neuroinflamacije tj, patologije (Chen et al., 2014, Fredholm et al., 2003, Matos et al., 2015). Efekti različitih strategija antagonizacije ili aktivacije A_{2A} receptora su široko obuhvaćeni različitim istraživanjima radne memorije, pamćenja, i patoloških stanja kao što su PD, AD, MS. Na osnovu literaturnih podataka maksimalni neuroprotektivni efekat bi trebalo da daje kombinacija blokade A_{2A} i potenciranjem aktivacije A₁ adenzinskih receptora (Cunha, 2016, Stockwell et al., 2017).

Uz ovakav terapijski potencijal adenzinskih receptora u neuroinflamaciji, ne smijemo zaboraviti na regulaciju produkcije adenzina od strane visoko ekspimirane eN/CD73. Napomenimo da su brojna istraživanja u biologiji kancera pokazala da farmakološka, imunološka ili molekularno biološka blokada eN/CD73 daje pozitivne efekte u promjeni patološkog fenotipa malignih ćelija, i naročito njihovog invazivnog potencijala (Antonioli et al., 2017, Antonioli et al., 2013, Bavaresco et al., 2008, Cappellari et al., 2012, Gao et al., 2014, Sadej et al., 2008, Wang et al., 2008). S obzirom na to da je masivno povećanje ekspresije eN/CD73 univerzalna odlika reaktivnih astrocita u svim do

sada ispitivanim neuropatologijama, od posebnog je značaja ispitati ulogu pojačane ekspresije ovog enzima u reaktivnom fenotipu astrocita, u njihovoj migraciji i proliferaciji, kao i u A1/A2 polarizaciji reaktivnih astrocita. Poznavanje uloge eN/CD73 u razvijanju inflamatornog ili protektivnog fenotipa astrocita omogućilo bi primjenu modulacije eN/CD73 kao samostalnog ili kombinovanog terapijskog pristupa u kontroli hronične neuroinflamacije.

II CILJEVI

Kao dio enzimske kaskade ektonukleotidaza, eN/CD73 određuje ukupnu brzinu razgradnje ATP i nastanka adenoзина, pa time presudno utiče na odnos koncentracija ATP/adenozin i inflamatorni status tkiva. Uz to, poznato je da eN/CD73 ima ulogu ćelijskog adhezivnog molekula, koji omogućava interakciju ćelija sa komponentama vanćelijskog matriksa i time mjenja svojstva njihove adhezivnosti. Imajući u vidu da se u svim do sada ispitanim modelima neuroinflamacije uočava snažna pozitivna regulacija eN/CD73 na reaktivnim astrocitima, u ovoj doktorskoj tezi smo postavili pitanje patofiziološke uloge ushodne regulacije eN/CD73 na reaktivnim astrocitima u uslovima neuroinflamacije. Stoga smo postavili sledeće eksperimentalne zadatke:

- 1) Ispitati uticaj ATP na morfološki (oblik i veličina ćelija, broj nastavaka, ekspresija citoskeletnih elemenata) i funkcionalni (preživljavanje, proliferacija, test migracije, oslobađanje citokina, oslobađanje reaktivnih vrsta kiseonika i azota) fenotip ćelija u primarnoj kulturi astrocita izolovanih iz kore prednjeg mozga pacova.
- 2) Ispitati ulogu adenoзина na opšte morfološke i funkcionalne odlike primarnih astrocita u kulturi.
- 3) Analizirati ulogu pojačane ekspresije eN/CD73 u nastanku reaktivnih astrocita u kontrolnim uslovima i nakon farmakološke (inhibitor aktivnosti APCP), imunološke (specifično anti-eN/CD73 antitijelo) i genetičke (eN/CD73-sFiRNK) blokade ovog enzima.
- 4) Ispitati ulogu eN/CD73 u migraciji astrocita u uslovima farmakološke, imunološke ili genetičke blokade ovog enzima.
- 5) Ispitati i korelisati promene nivoa ekspresije i ugljeno-hidratnog sadržaja eN/CD73 na primarnim astrocitima u kulturi, u različitim neuroinflamatornim paradigmatama koje uslovljavaju polarizaciju astrocita prema A1 (LPS, IL-1 β , TNF- α) ili A2 (IL-6, IFN- γ , ATP).

Upoznavanje značaja i patofiziološke uloge pojačane ekspresije eN/CD73 na astrocitima bi moglo da otvori nove mogućnosti primjene farmakološke blokade ovog enzima, samostalno ili u kombinaciji sa drugim farmakološkim agensima, u kontroli neuroinflamacije asocirane sa bolestima nervnog sistema, uključujući metaboličke, neurodegenerativne i autoimunske bolesti.

III MATERIJAL I METODE

1. Korišćeni materijali, reagensi i rastvori, tretmani, antitjela i prajmeri su navedeni u narednim tabelama (Tabela 1-5).

Tabela 1. Nazivi i proizvođači korišćenih komponenti i kompleta

NAZIV	PROIZVOĐAČ
DMEM, L-15, FBS, Opti-MEM, Penicilin i Streptomycin, Tripan plavo	Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, USA
Lipofectamine 2000, Trizol, upH₂O, Komplet za vizuelizaciju ECL Faloidin (<i>engl.</i> Phalloidin-AF568) (A12380)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA
Koktel inhibitora proteaza i fosfataza BCA komplet za određivanje koncentracije proteina	Pierce, ThermoFisher Scientific, MA, USA
Avidin konjugovan sa HRP, ABTS supstrat	eBioscience, ThermoFisher Scientific, MA, USA
Proteinski standard (PAGE ruler; 26616 kataloški broj)	ThermoFisher Scientific, MA, USA
SYBR zeleno proba (Power SYBR™ Green PCR Master Mix)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA
Komplet za sintezu cDNK (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ATP, ADP, AMP, ACP, Adenozin, Probenecid, BSA, MTT, DMSO, PFA, PLL (Mr 70-150 kDa), EDTA, HEPES, Mowiol, Tripsin, Tris, Triton™ X-100, Glicerol, Glukoza, Glicin, Amonijum molibdat, Malahit zeleno, Akrilamid/bisakrilamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, Na₃PO₄, NaOH, HCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgCl₂, H₂SO₄ DEPC, SDS, MTT, β-merkapt etanol, Tween, NP 40, TCA, PCA, APS, TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Komplet za deglikozilaciju pomoću PNGaze F (P0704S)	New England Biolabs, UK
Mini ELISA komplet za određivanje sadržaja IL-1β	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Komplet za vizuelizaciju ECL Max Clarity	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Aneksin V – FITC	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Propidijum Jodid	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Etanol, Izopropil-alkohol, metanol	Zorka, Srbija
Hloroform	J.T. Baker, SAD

Tabela 2. Sastav korišćenih medijuma, pufera i rastvora

RASTVORI/PUFERI/MEDIJUMI	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
Medijum za izolaciju na bazi L-15 medijuma pH 7.4 ~300 mOsm/L	Leibovitz L-15 medijum 1 mM L-glutamin 100 IJ/ml penicilin 0.1 mg/ml streptomycin 0.1% BSA
Medijum za gajenje (DMEM+) pH 7.4 300-320 mOsm/L	DMEM medijuma koji sadrži 25 mM glukozu 2 mM L-glutamin 1 mM Na-piruvat 100 IJ/ml penicilin 0.1 mg/ml streptomycin 10% fetalni goveđi serum (FBS)
Rastvor tripsina u 0.01M PBS	0.25% tripsin 0.02% EDTA

4% paraformaldehid (PFA) pH 7.4	40 g paraformaldehida 500 ml dH ₂ O 500 ml 0.2 M fosfatnog pufera (1 M NaOH)
Pufer za liziranje za Protočnu citofluorimetriju pH 7.4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0.1% SDS 10% glicerol
Pufer bez fosfata pH 7.4 ~300 mOsm/L	117 mM NaCl 5.3 mM KCl 1.8 mM MgCl ₂ 26 mM NaHCO ₃ 10 mM glucose
Radni rastvor Malahit zelenog zapreminski odnos MG, AM i TW je 10 : 2.5 : 0.2	0.1% rastvora Malahit zelenog u 20% H ₂ SO ₄ (MG) 7.5% Amonijum molibdata (AM) 11% Tween (TW)
RIPA pufer pH 7.4 neposredno pred upotrebu: + inhibitori proteaza i fosfataza + 1 mM Na-ortovanadat	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% NP 40 0.1% SDS 10 mM EDTA 10 mM EGTA 0.5% Triton X-100)
Gelovi za elektroforezu	Gel za koncentovanje: 4% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 10% SDS 10% amonijum persulfat 1% tetrametilen diamin Gel za razdvajanje: 12% akrilamid/bisakrilamid (29:1) 1.5 M Tris pH 8.8 10% SDS 10% amonijum persulfat 1% tetrametil-etilen diamin

Pufer za uzorke (6× Laemli pufer)	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	20% metanol 192 mM glicin 25 mM Tris pH 8.3
TBST pufer	50 mM Tris-HCl pH 7.4 150 mM NaCl 0.5% Tween
Pufer za vezivanje aneksina V pH 7.4	140 mM NaCl 2.5 mM CaCl ₂ i 10 mM HEPES
Grisov reagens Odnos reagens A i B je 1:1	A) 1% sulfanilamid u 2% H ₃ PO ₄ B) 0.1% N-(naftil)-etilenediamin-dihidroklorid
Nitro-plavo tetrazolijum rastvor (NTB)	1 mM NBT fosfatni pufer pH 8.6 0.1 mg/ml želatina
Radni reagens za određivanje malonaldehid (MDA) pH 3.5	15% trihlorsirćetne kiseline 0.375% tiobarbituratne kiseline 0.25 mol/l HCl ddH ₂ O
Reakcione komponente za određivanje ukunog glutationa (GSH) pH 7.5	A) NADH u PBS (0.211 mg, sa 6.3 mM EDTA) B) DNTB u PBS (6 mM, sa 6.3 mM EDTA) C) GR PBS (266 U/ml, sa 6.3 mM EDTA)
Ponceau S boja	1% Ponceau S boja 5% glacijalna sirćetna kiselina
DEPC tretirana voda	1 ml 0.1% dietil-pirokarbonata (DEPC) u 1000 ml dH ₂ O, autoklavirano
Rastvor moviola	9.6 g moviola 24 ml glicerola

Tabela 3. Spisak korišćenih tretmana

TRETMAN	RAZBLAŽENJE/RASTVARAČ	PROIZVOĐAČ/KAT.BR.
ATP	5 µM – 1 mM, DMEM+	Sigma-Aldrich, A2383
ADP	1 mM, DMEM+	Sigma-Aldrich, A2754
AMP	1 mM, DMEM+	Sigma-Aldrich, 01930
Adenozin	1 mM, DMEM+	Sigma-Aldrich, A9251
Probenecid	1.25 mM, DMEM+	Sigma-Aldrich, P8761
Anti-CD73 antitijelo	1:250 – 1:1000 tokom optimizacije	Santa Cruz (V-20), sc-14682
porijeklom iz kože	1:500, DMEM+	
miRNK (engl. siRNA)	25 – 100 nM tokom optimizacije	Thermo Fisher Scientific,
siRNA-CD73	50 nM, DMEM+ bez antibiotika	4390771, ID: s132854 URL za siRNA-CD73 ID
siRNA-GAPDH	50 nM, DMEM+ bez antibiotika	4390849
siRNA-CTR	50 nM, DMEM+ bez antibiotika	4390846
APCP	50 - 300 µM tokom optimizacije 100 µM, DMEM+	Sigma-Aldrich, M8386
IL-1β	10 ng/ml, DMEM+	R&D systems, 501-RL
IL-6	10 ng/ml, DMEM+	R&D systems, 506-RL
IL-10	10 ng/ml, DMEM+	R&D systems, 547-RL
IFN-γ	10 ng/ml, DMEM+	Sigma-Aldrich, I3275
TNF-α	100 ng/ml, DMEM+	Invitrogen, PRC3013
LPS	100 ng/ml, DMEM+	Sigma-Aldrich, L2654

Tabela 4. Spisak korišćenih antitijela

SPECIFIČNOST	PORIJEKLO/ KLONALNOST	RAZBLAŽENJE/ PRIMJENA	PROIZVOĐAČ/KAT.BR.
GFAP	Miš, monoklonsko	1:500 IF	Sigma–Aldrich, G3893
GFAP	Zec, poliklonsko	1:500 IF 1:7000 WB	DAKO, Z0334
Iba1	Koza, poliklonsko	1:500 IF	Abcam, ab5076
Mijelin CNPaza	Miš, monoklonsko	1:200 IF	Millipore, NE1020, klon SMI-91
Ki-67	Zec, poliklonsko	1:500 IF	Abcam, ab15580
CD73	Zec, monoklonsko	1:1500 WB, DB	Cell Signaling (D7F9A), #13160
CD73	Koza, poliklonsko	1:500 T	Santa Cruz (V-20), sc- 14682
CD73	Zec, poliklonsko	1:100 IF	www.ectonucleotidases-ab.com , Cat# [rNu-9L(I4,I5)]
β-aktin	Miš, monoklonsko	1:5000 WB	Sigma–Aldrich , A5316
GAPDH	Koza, poliklonsko	1:1000 WB	Santa Cruz (V-18), sc-20357
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Zec, monoklonsko	1:1000 WB	Cell Signaling, #4695
IL-1β-HRP konjugovano	Koza, poliklonsko	1:2000 WB 0.4 µg/ml ELISA	R&D Systems, BAF501
IL-1β	Koza, poliklonsko	0.8 µg/ml ELISA	R&D Systems, AF-501-NA
Anti-mišje AF647	Magarac, poliklonsko	1:200 IF	Invitrogen, A31571

Anti-kozje AF488	Magarac, poliklonsko	1:200 IF	Invitrogen, A11055
Anti-zečje AF555	Magarac, poliklonsko	1:200 IF	Invitrogen, A31572
Anti-zečje-HRP konjugovano	Magarac, poliklonsko	1:10000 WB, DB	Santa Cruz, sc-2305
Anti-kozje-HRP konjugovano	Magarac, poliklonsko	1:10000 WB, DB	Santa Cruz, sc-2020
Anti-mišje-HRP konjugovano	Magarac, poliklonsko	1:10000 WB	Santa Cruz, sc-2314
Anti-zečje Cy3	Magarac, poliklonsko	1:500 IF	Jackson ImmunoResearch, 711-165-152
Anti-mišje Cy2	Magarac, poliklonsko	1:500 IF	Jackson ImmunoResearch, 715-225-151

**IF – imunofluorescencija, WB – imunoblot, DB – dotblot, ELISA - enzimski
imunisorbentni test**

Tabela 5. Spisak korišćenih prajmera

CILJNI GEN		SEKVENCA PRAJMERA	DUŽINA PRODUKTA (bp)	TEMP. TOPLJENJA T _m (°C)
<i>Nt5e</i> (eN/CD73)	F	CAAATCTGCCTCTGGAAAGC	160	57.49
	R	ACCTTCCAGAAGGACCCTGT		57.73
<i>Adora1</i>	F	GTGATTTGGGCTGTGAAGGT	194	57.12
	R	GAGCTCTGGGTGAGGATGAG		56.62
<i>Adora2a</i>	F	TGCAGAACGTCACCAACTTC	141	56.5
	R	CAAAACAGGCGAAGAAGAGG		57.66
<i>Adora2b</i>	F	CGTCCCGCTCAGGTATAAAG	104	57.66
	R	CCAGGAAAGGAGTCAGTCCA		57.1
<i>Adora3</i>	F	TTCTTGTTTGCCTTGTGCTG	129	57.19
	R	AGGGTTCATCATGGAGTTCG		57.01
<i>Gapdh</i>	F	TGGACCTCATGGCCTACAT	118	53.5
	R	GGATGGAATTGTGAGGGAGA		53.97
<i>Hprt</i>	F	GGTCCATTCCTATGACTGTAG	126	59.67
	R	CAATCAAGACGTTCTTTCCAGTT		58.18

2. Eksperimentalne životinje

U svim eksperimentima su korišćeni novorođeni pacovi oba pola *Wistar* soja, starosti 1-2 dana, uzgajani u lokalnoj koloniji Instituta za fiziologiju i biohemiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Životinje su gajene u uslovima 12h:12h dnevno-noćnom ritmu, na temperaturi od 25 °C, pri čemu su im hrana i voda bili dostupni *ad libitum*. Procedure žrtvovanja i izolacije nervnog tkiva za formiranje primarnih ćelijskih kultura izvršene su u saglasnosti sa Direktivama Evropske unije o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe (2010/63/EU) i odobreni su od strane Etičkog komisije Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (EK-BF-2016/05).

3. Izolacija i održavanje primarne kulture kortikalnih astrocita

Primarna kultura astrocita izolovana je iz kore velikog mozga mladunaca starih do dva dana (P0-2), prema prethodno opisanom protokolu (McCarthy and de Vellis, 1980), uz male izmjene. Neposredno pred izolaciju svježe su pripremljeni neophodni sterilni rastvori i medijumi unutar laminarne komore, filtrirani kroz filter dijametra pora 0.2 µm i ohlađeni na +4°C ili zagrijani u vodenom kupatilu na 37°C, prema potrebama protokola. Disekcioni pribor je sterilisan korišćenjem 70% etanola i izlaganjem ultraljubičastom zračenju unutar laminarne komore u trajanju od 30 min. Nakon dezinfekcije glave i vrata životinje 70% etanolom, životinja je dekapitovana, a mozak je brzo i pažljivo izdvojen iz kranijuma i prebačen u petri šolju sa 0.01 M ledenim slanim rastvorom fosfatnog pufera (PBS, Tabela 2). Uklonjene su moždane ovojnice, tkivo kore prednjeg mozga obje hemisfere je odvojeno od ostatka moždanog tkiva, zatim je diseciran hipokampus obostrano. Tkivo struktura od interesa je disocirano u 5 ml izolacionog pufera sačinjenog od osnovnog Leibovitz L-15 medijuma (Tabela 2). Suspenzija ćelija je centrifugirana na 500 × g u trajanju od 4 min, a postupak mehaničke disocijacije i centrifugiranja je ponovljen tri puta. Prije poslednjeg koraka centrifugiranja ćelije su disocirane pomoću sterilnih igala prečnika 0.8 mm i 0.6 mm. Pred zasijavanje ćelije su resuspendovane u medijumu za gajenje (DMEM+, Tabela 2), zagrijanom na 37°C. Ćelije su zasijane u flaskove površine 25 cm² sa ukupno 5 ml DMEM+ medijuma i gajene u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, 5% CO₂ i na temperaturi

od 37°C. Svaka izolacija ćelijske kulture bila je porijeklom od jedne životinje tj. za pripremu ćelijskih kultura nisu združivana tkiva iz više životinja. Medijum DMEM+ je ćelijama prvi put mijenjan između prvog i trećeg dana u zavisnosti od procjene zalijepljenih ćelija i prisustva debrisa. S obzirom na to da je ovako izolovana ćelijska kultura mješovita i da sadrži ćelije mikroglije, oligodendrocita i prekursorne ćelije oligodendrocita, medijum DMEM+ je mijenjan svakog drugog dana, jer takav postupak favorizuje rast astrocita u odnosu na druge tipove ćelija. Ćelije drugih tipova su slabije zalijepljene za podlogu ili za površinu astrocitnog sloja pa se lako odstranjuju pod laganim mlazom medijuma iz pipete pri zamjeni medijuma. U cilju dodatnog prečišćavanja kulture i uvećanja broja ćelija, nakon dostizanja 80-90% konfluentnosti, ćelije su presijavane na 4-5 flaskova ili petri šolja ekvivalentne površine. Ćelije su prvo pomoću toplog PBS rastvora isprane od ostataka FBS iz DMEM+ medijuma, nakon čega su odlijepljene rastvorom tripsina (Tabela 2), dovoljne zapremine da prekrije površinu na kojoj rastu ćelije, na 37°C u inkubatoru. Tripsin je inhibiran nakon 2 min, pomoću toplog DMEM+ medijuma koji u sebi sadrži FBS odgovoran za inaktivaciju tripsina, pri čemu je odnos rastvora tripsina i DMEM+ medijuma bio 1:4. Prikupljene ćelije su centrifugirane 5 min na $500 \times g$, resuspendovane u svježem toplom DMEM+ medijumu, određen im je broj u komorici za brojanje (hemocitometar) i zasijane su na odgovarajući broj novih flaskova ili petri šolja, tako da gustina ćelija bude $1.5-2 \times 10^4/cm^2$. Kako bi se pri brojanju ćelija odredio % živih u odnosu na mrtve ćelije, korišćen je 0.4% rastvor tripan plavog, kojeg žive ćelije aktivno mogu da odstrane (žive ćelije ostaju nebojene), dok prolazi kroz membranu mrtvih ćelijam (mrtve ćelije se boje plavo). Kulture su održavane standardno uz zamjenu medijuma svakog drugog dana do dostizanja 90-100% konfluentnosti, kada su ponovo odlijepljivane rastvorom tripsina na prethodno opisani način, i zasijavane za eksperimente na različite površine i pri različitim gustinama u zavisnosti od zahtjeva samog eksperimenta. Svi eksperimenti su izvođeni na kulturama astrocita starim 15-25 dana od dana izolacije.

3.1. Zasiјavanje ćelija i priprema za eksperiment

Nakon odlijepivanja ćelija i određivanja njihovog broja, ćelije su zasijavane na različite površine u zavisnosti od potreba eksperimenta. Ćelije su zasijavane na sterilne posude čije su površine fabrički obložene specifično za adherentne ćelije: Petri šolje prečnika 60 mm i 35 mm, ploče sa 24 bunara, ploče sa 6 bunara i na stakla prečnika 15-25 mm koja su sterilisana i obložena poli-L-lizinom (PLL). Zapremina medijuma u posudama sa ćelijama je bila u skladu sa preporukama proizvođača u zavisnosti od površine dna posuda.

Ćelije su ravnomjerno zasijavane po površini posude u gustini od $1.5-2 \times 10^4/\text{cm}^2$, kako bi astrociti rasli u jednom sloju, nakon čega su ćelije odgajane standardno uz zamjenu medijuma svakog drugog dana do dostizanja 80-90% konfluentnosti. Dvadeset četiri sata pred tretiranje ćelija, DMEM+ medijum je zamijenjen medijumom istog sastava, koji je sadržao 0.5% FBS, kako bi se ćelije sinhrono uvele u G_0 fazu ćelijskog ciklusa (proliferacija biva svedena na minimum), osim ako nije navedeno drugačije u opisu metoda.

3.2. Određivanje čistoće primarne kulture kortikalnih astrocita

Čistoća primarne kulture, odnosno, stepen kontaminacije kulture drugim tipovima ćelija određena je primjenom imunofluorescentnog bojenja. Ćelije su zasijavane na stakla prečnika 25 mm obložena poli-L-lizinom (PLL, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) u fazi u kojoj se inače zasijavaju za eksperimente. Procedura imunofluorescentnog bojenja je detaljno objašnjena u okviru odjeljka 6, pri čemu su korišćena antitijela na specifične ćelijske markere. Za obilježavanje astrocita korišćena su antitela na glijski fibrilarni kiseli protein (GFAP), za mikrogliju antitela na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum (Iba1), dok su oligodendrociti obilježeni antitelom na mijelinski protein 2',3'-ciklični-nukleotid 3'-fosfodiesterazu (CNPase), Za svako primarno antitelo primjenjeno je odgovarajuće sekundarno antitijelo i rastvor 4,6 –diamidin-2-fenilindola (DAPI, 1:4000 u PBS) koji boji jedra ćelija. Detalji o korišćenim razblaženjima antitijela, specifičnošću i proizvođaču mogu se naći u Tabeli 4. Mikrografije su snimljene na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu LSM 510 (Carl Zeiss GmbH, Njemačka), uz upotrebu objektivna

Plan-Neofluar 20×/0.5 ili uljanih Plan-Neofluar 40×/1.3 i Plan-Apochromat 63×/1.4. Fluorescentne boje su pobuđivane korišćenjem ekscitacione linije 488 nm argonskog lasera, i linija 543 nm i 633 nm helijum-neonskih lasera. Emisioni dijelovi spektra su razdvojeni na odgovarajuće kanale pomoću NFT 635 i NFT 545 dihroičnih ogledala, uskoopsežnim BP 505-530, BP 560-615 i i širokoopsežnim LP 650 filterima. DAPI boja je ekscitovana živinom lampom i odgovarajućim filterom (350–390 nm). Mikrografije istih optičkih presjeka su preklapane, i određen je broj ćelija koje ekspimiraju svaki od navedenih obilježja. Na ovaj način je izvršena procjena zastupljenosti astrocita na tri nezavisne kulture sa po dva stakla i po pet mikrografija po staklu.

4. Tretmani

U jednom delu eksperimenata čiji je cilj bio određivanje uticaja inflamatornih faktora na ekspresiju eN/CD73, ćelije u primarnoj kulturi tretirane su medijatorima inflamacije, citokinima i bakterijskim endotoksinom, u koncentracijama koje su navedene u Tabeli 3. Primjenjene koncentracije medijatora inflamacije su optimizovane u prethodnim studijama, ili su izabrane na osnovu literaturnih podataka. Testirani pro-inflamatorni faktori su rastvoreni u DMEM+ medijumu, ukoliko nije drugačije naznačeno. U zavisnosti od parametara u eksperimentima koji su praćeni, trajanje tretmana ćelija je bilo u rasponu od 15 min do 48 h. Nakon isteka tretmana, medijumi su prikupljeni za dalje analize ili su odbačeni, a ćelijski materijal je prikupljen i obrađen u zavisnosti od zahtjeva metoda.

5. Procjena metaboličke aktivnosti, vijabilnosti i proliferacije astrocita

5.1. MTT test za procenu metaboličke aktivnosti

Mikrotitarski tetrazolijum test (MTT) je kolorimetrijski test za procjenu ukupne mitohondrijske aktivnosti kojom se može izraziti i ćelijska vijabilnost. Astrociti su uzgajani na ploči sa 24 bunara dok nisu dostigli 80% konfluentnosti, a test je ponovljen u prisustvu različitih koncentracija i trajanja tretmana. Nakon tretmana, medijum je prikupljen, a u

svaki bunarić je dodato po 200 µl MTT rastvora, tako da finalna koncentracija MTT bude 1 mg/ml. Čelije su inkubirane sa MTT rastvorom u inkubatoru na 37°C u trajanju od 30 min. Tokom inkubacije se žuti rastvor MTT redukuje do ljubičastog formazana, aktivnošću mitohondrijskih enzima, što je odraz metaboličke aktivnosti živih ćelija. Prisustvo nagrađenih istaloženih kristala formazana se provjerava vizuelno, nakon čega se supernatant odvaja, a talog u svakom bunaru se rastvara u 500-750 µl DMSO i lagano homogenizuje pipetiranjem. Zapremina dodatog DMSO zavisi od količine nagrađenog formazana odnosno broja ćelija, pa se na taj način prilagođava optička gustina rastvorenih kristala formazana kako ne bi izlazili iz optičkog opsega uređaja za očitavanje apsorbancije. Uzorak iz svakog bunara je nanešen na ploču sa 96 bunara u triplikatu, a optička gustina je određena mjerenjem apsorbancije na talasnoj dužini 540 nm sa korekcijom na 670 nm na čitaču za mikrotitar ploče (ELISA čitač, LKB 5060-006, Vienna, Austria). Srednja vrijednost spektrofotometrijskih očitavanja kontrolnih, netretiranih bunarića arbitrarno je određena kao 100%. Za ostale tretmane, određena je srednja vrijednost apsorbance u svim bunarićima jednog tretmana. Rezultati su prikazani kao promjena metaboličke aktivnosti ćelija u odnosu na kontrolu ($\% \pm SE$) iz dva ponavljanja u triplikatu.

5.2. Procjena citotoksičnog efekta primenom primenom protočne citofluorimetrije aneksin/propidijum jodid bojenja

U cilju procjene uticaja tretmana na ćelijsko preživljavanje, broj umrlih ćelija, kao i tip ćelijske smrti određen je primjenom dvojnog fluorescentnog obilježavanja ćelija i korišćenjem protočne citofluorimetrije. Protočna citofluorimetrija se zasniva na strogo kontrolisanoj fluidici, pri čemu se laserski pobuđuju fluorofore kojim su ćelije obilježene, a čija se emisija na određenoj talasnoj dužini detektuje na nivou svake pojedinačne ćelije. Ovom metodom je moguće dobiti informacije o ćelijskom ciklusu, proliferaciji, ćelijskoj smrti, veličini i obliku ćelija, kao i prisustvu ili odsustvu proteina od interesa. Za određivanje tipa ćelijske smrti, apoptoze ili nekroze, koristi se kombinacija obilježavanja ćelija aneksinom V (An V) i propidijum jodidom (PI). U fiziološkim uslovima molekuli membranskog fosfolipida fosfatidil-holina orijentisani su ka spoljnoj strani fosfolipidnog

dvosloja, dok su amino-fosfolipidi, kao što je fosfatidilserin locirani sa unutrašnje, citoplazmatske strane. Tokom procesa apoptoze dolazi do premještanja fosfatidilserina na spoljnu stranu ćelijske membrane, što se može detektovati specifičnim vezivanjem aneksina V. Propidijum jodid je interkalirajući agens, koji se umeće između baznih parova nukleinskih kiselina, a u ćeliju može da uđe samo ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane, što je slučaj tokom ćelijske smrti nekrozom. Na osnovu kombinovane primjene ova dva markera moguće je razlikovati žive ćelije, koje su negativne na oba bojenja (AnV^-/PI^-), ćelije u ranim fazama apoptoze (AnV^+/PI^-), ćelije u kasnim fazama apoptoze koje su pozitivne na oba markera, i nekrotične ćelije koje su pozitivne samo na propidijum jodid, dok je reakcija na aneksin V negativan (AnV^-/PI^+). Treba imati na umu da nekrotične ćelije vezuju An V, makar do izvjesnemjere i to sa unutrašnje strane plazmamembrane.

Za procjenu smrtnosti astrocita, ćelije su zasijane na ploču sa 6 bunara, i gajene do postizanja 80% konfluentnosti. Nakon 24-oro časovnog tretmana, ćelije su odlijepljene od podloge tripsinizacijom, centrifugirane 5 min na $500 \times g$, na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je resuspendovan u PBS, nakon čega je ponovljen korak centrifugiranja kako bi se potpuno odstranio tripsin. Ćelije su resuspendovane u 100 μ l mješavine aneksina V i propidijum jodida. Mješavina je pripremljena prema instrukcijama proizvođača u puferu za vezivanje aneksina V (Tabela 2) sa 1.5 μ l aneksina V (Tabela 1) i 1.5 μ l propidijum jodida (koncentracije štoka 1 mg/ml). Nakon inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min, reakcija je zaustavljena dodavanjem 200 μ l pufera za vezivanje aneksina, a sve tubice prebačene na led. Ćelije su analizirane na CyFlow Space Partec protočnom citofluorimetru sa instaliranim PartecFloMax softverom. Za svaki tretman je pripremljena je neobilježena negativna kontrola, kao i nekoliko obilježenih uzoraka radi podešavanja parametara očitavanja. Analizirano je najmanje 10 000 ćelija po tretmanu, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ćelija obeleženih na aneksin V i/ili propidijum jodid (AnV^-/PI^- , AnV^+/PI^- , AnV^+/PI^+ i AnV^-/PI^+) izražena u procentima (\pm SE), od ukupnog broja očitanih ćelija po uzorku iz dvije nezavisne culture astrocita, sa tretmanima u duplikatu.

5.3. Procjena stepena proliferacije astrocita u uslovima neuroinflamacije

Kao marker proliferacije astrocita korišćeno je antitijelo Ki-67 čiji je antigen jedarni protein koji se u eksprimira tokom G₁, S i G₂ faze mitoze, a odsutan u fazi G₀. U kombinaciji sa opštim jedarnim markerom koji se vezuje za nukleinske kiseline, kao što je DAPI, moguće je odrediti procenat ćelija koje su u proliferaciji u odnosu na ukupnu populaciju ćelija.

Astrociti su zasijani na PLL obloženim staklima prečnika 25 mm, gajeni do 80% ili potpune konfluentnosti u zavisnosti od potreba eksperimenta, tretirani i fiksirani u određenim vremenskim tačkama od početka tretmana. Nakon fiksacije kulture su podvrgnute proceduri imunofluorescentnog bojenja koja je detaljno objašnjena u okviru narednog odjeljka 5. U eksperimentima je korišćeno anti-Ki-67 antitijelo izolovano iz zeca (razblaženje 1:500 u NDS/BSA/PBS) i odgovarajuće sekundarno antitijelo obilježeno AlexaFluor 555 (razblaženje 1:200 u PBS) ili Cy3 (razblaženje 1:400 u PBS) (Tabela 4). Ćelije su obojene DAPI bojom (razblaženje 1:4000 u PBS). Snimljeno je 5-10 ravnomjerno pozicioniranih kadrova po staklu. Mikrografije su snimljene na Carl Zeiss AxioObserver A1 invertnom epifluorescentnom mikroskopu, uz A-Plan 10x objektiv, Evolve Photometrics EM512 CCD digitalnu kameru i VisiFluor sistem za vizuelizaciju. Kao izvor ekscitacione svjetlosti korišćena je kratko-lučna ksenonska lampa (Ushio, Japan), u kombinaciji sa polihromatorom (VisiChrome, Visitron Systems, Njemačka) i kompletom filtera (Chroma Technology Inc., SAD). Mikrografije su analizirane pomoću *ImageJ* softverskog paketa (odjeljak 18) i njegove ugrađene opcije za automatsko prebrojavanje jedara, odnosno, partikula zadatih dimenzija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost procenta ćelija sa jedrima pozitivnim na Ki-67 u odnosu na ukupan broj jedara obilježenih DAPI bojom (\pm SE), određen u dvije nezavisne ćelijske kulture sa po dva ponovka po tretmanu.

6. Imunofluorescentna bojenja

Ćelije se zasijavaju na pokrovna PLL obložena stakla prečnika 15-25 mm. Nakon gajenja i tretiranja, kulture astrocita na staklima se fiksiraju u rastvoru 4%

paraformaldehida (PFA, Tabela 2) u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Slobodne aldehidne grupe, za koje bi se mogla nespecifično vezati antitijela, blokirane su rastvorom 0.1M glicina (u 0.01M PBS-u), 10 min na sobnoj temperaturi. Stakla su ispirana 3×5 min u PBS-u, a dalja procedura je zavisila od lokacije ciljnog antigena.

Kada je obilježavan antigen sa vanćelijske strane membrane, kao što je eN/CD73, blokiranje i vezivanje primarnog antitijela obavljeno je prije permeabilizacije membrane tritonom. Kao rastvor za blokiranje korišćen je 10% serum iz istog izvora iz kojeg je izolovano sekundarno antitijelo, 2% BSA u PBS-u, mada je u slučaju nedostatka tog seruma, kao rastvor za blokiranje moguće primeniti 5% BSA u PBS-u. Inkubacija je trajala minimum sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja stakla nisu isprana, već su direktno stavljena na inkubaciju sa primarnim antitijelom (razblaženima u PBS-u, 1% serumu životinje iz koje je izolovano sekundarno antitijelo i 1% BSA). Primarno antitijelo je inkubirano preko noći na temperaturi $+4^{\circ}\text{C}$, nakon čega su stakla isprana u PBS. Slijedila je aplikacija odgovarajućeg sekundarnog antitijela rastvorenog samo u PBS, 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Posle ispiranja, primjenjeni su koraci za obilježavanje unutarćelijskih markera, koji podrazumijevaju blagu permeabilizaciju.

Ukoliko je antigen od interesa unutarćelijski, bilo da je membranski, a okrenut ka citoplazmi, citoplazmatski ili jedarni, neophodno je da se izvrši blaga permeabilizacija membrana. Rastvor za permeabilizaciju je 0.05-0.1% Triton X-100 deterdžent rastvoren u PBS, u kojem se drže stakla sa fiksiranim ćelijama u trajanju od 15-20 min. Ovaj rastvor narušava integritet membrana, usled čega unutarćelijski antigeni bivaju izloženi. Radi povećanja specifičnosti vezivanja antitijela, mjesta nespecifičnog vezivanja se blokiraju rastvorom za blokiranje, a zatim se dodaju primarna, pa sekundarna antitijela, u uslovima koji su prethodno opisani. Nakon završene inkubacije sa sekundarnim antitijelom, stakla se intenzivno ispiraju.

Ćelijski citoskeletni mikrofilamenti obojeni su pomoću faloidina (Phalloidin), bicikličnog peptida izolovanog iz gljive *Amanita phalloides*, koji se specifično vezuje za filamentoznu formu aktina. Faloidin je direktno konjugovan sa fluoroforom Alexa Fluor 568, usled čega ne zahtjeva primjenu sekundarnog antitijela. Nakon završenog blokiranja i vezivanja primarnih i sekundarnih antitijela od interesa, ćelije su inkubirane 30 min u

rastvoru faloidina (razblaženje 1:50 u PBS), na sobnoj temperaturi i u mraku, uz naredno intenzivno ispiranje.

Nakon završene procedure obilježavanja struktura i proteina od interesa, na samom kraju protokola po potrebi se obilježe jedra ćelija primjenom DAPI boje (4,6 –diamidin-2-fenilindola), u razblaženju 1:4000 u PBS-u, 15 min, na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije sa DAPI bojom, stakla sa kulturama se temeljno ispiraju pomoću PBS, 5×5 min. Ovako fluorescentno obilježeni preparati spremni su za trajno postavljanje na mikroskopske pločice pomoću medijuma za lijepljenje na vodenoj bazi (Mowiol). Nakon sušenja, pločice sa preparatima se čuvaju na $+4^{\circ}\text{C}$, u mraku do snimanja. Mikrografije su snimljene pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa LSM 510, uz objektivne i podešavanja kao što je opisano u odjeljku 5.3.

7. Morfološka karakterizacija astrocita vizuelizacijom u svjetlosnom polju: morfometrija

Astrociti zasijani na 35-milimetarskim petri šoljama su tretirani kako je navedeno. Kulture su snimane u različitim vremenskim tačkama, pomoću Carl Zeiss AxioObserver A1 invertnog mikroskopa i uz primjenu A-Plan $10\times$ objektivna i Evolve Photometrics EM512 CCD digitalne kamere u svjetlosnom polju. Najmanje šest kadrova je snimljeno po svakoj posudi, za svaki tretman i kontrolu u duplikatu u okviru jednog eksperimenta. Mikrografije rezolucije 512×512 piksela ($0.625 \text{ pixel}/\mu\text{m}$) analizirane su u *ImageJ* softveru (odjeljak 18). Određeni su sledeći morfometrijski parametri: površina ćelije izražena u μm^2 , procentualni odnos razgranatih astrocita u odnosu na ukupan broj ćelija u kadru. S obzirom na to da astrociti u primarnoj kulturi obično imaju poligonalan oblik bez izraženih nastavaka, pod razgranatim astrocitima su podrazumjevani oni koji su imali ≥ 3 jasno diferencirana nastavka koje se odvajaju direktno od ćelijskog tijela.

8. RNK interferencija

RNK interferencija je biološki proces tokom kojeg molekul male interferirajuće RNK (siRNK; *engl.* small interfering RNA, siRNA) privremeno moduliše ekspresiju ciljnog gena, zahvaljujući specifičnoj interakciji sa njegovom iRNK (Kim i Rossi, 2008). Mala interferišuća RNK je dvolančana sekvence RNK, dužine 20-25 nukleotida, koje interferiraju sa iRNK, sprečavajući njenu translaciju u ciljni protein. Osim endogenih siRNA, danas je moguće dizajnirati i sintetisati odgovarajuće sekvence RNK, koje nakon transfekcije u ćelije privremeno prekidaju ekspresiju ciljnog gena. Ovaj fenomen se naziva utišavanje (*engl.* silencing).

Za potrebe ovog postupka, astrociti su zasijani na 35-mm petri šoljama i gajeni do dostizanja 80% konfluentnosti. Transfekcija je izvršena pomoću siRNK, specifično dizajnirane da dovede do degradacije iRNK koja kodira eN/CD73 (siRNA-eN/CD73 ili kraće dalje u tekstu siCD73). U eksperimentu optimizacije utvrđeno je da koncentracija siRNK koja dovodi do maksimalnog utišavanja ekspresije eN/CD73 iznosi 50 nM. Nivo ekspresije eN/CD73-iRNK određen je PCR metodom (odjeljak 9), dok je nivo ekspresije eN/CD73 proteina nakon utišavanja određen pomoću Western blot analize (odjeljak 11). Pripremljene nezavisne smješe 50 nM miRNK (u 150 µl Opti-MEM) i 5 µl Lipofektamina 2000 (u 150 µl Opti-MEM) su inkubirane na sobnoj temperature 15 min. Nakon toga su združene, a takva smješa za transfekciju je inkubirana dodatnih 15 min na sobnoj temperaturi kako bi Lipofektamin obavio siRNK i omogućio transfekciju, odnosno, prenos nukleinskih kiselina kroz membranu ćelije. Za svaku petri posudu napravljeno je posebno po 300 µl transfekcione smješe, koja je dodata standardnom medijumu za gajenje sa 10 % FBS, ali bez penicilina i streptomocina, koji umanjuju uspješnost transfekcije. Kulture su inkubirane 8 sati u inkubatoru pri standardnim uslovima gajenja. Po završetku inkubacije, medijum je zamjenjen potpunim medijumom za gajenje (DMEM+ medijum), nakon čega su ćelije gajene dodatnih 48 sati, kako bi se postigao efekat RNK interferencije, a ova vremenska tačka je uzeta kao nulta tačka za početak tretmana.

Efikasnost transfekcije potvrđena je primjenom pozitivne i negativne kontrole. Kao pozitivna kontrola upotrijebljena je ista koncentracija miRNK specifična za iRNK koja

kodira gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (siGAPDH) kao interno eksprimiranu kontrolu. Kao negativna kontrola korišćena je posebno dizajnirana miRNK, čija sekvenca ne interferira ni sa jednom informacionom RNK (siCTR), i ima za cilj da pokaže uticaj ostalih komponenti uključenih u proces transfekcije astrocitne kulture. Procjenom ekspresije iRNK i proteina od interesa pomoću rtPCR metode i Western blot analizom, 48 i 72 sata nakon transfekcije utvrđeno je da sama transfekcija (ćelije transfektovane posredstvom siCTR) umanjuje ekspresiju eN/CD73-iRNK za 10.3%, odnosno, na nivou proteina za 12.1 % u odnosu na kontrolne uslove. Kada je riječ o utišavanju ekspresije eN/CD73, primjenom siCD73, vrijednosti iRNK-CD73 su iznosile 51%, a proteina 36%, posmatrano takođe u odnosu na ekspresiju istog gena odnosno proteina pri transfekciji pomoću siCTR.

9. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

9.1. Izolacija ukupne RNK

Astroцити су засијани на плочи са 6 бунара (ø 35 mm) и узгајани до достизања 80% конфлуентности. Третирани су на описан начин у трајању од 4 или 8 сати, након чега су медијуми аспирирани и одбаћени, а ћелије су лизиране додавањем 0.5 ml TRIzol реагенса по бунару. Ћелијски лизат је хомогенизован пипетирањем, након чега су узорци пребаћени у одговарајуће микротубе и остављени на собној температури 3-5 min како би се једарни протеински комплекси боље раздвојили. Сваком узорку је додато по 100 µl хлороформа, тубице су снажно помјешане 15 секунди вортексом, до формирања млијеčno-розе боје. Раздвajaње фаза се постиже центрифугирањем, 15 min на температури 4°C и брзини 12 000 × g, након чега се уочавају три фазе: горња водена фаза је безбојна и у нjoj је растворена RNK, средња интерфаза је бјелиčаста, док у доњој органској фази црвено-ружиčaste боје претежно остају растворени DNK и протеини. Горња фаза са RNK се пажљиво преноси у нове микротубе, којима се додaje по 0.25 ml изopropanола, након чега се тубице поново интензивно вортексую. Овако обраđени узорци се замрзавају на -80°C преко ноћи. Након одмрзавања, узорци се центрифугирају 30 min на температури 4°C и брзини 12 000 × g, чиме се RNK таложи на дну тубице у виду бјелиčастог талoга. Supernatant се одбацује, а RNK талoг се преčiшćава помоћу 0.5 ml 75% етанoла, који је растворен у DEPC третираној void. Узорци се поново центрифугирају 15 min на температури 4°C и брзини 7500 × g, након чега је

supernatant pažljivo odliiva, a talog ostavlja da se osuši na sobnoj temperaturi tokom 15 min. Pretjerano isušivanje smanjuje RNK rastvorljivost, pa je važno na to obratiti pažnju. Talog se zatim rastvara u 20 μl upH₂O. Koncentracije RNK su određene mjerenjem apsorbance na 260 nm (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS, Austrija), pri dva različita razblaženja u upH₂O (1:49 i 2:48) radi veće preciznosti. Čistoća uzoraka je procjenjena mjerenjem apsorbance i preračunom odnosa 260 nm/280 nm (prisustvo proteina) i 260 nm/230 nm (prisustvo DNK). Kvalitet izolovane RNK proveren je elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

9.2. Reverzna transkripcija

Za sintezu cDNK korišćen je komercijalno dostupan komplet za reverznu transkripciju (Tabela 1). Alikvoti odgovarajućih zapremina koje sadrže 1 μg RNK uzorka dopunjeni su do 10 μl dodavanjem upH₂O, a zatim je svakom uzorku dodato po 10 μl reakcione smješe. Reakciona smješa se sastoji od 0.8 μl mješavine dezoksiribonukleotida (dNTP), 2 μl nasumičnih heksamernih prajmera, 1 μl MultiScribe reverzne transkriptaze, 2 μl odgovarajućeg pufera i 4.2 μl upH₂O. Volumen komponenti reakcione smješe je preračunat po jednom uzorku tako da finalno razblaženje koncentracija svake komponente bude 1 \times u ukupnoj zapremini reakcione smješe od 20 μl . Ovako pripremljene reakcione smješe su inkubirane 10 min na 25°C, a zatim 2 sata na 37°C (optimalnoj temperaturi za aktivnost reverzne transkriptaze), nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 85°C u trajanju od 5 min. Ovako pripremljena cDNK je razblažena 10 puta u upH₂O, zamrznuta na -20°C i čuvana do korišćenja.

9.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-Time PCR)

Pripremljene cDNK su korišćene kao matrica u reakciji lančanog umnožavanja (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) koja se odigrava pomoću DNK polimeraze, pri čemu se umnožava DNK od interesa na osnovu oligonukleotidnih prajmera specifičnih za određenu sekvencu od interesa. Ovom metodom je moguće kvantitativno odrediti količinu sintetisanog produkta u realnom vremenu pomoću fluorescentne probe koja se vezuje isključivo za dvolančanu DNK. Korišćena je komercijalno dostupna smješa SYBR Green

boje (probe) koja dodatno sadrži odgovarajući pufer, mješavinu dezoksiribonukleotida (dNTP) i termostabilnu DNK polimerazu (Tabela 1).

Reakciona smješa za real-time PCR se sastojala 5 μ l QTM SYBR Green PCR Master miksa, po 0.5 μ l svakog od odgovarajućeg para prajmera (100 pmol/ml, Tabela 5) i 2 μ l upH₂O. Nakon što je reakciona smješa ispipetirana u bunare sterilne ploče sa 96 bunara specijalno prilagođene za real-time PCR, 2 μ l cDNA (10 ng/ml) svakog uzorka su nanijeti u duplikatu ili triplikatu tako u vidu kapljice na zidu bunara, kako bi se maksimalno odložio kontakt cDNK sa reakcionom smješom. Nakon završenog pipetiranja i postavljanja zaštitne trake, uzorci cDNK se spuste centrifugiranjem, čime se svi miješaju sa reakcionom smješom. Ukupna zapremina u svakom bunaru je 10 μ l. Umnožavanje je urađeno pomoću QuantStudio™3 Real-Time PCR sistema (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), pod sledećim uslovima: početna inkubacija na 50°C u trajanju od 2 min, zatim aktivacija enzima u trajanju od 10 min na 95°C, 40 ciklusa koji su obuhvatali po 15 denaturacije dvolančane DNK na 95°C, 30 s za vezivanje prajmera na 64°C, 30 s umnožavanja na 72°C i 5 s za očitavanje fluorescence na 72°C.

Rezultati PCR analize izraženi su kroz Ct vrijednosti (*engl.* threshold cycle), koja se definiše kao broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescentnog signala nagrađenog proizvoda prelazi prag detekcije tokom procesa umnožavanja. Na osnovu Ct vrijednosti se određuje nivo ekspresije određenog gena u uzorku i ukoliko je ekspresija gena veća, ranije će se dostići prag detekcije, odnosno Ct vrijednost će biti manja. Promjena ekspresije gena od interesa izražava se u relativno u odnosu na nivo ekspresije kontrolnog gena (unutrašnja kontrola), čiji bi nivo ekspresije trebalo da bude neizmijenjen u kontrolnim uslovima i nakon tretmana. Razlika Ct vrednosti gena od interesa i interne kontrole, Δ Ct u svakom od tretmana i u kontrolnim uslovima, koristi se za izračunavanje $2^{-\Delta Ct}$ vrijednosti za svaki pojedinačan tretman. Vrednost $2^{-\Delta Ct}$ izračunata za kontrolne uslove arbitrarno se određuje kao 100 % ekspresije, dok se $2^{-\Delta C}$ vrednost izračunata u individualnim tretmanima izražava kao % promene u odnosu na kontrolu. Specifičnost PCR reakcija proverena je analizom krivih topljenja, kao i analizom nagrađenih proizvoda na gel elektroforezi, prema potrebi.

10. Izolovanje ukupnog proteinskog sadržaja astrocita

U zavisnosti od potreba eksperimenta, astrociti su zasijavani na površine različitog prečnika, ali uvijek u standardnoj gustini zasijavanja od $1.5-2 \times 10^4$ ćelija/cm² i gajeni do 80-90% konfluentnosti. Nakon tretmana u određenim vremenskim tačkama, medijum je prikupljen ili odbačen, a ćelije su kratko isprane toplim 0.01 M PBS rastvorom, a zatim i prikupljene u određenoj zapremini hladnog PBS rastvora (zapremina zavisi od veličine suda u kojoj su ćelije odgajane), mehaničkim odvajanjem ćelija od podloge pomoću sterilne špatule i centrifugirane 5 min na $500 \times g$, kako bi ćelije bile staložene. Ćelijski talog je resuspendovan u određenoj zapremini hladnog RIPA pufera za liziranje, kojem je neposredno pred korišćenje dodata mješavina od 0.5 m/v % koktel proteaznih i fosfataznih inhibitora (Tabela 1). Zapremina pufera za liziranje (100 – 500 μ l) u ovom koraku je prilagođena i optimizovana u odnosu polaznu veličini suda u kom su ćelije gajene, kako bi na kraju bile dobijene potrebne koncentracije ukupnih proteina za dalji rad. Suspenzija je držana na ledu 30 min kako bi pufer imao maksimalan lizirajući učinak, nakon čega su uzorci centrifugirani 15 min na temperaturi 4°C i brzini od $10000 \times g$. Bjeličasti talog je odbačen, a u supernatantu je određena koncentracija proteina, na osnovu čega je alikvotiran i zamrznut do upotrebe na -80°C. Ovakvom procedurom izoluju se ukupni ćelijski proteini koji sadrže i proteine ćelijske membrane.

Medijum koji je prikupljen nakon tretmana kultura astrocita je centrifugiran na $500 \times g$ da bi se staložile zaostale ćelije, pa je talog odbačen, a supernatant alikvotiran i zamrznut na -80°C. Medijumi su korišćeni u imunoblot, dot blot i ELISA analizama.

11. Imunoblot i dot blot analiza

11.1. Priprema uzoraka i elektroforetsko razdvajanje proteina

Količina proteina u uzorcima membrana (10 μ g) podešena je na istu zapreminu dodavanjem pufera u kome su suspendovani uzorci. Uzorci su pripremljeni u Laemmli puferu za nalivanje (Laemmli 6 \times , Tabela 2), koji je sadržao 5% β -merkaptoetanol, kao redukujućeg agensa. Ovako pripremljeni uzorci su denaturisani na 95°C/5 min.

Proteini u uzorcima su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom (recepture gelova i rastvora korišćenih u imunoblotu su prikazani u Tabeli 2.) na 4%/12% gelu za koncentrovanje i razdvajanje. Kao standard molekulske težine korišćena je komercijalno dostupna smješa obojenih proteina (Tabela 1). Koncentrovanje uzorka se odvijala u uslovima konstantnog napona od 100V, dok je razdvajanje izvršeno na konstantnom naponu od 120V, u standardnom puferu za elektroforezu, na sobnoj temperature, na malom sistemu za elektroforezu (Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell, Bio-Rad, SAD).

11.2. Prenos proteina na PVDF membranu

Nakon završene elektroforeze, gelovi sa proteinima razdvojenim na osnovu molekulske mase, prebaćeni su u pufer za transfer (Tabela 2) u trajanju od 10-tak min, kako bi bili isprani od zaostalog natrijum-dodecilsulfata koji može dati jak nespecifičan signal pri vizuelizaciji. Poliviniliden-difluorid (PVDF) membrane su pripremljene za upotrebu, aktiviranjem 15 s u metanolu, ispiranjem u vodi 2 min i ekvilibrisanjem u puferu za transfer. S obzirom na to da su proteini u uzorku negativno naelektrisani, prenos sa gela na PVDF membranu odvija se u električnom polju kretanjem proteina ka pozitivnoj elektrodi, u sistemu za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, SAD). Transfer proteina odvijao se u uslovima konstantne jačine struje (20 mA/gelu), preko noći na +4°C. Nakon završenog transfera, membrane su isprane u TBST puferu (Tabela 2), a uspješnost transfera je proveravana, prema potrebi, u rastvoru Ponceau S (Tabela 2).

11.3. Vizuelizacija i detekcija/imunoblot analiza

Nespecifično vezivanje antitijela blokirano je inkubiranjem PVDF membrane u 5% BSA/TBST puferu, 1 sat, na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa primarnim antitijelima rastvorenim u TBST (Tabela 4), opciono sa 1.5% BSA, preko noći na +4°C. Membrane su nakon toga ispirane u TBST, 3×10 min, nakon čega je slijedila inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitijelom konjugovanim sa peroksidazom rena (Tabela 4), 2 sata na sobnoj temperature i ispiranje u TBST, 3 × 10 min..

Vizuelizacija traka dobijenih stvaranjem kompleksa antigen/primarno antitijelo/sekundarno antitijelo-HRP, izvršena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta (BioRad i Invitrogen ECL; *engl.* Enhanced chemiluminiscence), koji se zasniva na oksidaciji luminola u prisustvu HRP. Inkubacija membrana sa komercijalnim rastvorom pojačane hemiluminiscencije je trajala 1 min nakon čega je intenzitet hemiluminiscencije detektovan pomoću Chemi Doc-It sistema (UVP, Upland, CA, United States). Intenzitet signala je srazmjernan količini ciljnog proteina, a optička gustina dobijenih traka kvantifikovana je u ImageJ programu (odjeljak 18). Kao kontrola ispravnosti nanošenja uzorka korišćen je neki od konstitutivno eksprimiranih proteina sa stabilnom ekspresijom (β -aktin, GAPDH), čija je optička gustina takođe određena za svaku traku (uzorak). Odnos optičkih gustina ciljnog proteina i kontrole u svakoj traci predstavlja relativnu količinu ciljnog proteina u svakom uzorku. Promjene ekspresije ciljnog proteina izražene kao % srednje vrijednosti u odnosu na ekspresiju ciljnog proteina u kontrolnim kulturama astrocита koji nisu izloženi tretmanu (\pm SE), iz više nezavisnih izolovanja membrana i priprema kultura ($n > 3$).

11.4. Dot blot analiza

Prisustvo proteina od interesa koji se nalaze u uzorcima ukupnih proteina iz ćelijskog lizata ili medijuma moguće je detektovati i dot blot metodom koja se zasniva na direktnom nanošenju uzoraka na površinu prethodno aktivirane PVDF membrane, bez razdvajanja proteina u uzorku postupkom SDS-PAGE elektroforeze. Membrana se zajedno sa filter papirom (koji se koristi i pri pripremi membrana za transfer), postavlja između ploča komore za dot blot sa 96 bunarića (Minifold dot blot apparatus, Schleicher & Schuell Inc., Keene, N.H.). Sa gornje strane komore nanosi se uzorak, dok se u donjoj komori pomoću vakuumske pumpe pospješuje adsorpcija proteina na PVDF membranu.

Za analizu prisustva solubilnih proteina u medijumu prikupljenom nakon tretmana astrocита, po 300 μ l prečišćenog medijuma svakog uzorka nanijeto je u otvore ploče dot blot sistema. Ova zapremina medijuma određena je u nezavisnim eksperimentima optimizacije. Kao negativna kontrola korišćen je komercijalni DMEM medijum bez dodataka.

Nakon nanošenja uzoraka, membrana se blokira 2 h u 5% BSA/TBST, a zatim se inkubira preko noći sa primarnim antitijelom (Tabela 4) na +4°C. Membrane se potom ispiraju 3 × 10 min u TBST i inkubiraju sa odgovarajućim sekundarnim HRP-konjugovanim antitijelima (tabela 4). Nakon ispiranja u TBST, 5 × 10 min, signal je vizuelizovan na isti način kao u odjeljku 11.3 ovog poglavlja.

Pošto je u setu eksperimenata za detekciju prisustva solubilne eN/CD73 u medijumu kao tretman korišćeno kozje anti-CD73 antitijelo, ono je iskorišćeno kao svojevrsna pozitivna kontrola metode, pa su membrane sa istim setom i rasporedom uzoraka nakon koraka blokiranja inkubirane direktno sa sekundarnim anti-kozjim antitijelom konjugovanim sa HRP (Tabela 4).

12. Enzimski imunosorbentni test

Prisustvo proteina od interesa u uzorku, medijumu ili ćelijskom lizatu, može da se odredi i pomoću enzimskog imunosorbentnog testa (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Detekcija antigena u ovom testu zasniva se na istovremenoj primjeni dva seta antitijela koja su specifična za različite epitope istog antigena. Prvim setom antitela oblažu se bunarići mikrotitar ploče za ELISA esej, koji vezuju protein od interesa. Drugo antitelo koje se vezuje za isti ciljni protein, konjugovano je sa enzimom koji omogućava detekciju na osnovu enzimske reakcije. Koncentracije oba antitijela kao i supstrata za enzimsku reakciju su prvobitno određene tokom optimizacije protokola, na uzorcima pripremljenim za testiranje opsega detekcije ovom metodom.

Enzimski imunosorbentni test je primjenjen za određivanje nivoa citokina IL-1 β oslobođenog iz astrocita nakon tretmana. Astroцити su za ovaj esej zasijani na ploču sa 24 bunara, gajeni do 90% konfluentnosti i tretirani ATP u trajanju od 15 min do 24 sata. Nivo IL-1 β određen je u medijumima kulture koji su prikupljeni neposredno nakon tretmana i centrifugiranja. Za svaku ispitivanu vremensku tačku i koncentraciju ATP su testirani medijumi iz $n > 3$ nezavisne culture astrocita, testirane u tehničkom triplikatu.

Za esej su korišćene ploče sa 96 bunara specijalno proizvedene za ELISA postupak (NUNC, Thermo Scientific, SAD). Bunarići su obloženi primarnim antitijelima za

oblaganje (0.8 µg/ml, 100 µl/bunaru) rastvorenim u 0.01 M PBS, tokom noći, na sobnoj temperaturi. Nakon oblaganja, bunari su isprani 3 puta puferom za ispiranje (0.05% Tween u 0.01 M PBS). Nespecifična mjesta vezivanja blokirana su dodavanjem 5% BSA (300 µl/bunaru), 1 h na sobnoj temperaturi. Bunari su tri puta isprani puferom za ispiranje, nakon čega je nanijeto po 100 µl uzoraka/bunaru. Kao negativna kontrola korišćen je DMEM medijum. Takođe je nanijeta serija razblaženja komercijalno dostupnog rekombinantnog citokina IL-1β (u opsegu od 0 – 2 ng/ml pri čemu je donji prag osjetljivosti bio 0.03125 ng/ml) za konstruisanje standardne krive. Standardna razblaženja su rastvorena u DMEM medijumu bez dodataka. Inkubacija uzoraka i standarda je trajala 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega su bunari tri puta isprani, a zatim je uslijedila inkubacija sa drugim primarnim antitijelom konjugovanim sa biotinom (Tabela 4, 0.4 µg/ml u 2% BSA u 0.01 M PBS) u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, bunari su ponovo isprani tri puta, i u svaki bunar je dodato po 100 µl rastvorenog avidina (Tabela 1, 1:500 u PBS), koji ima visok afinitet za vezivanje za biotin, a konjugovan je sa HRP. Nakon 20 min, višak nevezanog avidina uklonjen je višestrukim ispiranjem. Enzimska HRP reakcija inicirana je dodavanjem hromogenog supstrata, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, Tabela 1), u količini od 100 µl/bunaru, 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. U reakciji nastaje plavo obojeni proizvod, a reakcija se zaustavlja dodavanjem 50 µl 2N H₂SO₄/bunaru (žuto boji nagrađeni proizvod). Intenzitet (optička gustina) je proporcionalan količini vezanog proteina od interesa. Optička gustina očitava se na ELISA čitaču (LKB 5060-006, Vienna, Austria), na λ= 450 nm. Na osnovu standardnih razblaženja konstruisana je standardna kriva koja je korišćena za određivanje nepoznatih koncentracija citokina u uzorcima (pg/ml).

13. Analiza enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze

Ekto-5'-nukleotidaza katalizuje reakciju hidrolize γ fosfatne grupe AMP. Stoga se njena aktivnost uobičajeno analizira mjerenjem količine oslobođenog fosfata. Detekcija se zasniva na formiranju obojenih kompleksa fosfata i molibdata u kiseloj sredini, pri čemu optička gustina rastvora korelira sa količinom oslobođenih fosfata. U našem radu

primjenjena je metoda malahit zeleno, u kojoj se mjeri apsorbance rastvora sa nagrađenim kompleksom ortofosfata, malahit zelene i molibdata. Optička gustina nagrađenog rastvora se određuje spektrofotometrijski, a količina ortofosfata se određuje pomoću standardne krive i iskazuje u odnosu na količinu polaznih proteina i trajanje reakcije.

Test je prilagođen za izvođenje na živim astrocitima, koje su zasijani na ploče sa 24 bunara, gajeni i tretirani kao što je opisano. Nakon isteka tretmana, ćelije su isprane puferom bez fosfata (Tabela 2) 3 × 5 min, kako bi se uklonio zaostali medijum koji u sebi sadrži fosfate i može dati lažno pozitivne rezultate. Nakon ispiranja u pojedinačne bunariće je u regularnim vremenskim razmacima dodato po 240 µl AMP-a (1 mM, rastvorenog u puferu bez fosfata), nakon čega je ploča sa ćelijama inkubirana 30 min/37°C u inkubatoru za gajenje ćelija. Reakcija je zaustavljena sukcesivnim prebacivanjem 240 µl supernatanta, istim redosledom i sa istim vremenskim razmakom kako je prethodno i dodavano, i prebacivanjem u prethodno obilježene mikrotubice u kome se nalazilo po 26.4 µl 3 M perhlorne kiseline (PCA) koje se drže na ledu, čime se, usled promene pH i smanjenja temperature, prekida aktivnost eventualno solubilisanih enzima. Koncentracija proteina u uzorku se određuje dodavanjem 100 µl RIPA pufera po bunariću, nakon čega se prikuplja ćelijski lizat i određuje koncentracija, na način koji je opisan kasnije.

Koncentracija supstrata (AMP) i trajanje reakcije primjenjeni tokom eseja određeni su u posebnim eksperimentima optimizacije. Kao negativna kontrola korišćena je proba u kojoj je izostavljen AMP, u kojoj optička gustina rastvora potiče od zaostalog fosfata koji nije oslobođen enzimskom reakcijom. Kao dodatna kontrola koristi se proba u koju se 240 µl pufera bez fosfata u prisustvu 1 mM AMP dodaje u mikrotubice sa 3 M PCA, kako bi se odredilo prisustvo slobodnih fosfata takvom rastvoru. Standardna kriva je konstruisana na osnovu mjerenja apsorbance rastvora poznatih koncentracija fosfata (4 - 40 µM, što odgovara količini fosfata u opsegu 0.32 – 3.2 nmol), uz korišćenje KH_2PO_4 kao standarda.

Nakon zaustavljanja reakcije, mikrotubice sa uzorcima i pripremljenim razblaženjima standardnih koncentracija stoje na ledu do 30 min. U međuvremenu se priprema svjež radni rastvor malahit zelenog, prema modifikovanom protokolu Baykov-a (Boykov 1987.), koji se sastoji iz 0.1% rastvora malahit zelenog, 7.5 % amonijum molibdata i 11 % Tween, u zapreminskom odnosu 10 : 2.5 : 0.2 (Tabela 2). Komponente za

pravljenje radnog rastvora su prethodno izvađene iz frižidera kako bi se temperirale. Svi uzorci su nanijeti u triplikatu po 80 μl , na ploču sa 96 bunara, dok su standardna razblaženja nanijeta u duplikatu, takođe po 80 μl . Zatim je svakom bunaru dodato po 20 μl radnog rastvora koji je intenzivno narandžaste. Ploča sa 96 bunara se inkubira 30 min na 37°C (u inkubatoru) kako bi se pospješilo formiranje kompleksa radnog reagensa i slobodnih fosfata pri čemu se od narandžaste razvija zelena boja čiji je intenzitet srazmjernan količini kompleksa slobodnih fosfata sa malahit zelenim i molibdatom. Apsorbanca se očitava na 620 nm, i koriguje za srednju vrijednost blanka (negativnih kontrola ukoliko nisu znatno odskakale njihove međusobne vrijednosti), a koncentracije odnosno količine slobodnih fosfata iz uzoraka se preračunavaju na osnovu standardne krive. Aktivnost enzima se konačno izražava kao specifična aktivnost, kao količina slobodnih fosfata, normalizovana u odnosu na količinu ukupnih proteina u uzorku, tokom vremena trajanja reakcije (nmol Pi/mg/min). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\pm SE) iz $n > 3$ nezavisne culture astrocita, a u okviru svakog eksperimenta pojedinačni tretmani su izvođeni u duplikatu, a zatim u triplikatu tehničkog očitavanja.

14. Određivanje koncentracije proteina u uzorku

Koncentracija ukupnih proteina određena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta (BCA protein assay kit, Pierce, Tabela 1). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji pri kojoj proteini redukuju jone bakra iz Cu^{2+} do Cu^+ u alkalnoj sredini, a redukovani joni se detektuju pomoću bicinholinske kiseline (BCA). Reakciona smješa se dobija kada se iz kompleta pomješaju reagens A i reagens B u odnosu 50:1. Po 200 μl reakcione smjese se nanese u bunare u kojima je prethodno ispipetirano po 20 μl uzorka ili standarda u duplikatu ili u triplikatu. Razvijanje boje je trajalo 30 min na 37°C, nakon čega su apsorbance očitane na 540 nm koristeći ELISA čitač (LKB 5060-006, Vienna, Austria). Standardna kriva je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija BSA i preračunate su koncentracije ukupnih proteina uzoraka na osnovu njihovih apsorbanci i jednačine dobijene standardnom krivom.

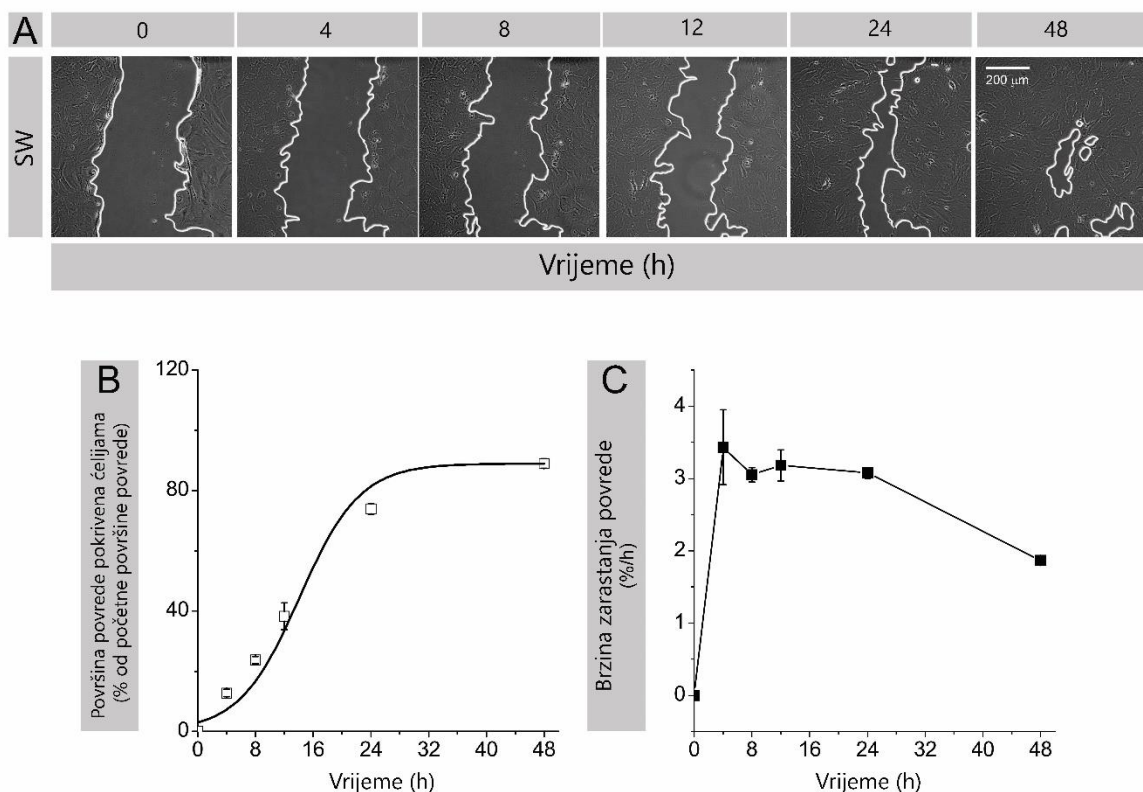
15. Zarastanja povrede u jednosloju ćelijske kulture

Migracija astrocita analizirana je nakon nanošenja ogrebitne u monosloju ćelija (*engl.* scratch wound, SW dalje u tekstu). Ogrobotina je nanešena povlačenjem sterilnog nastavka pipete po dnu posude, na čijoj putanji ostaje praznina (Lampugnani, 1999). Metoda je jednostavna za izvođenje i jeftina, a omogućava analizu pokretljivosti i proliferacije ćelija u različitim eksperimentalnim uslovima, kao što je tretiranje različitim citokinima, nukleozidima i nukleotidima, agonistima i antagonistima receptora, inhibitorima enzima, pojedinačno ili kombinovano, zatim ćelije se mogu prethodno transfekovati. Zarastanje povrede se posmatra pod svjetlosnim mikroskopom, pri čemu se može snimati u kontinuitetu tokom vremena korišćenjem automatizovanih sistema, a u tom slučaju analiza pomoću odgovarajućeg softvera može jasno da prati pojedinačne ćelije (Yarrow et al., 2004). Ukoliko mogućnosti sistema ne dozvoljavaju ovakvo uzorkovanje i obradu podataka, moguće je jednostavnije pratiti odabrane kadrove u određenim vremenskim tačkama, od momenta nanošenja ogrebotine do potpunog zarastanja iste (0 – 48 sati), pri čemu se gubi informativnost na nivou pojedinačnih ćelija, ali model i dalje adekvatno omogućava praćenje zarastanja ogrebotine posmatranjem fronta ćelija i površine koju one pokrivaju. Istovremeno, ovaj model predstavlja i model mehaničke povrede, pa samim tim može se smatrati svojevrsnim tretmanom ćelijske kulture.

Za potrebe eksperimenata koji su podrazumijevali SW kao model za procjenu migracije, astrociti su zasijani na petri šolje prečnika 35 mm i gajenui su do potpune konfluentnosti. Dvadeset četiri sata prije formiranja SW i tretmana, astrocitima je dodat DMEM medijum sa 0.5% sadržajem FBS-a, kako bi se astrociti što više sinhronizovali u smislu ćelijskog ciklusa. Istovjetnost kadrova za snimanje u sukcesivnim vremenskim tačkama osigurana je ucrtavanjem koordinata markerom sa donje strane petri šolje. Sterilnim nastavkom (žuti nastavak od 200 μ l), ručno je nanijeto tri ili četiri ogrebotine u jednosloju kulture astrocita, pod uravnoteženim nagibom pod kojim se pravi ogrobotina, pritiskom o podlogu i brzinom povlačenja, kako bi ogrebotine međusobno bile što

ujednačenijih dimenzija, a ćelijske ivice oko ogrebotine ravne. Po potrebi, ogrebotine su blago isprane DMEM medijumom, nakon čega je je kulturama dodat svjež DMEM medijum, obogaćenim 10 % FBS, sa ili bez dodatnih tretmana. Zatim su kadrovi snimljeni u nultom vremenu (0 h), pomoću invertnog mikroskopa (Carl Zeiss AxioObserver A1), u svjetlosnom polju, na uveličanju 10× (objektiv A-Plan 10×), pomoću EM512 CCD digitalne kamere (Digital Camera System, Evolve, Photometrics). Na svakoj petri posudi uzorkovano je do 16 kadrova, koji se snimaju i u daljim vremenskim tačkama (4, 8, 12, 24, 48 h, Slika 7). Naknadno se sa mikrofografija utvrđuje početna prosječna širina povrede (μm), kao i površina ogrebotine (μm^2) u svim vremenskim tačkama, pomoću ImageJ softvera (odjeljak 18). Na osnovu dobijenih vrijednosti se preračunavaju parametri na osnovu kojih se karakteriše kinetika zarastanja, a to su: stopa zarastanja površine (%) i brzina zarastanja (%/h) u svakoj vremenskoj tački, na osnovu kojih se može konstruisati kriva brzine zarastanja i preračunati brzina napredovanja migratornog fronta astrocita ka središtu ogoljene zone povrede ($\mu\text{m}/\text{h}$). Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti u odnosu na kontrolne, netretirane culture (\pm SE), preračunate iz minimum 3 nezavisne culture astrocita, sa tretmanom bar u duplikatu i do 16 kadrova po petri posudi.

Takođe, u određenim eksperimentalnim postavkama, osim za posmatranje migracije ćelija, SW model je korišćen u kulturi astrocita u kontekstu mehaničke povrede *in vitro*, kao nezavisan tretman na neizmjenjenim ili transfektovanim kulturama, uz naknadno dodate tretmane. U zavisnosti od potreba dodatnih analiza (immunoblot, real-time PCR, imunofluorescentno bojenje, analize enzimske aktivnosti), astrociti su zasijavani na različite površine, pri čemu se vodilo računa da ukupna površina zahvaćena ogrebotinama bude srazmjerna ukupnoj površini na kojoj su kulture rasle, tako što je prilagođen broj ogrebotina na datoj površini. Procenat površine povrede je u svim eksperimentima iznosila 7.5–10 % u odnosu na površinu na kojoj su astrociti gajeni.



Slika 7. Kinetika zarastanja povrede u monodloju kulture primarnih astrocita. U svakoj petri posudi je napravljeno 3-4 povrede pomoću sterilnog nastavka (200 μ l) i uzorkovano je do 16 kadrova koji se snimaju tokom vremena. **(A)** reprezentativne mikrografije istog kadra snimljenog u 0, 4, 8, 12, 24 i 48 h. Bijelom linijom su istaknute ivice povrede radi lakšeg uočavanja. Skala =200 μ m. Sa mikrografija je kvantifikovana površina ogrebotine (μ m²) u svim vremenskim tačkama, pomoću ImageJ softvera, i izražene kao **(B)** stopa zarastanja povrede u odnosu na početnu površinu povrede (%) i **(C)** preračunata brzina zarastanja povrede (%/h),

16. Deglikozilacija proteina

Uloga ugljenohidratni komponenti eN/CD73 u njegovoj katalitičkoj i adhezivnoj funkciji ispitana je u eksperimentima u kojima su ugljeno hidratne komponente uklonjene enzimskom deglikozilacijom, pomoću enzima peptid N-glikozidaze F (PNGase F) koja uklanja N-vezane oligosaharide.

N-glikozidaza F (PNGase F) je enzim amidaza (endoglikozidaza) izolovan iz *Flavobacterium meningosepticum*, koji specifično hidrolizuje amidnu vezu između β -acetilglikozilamina (GlcNAc) i L-aspargina N-glikozilovanog proteina. Enzim je komercijalno dostupan u okviru kompleta (Tabela 1), koji sadrži 15 000 jedinica, koncentracije 500 000 jedinica/ml. Jedna jedinica enzima definisana je kao količina enzima potrebna za deglikozilaciju 10 μ g denaturisanog proteina za vrijeme od 1 sata na 37°C, u ukopnoj zapremini od 10 μ l, sa uspješnošću od preko 95%.

Procedura deglikozilacija uzoraka za imunoblot blot analizu je podrazumijevala pripremu smješe uzorka i enzima PNGase F neposredno pred dalju analizu na imuno blotu. U reakcionu smještu je ulazilo 10 μ g ukupnih proteina zapremine od 15 - 20 μ l, kojoj se doda 2 μ l 10 \times glikoprotein denaturišućeg pufera (sadrži 5% SDS i 0,4 M ditiotritol - DTT) i ta zapremina se izjednačavala pomoću dejonizovane vode do 20 μ l. Ovako pripremljeni uzorci se denurišu 10 min na temperaturi od 95°C, nakon čega se prebacuju kratko na led da se uzorci ohlade. Uspješnost aktivnosti PNGase F je znatno veća na denaturisanim uzorcima, a potrebno trajanje reakcije je kraće. Denaturisanim uzorcima su dodate sledeće komponente: 2.5 μ l 10 \times gliko-pufera (0.5 M natrijum fosfat), 2.5 μ l nejonskog deterdženta NP-40 (10% razblaženja) i 1.25 μ l enzima PNGase F. Ovako pripremljena reakciona smješa se inkubira 1 sat na 37°C u vodenom kupatilu. U ovoj reakciji NP-40 služi da interaguje sa SDS-om koji bi u suprotnom inhibirao aktivnost enzima. Preporuka je da krajnje razblaženje enzima bude 1:20 pa i više, kako bi glicerol koji služi za prezervaciju enzima bio ispod 5% u reakcionoj smješi. Nakon završetka inkubacije, uzorcima se dodaje određena zapremina pufera za nalivanje (Laemmli 6 \times), kao i 5% β -merkaptan etanola radi redukcije proteina, kako bi bili potpuno uporedivi sa nedeglikozilovanim proteinima standardno pripremljenim za imunoblot analizu.

17. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Za potrebe ovih eksperimenata astrociti su zasijani na ploče sa 6 bunara u standardnoj gustini pri zasijavanju i gajeni su do 80-90% konfluentnosti. Medijumi i ćelijski lizati su prikupljeni 4 h ili 24 h nakon tretmana, sledećim postupkom: nakon

prikupljanja medijuma (centrifugirani i sačuvani supernatanti), kulture su par puta isprane ledenim sterilnim PBS puferom, nakon čega su u 500 µl PBS pufera po bunaru ćelije mehanički prikupljenje. Ćelije su lizirane sonikacijom i zatim su centrifugirane na $10\,000 \times g$ u trajanju od 10 min na $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant je sačuvan i njegov saržaj analiziran.

Analizirani su sledeći parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite: sadržaj azot-monoksida NO (indirektno, određivanjem sadržaja nitrita), superoksid anjona ($\text{O}_2^{\cdot-}$), malondialdehida (MDA), ukupnog glutationa (GSH), kao i aktivnosti superoksid dismutaza i to citosolne Cu/ZnSOD i mitohondrijalne MnSOD.

17.1. Procjena produkcije azot-monoksida određivanjem koncentracije nitrita

Produkcija NO od strane tretiranih astrocita procjenjena je Grisovom reakcijom (Griess) pomoću koje se određuje koncentracija nitrita (Navarro-González et al., 1998). Naime, NO u reakciji sa molekularnim kiseonikom i superoksid anjonom formira nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-) i peroksinitrite. Nitrati se redukcijom metalnim kadmijumom prevode u nitrite. Ukupni nitriti dalje sa sulfanilamidom (Grisov reagens A, Tabela 2) formiraju diazonijum soli, koje formiraju azo-jedinjenje crvene do ružičaste boje u reakciji sa N-(naftil)-etilenediamin dihidrohloridom (Grisov reagens B, Tabela 2) pri pH 2.0-2.5.

Radi redukcije nitrata u nitrite, u svaki uzork je dodata po jedna granula aktiviranog kadmijuma (granule u 5 mM rastvoru CuSO_4 u glicin-NaOH puferu). Po 50 ili 100 µl uzorka je pomješano sa istom zapreminom Grisovog reagensa. Poznate koncentracije natrijum nitrita NaNO_2 su služile za konstruisanje standardne krive. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku apsorbance su očitane na talasnoj dužini 492 nm (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijenost (\pm SE) ukupnih nitrita, izražena u µmol/l normalizovanih na mg proteina iz tri nezavisne ćelijske klture testirane u triplikatu.

17.2. Određivanje koncentracije superoksid anjona

Koncentracija superoksid anjona $\text{O}_2^{\cdot-}$ se može odrediti koriteći njegovu sposobnost da redukuje nitro-plavo tetrazolijum (*engl.* nitroblue tetrazolium, NBT) do monoformazana.

U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegoa redukcija u diformazan praćena promjenom u intenzivnu plavu boju i smanjenjem rastvorljivosti.

Krajnja koncentracija NBT treba da bude 1 mM, a receptura za radni rastvor NTB je navedena u Tabeli 2. Ova reakciona smješa se izlaže azotu pod pritiskom u trajanju od bar sat vremena kako bi se smanjio napon kiseonika. Reakcija otpoćinje dodavanjem 50 μ l uzorka u 1 ml reakcione smješe. Promjena apsorbance je mjerena na talasnoj dućini od 550 nm u trajanju od 5 min, a rezultat je izraćen kao srednja koncentracija (\pm SE) redukovanog NBT u μ mol/l, normalizovano na mg proteina i minutu trajanja reakcije, iz tri nezavisne ćelijske klture testirane u triplikatu.

17.3. Odrećivanje sardćaja malonaldehida

Pri oksidativnom stresu dolazi do povećane peroksidacije lipida, pri ćemu kao jedan od produkata nastaje malonaldehid (MDA). Njegovo prisustvo se moće odrediti pomoću eseja koji se zasniva na reakciji MDA sa tiobarbituratnom kiselinom, koja daje kompleks žute boje (Villacara et al., 1989). Receptura za pravljenje radni reagensa je u Tabeli 2. 200 μ l uzorka i 400 μ l radnog reagensa se pomješa i inkubirana 5 min na 95 $^{\circ}$ C. Nakon hlaćdenja i centrifugiranja na 3000 \times g u trajanju od 1 min, uzorci su nanešeni na mikrotitar ploću u duplikatu po 300 μ l i oćitavana je apsorbance na 532 nm talasnoj dućini. Rezultati iz tri nezavisne kulture astrocita su prikazani kao srednje koncentracije MDA (\pm SE) u nmol/l normalizovane na mg proteina.

17.4. Odrećivanje koncentracije ukupnog glutaciona

Glutation je prisutan u dvije forme, redukovanj GSH i oksidovanj GSSH formi. Glutation reduktaza (GR) je odgovorna za prevćdenje GSSH u GSH. U fizioloćkim uslovima, kao u stanjima povećanja antioksidativne zašćite dominira GSH, dok je u patofizioloćkim uslovima oksidativnog stresa prisutnija GSSH forma. Upravo je ova redukcija GSSH do GSH iskorišćtena u reciklirajućem eseju pomoću kog je moguće odrediti koncentraciju ukupnog glutaciona (Anderson, 1985).

Za reakcionu smješnu su pripremljene komponente kao što je navedeno u Tabeli 2. Reakciona smješna se sastojala od 700 μ l NADH pufera, 100 μ l DNTB pufera, 175 μ l vode i 25 μ l uzorka. Svakoju smješni sa uzorkom je dodato po 10 μ l GR (Tabela 2), čime dolazi do otpočinjanja reakcije. Očitavanje apsorbanci je izvršeno neposredno nakon otpočinjanja reakcije na talasnoj dužini od 412 nm u trajanju od 6 min. Poznatim koncentracijama GSSH je konstruisana standardna kriva. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije ukupnog glutationa (\pm SE) izraženi u nmol/l, normalizovani na mg proteina, iz tri nezavisne kulture astrocita.

17.5. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza: Cu/ZnSOD i MnSOD

Aktivnost ukupne aktivnosti superoksid dismutaze se ogleda u kumulativnoj aktivnosti citosolne Cu/ZnSOD i mitohondrijalne MnSOD. Supstrat za SOD je superoksid anjon $O_2^{\bullet-}$, kojeg ovaj enzim neutralizuje. Princip određivanja aktivnosti SOD se zaniva na reakciji spontane auto-oksidacije adrenalina (Sun and Zigman, 1978). Tokom oksidacije adrenalina dolazi do formiranja adrenohroma, proizvoda ružičaste boje, a pad intenziteta boje tokom perioda mjerenja apsorbance na talasnoj dužini od 480 nm, je srazmjernan ukupnoj aktivnosti SOD.

Reakciona smješna treba da sardži 2.85 ml Na-bikarbonatnog pufera (50 mM, pH 10.2 sa 1mM EDTA), 100 μ l adrenalina (iz 10 mM štoka tako da mu je finalna koncentracija 0.3 mM) i 50 μ l uzorka. Reakcija otpočinje dodavanjem adrenalina, nakon čega se prati apsorbance. Kako bi se doredila aktivnost MnSOD, neophodno je ponoviti reakciju, ali uz dodatak KCN (5 mM) u reakcionu smješnu kako bi specifično inhibirao CuZnSOD. Razlika ukupne aktivnosti SOD i dobijene aktivnosti za MnSOD je aktivnost Cu/ZnSOD. Određivane su vrijednosti IC₅₀ spontane oksidacije adrenalina, posmatrano u linearnom dijelu za svaku dobijenu krivu. Ova vrijednostu ujedno definiše jedinicu aktivnosti SOD u datom uzorku. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\pm SE) izražene u jedinicama aktivnosti po mg proteina datog uzorka, iz tri nezavisne kulture astrocita.

18. Obrada i prikaz podataka

Obrada mikrografija za procjenu broja proliferišućih ćelija, broja ćelija obilježenih specifičnim markerom u procjeni čistoće kulture i kvantifikaciju površine i širine povrede sa mikrografija, tokom vremena korišćen je ImageJ/Fiji softverski paketi (Rueden et al., 2017, Schindelin et al., 2012, Schneider et al., 2012).

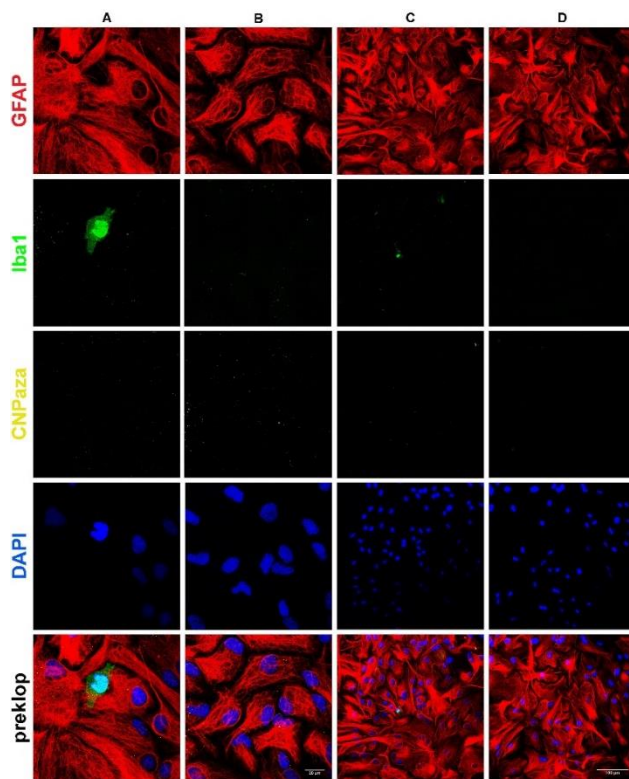
Statistička analiza vrijednosti dobijenih u eksperimentima je rađena u OriginPro7 i OriginPro8 softverskom paketu (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) i u IBM SPSS Statistics verzija 24 (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp, USA). Srednje vrijednosti različitih grupa su poređene jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Tuckey's *post hoc* testom. Studentov t test je korišćen za provjeravanje razlika između dvije grupe. Ukoliko podaci nisu prolazili normalnu raspodjelu i ujednačenost varijanse korišćen je neparametarski Kruskal-Wallis testom analize varijanse sa Dunn-Bonfferoni *post hoc* testom. Za provjeru razlika između dvije grupe u ovom slučaju je korišćen Mann-Whitney U test. Statistički značajnim su smatrane razlike u slučaju vrijednosti $p < 0.05$.

Srednje vrijednosti rezultata (\pm SE) normalizovane u odnosu na kontrolnu grupu ili ne, izražene u procentima ili ne, su predstavljene grafički korišćenjem prethodno pomenutim OriginPro softverom i GraphPad Prism verzija 6.00 softverom za Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

IV REZULTATI

1. Procjena stepena prečišćenosti primarne culture astrocita

Primarne kulture kortikalnih astrocita podliježu višefaznom prečišćavanju kako bi se odstranili u najvećoj mjeri ostali tipovi ćelija, međutim najčešće ćelije mikroglije u određenom broju ostaju prisutne. U cilju određivanja čistoće kultura astrocita, ćelije su podvrgnute imunofluorescentnom trostrukom obilježavanju (Slika 8) na markere astrocita, mikroglije i oligodendrocita (GFAP, Iba1, CNPaza, redom). Jedra su obilježena DAPI bojom. Brojanjem ćelija koje su pokazale imunoreaktivnost na svaki od markera pokazano je da su primarne kortikalne kulture sadržale ~98% astrocita i ~2% mikroglije, oligodendrociti imunoreaktivni na CNPazu nisu primjećeni u kulturama.

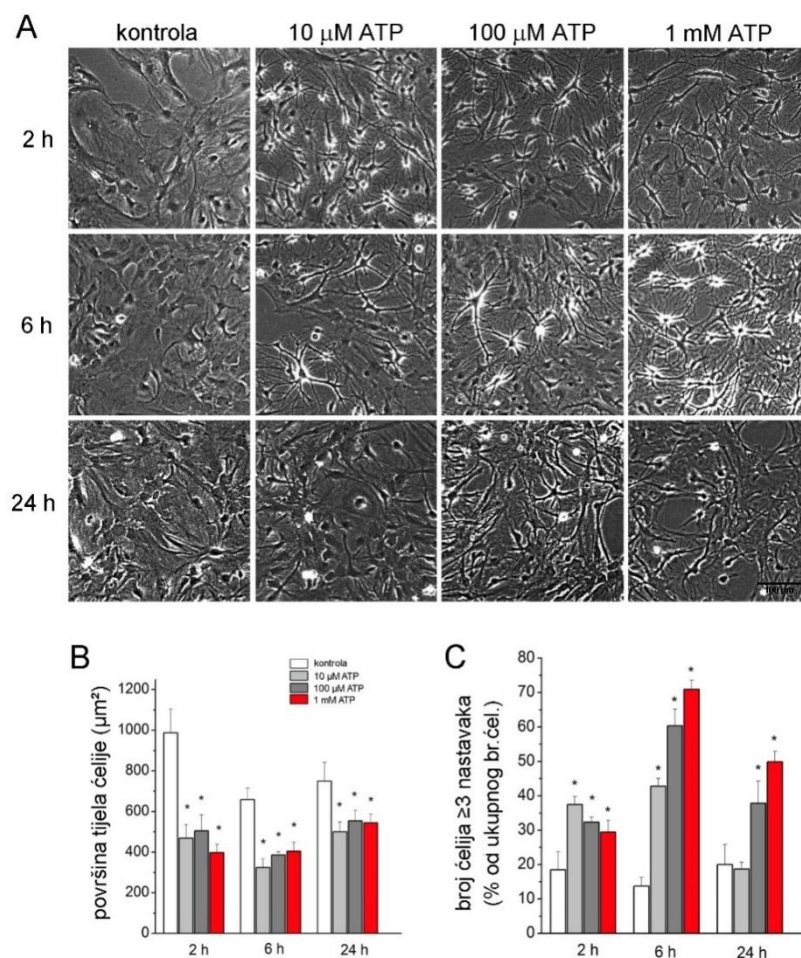


Slika 8. Reprezentativne konfokalne mikrografije kortikalnih astrocita sa imunofluorescentno obilježenim markerom astrocita (GFAP, crveno), mikroglije (Iba1, zeleno) i oligodendrocita (CNPaza, žuto), Jedra su obilježena DAPI bojom (plavo). Uveličanje: (A, B) 63x; (C, D) 40x.

2. Uticaj ATP na morfološki i funkcionalni fenotip ćelija u primarnoj kulturi astrocita

2.1. Morfologija i reorganizacija citoskeletnih elemenata

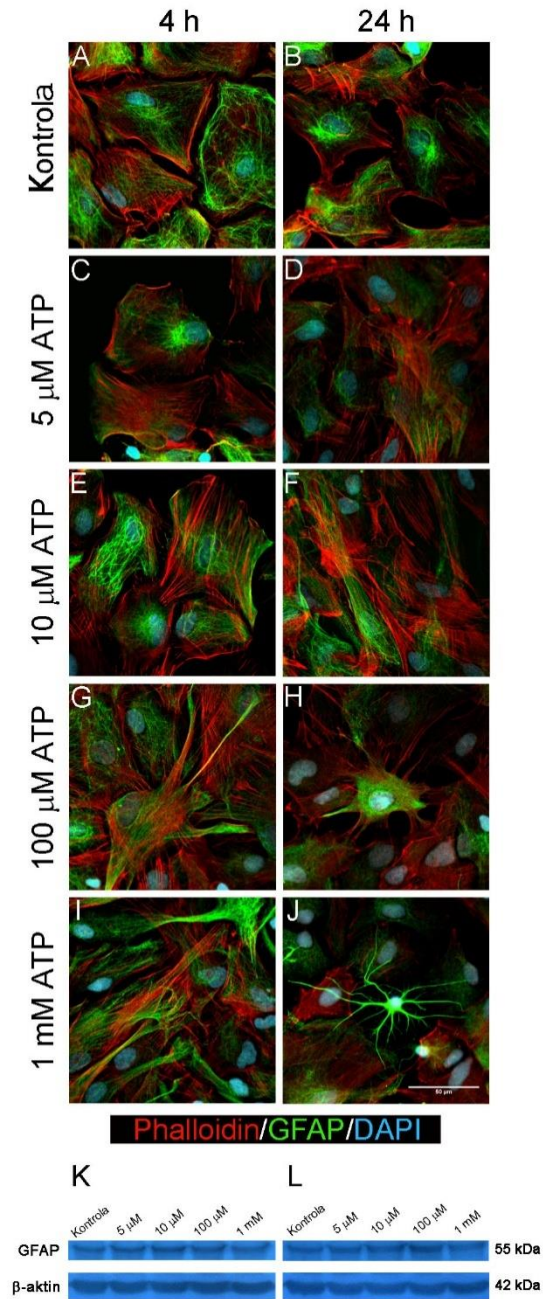
Aktivacija astrocita praćena je brojnim promjenama ćelijske morfologije. Stoga je procjenjen efekat ATP na remodelovanje astrocita u kulturi. Mikrografije kontrolnih i ATP tretiranih kultura su snimljene ravnomjerno po staklu na kom su astroцити rasli, u svjetlosnom polju, na svakih 2 h (Slika 9).



Slika 9. Uticaj ATP na oblik astrocita u kulturi. **(A)** Reprerzentativne mikrografije astrocita u svjetlosnom polju, snimljene 2, 6 i 24 h nakon ATP tretmana. Skala = 100 μm. **(B)** Promjene površina ćelijskog tijela (μm² ± standardna greška) u kulturi 2, 6 i 24 h nakon ATP tretmana. **(C)** Grananje astrocita pod uticajem ATP. Prikazan je % ćelija u kulturi koje ispoljavaju tri i više primarnih nastavaka (±SE). Analizirano je po šest nasumično odabranih kadrova iz $n = 2$ nezavisno pripremljene kulture astrocita. Statistička značajnost $*p < 0.01$.

Astroцити u kontrolnim uslovima tipično su poligonalnog oblika i bez nastavaka, što je uobičajena morfologija ovih ćelija u 2-D primarnoj kulturi u datim uslovima gajenja (Slika 9A). Uticaj ATP na morfologiju procenjen je na osnovu određivanja površine ćelijskog tijela i procjenom broja razgranatih ćelija, pri čemu su kao zvijezdaste smatrane ćelije sa 3 i više primarnih nastavaka. Prisustvo ATP u medijumu dovodi do brze i izražene promjene oblika, jer ćelije već u prvom kontrolnom vremenu (2 h) ispoljavaju zvijezdastu morfologiju sa karakterističnim sferičnim tijelima i brojnim manje ili više razgranatim nastavcima, nezavisno od primjenjene koncentracije ATP ($p < 0.001$), a promjena je stabilna i nakon 24 h u prisustvi svih koncentracija (Slika 9B). ATP pokazuje doznu zavisnost kada je riječ o formiranju nastavaka, pri čemu je maksimalni efekat vidljiv u kulturama astrocita tretiranih 1 mM ATP. Statistički značajno povećanje broja razgranatih astrocita uočeno je 2 h nakon tretmana, a maksimalan broj ovakvih ćelija je dostignut već nakon 6 h ($p < 0.001$) (Slika 9C). Promjene izazvane višim ATP koncentracijama (100 μ M, 1 mM) bile su stabilne tokom vremena, pa i nakon 24 h, dok je grananje astrocita u prisustvu najniže testirane koncentracije ATP bilo reverzibilno, a astroцити su povratili svoju početnu morfologiju 24 h od tretiranja (Slika 9A,C).

S obzirom na to da promjeni oblika i veličine ćelije prethodi reorganizacija citoskeletnih elemenata, ispitan je uticaj ATP na organizaciju aktinskih mikrofilamenata i GFAP intermedijalnih filamenata (Slika 10). U kontrolnim uslovima, aktinska vlakna krupnih poligonalnih astrocita organizovana su tako da u gustim snopovima prate ćelijsku membranu, dok GFAP filamenti formiraju delikatnu mrežu koja se ravnomjerno proteže od jedra do ćelijske membrane (Slika 10A,B). Astroцити tretirani 5 μ M ATP imaju manje izražen poligonalni oblik, a aktinski filamenti se uočavaju kao eksplicitnija vlakna u poređenju sa kontrolnim ćelijama u kontrolnim uslovima (Slika 10C,D). Veće koncentracije ATP dovode do gubitka fino organizovanih snopova aktinskih filamenata duž membrane i do formiranja isprepletanih paralelno orijentisanih stres vlakana, koja predstavljaju tipičnu reakciju mikrofilamenata na stres u *in vitro* uslovima. Kada je riječ o intermedijarnim filamentima, primjećuje se njihovo kondenzovanje u određenim regijama ćelije (Slika 10E-D).



Slika 10. Uticaj ATP (5 μ M – 1 mM) na organizaciju citoskeletnih elemenata u astrocitima. **(A-J)** Konfokalne mikrografije astrocita obojenih faloidinom koji se vezuje za F aktin (crveno) i GFAP (zeleno), dok su jedra obilježena DAPI bojom (plavo). Skala = 50 μ m. **(K-L)** Reprerentativni imunoblot ekspresije aktina i GFAP pod uticajem ATP, 4 i 24 sata nakon početka tretmana.

Pri tretmanu 1 mM ATP nakon 24 h, izduženi nastavci izraženo zvijezdastih astrocita imaju jasno izražene snopove GFAP filamenata, dok su stres aktinska vlakna gotovo u potpunosti depolimerisana, budući da se primjenjena fluorescentna boja faloidin vezuje isključivo za polimerisanu formu aktina (F aktin), ali ne i za monomernu jedinicu, G aktin (Slika 10J). Imunoblot analiza je pokazala da primjenjeni ATP tretmani ne dovode do promjena ukupnih količina eksprimiranih monomernih jedinica, aktina i GFAP, već uslovljavaju depolimerizaciju (aktin) i polimerizaciju (GFAP) u citoskeletna vlakna (Slika 10K,L).

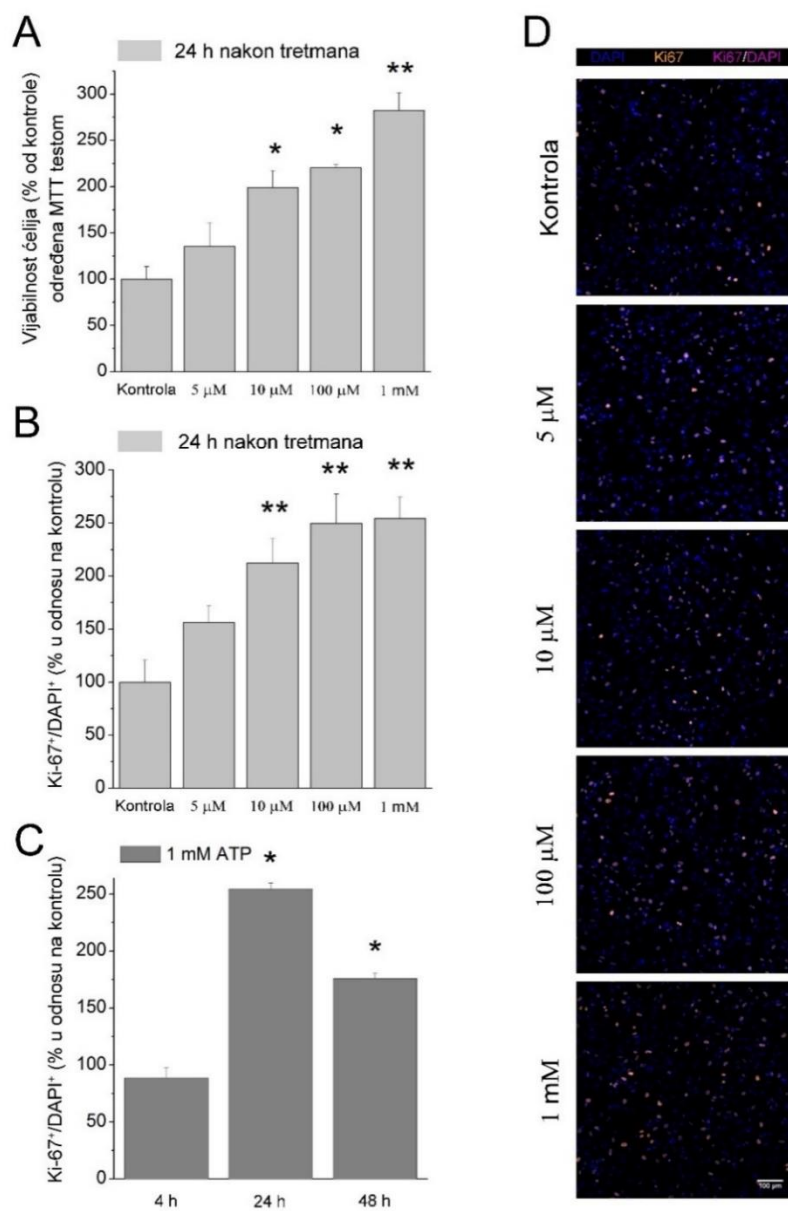
2.2. Preživljavanje ćelija

Vijabilnost ćelija nakon ATP tretmana (5 μ M - 1 mM), procjenjena je nakon 24 h primjenom MTT testa i protočnom citometrijom nakon vezivanja aneksina V i propidijum jodida. ATP dozno-zavisno povećava nivo formiranog kristala formazana ($p < 0.05$) počev od 10 μ M ATP (Slika 11A). Tretmani ATP-om ne dovode do promjena u broju vijabilnih ćelija, apoptotičnih ili nekrotičnih ćelija, na šta ukazuju rezultati protočno citometrijske analize (Tabela 6).

Tabela 6. Uticaj ATP na vijabilnost astrocita u kulturi.

ATP tretman	0 (kontrola)	5 μ M	10 μ M	100 μ M	1 mM
4 h tretman	Populacija ćelija (%)				
An V ⁻ /PI ⁻	92.29	93.33	92.82	92.34	90.52
An V ⁺ /PI ⁻	0.16	0.16	0.17	0.18	0.18
An V ⁻ /PI ⁺	0.57	0.82	0.62	0.85	0.71
An V ⁺ /PI ⁺	6.98	5.7	6.39	6.63	8.59
24 h tretman	Populacija ćelija (%)				
An V ⁻ /PI ⁻	92.29	93.64	95.46	95.58	94.60
An V ⁺ /PI ⁻	0.16	0.10	0.19	0.16	0.14
An V ⁻ /PI ⁺	0.57	0.43	0.31	0.31	0.49
An V ⁺ /PI ⁺	6.98	5.82	4.04	3.94	4.77

Procjena broja živih ćelija, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturi primjenom protočne citofluorimetrije i obilježavanjem ćelija na aneksin V i propidijum jodid (An V/PI), izražena u procentima (\pm SE), od ukupnog broja očitanih ćelija po uzorku iz dvije nezavisne culture astrocita, sa tretmanima u duplikatu.



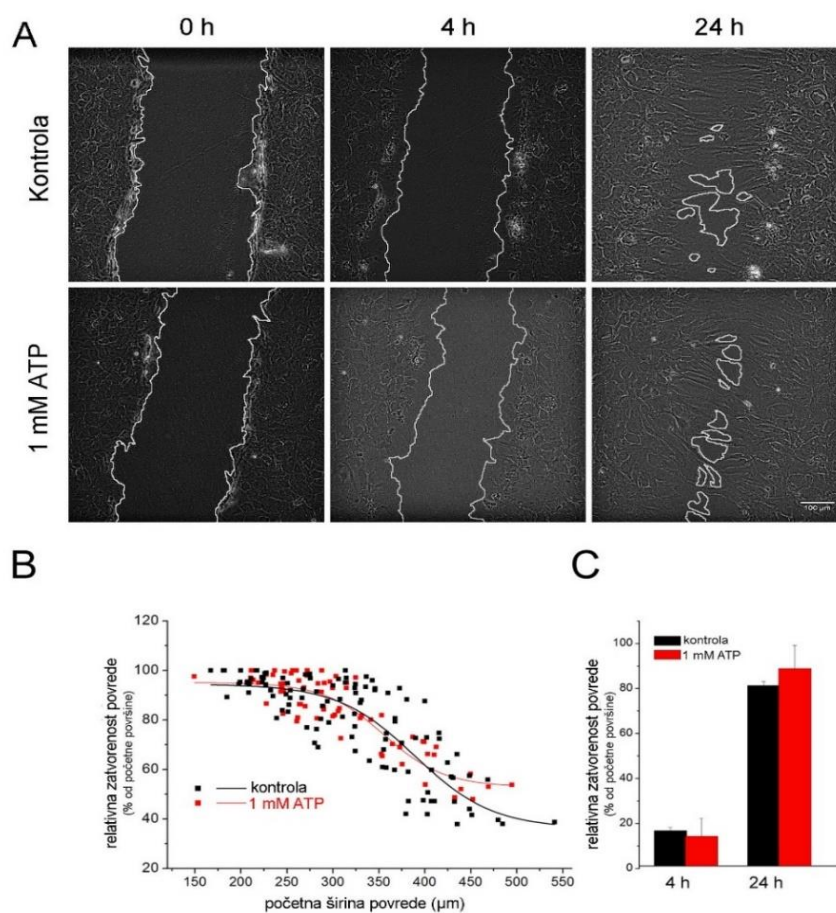
Slika 11. Uticaj ATP (5 μ M - 1mM) na metabolički i proliferativni status astrocita 24 h nakon tretmana. **(A)** Vijabilnost ćelija određena MTT testom. Stubići na grafiku predstavljaju srednje vrijednosti apsorbance formazana iskazane u odnosu na asorbancu kontrole (100 %) \pm SE. **(B)** Stopa proliferacije astrocita u kulturi astrocita određena dvojnim fluorescentnim Ki67/DAPI bojenjem. Stubići predstavljaju % dvojno pozitivnih Ki67⁺/DAPI⁺ ćelija u odnosu na kontrolu (100%) \pm SE. **(C)** Promjene stope proliferacije astrocita tretiranih 1 mM ATP u vremenskim tačkama 4-48 h nakon početka tretmana. Statistička značajnost: * p < 0.01; ** p < 0.001. **(D)** Reprerzentativne mikrografije fluorescentnog Ki67/DAPI bojenja, 24 h nakon početka tretmana. Skala = 100 μ m.

S obzirom na to da ATP u testiranim koncentracijama ne dovodi do citotoksičnih efekata, ispitina je promjena stope proliferacije astrocita u primarnim kulturama tretiranim ATP-om, pomoću dvojnog bojenja Ki67/DAPI (Slika 11B,D). U kontrolnim uslovima, astrociti pokazuju stopu proliferacije od oko ~15%, dok se pod uticajem ATP stepen proliferacije povećava na ~40% ($p < 0.01$) 24 h nakon tretmana, u prisustvu svih koncentracija, osim najniže. Maksimalan proliferativni efekat uočen je u prisustvu 1 mM ATP, 48 sati nakon tretiranja ($p < 0.001$) (Slika 11C).

2.3. Migracija

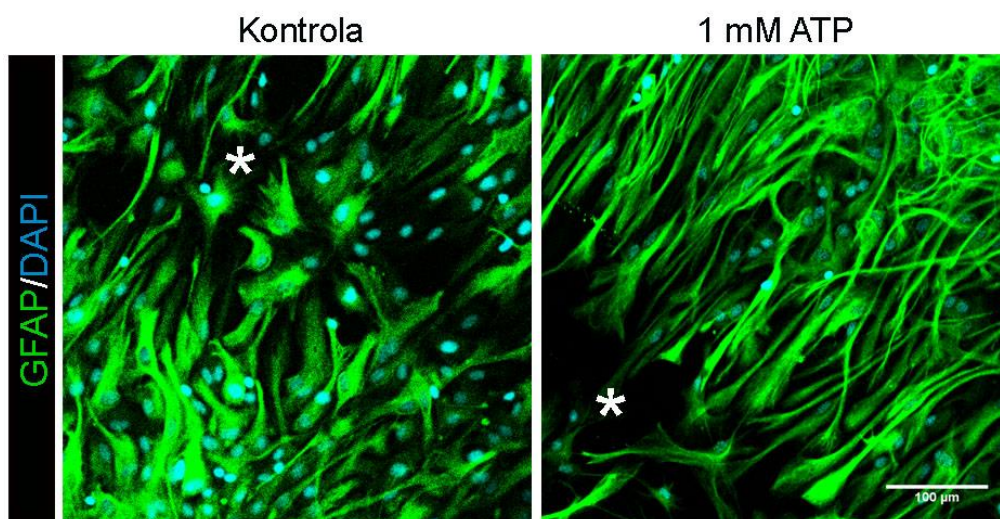
Sticanje sposobnosti migracije jedna je od glavnih karakteristika reaktivnog fenotipa astrocita, kako *in vivo*, tako i *in vitro*, u cilju zaštite okolnog nervnog tkiva i formiranja glijskog ožiljka. Stoga je analiziran uticaj ATP tretmana na migraciju primarnih astrocita u testu povrede monosloja ćelijske kulture (SW) (Slika 12A).

Dinamika zarastanja povrede u kontrolnim i tretiranim kulturama obrnuto je proporcionalna početnoj širini povrede (Slika 12B,C). U okviru povreda čija je početna prosječna širina bila $< 300 \mu\text{m}$, već nakon 4 sata uočljivo je pomjeranje fronta ka središtu povrede, a nakon 24 sata dolazi do gotovo potpunog pokrivanja površine povrede i u kontrolnim uslovima i nakon ATP tretmana (Slika 12A). U slučaju da je inicijalna širina povrede veća od $300 \mu\text{m}$, dinamika zarastanja je znatno smanjena, tako da čak ni nakon 48 sati nije u potpunosti došlo do zarastanja (Slika 12B). Pošto je dinamika zarastanja zavisna od početne širine povrede, za kvantifikaciju su odabrani samo kadrovi gdje je početna širina povrede iznosila od 250 do $350 \mu\text{m}$ (Slika 12C).



Slika 12. Uticaj ATP na migraciju astrocita u modelu povrede u monosloju ćelijske kulture. **(A)** Mikrografije kontrolnih i 1 mM ATP tretiranih astrocita, snimljene u svjetlosnom polju u nultom trenutku i 4 h i 24 h nakon nanošenja povrede. Ivice povrede su približno označene bijelom linijom radi lakšeg uočavanja. Skala = 100 μm. **(B)** Zavisnost brzine zarastanja od širine inicijalne povrede (μm), iskazana kao ukupno smanjenje ogoljenje površine nakon 24 h, normalizovano u odnosu na površinu rane u 0 h, koja je arbitrarno predstavljena kao 100% u kontrolnim uslovima (crni krugovi), i nakon tretmana ATP-om (crveni krugovi). **(C)** Procjena zacjeljenja povrede nakon 4 i 24 h izražena je kao % u odnosu na kontrolu ± SE u kontrolnim (crni stubići) i ATP tretiranim (crveni stubići) kulturama. Za kvantifikaciju su korišćene samo mikrografije sa početnim širinama povreda od 250 do 350 μm.

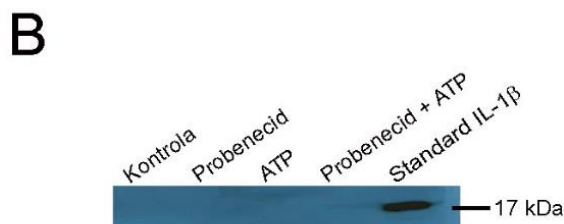
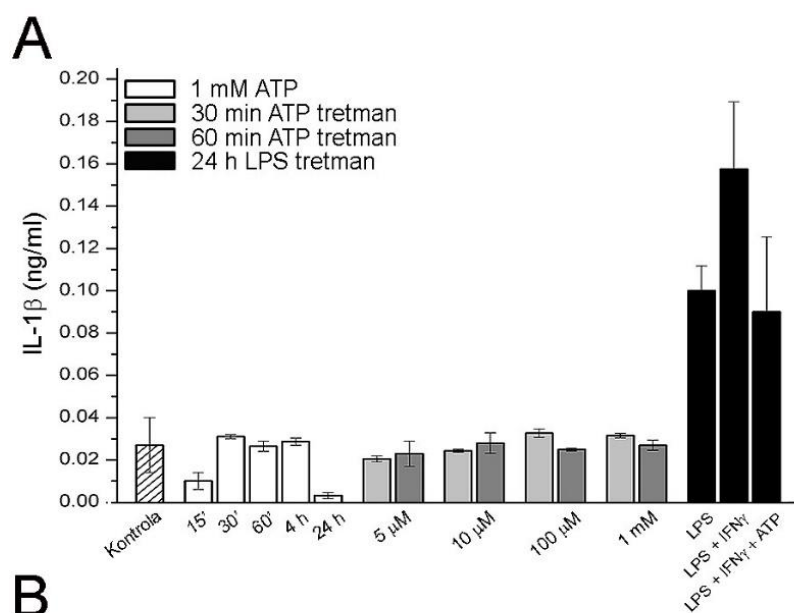
Rezultati pokazuju da dodavanje ATP kulturama nije dovelo do promjene u dinamici zarastanja povrede ($p > 0.05$), ali je uticalo na izgled astrocita duž fronta uz samu povredu (Slika 13). Astrociti koji ovičavaju povredu su razvili izdužene nastavke usmjerene ka praznoj površini povrede, dok u netretiranim kulturama ćelije uz ivicu povrede imaju radijalno orijentisane hipertrofirane nastavke (Slika 13).



Slika 13. Uticaj ATP tretmana na morfologiju astrocita duž ivice povrede. Čelije su imunofluorescentno obilježene na GFAP. i snimljene konfokalnim mikroskopom. Bijela zvijezdica označava region povrede. Skala = 100 μm .

2.4. Indukcija oslobađanja IL-1 β

S obzirom na to da je IL-1 β jedan od ključnih faktora koji pokreće događaje koji vode ka neuroinflamaciji i aktivaciji astrocita i mikroglije, koje i same postaju sposobne da proizvode i oslobađaju proinflamatorne citokine, uključujući IL-1 β , dalje smo postavili pitanje da li ATP dovodi do oslobađanja ovog citokina od strane astrocita u kulturi. Sadržaj IL-1 β u medijumu kontrolnih i tretiranih kultura određen 15 min, 30 min, 1 sat, 4 sata i 24 h nakon dodavanja ATP pomoću komercijalnog ELISA testa. Osim u kulturama tretiranim ATP, oslobađanje IL-1 β određeno je u kulturama koje su tretirane LPS, kombinacijom tretmana LPS+IFN- γ i LPS+IFN- γ +ATP, čiji su medijumi takođe prikupljeni nakon 24 h i analizirani uporedo sa ATP tretmanima. Ovi tretmani su služili kao pozitivna kontrola ELISA testa. Kombinacija tretmana LPS i LPS+IFN- γ dovodi do znatnog oslobađa IL-1 β (Slika 14A), dok tretman ATP-om, ni u jednoj primjenjenoj koncentraciji nije doveo do povećanja oslobađanja IL-1 β u kulturi. Odsustvo efekta ATP na oslobađanje IL-1 β dodatno je potvrđeno imunoblot analizom IL-1 β , pomoću antitela na IL-1 β uz rekombinantni IL-1 β koji je služio kao pozitivna kontrola (Slika 14B)

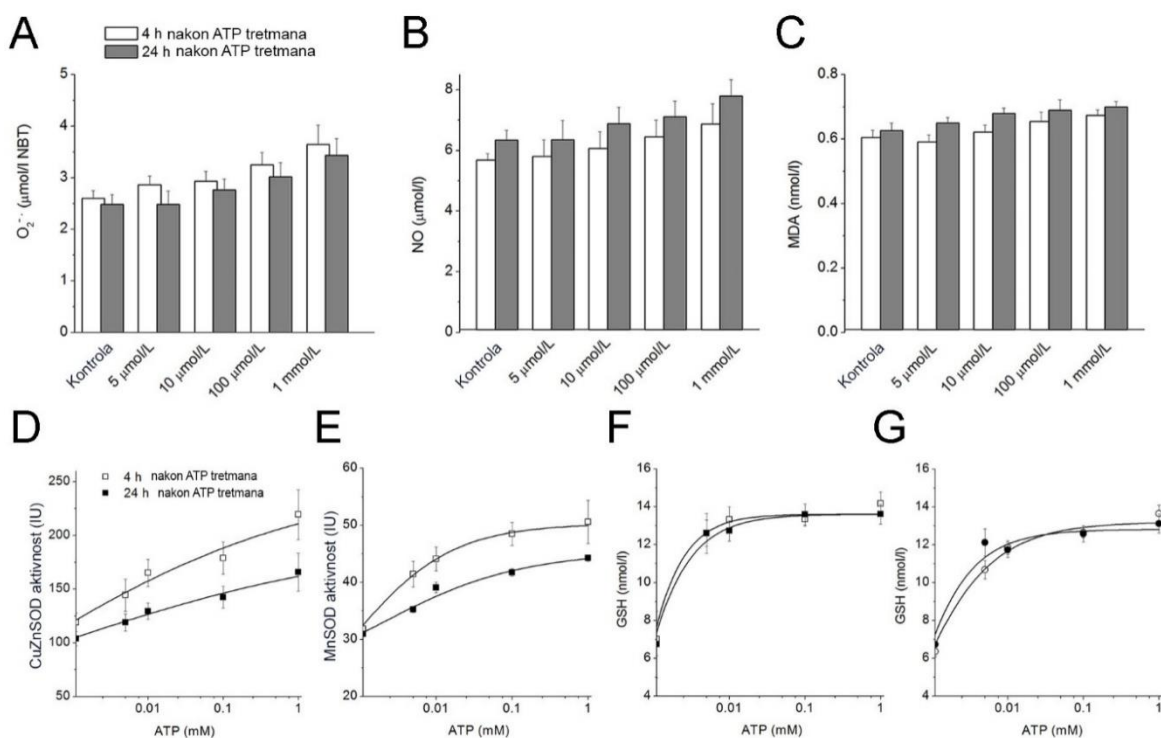


Slika 14. Uticaj ATP na oslobađanje IL-1 β od strane astrocita. **(A)** Nivo IL-1 β u medijumu kontrolnih kultura i kultura tretiranih 1 mM ATP, u trajanju od 15 min do 24 h (bijeli stubići), rastućim koncentracijama ATP u trajanju od 30 min (svijetlo sivi stubići) ili 60 min (tamno sivi stubići). Količina IL-1 β u medijumu kultura astrocita je određena pomoću enzimskog imunosorbentog testa. Kao pozitivna kontrola korišćeni su medijumi kultura astrocita tretiranih sa LPS, LPS+IFN- γ ili LPS+IFN- γ +ATP (crni stubići). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti detektovane koncentracije IL-1 β (ng/ml) \pm SE, iz $n > 3$ nezavisne kulture astrocita testirane u triplikatu. **(B)** Imunoblot analiza IL-1 β u medijumu kultura tretiranih 1 mM ATP, probenecidom (1.25 mM) ili kombinovano. Kao pozitivna kontrola korišćen je pacovski rekombinantni IL-1 β /IL-1F2 koji je dao traku na očekivanoj visini od \sim 17 kDa.

2.5. Antioksidativna zaštita astrocita

S obzirom na to da ATP ne indukuje oslobađanje IL-1 β , što je jedna od važnih odlika aktivacije astrocita, dalje smo analizirali kakav je uticaj ovog nukleotida na stanje antioksidativne zaštite i parametre oksidativnog stresa. Stoga su analizirani ukupni lizati ćelija i medijumi prikupljeni 4 h i 24 h nakon tretmana. Određeni su parametri oksidativnog stresa koji se odnose na produkciju ROS i RNS, kao što su O $_2^{\bullet-}$ i NO. Ovi molekuli

međusobno reaguju formirajući peroksinitrite, veoma reaktivne sa raznim ćelijskim komponentama. Takođe, određen je nivo MDA kao krajnjeg produkta degradacije fosfolipidnih ćelijskih membrana, koji svjedoči o nivou lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati jasno pokazuju da ATP, u opsegu koncentracija od 5 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l , ne utiče značajno na promjenu nivoa $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO i MDA u odnosu na kontrolne uslove (Slika 15A-C).



Slika 15. Uticaj ATP na stanje antioksidativne zaštite u kulturi astrocita. Koncentracije (A) $\text{O}_2^{\cdot-}$, (B) NO i (C) MDA određene su u ukupnim lizatima astrocita tretiranih ATP (5 $\mu\text{mol/L}$ do 1 mmol/L), u trajanju od 4 h (bijeli stubići) ili 24 h (sivi stubići). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti koncentracija testiranih radikala ($\mu\text{mol/l}$) \pm SE, normalizovano na mg proteina. (D) Aktivnost Cu/ZnSOD i (E) MnSOD u ćelijskim lizatima astrocita tretiranih ATP-om, 4 (bijeli krugovi) i 24 h (crni krugovi) nakon početka tretmana. Simboli predstavljaju srednje vrijednosti aktivnosti (\pm SE) iz $n = 3$ nezavisne culture, ponovljeno u duplikatu. Ukupni nivo GSH u (F) ćelijskim lizatima i u (G) medijumima kultura tretiranih astrocita. Prikazane su srednje vrijednosti količine GSH (nmol/l) \pm SE, u uzorcima prikupljenim 4 h (bijeli kvadratići) i 24 h (crni kvadratići), iz $n = 3$ nezavisne kulture testirane u duplikatu.

Kao indikatori antioksidativne zaštite, analizirane su aktivnosti Cu/ZnSOD i MnSOD koje uklanjaju štetni $O_2^{\cdot-}$, pri čemu se produkuje H_2O_2 , koji se dalje detoksifikuje u H_2O . Tretman ATP-om dovodi do dozno-zavisnog porasta aktivnosti Cu/ZnSOD ($p < 0.01$) i MnSOD ($p < 0.05$) (Slika 15D,F). Takođe, ATP dovodi do povećanja ukupnog glutaciona unutar ćelije ($p < 0.001$) i u medijumu tretiranih kultura ($p < 0.0001$) u odnosu na kontrolne uslove (Slika 15F,G).

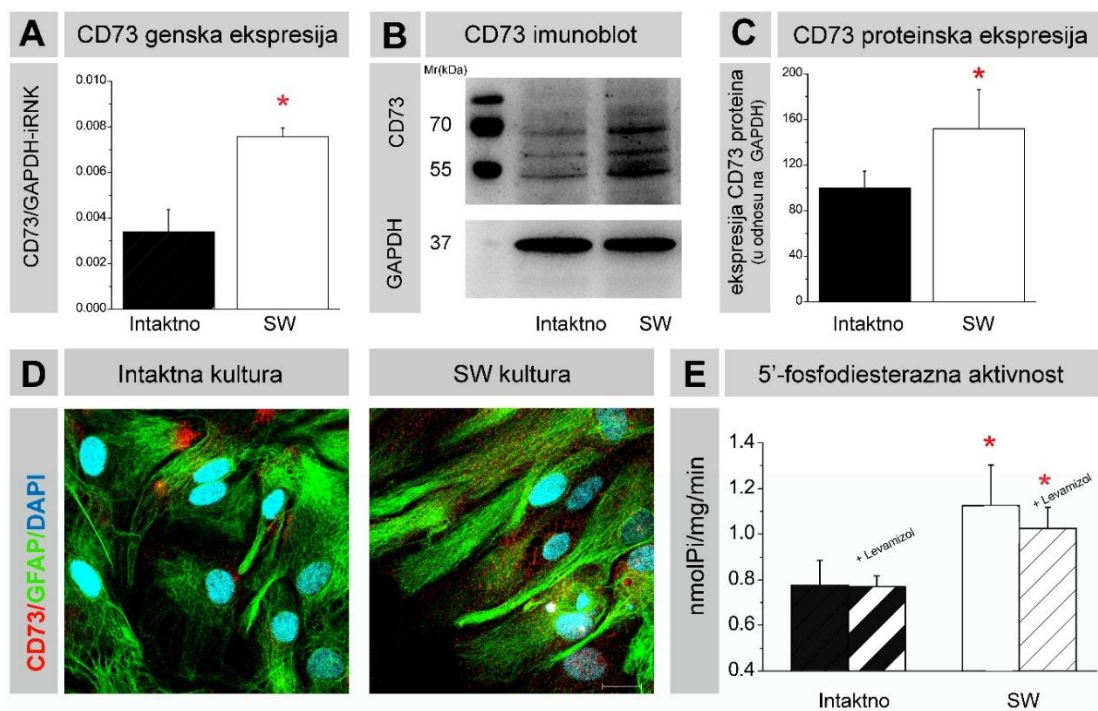
3. Karakterizacija ekspresije adenozijskih receptora i eN/CD73 u modelu povrede astrocita u kulturi

3.1. Ekspresija eN/CD73 na astrocitima u modelu povrede

S obzirom na to da je centralni cilj ove doktorske teze ispitivanje uloge eN/CD73 u adheziji i migraciji astrocita, ustanovljen je model povrede u monosloju astrocita u kulturi, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode (odjeljak 15). Stoga smo najprije okarakterisali bazalni nivo ekspresije, distribucije i aktivnosti eN/CD73 u kulturi astrocita izloženoj povredi (SW) (Slika 16). U uzorcima prikupljenim 4 h nakon nanošenja povrede detektovano je povećanje ekspresije iRNK koja kodira eN/CD73 ($223.5 \pm 5.1\%$, $p < 0.01$) u poređenju sa intaktnom kulturom (Slika 16A). Takođe je pokazano značajno povećanje proteinske ekspresije eN/CD73 (Slika 16B,C) kao i njegove fosfodiesterazne aktivnosti (Slika 16E). Nakon razdvajanja uzoraka na membranama elektroforezom i inkubiranja sa specifičnim antitijelom na eN/CD73, na tipičnim blotovima mogle su se razlikovati tri trake, molekularnih težina oko 69, 61 i 55 kDa (Slika 16B), koje najvjerojatnije predstavljaju različite glikoforme eN/CD73. S obzirom da sve tri trake potiču od eN/CD73, izvršili smo zbirnu kvantifikaciju svih traka u jednoj koloni. Kvantifikacija je pokazala značajno povećanje proteinske ekspresije eN/CD73 u SW kulturama astrocita nakon 24 h ($151.6 \pm 34.2\%$, $p < 0.05$) u odnosu na nivo zabilježen u intaktnim kontrolama (Slika 16C).

Membranska lokalizacija eN/CD73 analizirana je konfokalnom mikroskopijom, pomoću dvojnog imunofluorescentnog obilježavanja eN/CD73/GFAP (Slika 16D). U konfluentnim intaktnim kulturama, na astrocitima tipične morfologije i GFAP organizacije, molekuli eN/CD73 grupisani su na marginalnim regionima membrane u okviru kratkih

nerazgranatih nastavaka koji se nastavljaju na poligonalna tijela ćelija. Na ćelijama u SW kulturi, astrociti duž same povrede formiraju nešto duže protoplazmatične nastavke koji pokazuju intenzivniju imunoreaktivnost na GFAP, dok je imunoreaktivnost eN/CD73 distribuirana po čitavoj površini astrocita u okviru diskretnih tačkastih signala.



Slika 16. Ekspresija eN/CD73 u intaktnoj kulturi astrocita i u kulturama sa povredom (SW), 24 h nakon povrede **(A)** Nivo iRNC koja kodira eN/CD73, utvrđena primjenom rtPCR. Stubići predstavljaju relativnu količinu iRNC-eN/CD73 iskazanu u odnosu na količinu iRNC-GAPDH, koja je korišćena kao interna kontrola \pm SE, u uzorcima intaktne (crni stubići) i SW kulture (bijeli stubići). **(B)** Reprerentativni imunoblot dobijen inkubacijom uzoraka intaktne i tretirane kulture sa anti-eN/CD73 antitijelima (gornji blot) i anti-GAPDH antitijelima (donji blot). Lijeva kolona prikazuje položaj markera molekularskih težina. **(C)** Kvantifikacija rezultata imunoblota. Stubići predstavljaju nivo ekspresije eN/CD73 u intaktnim (crni stubić) i tretiranim (bijeli stubić) kulturama, iskazane relativno u odnosu na ekspresiju GAPDH, \pm SE iz $n = 3$ nezavisnih eksperimenata. **(D)** Reprerentativne konfokalne mikrografije dvojnog eN/CD73 (crveni signal) i GFAP (zeleni signal) imunofluorescentnog bojenja. Jedra su obojena DAPI bojom (plavi signal). Skala = 25 μ m. **(E)** 5'-AMP fosfohidrolazna aktivnost u intaktnim kulturama (crni stubić) i SW kulturama (bijeli stubić), kao i u prisustvu 100 μ M levamizola (prugasti stubići). Stubići predstavljaju srednje vrijednosti specifične aktivnosti (nmol Pi/mg/min) \pm SE, iz $n = 3$ nezavisne kulture astrocita testirane u triplikatu. Statistička značajnost $*p < 0.05$ u odnosu na intaktnu kulturu.

Određen je i nivo 5'-AMP fosfohidrolazne aktivnosti koja potiče od eN/CD73. U SW kulturama 24 h nakon povrede, detektivano je značajno povećanje specifične aktivnosti eN/CD73 (1.13 ± 0.18 nmol Pi/mg/min, $p < 0.05$) u odnosu na aktivnost intaktnih astrocita (0.78 ± 0.11 nmol Pi/mg/min). Pošto se metoda određivanja aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze zasniva na hidrolizi AMP, intaktna i SW kultura su dodatno tretirane levamizolom, specifičnim inhibitorom aktivnosti alkalne fosfataze koja takođe hidrolizuje AMP, na optimalnom baznom pH. S obzirom na to da tretman levamizolom nije doveo do promjena 5'-AMP hidrolazne aktivnosti ni u intaktnim ni u tretiranom kulturama, zaključili smo da cjelokupna produkcija slobodnih fosfata potiče od eN/CD73 (Slika 16E).

3.2. Ekspresija adenozijskih receptora u modelu povrede astrocita u kulturi nakon farmakološke inhibicije eN/CD73

Proizvod enzimske aktivnosti eN/CD73 je adenzin, koji je ligand P1 adenozijskih receptora. Stoga je dalje okarakterisana ekspresija P1 receptora, na nivou transkripta u kulturama kortikalnih astrocita u modelu povrede ili nakon farmakološke inhibicije eN/CD73, kao i u prisustvu vanćelijski dodatog adenzina. Rezultati dobijeni na uzorcima prikupljenim 4 h nakon povrede i/ili tretmana prikazani su u Tabeli 7. Primjenjene su dvije strategije blokade eN/CD73: inhibicijom kompetitivnim inhibitorom APCP-om i tretman ćelija anti-eN/CD73 antitijelima. Tretman ćelija anti-CD73 antitijelima četiri puta povećava ekspresiju A_{2A} i osam puta povećava ekspresiju A_{2B} receptora, ali i smanjuje ekspresiju A_3 receptora na gotovo 20% u odnosu na SW ($p < 0.05$). U prisustvu APCP, astrociti upola smanjuju ekspresiju A_1 receptora, a ovaj efekat se antagonizuje ukoliko se inhibicija APCP-om odvija u prisustvu adenzina, mada adenzin samostalno izaziva samo smanjenje ekspresije A_{2A} receptora.

Tabela 7. Ekspresija adenozijskih receptora

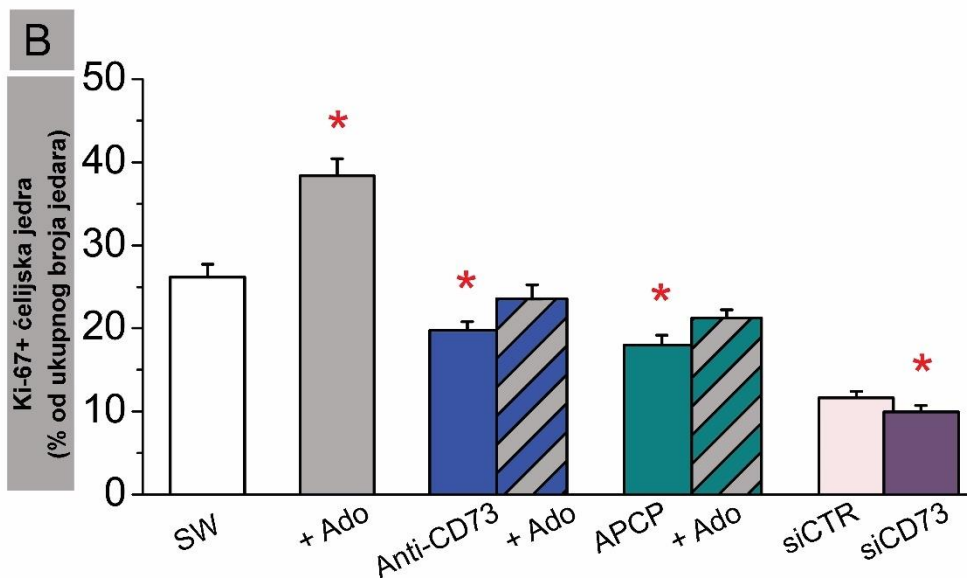
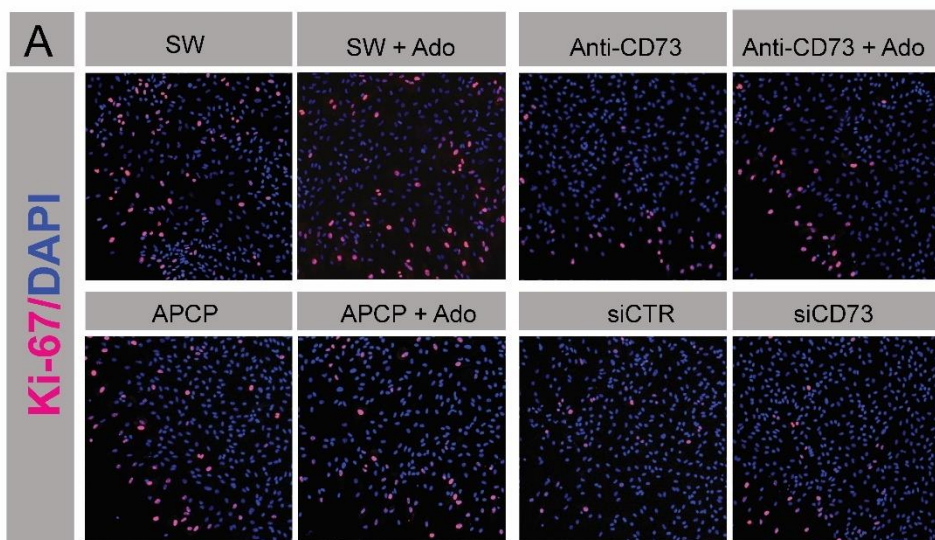
Gen od interesa	Gen od interesa /GAPDH-iRNK (%. normalizovano u odnosu na SW)					
	SW	+ Ado	Anti-CD73	Anti-CD73 + Ado	APCP	APCP + Ado
A ₁ R	100.0 ± 7.6	90.7 ± 11.8	117.7 ± 19.4	87.6 ± 10.6	52.4 ± 19.7*	151.3 ± 10.1 [#]
A _{2A} R	100.0 ± 10.3	50.7 ± 31.6*	389.3 ± 20.3*	286.8 ± 12.8*	90.2 ± 9.1	96.4 ± 20.0
A _{2B} R	100.0 ± 8.5	147.1 ± 18.8	804.3 ± 44.4*	674.9 ± 65.5*	112.8 ± 27.4	139.2 ± 19.2
A ₃ R	100.0 ± 30.8	77.6 ± 36.5	21.1 ± 10.1	117.0 ± 28.4	111.2 ± 43.4	222.2 ± 67.7

Ekspresija je iskazana relativno u odnosu GAPDH-iRNK u SW kulturi i kulturama tretiranim adenozinom (Ado), antitijelima na eN/CD73 i APCP-om, 4 h nakon povrede i tretmana. Rezultati su srednje vrijednosti relativne zastupljenosti ± SE, iskazani relativno u odnosu na SW, i dobijeni iz $n = 2$ nezavisne kulture astrocita, dva puta testirane u duplikatu. Statistička značajnost * $p < 0.05$ u odnosu na SW kontrolne astrocite.

4. Uloga eN/CD73 u uspoljavanju reaktivnog fenotipa astrocita u kulturi

4.1. Uticaj na proliferaciju astrocita

Kulture su tretirane APCP-om, anti-eN/CD73 antitijelima ili su transfektovane siRNK koja je specifična za eN/CD73-iRNK. Stopa proliferacije je određena dvojnim Ki67/DAPI fluorescentnim bojenjem, 24 h nakon formiranja povrede i dodavanja tretmana (Slika 17A). Proliferacija astrocita u intaktnim kulturama je oko 2%, a povećava se i do deset puta u SW kulturi ($26.2 \pm 1.5\%$, $p < 0.01$) (Slika 17B). U prisustvu anti-CD73 antitijela stopa proliferacije se smanjuje ($19.8 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$), kao i nakon inhibicije APCP-om ($18.0 \pm 1.2\%$, $p < 0.001$). Značajno niža proliferacija zabilježena je u siCD73 transfektovanim kulturama ($9.9 \pm 0.8\%$, $p < 0.001$) u odnosu na SW kulture, mada razlika nije uočena u odnosu na kontrolne siCTR transfekcije. Zaključili smo da inhibicija eN/CD73, kao i smanjenje prisustva eN/CD73 na površini membrane utiče na smanjenje proliferacije astrocita nakon SW.



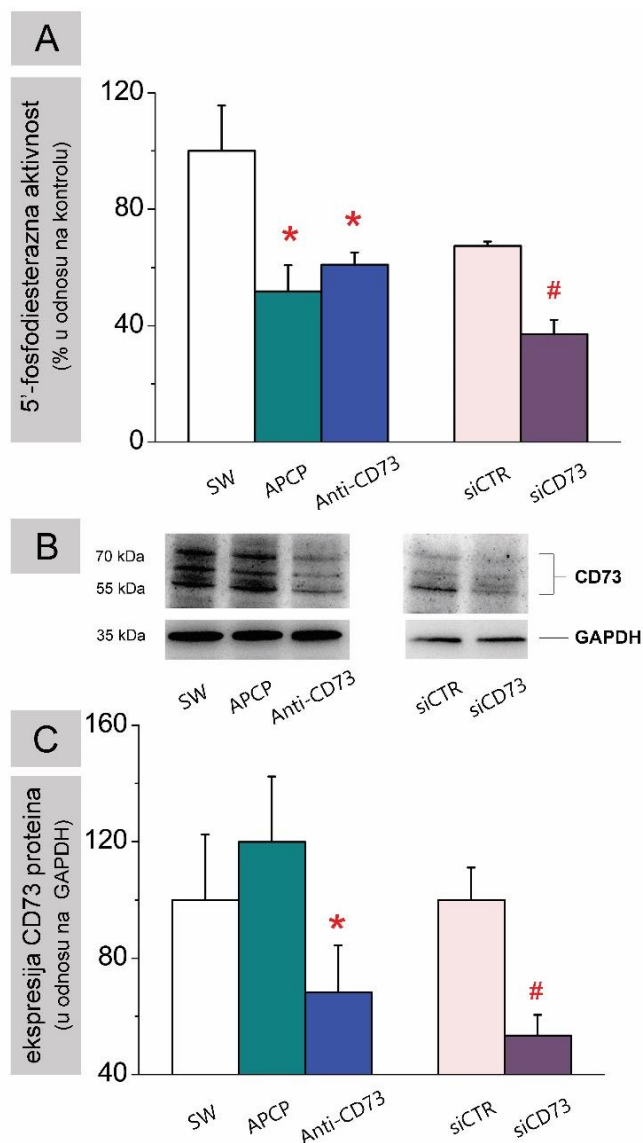
Slika 17. Uticaj blokade eN/CD73 na proliferaciju astrocita. Kulture su tretirane APCP-om, anti-eN/CD73 antitelima ili su transfektovane siRNK-CD73. Proliferacija je određena dvojnim Ki67 (narandžasti signal) i DAPI (plavi signal) bojenjem, a preklapanje signala (roze signal) označava ćeliju u mitozu. Stopa proliferacije je određena kao odnos broja Ki67⁺/DAPI⁺ ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u kulturi (DAPI⁺). (A) Reprezentativne mikrografije Ki67/DAPI bojenja, 24 h nakon pravljenja povrede i apliciranja tretmana. (B) Stopa proliferacije iskazana kao srednja vrijednost broja Ki67⁺/DAPI⁺ ćelija u odnosu na DAPI⁺ ćelije ± SE, dobijena analizom 5-10 nasumično odabranih kadrova iz $n = 2$ nezavisne kulture astrocita testirane u duplikatu. Statistička značajnost $*p < 0.05$ u odnosu na SW kontrolnu kulturu.

4.2. Uticaj farmakološke i genetičke blokade eN/CD73 na aktivnost i ekspresiju eN/CD73 u modelu povrede astrocita u kulturi

U ovom setu eksperimenata određena je aktivnost eN/CD73 u kulturama u kojima je eN/CD73 blokirana primenom APCP, anti-eN/CD73 antitela ili siRNK (Slika 18A). Tretman APCP-om (0.58 ± 0.11 nmol Pi/mg./min, $p < 0.05$) i anti-CD73 antitijelima (0.69 ± 0.05 nmol Pi/mg/min, $p < 0.001$) značajno smanjuje aktivnost u odnosu na SW (0.13 ± 0.18 nmol Pi/mg/min). Kao što je očekivano, kulture astrocita koje su podvrgute procesu transfekcije sa siCD73 pokazale su smanjenu aktivnost ovog enzima (0.42 ± 0.04 nmol Pi/mg/min, $p < 0.001$) u odnosu na kontrolnom transfekcijom siCTR (0.76 ± 0.02 nmol Pi/mg/min). Aktivnost eN/CD73 je analizirana 24 h nakon povrede i tretmana.

Dalje smo ispitali ekspresiju eN/CD73 na nivou proteina, 24 h nakon povrede i tretmana pomoću imunoblot analize (Slika 18B,C). Tretman anti-CD73 i siCD73 smanjuje proteinsku ekspresiju eN/CD73 (Slika 18B), u odnosu na odgovarajuće kontrole (SW i siCTR). Inhibicija APCP-om ne mjenja ekspresiju eN/CD73 u odnosu na SW kulturu.

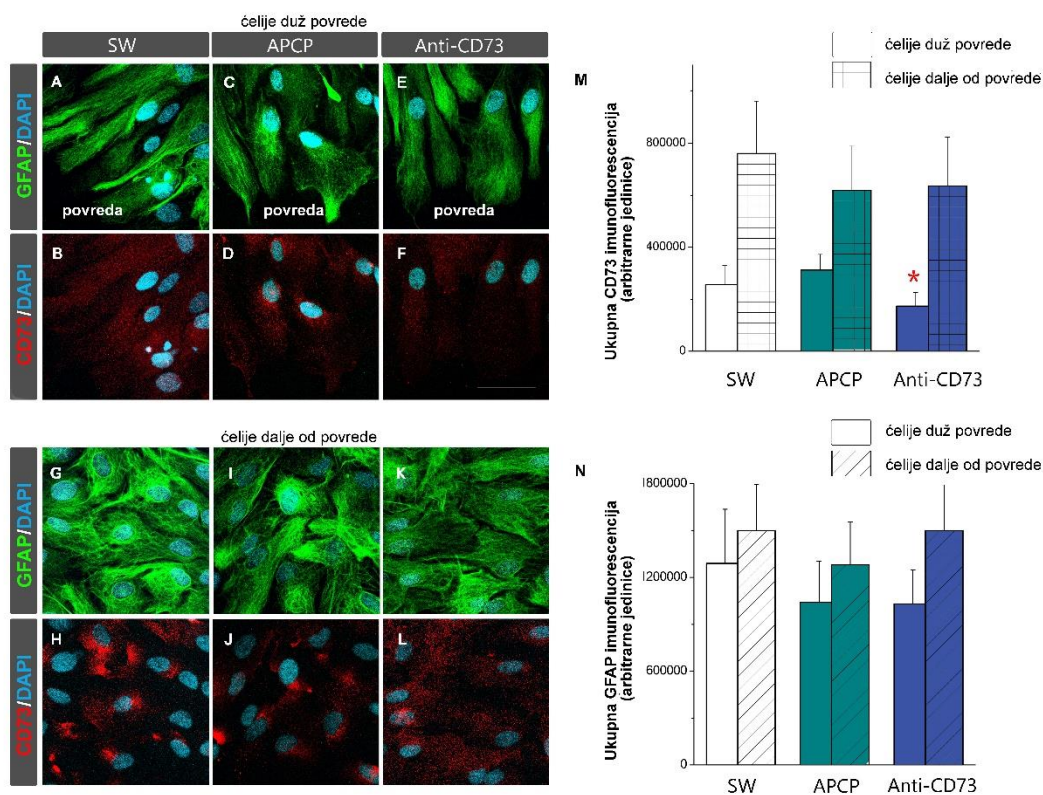
Ovakvi rezultati ukazali su da je prethodno uočeno smanjenje aktivnosti eN/CD73 nakon tretmana anti-CD73 antitijelom vjerovatno posledica smanjenog prisustva ovog enzima prisutnog na površini ćelija, dok je u slučaju APCP, smanjenje aktivnosti eN/CD73 izazvano isključivo katalitičkom inhibicijom ovog enzima.



Slika 18. Ekspresija eN/CD73 na astrocitima u prisustvu različitih blokada eN/CD73. **(A)** 5'-AMP fosfodiesterazna aktivnost, 24 h nakon tretmana APCP (zeleni stubić), anti-CD73 antitijelima (plavi stubić) i na transfekovanim siCD73 (ljubičasti stubić) i siCTR (roze stubić) kulturama. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti specifične aktivnosti \pm SE, normalizovani u odnosu na SW (100%), iz $n = 7$ nezavisnih kultura astrocita testiranih u sekstuplikatu. Statistička značajnost $*p < 0.01$ u odnosu na aktivnost SW kulture; $^{\#} p < 0.05$ u odnosu na siCTR. **(B)** Reprerativni imunoblot na eN/CD73 ekspresiju u lizatima kultura tretiranih farmakološkim blokatorima eN/CD73. Obilježen je položaj molekularskih markera. Inkubacija sa antitelima na GAPDH poslužila je kao interna kontrola. **(C)** Kvantifikacija proteinske ekspresija eN/CD73. Ekspresija eN/CD73 iskazana je relativno u odnosu na GAPDH. Rezultati predstavljaj srednju vrijednost odnosa optičkih gustina eN/CD73/GAPDH \pm SE normalizovano u odnosu na SW kontrolnu ekspresiju. Analizirani su uzorci iz $n = 3$ nezavisne kulture astrocita. Statistička značajnost. $*p < 0,05$ u odnosu na SW kulturu; $^{\#} p < 0.05$ u odnosu na siCTR transfekovanu kulturu.

4.3. Uticaj imunološke blokade eN/CD73 na distribuciju i lokalizaciju eN/CD73 na astrocitima u modelu povrede

Iz prethodnih rezultata je jasno da postoji različit uticaj anti-CD73 antitijela i APCP na proteinsku ekspresiju eN/CD73, zbog čega smo pomoću dvojnog CD73/GFAP imunofluorescentnog bojenja ispitali distribuciju ovog enzima na površini astrocita (Slika 19A-L).



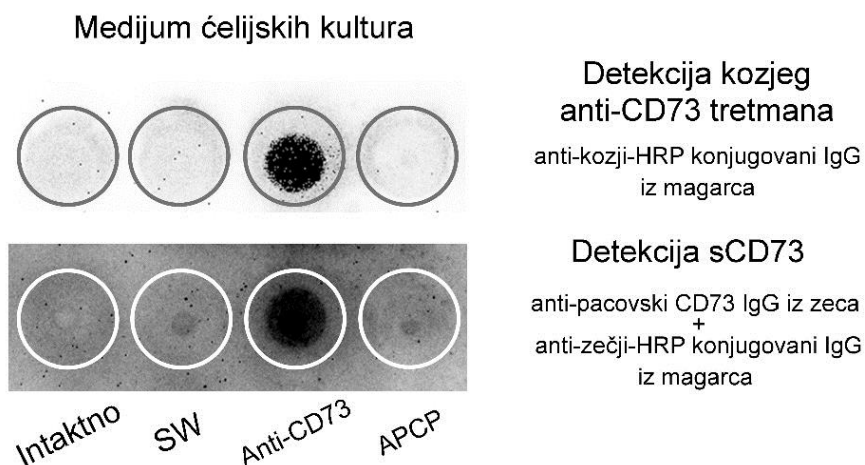
Slika 19. Distribucija eN/CD73 na membrani astrocita. Reprezentativne konfokalne mikrografije astrocita obilježih imunofluorescentnim bojenjem na CD73 (crveni signal) i GFAP (zeleni signal), uz obilježavanje jedara DAPI bojom (plavo). Mikrografije prikazuju astrocite u kulturama sa povredom (SW) i tretirane dodatno anti-CD73 antitijelima i APCP, u pozicijama duž povrede (A-F) i 1-3 reda ćelija udaljeno od povrede (G-L) 24 h nakon povrede i tretmana. Skala = 50 μ m (F). Ukupni intenzitet fluorescencije (korigovan u odnosu na pozadinski šum) na eN/CD73 (M) i GFAP (N) predstavljen je kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije \pm SE greška, određena na 15 kadrova iz $n = 2$ nezavisne kulture astrocita. Statistička značajnost $*p < 0.05$ u odnosu na SW kulturu.

Pošto su uočene razlike u pogledu morfologije astrocita zavisno od položaja u odnosu na liniju povrede, kvantifikacija ukupnog intenziteta imunofluorescencije je shodno tome obuhvatila ćelije koje su se nalazile direktno uz povredu nasuprot ćelija koje su se nalazile 1-3 reda ćelija udaljeno od povrede (Slika 19M,N). Ćelije koje se nalaze direktno uz povredu su razvile protopolazmatske nastavke usmjerene ka slobodnom prostoru povrede, nezavisno od apliciranog tretmana (Slika 19A,C,E). Ovi nastavci su se intenzivnije bojili na GFAP, dok je imunoreaktivnost na eN/CD73 pokazivala finu tačkastu i ravnomjernu distribuciju po površini ćelija (Slika 19B,D,F). Kvantifikacija intenziteta fluorescencije eN/CD73 pokazala je razlike u zavisnosti od tretmana. Značajno niža vrijednost je dobijena u SW kulturama tretiranim anti-CD73 antitijelom ($66.2 \pm 22.8\%$, $p < 0.01$), ne samo u odnosu na SW culture, već i na SW kulture tretirane APCP-om ($130.3 \pm 27.1\%$, $p = 0.58$) (Slika 19M). Drugačija situacija je zabilježena na astrocitima koje su udaljeni 1-3 reda ćelija od povrede (Slika 19G-L). Nezavisno od tretmana, ćelije su gusto pakovane u monosloju sa jasnom GFAP imunoreaktivnošću. U SW kulturama i APCP tretiranim SW kulturama, uočena je grupisanost fluorescentnog eN/CD73 signala u nekoliko fokalnih tačaka na površini astrocita (Slika 19D,E), dok je na astrocitima tretiranim anti-eN/CD73 antitijelima, eN/CD73 signal bio ujednačeno rasprostranjen (Slika 19F), iako nije uočena značajna promjena ukupnog intenziteta fluorescencije između grupa. Takođe, nije zabilježena značajna reorganizacija GFAP filamenata ili ukupne ekspresije GFAP proteina (Slika 19N), ni u jednoj od posmatranih grupa astrocita.

4.4. Uticaj imunološke blokade eN/CD73 antitijela na isecanje eN/CD73 i oslobađanje solubilne forme u medijum

Isjecanje ektodomena proteina je čest mehanizam regulacije ektoproteina, a ovaj fenomen može objasniti rezultate eksperimenata koji pokazuju smanjenje eN/CD73 na membrani astrocita u kulturi nakon tretmana anti-CD73 antitijelima. Stoga smo analizirali medijume kultura astrocita prikupljene 24 h nakon različitih primjenjenih tretmana. Medijumi su analizirani na prisustvo eN/CD73, ali i na prisustvo anti-CD73 antitijela kako bismo potvrdili uzročno-posledičnu vezu u okviru ovog tretmana (Slika 20). Tačkastom

imunoblot (dot blot) metodom smo pokazali pozitivnu reakciju medijuma na prisustvo eN/CD73 proteina samo u medijumima tretiranim anti-CD73 antitijelima. U istim medijumima je potvrđeno prisustvo antitijela, takođe. Ovakav rezultat sugerise da dolazi do solubilizacije eN/CD73 nakon vezivanja specifičnog antitijela za njega.

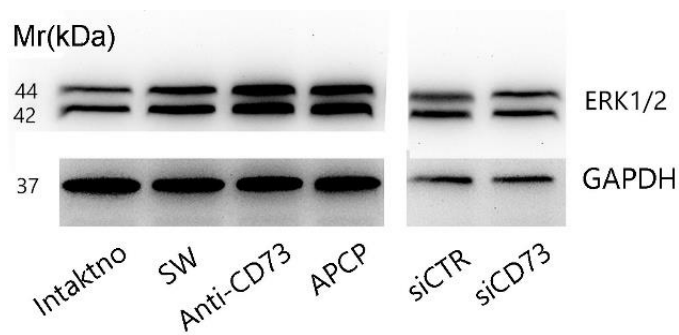


Slika 20. Detekcija solubilnog molekula eN/CD73 u medijumu ćelijskih kultura tretiranih različitim farmakološkim tretmanima. Medijumi ćelijskih kultura, intaktne, SW, SW tretirane anti-eN/CD73 antitelima i APCP-om, prikupljeni 24 h nakon povrede i tretmana, analizirani su tačkastim imunoblotom. S obzirom na to da je jedan od tretmana astrocita bio tretman antitijela na eN/CD73 (kozje anti-eN/CD73 antitijelo), onda je prisustvo ovih antitijela u medijumu detektovano primjenom sekundarnih anti-kozjih IgG antitela (gornji red). Ova analiza pokazala je prisustvo bojenog proizvoda samo u bunariću sa uzorkom medijuma ćelija tretiranih anti-eN/CD73 antitijelima. U donjem redu, medijumi kultura su inkubirani tako da se detektuje solubilni eN/CD73, kombinacijom zečjeg primarnog antitijela na pacovski eN/CD73 i magarećeg sekundarnog antitijela na zečje IgG antitijela. Analizirani su medijumi iz $n = 4$ nezavisne ćelijske kulture, testirani u duplikatu.

4.5. Uticaj blokade eN/CD73 na ERK1/2 signalizaciju

S obzirom na to da eN/CD73 ima ulogu ćelijskog adhezivnog molekula i receptora za komponente vanćelijskog matriksa, odlučili smo da ispitamo da li primjenjene blokade eN/CD73 pokreću ERK1/2 signalni put. Ekspresiju ukupne forme ERK1/2 analizirali smo imunoblot metodom (Slika 21). Blokada anti-CD73 antitijelima i inhibicija APCP-om povećava ekspresiju obje forme ERK, dok nivo ekspresije ERK1/2 u transfekovanim

kulturama ostaje nepromjenjen. Rezultati ukazuju na to da eN/CD73 djeluje kao membranski receptor sa vaćelijske signale posredovane komponentama vanćelijskog matriksa.



Slika 21. Reprezentativni imunoblot ekspresije ERK1/2 i GAPDH (interna kontrola) u ukupnim ćelijskim lizatima izolovanim iz netretirane kulture (SW) i kultura tretiranih anti-eN/CD73 antitelima, APCP-om ili transfektovane siRNK. Uzorci su prikupljeni 24 h nakon tretmana i povrede.

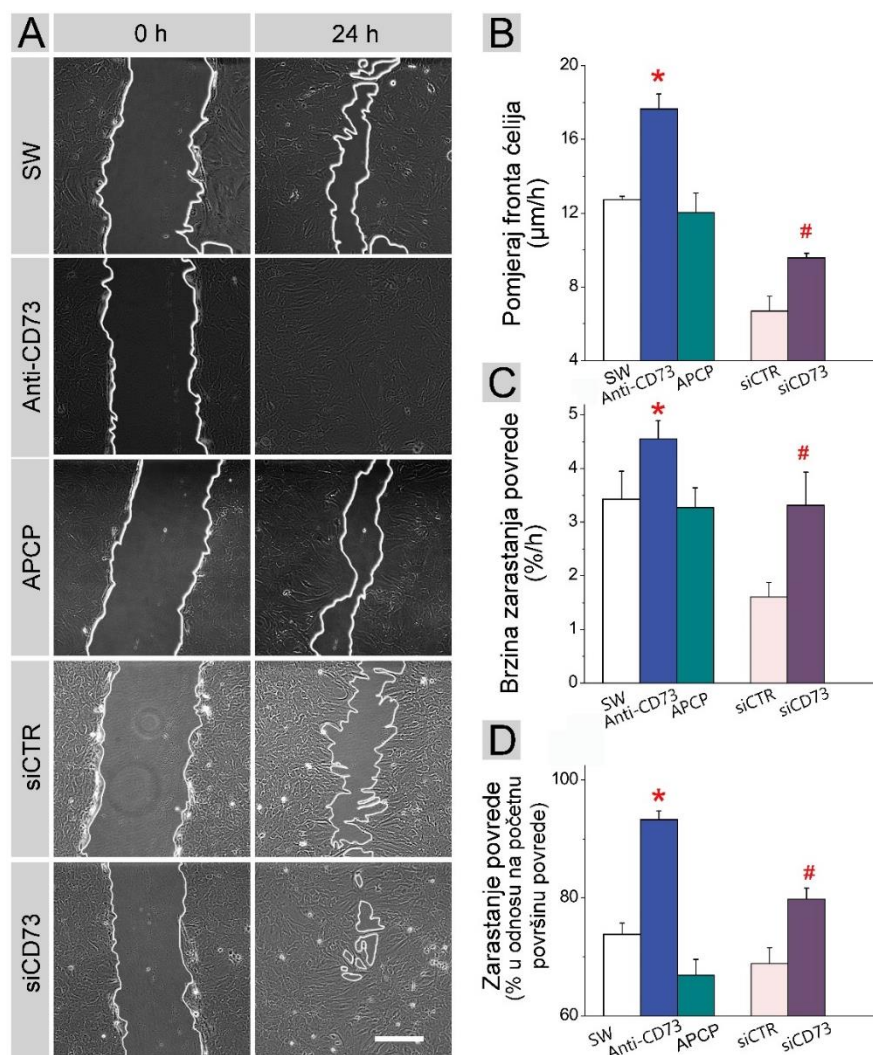
5. Uloga eN/CD73 u migraciji astrocita

5.1. Uloga eN/CD73 proteina na membrani astrocita u migraciji

Model povrede koji smo koristili da okarakterišemo pokretljivost astrocita u kulturi je opisan u poglavlju 15 (Materijal i metode). Da bi smo utvrdili kakvu ulogu igra eN/CD73 u migraciji astrocita, ćelijskim kulturama su odmah nakon formiranja povrede u monosloju astrocita su dodati tretmani: anti-CD73 antitijela, APCP, siRNK-CD73 uz adekvatnu kontrolnu grupu transfekcije (siCTR). Reprezentativne mikrografije, kao i grafici parametara zarastanja povrede mogu se vidjeti na Slici 21, dok se u Tabeli 8 nalaze i podaci koji osim osnovnih eksperimenata obuhvataju i kvantifikaciju eksperimenata koji su podrazumijevali dodavanje adenozina, AMP ili ATP na osnovni tretman.

Tretman SW kultura anti-CD73 antitijelima je doveo do ubrzanja zarastanja povrede (Slika 22A,B) i većeg pomjeraja ćelijskog fronta (Slika 22C), što rezultuje potpunim zarastanjem povrede nakon 24 h (Slika 22A-D). APCP tretman, sa druge strane, je značajno uticao na brzinu zarastanja povrede. U siCD73 transfekovanim kulturama astrocita brzina zarastanja i procenat pokrivenosti površine bili su veći od istih parametara

u kontrolnim siCTR kulturama. Ovdje treba naglasiti da je transfekcijom postignuto ~50% utišavanje translacije iRNK-CD73 u zreli protein u 48. satu kada je formirana povreda u kulturama, što znači da je u tom trenutku postojala određena količina funkcionalnih eN/CD73 molekula na astrocitima.



Slika 22. Uticaj farmakološke blokade eN/CD73 na kinetiku zarastanja povrede u monosloju kulture astrocita. (A) Reprezentativne mikrografije snimljene u svjetlosnom polju 0 h i 24 h nakon povrede i tretmana. Bijelom linijom su istaknute ivice povrede radi lakšeg uočavanja. Skala =100 μ m. (B-D): Parametri kinetike zarastanja povrede: Kretanje fronta ćelija (B), brzina zarastanja povrede (C) i Stepen pokrivenosti povrede (D). Stubići predstavljaju srednje vrijednosti izračunatih parametara \pm SE, iz $n > 7$ nezavisnih ćelijskih kultura i 3 transfekovane kulture, u duplikatu tretmana. Statistička značajnost: * $p < 0.05$ u odnosu na SW; # $p < 0.001$ u odnosu na siCTR.

Ovi rezultati ukazuju da smanjena ekspozicija molekula eN/CD73, bilo da je postignuta genetičkim utišavanjem ili maskiranjem/solubilizacijom molekula eN/CD73 koji su već prisutni na površini astrocita, dovodi do povećanja migratornih sposobnosti, što se reflektuje kroz brže zarastanje povrede. Efekat bržeg zarastanja nakon tretmana antitijelima sigurno nije uslovljen proliferacijom astrocita, s obzirom na to da je pokazano u prethodnom eksperimentu da takav tretman, štaviše, dovodi do smanjenja proliferacije (Slika 17).

5.2. Uticaj vanćelijskog adenzina na pokretljivost astrocita

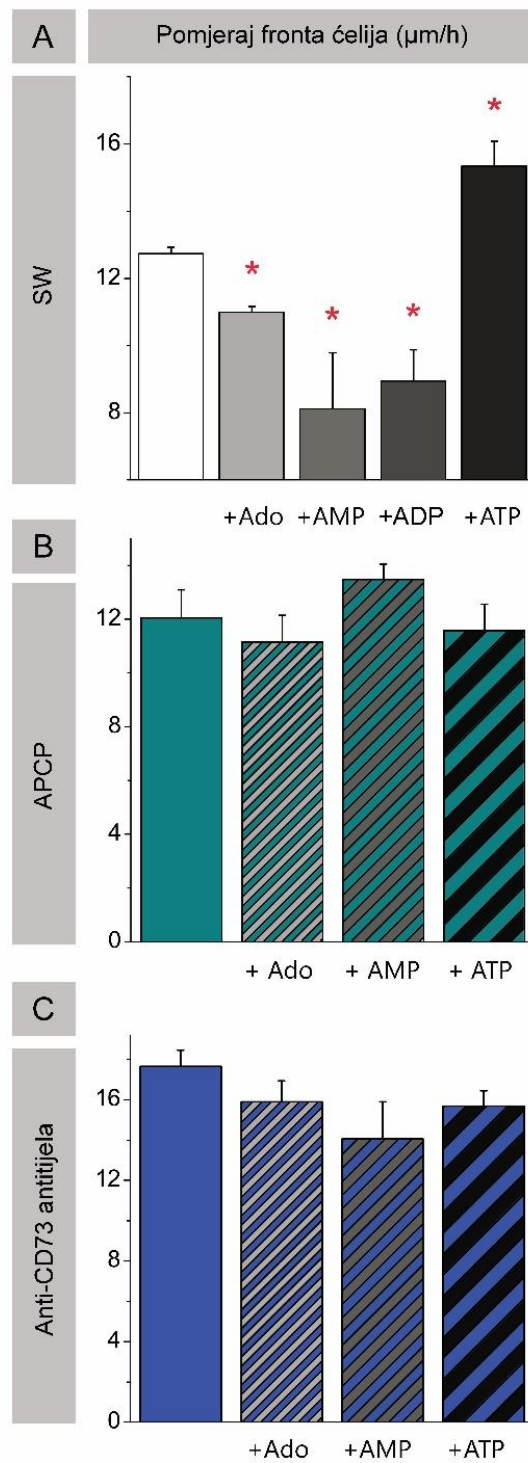
S obzirom na to da primjenjene farmakološke blokade, u manjoj ili većoj mjeri, prekidaju katalitičku aktivnost eN/CD73 i time smanjuju produkciju adenzina, željeli smo da provjerimo da li se uočeni efekti na migraciju ćelija mogu pripisati sniženju nivoa adenzina u vanćelijskom prostoru. Pošto su prethodni rezultati pokazali da APCP ne uslovljava potpunu inhibiciju eN/CD73, izveli smo dodatne eksperimente u kojima su SW kulture tretirane adenzinom, samostalno ili zajedno sa nukleotidima AMP, ADP i ATP, koji, nakon kaskadne aktivnosti ektonukleotidaza mogu biti prevedeni u adenzin. Uticaj purinskih molekula na migraciju je procjenjen u slučaju kada su oni dodati SW kulturama kao pojedinačni tretmani (Slika 23A) ili kao kotretmani uz inhibitore eN/CD73 (Slika 23B,C). U prisustvu adenzina, AMP i ADP kinetika zarastanja se značajno usporava u odnosu na kontrolnu SW kulturu, dok ATP dovodi do statistički značajnog povećanja pomjeranja fronta (Slika 23A, Tabela 8). Međutim, kada se uz ove tretmane apliciraju bilo APCP (Slika 23B) ili anti-CD73 antitijela (Slika 23C), izostaju pojedinačni uočeni efekti nukleotida.

Dobijeni rezultati ukazuju da dodavanje vanćelijskog adenzina ne može da se suprotstavi povećanju migratornog kapaciteta astrocita kod kojih je eN/CD73 farmakološki blokirana. Takvi nalazi snažno ukazuju da se uočeni efekti blokade eN/CD73 ne mogu pripisati katalitičkom delovanju eN/CD73 i nedostatku adenzina, već pre interakciji eN/CD73 sa podlogom.

Tabela 8. Parametri zarastanja povrede u kulturi astrocita nakon farmakološke blokade eN/CD73 u prisustvu ili odsustvu purinskih molekula

	V_{max} (% pokrivena površina povrede/ h)	Nagib linearne faze (% pokrivena površina povrede / h)	Brzina pomjeranja fronta ćelija ($\mu\text{m/h}$)
Kontrola	3.43 ± 0.52	3.11 ± 0.19	12.73 ± 0.77
Anti-CD73 At.	$4.56 \pm 0.35^*$	$4.31 \pm 0.20^*$	$17.66 \pm 0.80^*$
Anti-CD73 At. + Ado	4.44 ± 0.48	3.88 ± 0.26	15.89 ± 0.04
Anti-CD73 At. + AMP	4.04 ± 0.40	3.73 ± 0.45	14.05 ± 0.84
Anti-CD73 At. + ATP	3.96 ± 0.28	$3.83 \pm 0.18^*$	$15.69 \pm 0.75^*$
APCP	3.27 ± 0.37	2.94 ± 0.26	12.04 ± 1.06
APCP + Ado	3.34 ± 0.28	2.72 ± 0.25	11.40 ± 1.01
APCP + AMP	3.71 ± 0.14	3.29 ± 0.14	13.48 ± 0.57
APCP + ATP	3.82 ± 0.61	2.58 ± 0.24	11.57 ± 0.98
Ado	$2.92 \pm 0.21^*$	$2.68 \pm 0.17^*$	$10.99 \pm 0.68^*$
AMP	2.25 ± 0.08	$1.98 \pm 0.41^*$	$8.11 \pm 1.68^*$
ADP	$1.99 \pm 0.41^*$	$2.18 \pm 0.23^*$	$8.93 \pm 0.94^*$
ATP	3.14 ± 0.25	$3.74 \pm 0.18^*$	$15.33 \pm 0.76^*$
siCTR	1.61 ± 0.27	1.63 ± 0.20	6.68 ± 0.82
siCD73	$3.31 \pm 0.62^*$	$2.34 \pm 0.06^*$	$9.58 \pm 0.24^*$

Rezultati su srednje vrijednosti izračunatih parametara \pm SE, iz $n > 7$ nezavisnih ćelijskih kultura, u duplikatu tretmana. Statistička značajnost: $p < 0.05$ u odnosu na SW kontrolu.



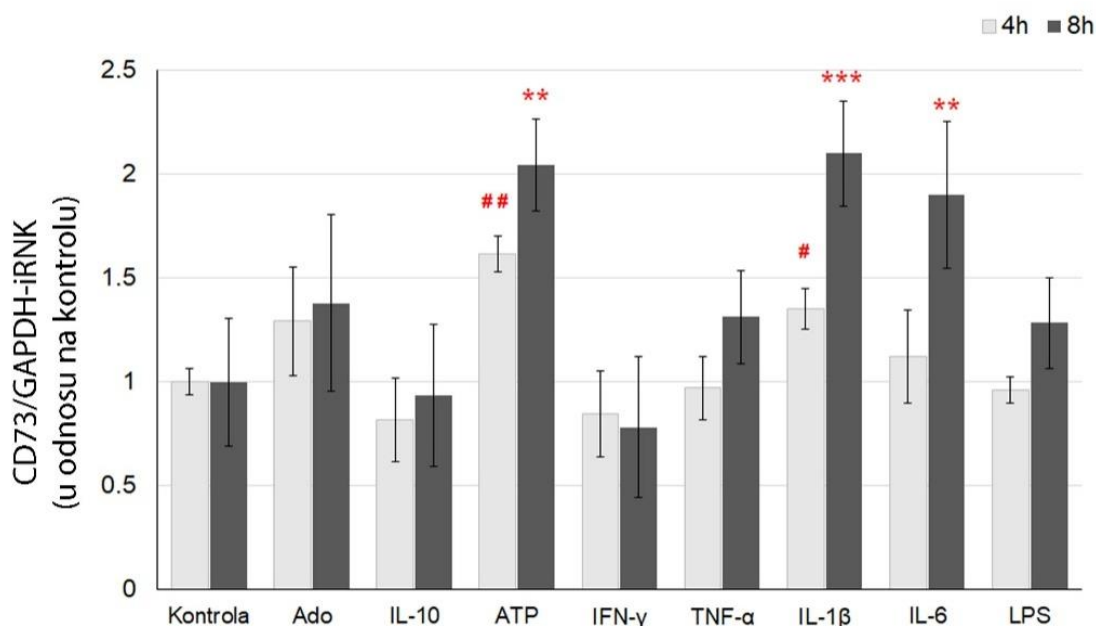
Slika 23. Uticaj purinskih nukleotida i adenzina na migraciju astrocita u (A) kontrolnoj SW kulturi, (B) u prisustvu APCP i u prisustvu (C) anti-CD73 antitijela. Stubići predstavljaju srednje vrijednosti brzine pomjeranja fronta ($\mu\text{m}/\text{h}$) \pm SE. iz $n > 7$ nezavisnih kultura astrocita, u duplikatu. Statistička značajnost: $*p < 0.05$ u odnosu na SW kontrolnu kulturu.

6. Uloga inflamatornih medijatora u regulaciji ekspresije eN/CD73 u kulturi primarnih astrocita

Indukcija *NT5E*, i konsekvantno povećanje aktivnosti eN/CD73, jedno su od tipičnih odlika aktiviranih astrocita u brojnim modelima neuroloških bolesti *in vivo*, uključujući mehaničku traumu, ishemiju, autoimunske i neurodegenerativne bolesti. Rezultati dobijeni u okviru ove teze pokazuju da je aktivacija astrocita nakon povrede monosloja praćena snažnim povećanjem ekspresije eN/CD73. Efikasnoj migraciji astrocita, što je odlika aktiviranih astrocita, pogoduje smanjenje prisustva eN/CD73 molekula na površini ćelije. Imajući u vidu da je inflamatorni fenotip astrocita pod kontrolom većeg broja citokina i faktora inflamacije, u narednom setu eksperimenata htjeli smo da utvrdimo kako pojedinačni citokini, ili njihovi kombinovani tretmani utiču na ekspresiju eN/CD73. Kulture primarnih astrocita tretirane su infalamotrnim faktorima čije su koncentracije u tabeli tretmana Materijalima i metodama (Tabela 3).

6.1. Uticaj na gensku ekspresiju

Kulture su tretirane navedenim faktorima 4 h i 8 h, a nivo ekspresije iRNK za eN/CD73 analiziran je iz ukupne iRNK (Slika 24). Adenozin, IL-10, IFN- γ , TNF- α i LPS nisu izazvali značajne promjene ekspresije, ni u jednoj od vremenskih tačaka. Povećanje ekspresije eN/CD73-iRNK nakon 4 h detektovano je u tretmanu ATP-om i IL-1 β , a nakon 8 h, osim ova dva faktora i IL-6 je ispoljio induktivni efekat.

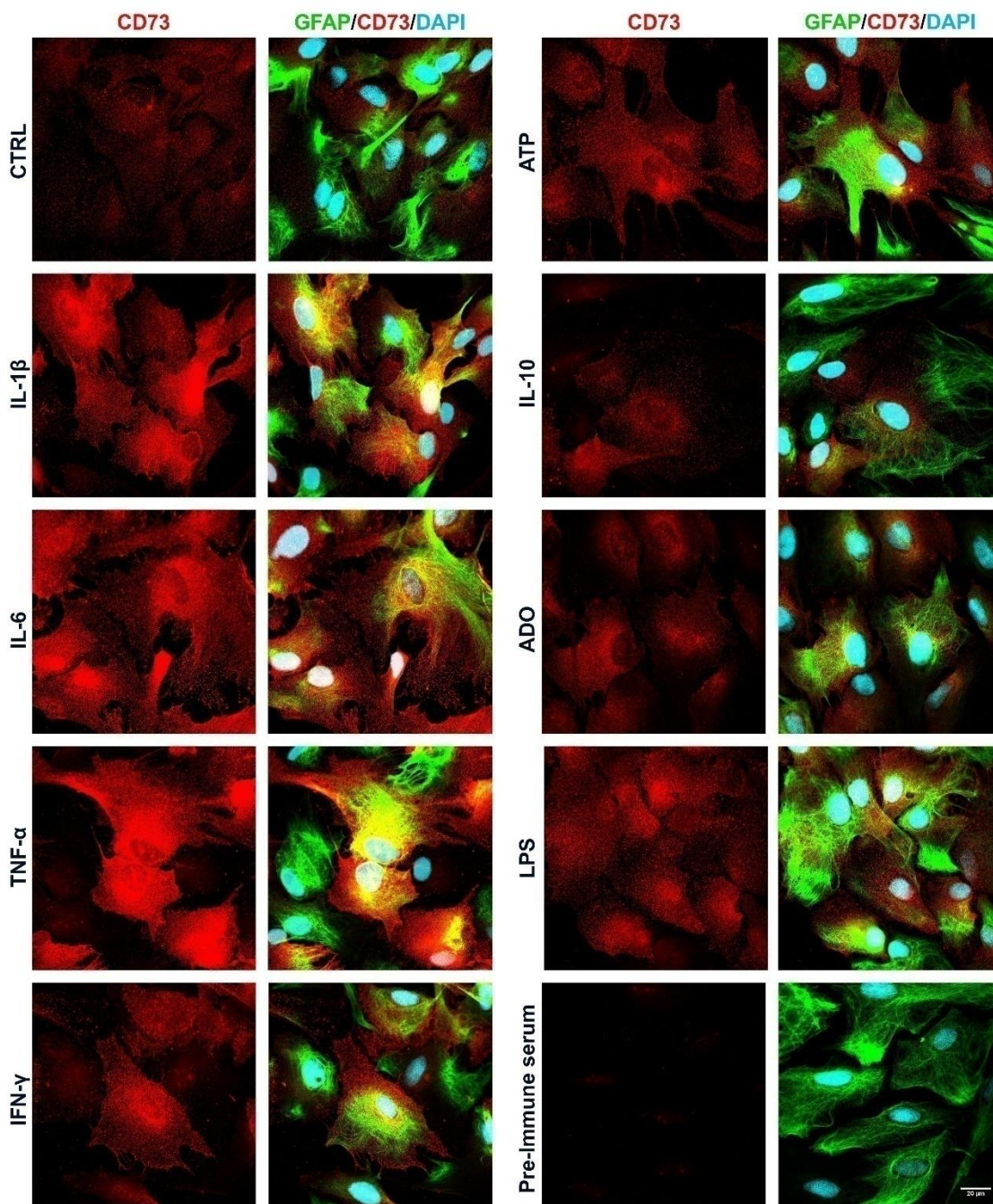


Slika 24. Ekspresija eN/CD73-iRNK u astrocitima tretiranim inflamatornim medijatorima, 4 i 8 h nakon početka tretmana. Ekspresija eN/CD73-iRNK iskazana je relativno u odnosu na GAPDH-iRNK, a rezultati ovog odnosa su normalizovani u odnosu na vrijednost kontrole (100%). Stubići predstavljaju srednje vrijednosti ekspresije \pm SE, iz $n = 2$ nezavisna eksperimenta, analizirana dva puta u duplikatu. Statistička značajnost: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na 4 h kontrolu; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ u odnosu na 8 h kontrolu.

6.2. Uticaj na membransku ekspresiju i lokalizaciju

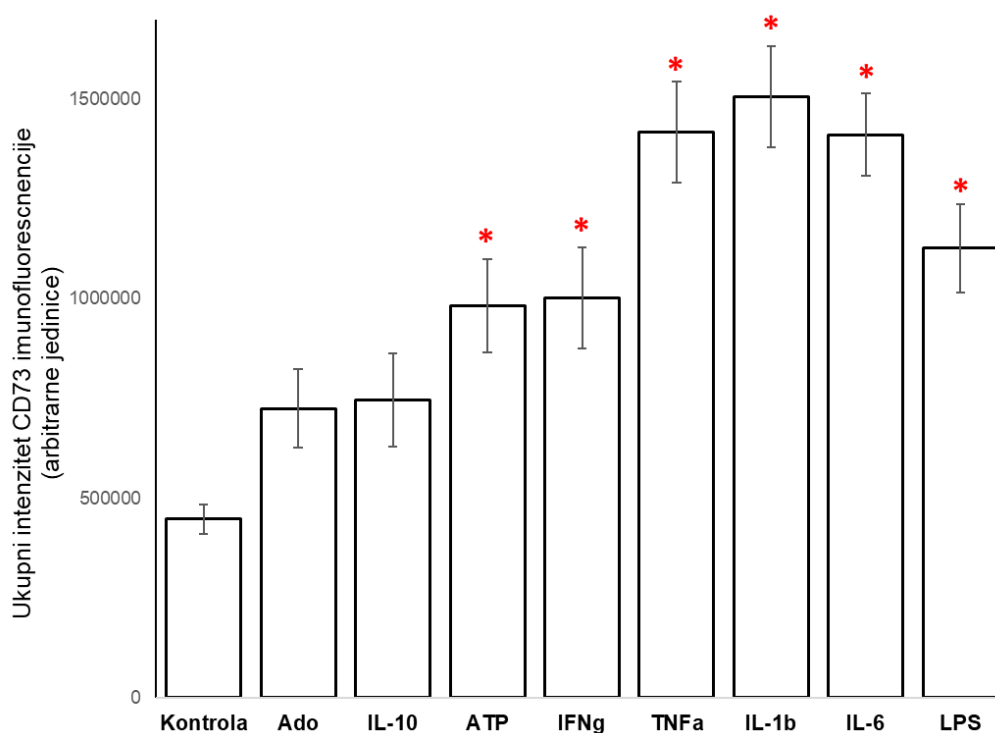
Uticaj inflamatornih medijatora na ekspresiju zrele eN/CD73 na membranama astrocita, praćeno je imunofluorescentnim dvojnim bojenjem na eN/CD73 i GFAP, 24 h nakon aplikacije tretmana (Slika 25). Povećana imunoreaktivost na eN/CD73 jasno je uočljiva nakon većine tretmana, sa izuzetkom adenozina i IL-10.

U netretiranim kontrolnim kulturama, imunoreaktivnost koja odgovara eN/CD73 je slabog intenziteta i sporadično se uočava po površini ćelija. Astrociti tretirani adozinom i IL-10, ne mjenjaju morfološke odlike, niti se na njima uočava promjena intenziteta fluorescencije koja potiče od eN/CD73. Tretman ATP-om, IFN- γ i LPS-om dovodi do umjerenog, ali statistički značajnog povećanja imunofluorescencije, dok TNF- α . IL-1 β i IL-6 dovode do veoma izraženog povećanja (Slika 25, 26).



Slika 25. Uticaj inflamatornih citokina na ekspresiju i ćelijsku lokalizaciju eN/CD73 u kulturi astrocita, 24 h nakon tretmana. Reprezentativne konfokalne mikrografije astrocita obilježenih na eN/CD73 (crveni signal) i GFAP (zeleni signal), dok su jedra obilježena DAPI bojom (plavi signal). Specifičnost vezivanja antitijela testirana je korišćenjem odgovarajućeg pre-immunog seruma. Skala = 20 μm .

Kao što je prethodno utvrđeno, ATP dovodi i do reorganizacije mreže GFAP filamenata duž nastavaka. Grananje nastavaka izazivaju i TNF- α , IL-1 β i IL-6, koji osim reorganizacije GFAP filamenata, indukuju formiranje brojnih kraćih nastavaka, usled čega astrociti gube poligonalan oblik, što nije uočeno u tretmanima IFN- γ i LPS-om. Imunofluorescencija koja potiče od eN/CD73 pokazuje tačkastu, ujednačenu distribuciju, koja prati i najfinije nastavke ovih astrocita (Slika 25). Kulture tretirane pre-imunim serumom nisu pokazale specifičnu imunoreaktivnost na eN/CD73.



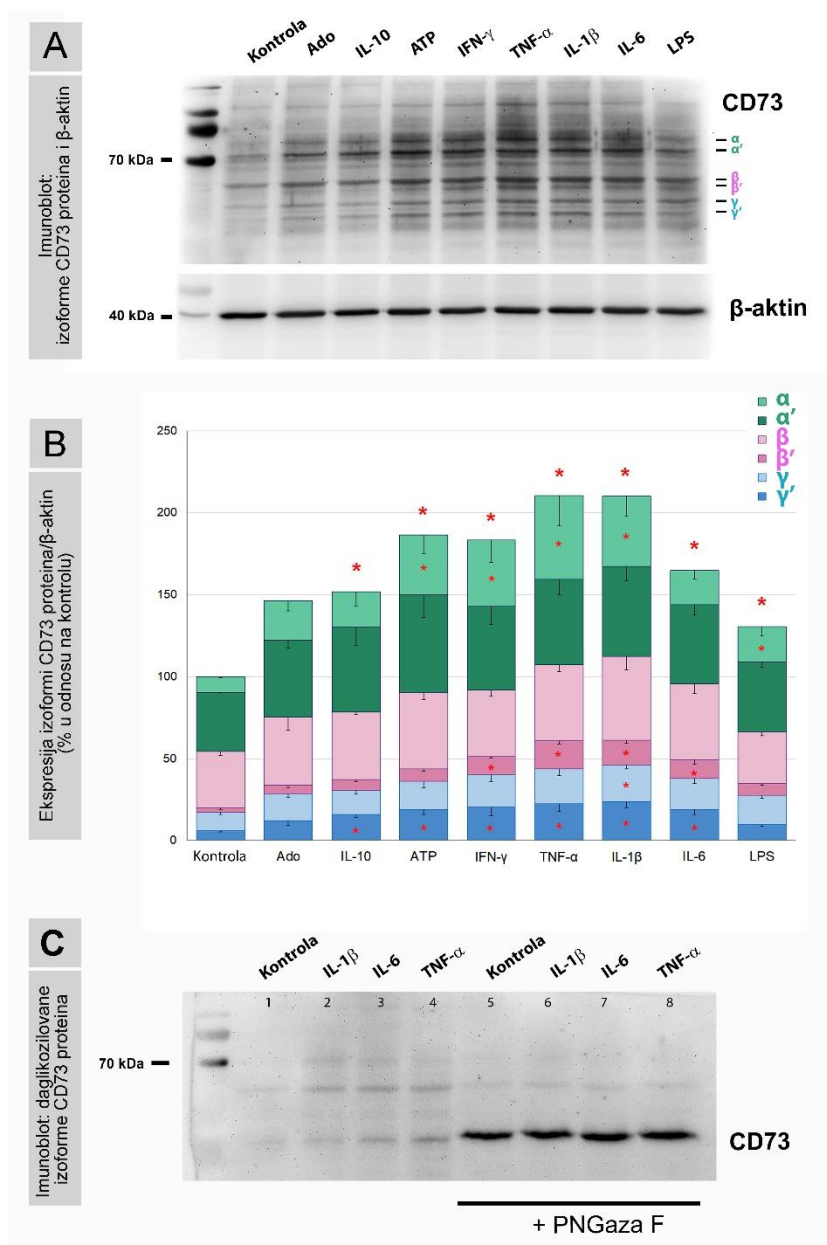
Slika 26. Ukupni intenzitet fluorescencije koja potiče od eN/CD73 (korigovan za pozadinski nespecifični signal), 24 h nakon tretmana. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost fluorescencije (arbitrarne jedinice) \pm SE, iz 15 nasumično izabranih kadrova, iz $n = 2$ nezavisne kulture astrocita. Statistička značajnost: $*p < 0.01$.

6.3. Uticaj na proteinsku ekspresiju i posttranslacione modifikacije

Prethodne imunoblot analize pokazale su da se eN/CD73 detektuje u vidu više glikoformi različitih molekulskih težina ~55 do ~70 kDa, koje mogu ispoljiti različite uticaje na fiziologiju i ponašanje astrocita. Stoga smo htjeli da utvrdimo da li testirani medijatori inflamacije mijenjaju obrazac glikolizacije eN/CD73.

Reprezentativni imunoblot dobijen razdvajanjem membranskih proteina i detekcijom i vizuelizacijom eN/CD73 pomoću specifičnog anti-eN/CD73 antitijela prikazan je na Slici 26A. U uzorcima astrocitnih membrana uočava se prisustvo tri dubleta traka koje smo označili oznakama α , β , i γ , a koje najverovatnije predstavljaju različite glikoforme eN/CD73. S obzirom na to da je ovakav raspored traka bio reproducibilan u tri nezavisne imunoblot analize, u cilju kvantifikacije ekspresije eN/CD73 najprije je određena zbirna optička gustina svih traka u jednoj koloni, a zatim su pojedinačno denzitometrijski obrađene reprezentativne trake (Slika 27B). Tretmani ATP-om, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 i LPS-om statistički značajno povećavaju ukupnu proteinsku ekspresiju eN/CD73, a najveće povećanje izazivaju TNF- α i IL-1 β . Kada se uporedi ekspresija pojedinačnih traka, uočava se da ovi tretmani indukuju selektivno povećanje ekspresije pojedinačnih glikoformi eN/CD73. U svim uzorcima membrana, kako kontrolnim, tako i tretiranim, najveći udio eN/CD73 eksprimira se u vidu traka koje smo označili sa α i β' , dok tretmani medijatorima inflamacije dovode do povećanja ekspresije glikoformi α' , β i γ ($p < 0.05$).

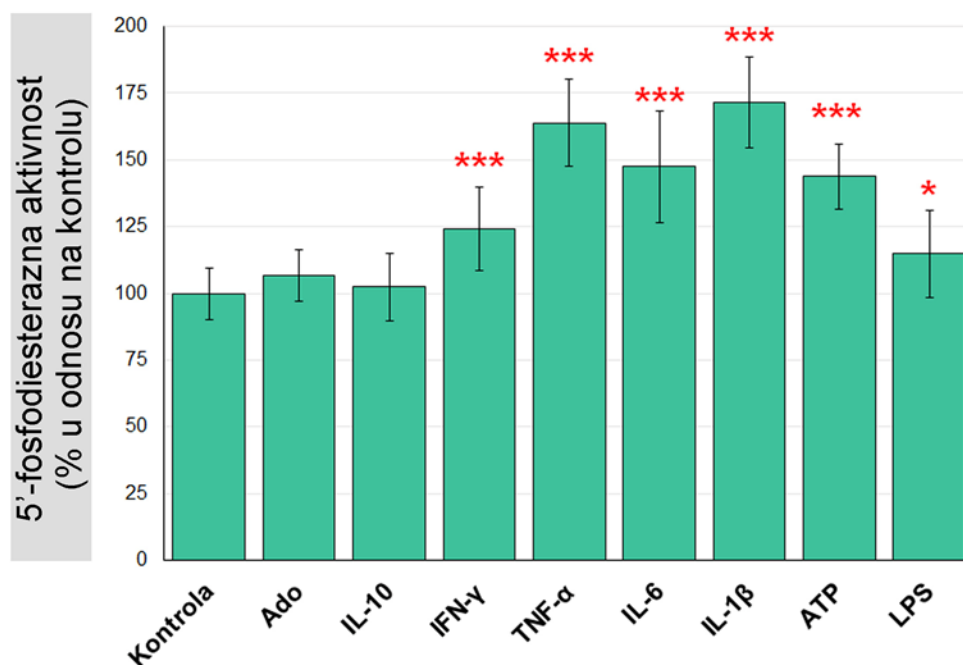
Da bi dokazali da pojedinačne trake zaista predstavljaju različite glikoforme eN/CD73 nastale posttranslacionim modifikacijama, uzorci membrana su podvrgnuti deglikozilaciji pomoću enzima PNGase F, koji uklanja glikanske molekule vezane N-glikozidnim vezama za Asp nastavke proteina. Takvi uzorci su razdvojeni elektroforetski i inkubirani sa anti-eN/CD73 antitijelima (Slika 27C). Imunoblot analiza pokazuje da kod deglikozilavanih uzoraka u najvećoj mjeri gube višestruke trake, i glavnina eN/CD73 se javlja u vidu jedne dominantne trake na najnižoj molekulskoj težini u odnosu na prethodno okarakterisane trake. Ovaj rezultat potvrđuje da su pojedinačne trake na imunoblotu sa Slike 26A specifične i da predstavljaju glikoforme istog proteina, a ne različite izoforme ili nespecifičnog obojene proteine.



Slika 27. Uticaj medijatora inflamacije na proteinsku ekspresiju eN/CD73. **(A)** Reprezentativni imunoblot ukupnih ćelijskih lizata tretiranih kultura astrocita, nakon inkubacije sa primarnim anti-eN/CD73 antitijelima. Obilježen je položaj tri dubleta traka na ~70 kDa - α i α' , ~60 kDa- β i β' , i ~55 kDa - γ i γ' . Prikazan je odgovarajući imunoblot ekspresije β -aktina (~40 kDa). **(B)** Ekspresija eN/CD73 određena je relativno u odnosu na ekspresiju aktina i normalizovana na taj odnos u kontrolnim uslovima (100%). Stubići predstavljaju srednju vrijednost relativne ekspresije eN/CD73/aktin \pm SE, iz 4 nezavisna eksperimenta ponovljena dva puta. Posebno su kvantifikovane pojedinačne trake i izražene u odnosu na optičku jačinu β -aktina, kako bi se evaluirao doprinos pojedinačnih glikoformi enzima. Statistička značajnost: * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu. **(C)** Reprezentativni imunoblot nativnih uzoraka astrocitnih membrana (1-4) i uzoraka izolovanih iz istih tretmana i podvrgnutih deglikozilaciji PNGazom F (5-8).

6.4. Uticaj medijatora inflamacije na fosfohidrolaznu aktivnosti eN/CD73

S obzirom na uočeno povećanje ekspresije eN/CD73 na nivou transkripta i proteina, dalje smo analizirali promjene aktivnost ovog enzima. Esej aktivnosti je izveden na živim kulturama astrocita 24 h nakon tretmana medijatorima inflamacije (Slika 28). Tretman astrocita IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , ATP ($p < 0.001$) i LPS-om ($p < 0.05$) dovodi do statistički značajnog povećanja 5'-AMP fosfohidrolazne aktivnosti.



Slika 28. Uticaj medijatora inflamacije na enzimsku aktivnost eN/CD73. Test enzimske aktivnosti izveden je na živim ćelijama u prisustvu 5'-AMP kao supstrata. Stubići predstavljaju srednje vrijednosti specifične aktivnosti enzima, izražene kao % odsupanja od aktivnosti detektovane u kontrolnim uslovima \pm SE. Aktivnost eN/CD73 u kontrolnim kulturama bila je nmolPi/mg proteina/min. Test je izveden na $n = 4$ nezavisne kulture astrocita, u duplikatu tretmana i triplikatu očitavanja apsorbance. Statistička značajnost: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

V DISKUSIJA

Osnovni ciljevi neuroinflamacije su da različitim molekulskim i ćelijskim mehanizmima ograniči oštećenja nervnog tkiva nastala usled mehaničke povrede ili metaboličkog disbalansa, te da omogući uspostavljanje fiziološke homeostaze i obnovu funkcije CNS. Hronični inflamatorni procesi su pak okarakterisani u gotovo svim neuropatologijama. Pošto do danas ni za jedno neurodegenerativno oboljenje ne postoji adekvatan lijek, a terapije se baziraju na ublažavanju simptoma i toka bolesti, razumijevanje i mogućnost kontrolisanja raličitih faza neuroinflamacije (inicijacije, toka i razrješenja/ishoda) su od izuzetnog značaja za dalji razvoj terapijskih strategija. Komponente sistema purinske signalizacije, posebno ATP i njegov krajnji metabolit adenzin, koji su ligandi za P2 odnosno P1 receptore, redom, i s posebnim isticanjem enzima ekto-5'-nukleotidaza/CD73 kao ključne tačke odnosa ATP/adenzin, učestvuju u kontrolisanju inflamatornih procesa na kompleksne načine. Ključni regulatori prvih faza neuroinflamatornog odgovora su aktivacija inflamazomskog kompleksa, migracija i aktivacija glijskih ćelija (mikroglije i astrocita) i produkcija pro- i anti-inflamatornih citokina. Kao što je u uvodu ove teze opisano, u brojnim eksperimentalnim modelima neuropatologija je pokazano povećanje ekspresije i aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze/CD73 na reaktivnim astrocitima *in vivo* i *in vitro*. Dodatno, prisustvo eN/CD73 na ćelijskoj membrani mijenja migratorni i adhezivni kapacitet ćelija. Pošto je ovo bitna karakteristika reaktivnih astrocita, u ovom istraživanju smo ispitali aspekte povećane ekspresije eN/CD73 na aktiviranim astrocitima, s osvrtom i na A1/A2 polarizaciju astrocita. Takođe, u okviru ovog istraživanja, ispitali smo uticaj vanćeliskog ATP koji je prekusorni molekul za eN/CD73 supstrat (AMP). Razmotren je i uticaj adenozina, kao produkta aktivnosti ovog enzima, na aspekte migracije, proliferacije, promjene morfoloških i funkcionalnih odlika astrocita u primarnoj kulturi.

U fiziološkim uslovima koncentracije ATP su izuzetno niske i strogo kontrolisane (1-3 nmol/l), dok se usled metaboličkog ili mehaničkog oštećenja njegova koncentracija u međućelijskom prostoru drastično povećava (>1 mmol/l) (Abbraccio and Ceruti, 2006, Franke et al., 2006). Visokoj vanćelijskoj koncentraciji ATP najviše doprinose astrociti koji

su zahvaćeni povredom, ali ATP oslobađaju i neoštećene ćelije iz neposredne blizine, ali i locirane na većoj udaljenosti od nastalog oštećenja (Abbracchio et al., 2009). Nekontrolisana i kontrolisana dinamika oslobađanja ATP nam ukazuju da prisustvo ovog molekula u vanćelijskoj sredini pri oštećenjima nije slučajno, već da je njegova uloga vrlo specifična i informativna, okarakterisana kao „signal opasnosti“, DAMP ili alarmin (Bours et al., 2011, Bours et al., 2006, Di Virgilio, 2000, Rodrigues et al., 2015). Astrociti i mikroglia prvi detektuju obavještenje da je do oštećenja došlo što izaziva aktivaciju ovih ćelija (Abbracchio et al., 2009, Di Virgilio et al., 2009). Usled gradijenta koncentracije vanćelijskog ATP formira se spektar odgovora glijskih ćelija u zavisnosti od njihove pozicije u odnosu na oštećenje u CNS. Stoga, u ovom istraživanju smo primjenili seriju koncentracija ATP (5 -1000 $\mu\text{mol/l}$) na primarne kulture astrocita, u namjeri da vjerno predstavimo gradijent koncentracije ovog signala opasnosti. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da ATP pokreće nekoliko aspekata karakterističnih za fenotip aktiviranih astrocita, a efekti su intenzivniji sa porastom aplicirane koncentracije ATP. Nakon diskusije uvidjećemo da ATP nije dovoljan da samostalno dovede do potpune transformacije astrocita u reaktivni fenotip. Nakon diskusije uvidjećemo da ATP izaziva reaktivni fenotip koji je u kontekstu A1/A2 polarizacije bliži protektivnom A2 fenotipu. Ovakvi rezultati sugerišu da bi vanćelijski ATP u *in vivo* uslovima mogao imati ulogu da pokrene neuroinflamatorne procese, ali da posredstvom aktiviranih astrocita može da predstavlja signal u službi zaštite nervnog tkiva.

Odgovor primarnih kultura kortikalnih astrocita na jednokratno dodavanje ATP se ogleda u promjenama njihove morfologije i proliferacije. Astrociti u intaktnoj kulturi se karakterišu uvećanim tijelima ćelije, sa manjim brojem kratkih nastavaka koji najčešće u potpunosti odsustvuju. Aktinski filamenti formiraju guste snopove koji prate površinu ćelijske membrane duž ivica ćelije. Takođe, karakteristično je da se u intaktnim kulturama broj proliferativnih astrocita postepeno smanjuje što je kultura bliža konfluentnosti (Lewis et al., 2008). Pokazano je da ukoliko se astrociti izlože nekom od stimulusa koji narušavaju fiziološki kontekst dolazi do njihove pojačane proliferacije *in vitro* (Gallo et al., 2000) i *in vivo* (Sofroniew, 2009). U prethodnim istraživanjima opisani su mitogeni efekti

vanćelijskog ATP na astrocite (Ciccarelli et al., 1994, Franke and Illes, 2006, Neary and Zimmermann, 2009, Quintas et al., 2018). Najniža koncentracija ATP (5 μ M) testirana u našim eksperimentima nije imala efekta na proliferativni kapacitet astrocita u kulturi, niti je dovela do reorganizacije citoskeletnih elemenata, koja inače prethodi promjeni oblika ćelija. Ipak, više koncentracije ATP (0.01 – 1 mM) su izazvale dozno- i vremensko-zavisno povećanje proliferacije astrocita. Posmatrajući koncentracije od nižih ka višim uočili smo da su astrociti postepeno mijenjali svoj oblik, formirali sve veći broj manje ili više razgranatih nastavaka. Pri svim ATP tretmanima površina tijela astrocita se smanjila, i od poligonalnog oblika prešla u sferični. Sa porastom primjenjene koncentracije ATP rastao je i broj astrocita zvjezdaste morfologije, koja je slična tipičnom obliku reaktivnih astrocita *in vivo* (Franke et al., 2012) i *in vitro* (Renner et al., 2013). U osnovi ovih morfoloških promjena leži reorganizacija citoskeletnih mreža (John et al., 2004), tačnije restrukturiranje aktinskih vlakana, koja formiraju robusna stresna vlakna prateći membranu cijelom površinom ćelije i obmotavajući intermedijarne filamente duž izduženih nastavaka. Naši eksperimenti, međutim, nisu pokazali da dolazi do promjene u ukupnom sadržaju aktina i GFAP filamenata, tj. nema promjene u ukupnoj količini monomernih jedinica ovih filamenata, što sugerira da se promjene dešavaju isključivo na račun reorganizacije postojećih citoskeletnih elemenata. Pozitivna regulacija ekspresije GFAP je jedna od osnovnih karakteristika reaktivnih astrocita, pa shodno tome ne može se reći da je ATP u našim eksperimentima izazvao potpunu aktivaciju astrocita u kulturi, iako je doveo do značajne promjene u njihovoj morfologiji.

Promjena organizacije aktina i formiranje stresnih vlakana je veoma važno za generisanje sile tokom kretanja ćelije (John et al., 2004, Parsons et al., 2000). Stoga, u ovom istraživanju smo analizirali migratorni potencijal astrocita nakon dodavanja ATP *in vitro*. Naši rezultati govore da ATP nije doveo do ukupne promjene u dinamici zarastanja povrede u monosloju astrocita u kulturi, ali ATP je i u ovom slučaju doveo do strukturnih promjena ćelija. Astrociti koju su se nalazili uz ivicu povrede su formirali veoma izdužene nastavke usmjerene ka središtu povrede, ali do neto povećanja kretanja astrocita nakon ATP tretmana nije došlo.

Iako su naši rezultati ukazali da ATP usmjerava astrocite ka reaktivnom fenotipu, pokazalo se da je taj reaktivni fenotip protektivnog karaktera. Samostalno i jednokratnim apliciranjem, ATP nije bio u mogućnosti da pokrene oslobađanje IL-1 β od strane astrocita. Takođe, astrociti nisu dodatno oslobodili ovaj citokin kada se ATP doda tretmanu LPS + IFN- γ (Ferrari et al., 1997). Naši rezultati pokazuju da ATP nije indukovao povećanje oksidativnog stresa kod astrocita u kulturi, dok je sa druge strane došlo do ojačavanja antioksidativne zaštite time što je pojačana aktivnost SOD enzima (Cu/ZnSOD i MnSOD) i povećanim unutarćelijskim sadržajem GSH i njegovim oslobađanjem u vanćelijsku sredinu. Ovakva reakcija astrocita nam govori da u stanju opasnosti usled oštećenja nervnog tkiva i oslobađanja većih koncentracija ATP u vanćelijsku sredinu, uloga astrocita je da zaštite neurone od oksidativne toksičnosti (Dringen, 2000).

Ovakve, naizgled oprečne reakcije astrocita koje smo dobili u ovom istraživanju, mogu biti posledica aktivacije nukleotid-senzitivnih P2 receptora, ali i adenzinskih P1 receptora različitim koncentracijama svojih liganada (Abbracchio and Ceruti, 2006, Burnstock and Knight, 2004). Efekat vanćelijskog ATP će zavisiti od specifične kompozicije i lokalizacije purinskih receptora na samoj površini astrocita (Coddou et al., 2011) u zavisnosti od stadijuma razvića ili uslova u nervnom tkivu (*in vivo*) odnosno u kulturi (*in vitro*) (Quintas et al., 2011). Pokazano je da primarni kortikalni astrociti izolovani iz novorođenih mladunaca pacova eksprimiraju P2Y₁, P2Y₂ i P2Y₄ (Lenz et al., 2000) kao i čitav set P2X₁₋₇ receptora (Jacques-Silva et al., 2004).

Astrociti u kulturi takođe eksprimiraju ektonukleotidazne enzime, koji vrše hidrolizu ATP molekula, sa najzastupljenijim članovima NTPDaza2 i ekto-5'-nukleotidaza/CD73 (Brisevac et al., 2015). Ova dva enzima produkuju ADP (NTPDaza2) odnosno adenzin (eN/CD73), pa se tako astrocitni purinski receptori mogu biti dodatno aktivirati. Neki od efekata koji su pokazani u ovom istraživanju mogu nastati posredstvom ADP-senzitivnog P2Y₁ receptora, ali i aktivacijom adenzin-senzitivnog seta P1 receptora koji su eksprimirani na astrocitima *in vitro* (Boison et al., 2010, Chen et al., 2014). Suprotno od ATP molekula kao signala opasnosti, molekul adenzina u vanćelijskoj sredini ispoljava izraziti anti-inflamatorni karakter, imunosupresivno dejstvo i doprinosi reparaciji i

očuvanju KMB (Cunha, 2016). Vjerovatno da su neki od pozitivnih efekata izazvanih ATP tretmanima upravo odraz aktivacije adenozijskih receptora. Adenozin je takođe važan modulator funkcije astrocita koji ih štiti od ishemijskih oštećenja u slučajevima kada dolazi do energetskeg disbalansa, usled oslobađanja velike količine ATP van ćelija (Boison, 2012).

Smatra se da je masivno oslobađanje ATP usled oštećenja prvi od dva neophodna signala u razvoju neuroinflamacije (Fiebich et al., 2014). Kao što je viđeno i u rezultatima ovog istraživanja, ATP ne može samostalno da dovede do potpunog reaktivnog fenotipa astrocita, iako ih aktivira po pitanju nekoliko prethodno opisanih aspekata. Imajući ovo u vidu, jasno je da identifikacija odgovora astrocita na vanćelijski ATP tretman može da obezbjedi nove uvide u regulaciju ranih faza neuroinflamacije.

Kao što je pomenuto, na drugom kraju kaskadne fosfohidrolazne aktivnosti ektoenzima akumulira se adenozin. Osim razgradnjom ATP molekula, adenozin može da bude aktivno oslobođen iz ćelija (Boison, 2006, Gomes et al., 2011, Melani et al., 2012). U zavisnosti od porijekla vanćelijskog adenozina, ali i od ekspresije njegovih P1 receptora, dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva kao što je već opisano u uvodu ove teze. Poznato je da adenozin smanjuje proliferaciju astrocita aktivirajući svoje A₁ receptore, a aktivacijom A_{2A} receptora stopa proliferacije se povećava (Boison et al., 2010, Ciccarelli et al., 1994). U ovom istraživanju, tretman adenozinom je doveo do povećanja proliferacije astrocita u modelu povrede u kulturi, posredno ukazujući da ovaj nukleozid dominantno aktivira A_{2A} receptore, ali i da negativno reguliše ekspresiju sopstvenog *Adora2a* gena u ovom modelu. Uprkos ovakvom efektu na proliferaciju, adenozin nije promijenio dinamiku zarastanja povrede sugerišući da je migratorni kapacitet astrocita neizmjenjen ili čak smanjen, ali kompenzovan povećanjem broja astrocita. Astroцити ne mijenjaju svoju morfologiju nakon tretmana adenozinom, niti dolazi do reorganizacije citoskeletnih elemenata.

Adenozin takođe reguliše ekspresiju eN/CD73 i to promjenom koncentracije cAMP u citoplazmi posredstvom A₁ (u fiziološkim stanjima) ili A_{2A} (u patofiziologiji) (Borrotto-Escuela et al., 2018, Orr et al., 2015). Dodatak adenozina kulturama astrocita u ovoj studiji

je doveo do neznatnog povećanja, ali ne i značajnog, u ekspresiji *Nt5e* gena, samim tim i bez efekta na povećanje proteinskog prisustva eN/CD73, kao i njene aktivnosti. Na osnovu ovih rezultata, možemo sugerisati da adenozin kao anti-inflamatorni medijator ne indukuje aktivaciju astrocita u kulturi.

Brojna istraživanja iz oblasti neuropatologije su pokazala značajno povećanje ekspresije eN/CD73 na reaktivnim astrocitima u *in vivo* (Bjelobaba et al., 2011, Bonan, 2012, Bonan et al., 2000, Braun et al., 1998, Gandelman et al., 2010, Lavrnja et al., 2009, Lavrnja et al., 2015, Nedeljkovic et al., 2006) i *in vitro* (Bavaresco et al., 2008, Brisevac et al., 2015, Brisevac et al., 2012, Fenoglio et al., 1997) uslovima. Zbog ovako specifične regulacije ekspresije eN/CD73, u ovom istraživanju smo analizirali ekspresiju i aktivnost ovog enzima u modelu povrede u kulturi astrocita. Dobijeni rezultati ukazuju da je mehanička povreda dovoljan inicijator povećanja ekspresije i aktivnosti eN/CD73 na primarnim astrocitima *in vitro*. Promjenjena je i topologija eN/CD73 koja na astrocitima duž povrede postaje ujednačenije distribuirana na ćelijskoj membrani. Ovakva promjena lokalizacije enzima karakteristično prati povećanu aktivnost eN/CD73, a vjerovatno na taj način adekvatnije formira funkcionalne jedinice sa adenozijskim A_{2A} receptorom (Barros-Barbosa et al., 2016, Rebola et al., 2011). Možemo na osnovu dosadašnjih rezultata reći da je povreda u kulturi primarnih astrocita dovela do aktivacije astrocita i karakterističnog povećanja eN/CD73 na ovim ćelijama, čineći ovaj model adekvatnim za dalja ispitivanja značaja eN/CD73 u aktivaciji astrocita izazvanoj povredom.

Tokom daljeg istraživanja, eN/CD73 je blokirana primjenom različitih farmakoloških strategija. Na taj način smo u modelu povrede u kulturi astrocita analizirali uticaj inhibicije eN/CD73 aktivnosti i nedostatka ili smanjenog prisustva eN/CD73 na površini astrocita aplikacijom APCP, anti-CD73 antitijela ili transfekcijom sa siCD73. I u ovim eksperimentima analizirali smo proliferaciju, karakterističnu za reaktivne astrocite. U literaturi je opisano da povreda u kulturi ćelija sama po sebi indukuje povećanje proliferacije (Kornyei et al., 2000, Lampugnani, 1999). Kako bismo bolje shvatili postojanje veze između ekspresije eN/CD73 i proliferacije ćelija, pomenućemo da istraživanja na tumorskim ćelijskim linijama ukazuju da proliferacija ovih ćelija pozitivno

korelira sa povećanom ekspresijom eN/CD73 (Bavaresco et al., 2008, Christensen et al., 1996, Ciccarelli et al., 2000, Gao et al., 2017, Ohana et al., 2001, Turnay et al., 1989). Proliferacija i eN/CD73 ekspresija djeluju preko zajedničke Wnt signalizacije, tačnije preko TCF/LEF vezujućeg mjesta u okviru regulatorne sekvence gena za eN/CD73 (Spychala and Kitajewski, 2004, Synnestvedt et al., 2002). Ovakva regulacija objašnjava rezultate eksperimenata ovog istraživanja koji ukazuju na smanjenu proliferaciju astrocita u modelu povrede *in vitro* nakon sve tri primjenjene vrste blokade eN/CD73. Ukoliko se osvrnemo na rezultate proliferacije astrocita pod uticajem adenzina u našem istraživanju, shvatićemo da postoji sinergizam između prisustva eN/CD73 i adenzinske aktivacije A_{2A} receptora na proliferativni status ćelije. Prema tome, sprega inhibicije eN/CD73 sa smanjenjem proliferacije (Andree et al., 1987, Bavaresco et al., 2008) predstavlja osnovu za nove obećavajuće opcije u terapiji kancera, ali i za regulaciju formiranja glijskog ožiljka i cilju izbjegavanja negativnih aspekata ovog fenomena u CNS nakon povrede.

Poređenjem rezultata proteinske ekspresije i aktivnosti eN/CD73 u okviru ovog istraživanja, zapaženo je da dolazi do paralelnog smanjenja aktivnosti ovog enzima nakon bilo koje od primjenjenih blokada. Očekivano, siCD73 transfekovane kulture su pokazale smanjenje ekspresije eN/CD73 na proteinskom novou, dok APCP nije izazvao nikakvu promjenu. Zapaženo smanjenje eN/CD73 proteina nakon tretmana anti-CD73 antitijelima je objašnjeno naknadnim eksperimentima koji su pokazali prisustvo solubilne eN/CD73 jedino nakon ovog tretmana. Različita istraživanja koja takođe uključuju specifično anti-CD73 antitijelo u kontekstu tretmana, su okarakterisala tri moguća ishoda i to: internalizaciju eN/CD73 (Terp et al., 2013), isjecanje eN/CD73 i solubilizaciju (Airas et al., 2000, Geoghegan et al., 2016) ili izostanak promjene (Airas et al., 1997, Geoghegan et al., 2016, Sadej and Skladanowski, 2012, Sadej et al., 2006b, Terp et al., 2013). Ovim se ukazuje na potencijalni diferencijalni uticaj antitijela u zavisnosti od specifičnosti na određeni epitop eN/CD73. Solubilizacija eN/CD73 je proces koji se inače dešava proteolitičkim isjecanjem ili posredstvom aktivnosti fosfatidil-inozitol specifične fosfolipaze. Na ovaj način se povećava koncentracija eN/CD73 u krvi ili drugim tjelesnim

tečnostima gdje ekto-5' nukleotidaza ima ulogu u održavanju nukleotidnih koncentracija (Heuts et al., 2012, Laketa et al., 2015, Yegutkin, 2008).

Interesantno je da studije na tumorskim ćelijskim linijama pokazuju da utišavanjem *Nt5e* gena dolazi do efikasnijeg onemogućavanja adhezije ćelija za ECM u odnosu na APCP inhibiciju eN/CD73 (Zhi et al., 2007). Pošto interakcija eN/CD73 sa proteinima vanćelijskog matriksa utiče na proliferaciju, migraciju, morfologiju, ukupni adhezivni kapacitet ćelije i njeno ponašanje (Mehul et al., 1993, Olmo et al., 1992, Sadej et al., 2008, Stochaj et al., 1990), u ovom istraživanju smo ispitali i analizirali koje efekte eN/CD73 ima na migraciju astrocita u kulturi i samim tim zarastanje povrede. Naša procjena migracije astrocita u kulturi, u kombinaciji sa prethodnim rezultatima ovog istraživanja, ukazuju da smanjeno prisustvo eN/CD73 na membrani astrocita (usled tretmana anti-CD73 antitijelima i siCD73) dovodi do bržeg zarastanja povrede, odnosno da su astrociti znatno pokretljiviji. Kako smo prethodno u diskusiji naveli da uticaj adenozina u modelu povrede u kulturi astrocita povećava njihovu proliferaciju, a smanjuje migraciju, možemo sugerisati da bi nedostatak adenozina izazvao suprotne efekte. Međutim, inhibicija eN/CD73 pomoću APCP ne mijenja stopu zarastanja povrede u kulturi astrocita, ali ostaje otvoreno pitanje da li ipak katalitička inhibicija eN/CD73 neznatno povećava migratorni kapacitet astrocita čime kompenzuje svoj efekat na smanjenje proliferacije.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da smanjenje eN/CD73 na membrani astrocita izazvano njenom solubilizacijom nakon tretmana anti-CD73 antitijelima, ne dovodi do reorganizacije GFAP filamenata niti do značajnih promjena u morfologiji astrocita duž povrede. Stoga, izmjenjena pokretljivost astrocita se može pripisati direktno eN/CD73 i njenom karakteru ćelijskog adhezivnog molekula. U literaturi se mogu zapaziti suprotni nalazi po pitanju uloge eN/CD73 u ćelijskoj pokretljivosti i adheziji, kao i po pitanju efekata do kojih njeno prisustvo ili odsustvo na ćelijskoj membrani dovodi (Andrade et al., 2011, Wang et al., 2008, Zhi et al., 2007). Istraživanja na neoplastično transformisanim ćelijskim linijama su pokazala da eN/CD73 specifično vezuje tenascin C, laminin i fibronektin (Stochaj et al 1990, Sadej et al 2008) koji mijenjaju katalitičku aktivnost ovog enzima, ali i adhezivni kapacitet ćelija. Tenascin C utiče inhibitorno na

eN/CD73 aktivnost, ali promoviše proliferaciju ćelija (Sadej et al., 2008). Interakcija eN/CD73 sa fibronektinom i lamininom ojačava ćelijsku adhezivnost, dok se njena aktivnost povećava ili nema promjene (Mehul et al., 1993, Olmo et al., 1992). Interakcija proteina ECM sa eN/CD73 vjerovatno pokreće i unutarćelijske signalne puteve, pošto su naši rezultati pokazali da blokada eN/CD73 antitijelima ili APCP-om u povredi astrocita u kulturi dodatno aktivira signalne puteve koji obuhvataju ERK1/2. Ovaj signalni put, osim što je uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa i proliferacije, snažno promoviše ćelijsko preživljavanje, mada sa druge strane neka istraživanja su pokazala i da učestvuje u apoptozi i regulaciji tumorsupresora (Mebratu and Tesfaigzi, 2009). Iako je kombinacija povrede i blokade/isjecanja eN/CD73 dovela do pokretanja ovog signalnog puta, jasno je da u nekoj mjeri direktna interakcija sa eN/CD73 indukuje dalju signalizaciju, pošto utišavanje ekspresije eN/CD73 iRNK nije pokazalo sličan efekat.

Osvrnućemo se ukratko na dinamiku povećanja ekspresije eN/CD73 zapaženu u različitim studijama (Bjelobaba et al., 2011, Lavrnja et al., 2015, Nedeljkovic et al., 2006) u kojima je opisano odloženo povećanje eN/CD73 ekspresije u odnosu na prvobitno povećanje ekspresije GFAP na reaktivnim astrocitima. Djeluje da je ovo odlaganje povećanja količine eN/CD73 „strateški potez“ aktiviranih astrocita, koji u početnoj fazi neuroinflamacije imaju zadatak da se probiju do mjesta povrede. Rezultati ovog *in vitro* istraživanja upravo podržavaju *in vivo* osobinu reaktivnih astrocita da, tek kada je potrebno da se zaustave u neposrednoj okolini povrede, povećavaju ekspresiju eN/CD73, a samim tim i svoju adheziju za ECM. U uslovima povrede, opisano je da reaktivni astrociti akumuliraju velike količine tenascina C u vanćelijskom prostoru (Brosicke and Faissner, 2015, Wiese et al., 2012) lokalno mijenjajući sadržaj ECM i signalizaciju koja utiče na promjenu ponašanja pristiglih ćelija (Geiger et al., 2009). Sa druge strane, u fiziološkim uslovima, sinteza tenascina C je izuzetno niska u fiziološkim uslovima adultnog CNS nervnom, a smatra se da tada eN/CD73 interagujući sa fibronektinom pomaže astrocitima da održavaju svoju domensku organizaciju i adhezivnost.

Sumarno, u modelu mehaničke povrede kortikalnog regiona kore prednjeg mozga pacova (Bjelobaba et al., 2011, Nedeljkovic et al., 2006) ili u kulturi astrocita u okviru ovog

istraživanja, rezultati impliciraju da reaktivni astrociti povećano ekspimiraju eN/CD73 koja je zadužena za adheziju ćelija, za lokalnu produkciju adenoza i aktivaciju P1 purinskih receptora. Postavlja se pitanje da li će astrociti u *in vitro* uslovima na sličan način oslikavati ovakvu dinamiku ekspresije ukoliko ih uporedimo sa reaktivnim astrocitima u različitim neuropatologijama kao na primjer sa astrocitima u studiji na EAE modelu multiple skleroze (Lavrnja et al., 2015) u kojoj je takođe zabilježen porast u ekspresiji i aktivnosti eN/CD73. Zato je dodatni cilj ove teze bio da ispitamo korelaciju ekspresije eN/CD73 sa reaktivnošću astrocита odnosno sa A1/A2 fenotipom astrocита. Analiza iRNK i proteinske ekspresije eN/CD73 ukazuje na pozitivnu regulaciju nakon tretmana pro-inflamatornim medijatorima (ATP, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, LPS), dok nije pokazana značajna promjena nakon tretmana okarakterisanih kao anti-inflamatornim (adenozin, IL-10). Ovakav rezultat sugerise da reaktivne astrocite, ili u određenoj mjeri aktivirane astrocite karakterise povećano prisustvo eN/CD73 na njihovoj membrani. Imunofluorescentnim bojenjem smo pokazali da trend povećanja ekspresije eN/CD73 prati aktiviranje astrocита u kulturi.

Već smo ranije u diskusiji govorili o uticaju adenoza na ekspresiju eN/CD73 na aktiviranim astrocitima, a sličan efekat je zabilježen nakon IL-10 tretmana. Ovaj anti-inflamatorni citokin nije doveo do povećanja ekspresije eN/CD73 na genskom ili proteinskom nivou pa ni do povećanja katalitičke aktivnosti ovog enzima. Podsjećanja radi, IL-10 onemogućava translokaciju NF- κ B faktora i na taj način spriječava produkciju pro-inflamatornih medijatora od strane samih astrocита, a pokreće mehanizme zaštite neurona, remijelinizacije i smanjenja astroglioze (Rothhammer and Quintana, 2015, Yang et al., 2009). Uticaj vanćelijskog ATP je u ovoj studiji okarakterisan kao aktivirajući, ali po svemu sudeći indukujući protektivni A2 karakter astrocита, na kojima je zabilježena povećana ekspresija eN/CD73. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Brisevac et al., 2015), a aktivnošću eN/CD73 i produkcijom adenoza kao krajnjeg produkta ATP-a, ostvaruje se kumulativni efekat na regulaciju ekspresije i aktivnosti eN/CD73.

Pro-inflamatorni IFN- γ i IL-6 pokreću JAK-STAT3 signalni put (Colombo and Farina, 2016, Liddelow and Barres, 2017, Sofroniew, 2009). Pokazano je da ovaj signalni put pospješuje oporavak nakon CNS povrede (Okada et al., 2006) ili u EAE modelu multiple skleroze (Hindinger et al., 2012). Receptor za IFN- γ je visoko eksprimiran na astrocitima (Colombo and Farina, 2016), a signalizacija posredovana IFN- γ je karakteristična za A2 zaštitni fenotip aktiviranih astrocita. Sun i saradnici su u nedavnom istraživanju potvrdili da IFN- γ ispoljava neuro-protektivni karakter indukujući IL-6 produkciju od strane astrocita (Sun et al., 2017). Na ovaj način se potencira uticaj IL-6 na mikrogliju i astrocite čime se dodatno pojačava benefitarna JAK-STAT3 signalizacija. Naši rezultati pokazuju da A2 reaktivni astrociti indukovani pro-inflamatornim IFN- γ i IL-6 citokinima pojačavaju ekspresiju i aktivnost eN/CD73.

Osim prethodno okarakterisanih, pro-inflamatorni IL-1 β i TNF- α su takođe sintetisani u velikoj mjeri od strane aktiviranih astrocita i mikroglije tokom neuroinflamacije, a pokazano je da su receptori za ove citokine eksprimirani na astrocitima (Puntambekar et al., 2018, Sofroniew, 2015). IL-1 β i TNF- α snažno aktiviraju astrocite pošto pokreću NF-kB signalni put, specifičan za A1 tip reaktivnih astrocita u neuroinflamaciji u okviru patoloških stanja, ali i tokom starenja (Clarke et al., 2018, Liddelow and Barres, 2017, Liddelow et al., 2017, Rothhammer and Quintana, 2015). Istraživanja su pokazala da A1 fenotip astrocita nastaje i u odgovoru na aktivacija TLR4 od strane sistemski apliciranog LPS, posredstvom mikroglije (Liddelow et al., 2017). Naši rezultati ukazuju da astrociti mogu biti direktno aktivirani od strane LPS, koji takođe dovodi do povećane ekspresije eN/CD73. Dakle, ekspresija i aktivnost eN/CD73 su značajno povećani na reaktivnim astrocitima okarakterisanim kao A1 nakon izlaganja pro-inflamatornim citokinima IL-1 β i TNF- α , kao i LPS.

Moguće je dakle izvesti zaključak je da je eN/CD73 pozitivno regulisana na oba tipa reaktivnih astrocita. To znači da je povećanje ekspresije eN/CD73 jedan od obaveznih odlika reaktivne astroglioze, jer se javlja na svim aktiviranim astrocitima nezavisno od funkcionalne polarizacije astrocita na A1 ili A2 fenotip. Sa druge strane, nivo ekspresije i aktivnosti eN/CD73 je značajno manji na neaktiviranim astrocitima.

Interesantno je primjetiti da u literaturi postoji diskrepanca između proteinske ekspresije eN/CD73 i aktivnosti ovog enzima (Airas et al., 1997, Brisevac et al., 2012, Christensen et al., 1996, Cunha, 2001, Cunha et al., 2000, Lavrnja et al., 2015, Nedeljkovic et al., 2006, Stanojevic et al., 2011) ili adhezivnom afinitetu eN/CD73 prema ECM (Airas et al., 1997, Mehul et al., 1993, Navarro et al., 1998, Olmo et al., 1992). Takođe postoje kontradiktornosti uloge eN/CD73 u tumorskom rastu, invazivnosti i metastatičkom potencijalu različitih tumorskih ćelijskih linija (Antonioli et al., 2016b). Ovakav fenomen se pak može objasniti različitim ugljeno-hidratnim sadržajem proteina eN/CD73.

Pošto su eN/CD73 ekspresija i aktivnost pozitivno regulisani na reaktivnim astrocitima, što je pokazano i u istraživanju ove teze, odlučili smo da detaljno ispitamo pojavu gliko-izoformi ovog proteina u kulturi astrocita tretiranih pro- i anti-inflamatornim medijatorima. Uočene su tri dominantne molekulske težine na imunoblotu u opsegu od ~55 do ~70 kDa. Kako je u okviru jedne pozicije N-glikozilacije moguće zateći različitu zastupljenost kompleksnih šećera, manoze ili sijalinske kiseline, na imunoblotu se mogu uočiti dodatne trake. Ovim eksperimentom je utvrđeno da se povećanje aktivnosti eN/CD73 može pripisati i post-translacionoj izmjeni sadržaja ugljenih-hidrata u okviru sve tri dominantne trake. Očigledno je da nakon pro-inflamatornih tretmana oba tipa snažno aktiviranih astrocita *in vitro* (A1 i A2) kontrolisano mijenjaju zastupljenost određenih glikana u okviru iste N-glikoidne pozicije. Ovakva post-translaciona modifikacija eN/CD73 može biti kratkoročna (Lavrnja et al., 2015, Schoen and Kreutzberg, 1994) ili trajna (Grkovic et al., 2014), utičući osim na produkciju adenzina i na adhezivne sposobnosti eN/CD73.

Svi prethodno izneseni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na veoma kompleksnu i strogo regulisanu transkripciju i post-translacione modifikacije eN/CD73 u kulturama primarnih kortikalnih astrocita pacova. Jasno je da eN/CD73 utiče na adhezivne i migratorne karakteristike astrocita *in vitro*. Ne smijemo zaboraviti da interakcije eN/CD73 sa proteinima ECM mijenjaju njenu funkciju i unutarćelijsku signalizaciju utičući i na produkciju adenzina i aktivacije P1 receptora. Precizno kontrolisane promjene ekspresije i stepena glikozilacije eN/CD73 prisutne na ćelijskoj membrani su odraz strategije astrocita u

stanjima oštećenja nervnog tkiva. U slučaju povrede CNS mikroglia prva biva aktivirana i produkuje značajne količine inflamatornih medijatora koji aktiviraju astrocite. Astrociti, kao visoko migrirajuće ćelije, imaju zadatak da se usmjere ka žarištu oštećenja kako bi ga lokalizovali i zaštitili direktno ugrožene neurone. Tokom migracije se eN/CD73 ekspresija održava na bazalnom nivou, vjerovatno radi olakšanog kretanja astrocita. Krećući se uz gradijent inflamatornih medijatora, ka povredi, astrocite sve više karakteriše reaktivni fenotip. Usled plejade signala i potreba tkiva za paralelnom aktivacijom velikog broja ćelija, ali i zaštitom tkiva, javljaju se oba tipa reaktivnih astrocita: A1 neurotoksičnih i A2 neuroprotektivnih. Takođe, oba tipa reaktivnih astrocita pojačano ekspimiraju eN/CD73 koja sada ima funkciju da osnaži adheziju astrocita duž povrede i da produkuje veće količine anti-inflamatornog adenzina koji će prevashodno aktivirati A_{2A} receptore na astrocitima i na drugim ćelijama, kako bi se inflamacija usmjerila ka razrješenju.

Modifikacija eN/CD73 ekspresije, produkcije adenzina, adhezivnog kapaciteta i uticaja na proliferaciju ćelija se već primjenjuje u kliničkim testiranjima terapija za određene vrste kancera. Imajući u vidu iznijete rezultate i diskusiju ove teze od velikog je naučnog značaja dalje usmjeriti istraživanja na potencijal blokade eN/CD73 različitim farmakološkim strategijama, kako bi se razvili terapijski pristupi u kontroli faza neuroinflamacije. Neuroinflamacija nastaje usled metaboličkih, mehaničkih ili infektivnih faktora, a odsustvom kontrolisanja iste dolazi do razvoja različitih neuropatologija ili onemogućenog oporavka nakon povrede usled astroglioze i formiranog glijskog ožiljka. Purinska signalizacija generalno, a naročito adenzinski sistem signalizacije, uz poseban interes za višestruko funkcionalnu eN/CD73, predstavljaju širok opseg farmakoloških modifikacionih mogućnosti i regulacije ovog sistema signalizacije u akutnoj, ali i u hroničnoj neuroinflamaciji.

VI ZAKLJČCI

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

- 1) **Vanćelijski ATP izaziva aktivaciju astrocita i usmjerava je u pravcu neuroprotektivnog fenotipa.** ATP izaziva tipičnu promjenu morfologije astrocita uključujući hiperplaziju, hipertrofiju i odgovarajuću reorganizaciju mikrofilamenata i intermedijarnih filamenata. U funkcionalnom smislu, astrociti aktivirani ATP-om ne povećavaju produkciju IL-1 β , a pojačavaju aktivnost enzima antioksidativne zaštite (Cu/ZnSOD i MnSOD), produkciju i oslobađanje glutationa, uz nepromjenjen nivo lipidne peroksidacije i kiseoničnih i nitroznih radikala.
- 2) **Vanćelijski adenozin podstiče održavanje mirujućeg fenotipa astrocita.** Adenozin (kao i ushodni nukleotidi, AMP i ADP), ne mjenja morfologiju astrocita i ne izaziva reorganizaciju citoskeletnih filamenata. Ovaj nukleozid povećava stopu proliferacije astrocita u kulturi, smanjuje migratorni kapacitet astrocita i smanjuje ekspresiju „pro-inflamatornih“ A_{2A}R receptora.
- 3) **Aktivacija astrocita izazvana mehaničkom povredom praćena je povećanjem ekspresije eN/CD73 na genskom, proteinskom i funkcionalnom nivou, kao i redistribucijom molekula eN/CD73 po površini ćelija.** Kod astrocita aktiviranih povredom eN/CD73 je raspoređena po cijeloj površini ćelija, umjesto fokalne lokalizacije enzima koja je uočena na intaktnim ćelijama.
- 4) **Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 ima ulogu membranskog senzora za vanćelijske signale koji mjenjaju brojne aspekte fiziologije astrocita.** Blokada aktivnosti eN/CD73, primjenom APCP inhibitora, posredstvom specifičnih anti-eN/CD73 antitela ili genetičkim utišavanjem ekspresije eN/CD73, smanjuje 5'-AMP fosfohidrolaznu aktivnost ovog enzima, ali smanjuju i stopu proliferacije astrocita u kulturi. Uz to, vezivanje anti-eN/CD73 antitijela za eN/CD73 izaziva isjecanje GPI sidra i oslobađanje eN/CD73 u medijum. Inhibicija APCP-om i blokada antitjelom aktiviraju unutarćelijsku kaskadu posredovanu ERK1/2 i dovode do promjena ekspresije svih adenozijskih receptora.

- 5) **Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 podstiče adheziju astrocita za podlogu i smanjuje migraciju, produkcijom adenzina i svojim adhezivnim svojstvima.** Astrociti sa manjim brojem eN/CD73 molekula na površini ćelije brže migriraju u testu migracije. Imajući u vidu uticaj adenzina na usporenje migracije, kao i ulogu eN/CD73 kao ćelijskog adhezivnog molekula, može se zaključiti da eN/CD73 ima direktnu ulogu u adheziji i migraciji astrocita u ćelijskoj kulturi, kako zbog svoje katalitičke aktivnosti i produkcije adenzina, tako i kao ćelijski adhezivni molekul.
- 6) **Proinflamatorni citokini direktno regulišu ekspresiju eN/CD73 u astrocitima.** Citokini IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, ATP i LPS povećavaju ekspresiju eN/CD73 na genskom i proteinskom nivou, a dovode i do posttranslacionih promena koji modulišu funkcionalne odlike enzima. U kontekstu A1/A2 polarizacije astrocita, može se zaključiti da i citokini koji polarizuju astrocite prema toksičnom A1 fenotipu (TNF- α , IL-1 β i LPS), kao i citokini koji usmjeravaju astrocite prema neuroprotektivnom A2 fenotipu, povećavaju ekspresiju eN/CD73. To navodi na zaključak da je povećanje ekspresije eN/CD73 jedan od univerzalnih aspekata reaktivne astroglioze, nezavisno od funkcionalne polarizacije astrocita na A1 ili A2.

Sumirajući sve prethodno navedeno, može se izvesti generalni zaključak:

Ekto-5'-nukleotidaza/CD73 ima brojne i specifične uloge u procesu aktivacije astrocita, jer se ushodna regulacija ovog enzima javlja kod svih reaktivnih astrocita nezavisno od njihove funkcionalne polarizacije. Imajući u vidu ulogu eN/CD73 u produkciji adenzina, u interakcijama ćelija sa podlogom kao i prenosu vanćelijskih signala i aktivaciji unutarćelijskih signalinih puteva, modulacija ekspresije i aktivnosti eN/CD73 putem farmakološke, imunološke i/ili genske intervencije može biti potencijalni terapijski pristup u bolestima centralnog nervnog sistema.

LITERATURA

1. Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 41-53.
2. Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences* 32, 19-29.
3. Abbracchio, M.P. and Ceruti, S. (2006) Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal* 2, 595-604.
4. Airas, L., Hellman, J., Salmi, M., Bono, P., Puurunen, T., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1995) CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *The Journal of experimental medicine* 182, 1603-1608.
5. Airas, L., Niemela, J., and Jalkanen, S. (2000) CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165, 5411-5417.
6. Airas, L., Niemela, J., Salmi, M., Puurunen, T., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1997) Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *The Journal of cell biology* 136, 421-431.
7. Airas, L., Niemela, J., Yegutkin, G., and Jalkanen, S. (2007) Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1110, 641-648.
8. Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C., and Stagg, J. (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological reviews* 276, 121-144.
9. Alvarez, J.I., Katayama, T., and Prat, A. (2013) Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61, 1939-1958.
10. Amor, S., Puentes, F., Baker, D., and van der Valk, P. (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154-169.
11. Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology* 113, 548-555.
12. Andrade, C.M., Lopez, P.L., Noronha, B.T., Wink, M.R., Borojevic, R., Margis, R., . . . Guma, F.C. (2011) Ecto-5'-nucleotidase/CD73 knockdown increases cell migration and mRNA level of collagen I in a hepatic stellate cell line. *Cell and tissue research* 344, 279-286.
13. Andree, T., Gutensohn, W., and Kummer, U. (1987) Is ecto-5'-nucleotidase essential for stimulation of human lymphocytes? Evidence against a role of the enzyme as mitogenic lectin receptor. *Immunobiology* 175, 214-225.
14. Antonioli, L., Blandizzi, C., Malavasi, F., Ferrari, D., and Haskó, G. (2016a) Anti-CD73 immunotherapy: A viable way to reprogram the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 5, e1216292-e1216292.

15. Antonioli, L., Fornai, M., Blandizzi, C., Pacher, P., and Hasko, G. (2019) Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. *Immunology letters* 205, 9-15.
16. Antonioli, L., Novitskiy, S.V., Sachsenmeier, K.F., Fornai, M., Blandizzi, C., and Hasko, G. (2017) Switching off CD73: a way to boost the activity of conventional and targeted antineoplastic therapies. *Drug discovery today* 22, 1686-1696.
17. Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Hasko, G. (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 19, 355-367.
18. Antonioli, L., Yegutkin, G.G., Pacher, P., Blandizzi, C., and Haskó, G. (2016b) Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in cancer* 2, 95-109.
19. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* 22, 208-215.
20. Ashton, R.S., Conway, A., Pangarkar, C., Bergen, J., Lim, K.I., Shah, P., . . . Schaffer, D.V. (2012) Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nature neuroscience* 15, 1399-1406.
21. Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A. (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232-243.
22. Augusto, E., Matos, M., Sevigny, J., El-Tayeb, A., Bynoe, M.S., Muller, C.E., . . . Chen, J.F. (2013) Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 11390-11399.
23. Aungst, S.L., Kabadi, S.V., Thompson, S.M., Stoica, B.A., and Faden, A.I. (2014) Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34, 1223-1232.
24. Avila-Munoz, E. and Arias, C. (2014) When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing research reviews* 18, 29-40.
25. Bailly, Y., Schoen, S.W., Delhay-Bouchaud, N., Kreutzberg, G.W., and Mariani, J. (1990) [Synaptic localization of 5'-nucleotidase activity in the cerebellar cortex in adult rats irradiated by X rays after birth]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 311, 487-493.
26. Baron, M.D. and Luzio, J.P. (1987) The synthesis and turnover of 5'-nucleotidase in primary cultured hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta* 927, 81-85.
27. Barros-Barbosa, A.R., Ferreirinha, F., Oliveira, A., Mendes, M., Lobo, M.G., Santos, A., . . . Correia-de-Sa, P. (2016) Adenosine A2A receptor and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are upregulated in hippocampal astrocytes of human patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). *Purinergic Signal* 12, 719-734.
28. Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A.R., Rockenbach, L., Farias, P.F., . . . Battastini, A.M. (2008) The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and cellular biochemistry* 319, 61-68.

29. Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, Pierre J. (2011) Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell metabolism* 14, 724-738.
30. Belanger, M. and Magistretti, P.J. (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues in clinical neuroscience* 11, 281-295.
31. Bianchi, V. and Spychala, J. (2003) Mammalian 5'-nucleotidases. *The Journal of biological chemistry* 278, 46195-46198.
32. Bjelobaba, I., Parabucki, A., Lavnja, I., Stojkov, D., Dacic, S., Pekovic, S., . . . Nedeljkovic, N. (2011) Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *Journal of neuroscience research* 89, 862-873.
33. Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Lavnja, I., Stojkov, D., Pekovic, S., Dacic, S., . . . Nedeljkovic, N. (2009) Regional changes in ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rat. *General physiology and biophysics* 28 Spec No, 62-68.
34. Boison, D. (2006) Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends in pharmacological sciences* 27, 652-658.
35. Boison, D. (2012) Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia* 60, 1234-1243.
36. Boison, D., Chen, J.F., and Fredholm, B.B. (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell death and differentiation* 17, 1071-1082.
37. Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., . . . Mann, J.J. (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell stem cell* 22, 589-599.e585.
38. Bonan, C.D. (2012) Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. *CNS & neurological disorders drug targets* 11, 739-750.
39. Bonan, C.D., Walz, R., Pereira, G.S., Worm, P.V., Battastini, A.M., Cavalheiro, E.A., . . . Sarkis, J.J. (2000) Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 39, 229-238.
40. Borroto-Escuela, D.O., Hinz, S., Navarro, G., Franco, R., Müller, C.E., and Fuxe, K. (2018) Understanding the Role of Adenosine A2AR Heteroreceptor Complexes in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Frontiers in neuroscience* 12, 43-43.
41. Bours, M.J., Dagnelie, P.C., Giuliani, A.L., Wesselius, A., and Di Virgilio, F. (2011) P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 3, 1443-1456.
42. Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 112, 358-404.
43. Boyle, J.M., Hey, Y., Grzeschik, K.H., Thompson, L., Munro, E., and Fox, M. (1989) Regional localization of human ecto-5' nucleotidase to chromosome 6q14-q21. *Human genetics* 83, 179-180.
44. Braun, N., Brendel, P., and Zimmermann, H. (1995) Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Developmental Brain Research* 88, 79-86.
45. Braun, N., Zhu, Y., Kriegstein, J., Culmsee, C., and Zimmermann, H. (1998) Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient

- forebrain ischemia in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 4891-4900.
46. Brisevac, D., Adzic, M., Laketa, D., Parabucki, A., Milosevic, M., Lavrnja, I., . . . Nedeljkovic, N. (2015) Extracellular ATP Selectively Upregulates Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 and Ecto-5'-Nucleotidase by Rat Cortical Astrocytes In Vitro. *Journal of molecular neuroscience : MN* 57, 452-462.
 47. Brisevac, D., Bjelobaba, I., Bajic, A., Clarner, T., Stojiljkovic, M., Beyer, C., . . . Nedeljkovic, N. (2012) Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochemistry international* 61, 681-688.
 48. Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., . . . Hunot, S. (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 119, 182-192.
 49. Brosicke, N. and Faissner, A. (2015) Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell adhesion & migration* 9, 131-140.
 50. Burda, J.E. and Sofroniew, M.V. (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229-248.
 51. Burnstock, G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87, 659-797.
 52. Burnstock, G., Fredholm, B.B., and Verkhratsky, A. (2011) Adenosine and ATP receptors in the brain. *Current topics in medicinal chemistry* 11, 973-1011.
 53. Burnstock, G. and Knight, G.E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology* 240, 31-304.
 54. Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., . . . Sofroniew, M.V. (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297-308.
 55. Cao, X., Li, L.P., Qin, X.H., Li, S.J., Zhang, M., Wang, Q., . . . Zhu, X.H. (2013) Astrocytic adenosine 5'-triphosphate release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 1633-1643.
 56. Cappellari, A.R., Rockenbach, L., Dietrich, F., Clarimundo, V., Glaser, T., Braganhol, E., . . . Battastini, A.M. (2012) Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell lines: ecto-5'NT/CD73 in metastasis as potential prognostic factor. *PloS one* 7, e47468.
 57. Carrero, I., Gonzalo, M.R., Martin, B., Sanz-Anquela, J.M., Arevalo-Serrano, J., and Gonzalo-Ruiz, A. (2012) Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* 236, 215-227.
 58. Cassé, F., Richetin, K., and Toni, N. (2018) Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 12, 432-432.

59. Cekanaviciute, E. and Buckwalter, M.S. (2016) Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics* 13, 685-701.
60. Cekanaviciute, E., Dietrich, H.K., Axtell, R.C., Williams, A.M., Egusquiza, R., Wai, K.M., . . . Buckwalter, M.S. (2014) Astrocytic TGF-beta signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system Toxoplasma infection. *J Immunol* 193, 139-149.
61. Chen, J.F., Lee, C.F., and Chern, Y. (2014) Adenosine receptor neurobiology: overview. *International review of neurobiology* 119, 1-49.
62. Chen, W.W., Zhang, X., and Huang, W.J. (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular medicine reports* 13, 3391-3396.
63. Chen, Y., Vartiainen, N.E., Ying, W., Chan, P.H., Koistinaho, J., and Swanson, R.A. (2001) Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of neurochemistry* 77, 1601-1610.
64. Christensen, L.D., Andersen, V., and Ryder, L. (1996) Decreased number of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) molecules on lymphocytes from patients with primary immunoglobulin deficiencies. Correlation between number of CD73 molecules and T-lymphocyte function in vitro. *Scandinavian journal of immunology* 44, 62-70.
65. Chu, S., Xiong, W., and Parkinson, F.E. (2014) Effect of ecto-5'-nucleotidase (eN) in astrocytes on adenosine and inosine formation. *Purinergic signalling* 10, 603-609.
66. Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Ballerini, P., Ambrosini, G., Giuliani, P., Tiboni, G.M., and Caciagli, F. (1994) Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research* 39, 556-566.
67. Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, I., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., . . . Rathbone, M.P. (2000) Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29, 202-211.
68. Cieślak, M., Komoszyński, M., and Wojtczak, A. (2008) Adenosine A(2A) receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic signalling* 4, 305-312.
69. Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Munch, A.E., Heiman, M., and Barres, B.A. (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1896-E1905.
70. Clifford, E.E., Martin, K.A., Dalal, P., Thomas, R., and Dubyak, G.R. (1997) Stage-specific expression of P2Y receptors, ecto-apyrase, and ecto-5'-nucleotidase in myeloid leukocytes. *The American journal of physiology* 273, C973-987.
71. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* 63, 641-683.
72. Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., and Thompson, L.F. (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2, 351-360.
73. Colombo, E. and Farina, C. (2016) Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37, 608-620.

74. Colonna, M. and Butovsky, O. (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual review of immunology* 35, 441-468.
75. Colton, C.A. (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 399-418.
76. Coulthard, L.G., Hawksworth, O.A., and Woodruff, T.M. (2018) Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain. *Trends in neurosciences* 41, 373-384.
77. Cruz-Haces, M., Tang, J., Acosta, G., Fernandez, J., and Shi, R. (2017) Pathological correlations between traumatic brain injury and chronic neurodegenerative diseases. *Translational neurodegeneration* 6, 20-20.
78. Cunha, R.A. (2001) Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochemical research* 26, 979-991.
79. Cunha, R.A. (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic signalling* 1, 111-134.
80. Cunha, R.A. (2016) How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *Journal of neurochemistry* 139, 1019-1055.
81. Cunha, R.A., Brendel, P., Zimmermann, H., and Ribeiro, J.A. (2000) Immunologically distinct isoforms of ecto-5'-nucleotidase in nerve terminals of different areas of the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 74, 334-338.
82. Cunha, R.A., Ferre, S., Vaugeois, J.M., and Chen, J.F. (2008) Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Current pharmaceutical design* 14, 1512-1524.
83. Cunha, R.A., Johansson, B., Constantino, M.D., Sebastiao, A.M., and Fredholm, B.B. (1996) Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H] CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353, 261-271.
84. Daneman, R. and Prat, A. (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a020412.
85. Dani, J.W., Chernjavsky, A., and Smith, S.J. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8, 429-440.
86. Daniels, B.P., Jujjavarapu, H., Durrant, D.M., Williams, J.L., Green, R.R., White, J.P., . . . Klein, R.S. (2017) Regional astrocyte IFN signaling restricts pathogenesis during neurotropic viral infection. *J Clin Invest* 127, 843-856.
87. Dare, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., and Fredholm, B.B. (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiology & behavior* 92, 15-20.
88. Del Puerto, A., Wandosell, F., and Garrido, J.J. (2013) Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 197-197.
89. DePierre, J.W. and Karnovsky, M.L. (1974) Ecto-enzyme of granulocytes: 5'-nucleotidase. *Science (New York, N.Y.)* 183, 1096-1098.
90. Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinnes, K.M., Carihfield, A., Lynch, K.R., and Kipnis, J. (2010) Regulation of learning and memory by meningeal

- immunity: a key role for IL-4. *The Journal of experimental medicine* 207, 1067-1080.
91. Di Virgilio, F. (2000) Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *Journal of the autonomic nervous system* 81, 59-63.
 92. Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., and Abbracchio, M.P. (2009) Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends in neurosciences* 32, 79-87.
 93. Ding, Y., Zhang, K., Liu, S., Zhang, Q., Ma, C., Bruce, I.C., and Zhang, X. (2014) Tumor necrosis factor- α promotes the expression of excitatory amino-acid transporter 2 in astrocytes: Optimal concentration and incubation time. *Experimental and therapeutic medicine* 8, 1909-1913.
 94. DiSabato, D.J., Quan, N., and Godbout, J.P. (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 2, 136-153.
 95. Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, 649-671.
 96. Dubbelaar, M.L., Kracht, L., Eggen, B.J.L., and Boddeke, E. (2018) The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Frontiers in immunology* 9, 1753.
 97. During, M.J. and Spencer, D.D. (1992) Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Annals of neurology* 32, 618-624.
 98. Eddleston, M. and Mucke, L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36.
 99. Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Furuta, G.T., Leonard, M.O., Jacobson, K.A., Enjyoji, K., . . . Colgan, S.P. (2003) Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *The Journal of experimental medicine* 198, 783-796.
 100. Engelhardt, B. (2018) Cluster: barriers of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 135, 307-310.
 101. Engelhardt, B., Vajkoczy, P., and Weller, R.O. (2017) The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology* 18, 123.
 102. Faden, A.I. and Loane, D.J. (2015) Chronic Neurodegeneration After Traumatic Brain Injury: Alzheimer Disease, Chronic Traumatic Encephalopathy, or Persistent Neuroinflammation? *Neurotherapeutics* 12, 143-150.
 103. Faden, A.I., Wu, J., Stoica, B.A., and Loane, D.J. (2016) Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *British journal of pharmacology* 173, 681-691.
 104. Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28, 138-145.
 105. Farmer, W.T. and Murai, K. (2017) Resolving Astrocyte Heterogeneity in the CNS. *Front Cell Neurosci* 11, 300.
 106. Fenoglio, C., Necchi, D., Civallero, M., Ceroni, M., and Nano, R. (1997) Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5' nucleotidase in human glioblastoma. *Anticancer research* 17, 2507-2511.
 107. Feraud-Espinosa, I., Nieto-Sampedro, M., and Bovolenta, P. (1993) Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 8, 277-291.

108. Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., and Di Virgilio, F. (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of experimental medicine* 185, 579-582.
109. Fiebich, B.L., Akter, S., and Akundi, R.S. (2014) The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci* 8, 260.
110. Fiebich, B.L., Batista, C.R.A., Saliba, S.W., Yousif, N.M., and de Oliveira, A.C.P. (2018) Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 12, 329-329.
111. Fini, C., Palmerini, C.A., Damiani, P., Stochaj, U., Mannherz, H.G., and Floridi, A. (1990) 5'-nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. *Biochimica et biophysica acta* 1038, 18-22.
112. Fini, C., Talamo, F., Cherri, S., Coli, M., Floridi, A., Ferrara, L., and Scaloni, A. (2003) Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *The Biochemical journal* 372, 443-451.
113. Fischer, W., Norenberg, W., Franke, H., Schaefer, M., and Illes, P. (2009) Increase of intracellular Ca²⁺ by P2Y but not P2X receptors in cultured cortical multipolar neurons of the rat. *The Journal of comparative neurology* 516, 343-359.
114. Franke, H. and Illes, P. (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & therapeutics* 109, 297-324.
115. Franke, H., Krugel, U., and Illes, P. (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452, 622-644.
116. Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., and Illes, P. (2012) Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal* 8, 629-657.
117. Fredholm, B.B. (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell death and differentiation* 14, 1315-1323.
118. Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Linden, J., and Muller, C.E. (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews* 63, 1-34.
119. Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., and Wasserman, W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362, 364-374.
120. Fredholm, B.B., Cunha, R.A., and Svenningsson, P. (2003) Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Current topics in medicinal chemistry* 3, 413-426.
121. Gallo, F., Morale, M.C., Spina-Purrello, V., Tirolo, C., Testa, N., Farinella, Z., . . . Marchetti, B. (2000) Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts on both neurons and glia to mediate the neurotrophic effects of astrocytes on LHRH neurons in culture. *Synapse (New York, N.Y.)* 36, 233-253.
122. Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J.S., Cassina, P., and Barbeito, L. (2010) Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 7, 33.
123. Gao, Q., Li, Y., and Chopp, M. (2005) Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein

- kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience* 136, 123-134.
124. Gao, Z.W., Dong, K., and Zhang, H.Z. (2014) The roles of CD73 in cancer. *BioMed research international* 2014, 460654.
 125. Gao, Z.W., Wang, H.P., Lin, F., Wang, X., Long, M., Zhang, H.Z., and Dong, K. (2017) CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC cancer* 17, 135.
 126. Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 21-33.
 127. Geoghegan, J.C., Diedrich, G., Lu, X., Rosenthal, K., Sachsenmeier, K.F., Wu, H., . . . Damschroder, M.M. (2016) Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, non-competitive mechanism of action. *mAbs* 8, 454-467.
 128. Gomes, C.V., Kaster, M.P., Tome, A.R., Agostinho, P.M., and Cunha, R.A. (2011) Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 1380-1399.
 129. Grkovic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Mitrovic, N., Drakulic, D., Stanojlovic, M., and Horvat, A. (2014) Developmental increase in ecto-5'-nucleotidase activity overlaps with appearance of two immunologically distinct enzyme isoforms in rat hippocampal synaptic plasma membranes. *Journal of molecular neuroscience : MN* 54, 109-118.
 130. Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L., and Oliveira, J.F. (2018a) Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. *Front Cell Neurosci* 11, 427-427.
 131. Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L., and Oliveira, J.F. (2018b) Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11.
 132. Hanamsagar, R., Hanke, M.L., and Kielian, T. (2012) Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology* 33, 333-342.
 133. Hansen, K.R., Resta, R., Webb, C.F., and Thompson, L.F. (1995) Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene* 167, 307-312.
 134. Haroon, F., Drogemuller, K., Handel, U., Brunn, A., Reinhold, D., Nishanth, G., . . . Schluter, D. (2011) Gp130-dependent astrocytic survival is critical for the control of autoimmune central nervous system inflammation. *J Immunol* 186, 6521-6531.
 135. Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., . . . Appel, S.H. (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of neurology* 55, 221-235.
 136. Heuts, D.P., Weissenborn, M.J., Olkhov, R.V., Shaw, A.M., Gummadova, J., Levy, C., and Scrutton, N.S. (2012) Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 13, 2384-2391.

137. Hindinger, C., Bergmann, C.C., Hinton, D.R., Phares, T.W., Parra, G.I., Hussain, S., . . . Stohlman, S.A. (2012) IFN-gamma signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. *PLoS One* 7, e42088.
138. Howarth, C. (2014) The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Frontiers in neuroscience* 8, 103.
139. Hsiao, H.Y., Chen, Y.C., Chen, H.M., Tu, P.H., and Chern, Y. (2013) A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor-kappaB-dependent inflammation in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 22, 1826-1842.
140. Humphries, A.C. and Mlodzik, M. (2018) From instruction to output: Wnt/PCP signaling in development and cancer. *Current opinion in cell biology* 51, 110-116.
141. Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S., and Spsychala, J. (2005) The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics* 107, 1-30.
142. Jacques-Silva, M.C., Rodnight, R., Lenz, G., Liao, Z., Kong, Q., Tran, M., . . . Neary, J.T. (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *British journal of pharmacology* 141, 1106-1117.
143. Jakovljevic, M., Lavrnja, I., Bozic, I., Savic, D., Bjelobaba, I., Pekovic, S., . . . Laketa, D. (2017) Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in cellular neuroscience* 11, 333.
144. Jessen, N.A., Munk, A.S., Lundgaard, I., and Nedergaard, M. (2015) The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* 40, 2583-2599.
145. Jha, M.K., Lee, W.H., and Suk, K. (2016) Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochemical pharmacology* 103, 1-16.
146. John, G.R., Chen, L., Rivieccio, M.A., Melendez-Vasquez, C.V., Hartley, A., and Brosnan, C.F. (2004) Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 2837-2845.
147. Kalsi, K., Lawson, C., Dominguez, M., Taylor, P., Yacoub, M.H., and Smolenski, R.T. (2002) Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF-alpha in human endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry* 232, 113-119.
148. Khakh, B.S. and McCarthy, K.D. (2015) Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020404.
149. Kielian, T. (2006) Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research* 83, 711-730.
150. Kigerl, K.A., de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Popovich, P.G., and Keane, R.W. (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258, 5-16.
151. Kim, S.G., Soltysiak, K.A., Gao, Z.-G., Chang, T.-S., Chung, E., and Jacobson, K.A. (2003) Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in astrocytes is prevented by the activation of P2Y6, but not P2Y4 nucleotide receptors. *Biochemical pharmacology* 65, 923-931.

152. Kinoshita, T. (2016) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *Journal of lipid research* 57, 4-5.
153. Kirby, E.D., Muroy, S.E., Sun, W.G., Covarrubias, D., Leong, M.J., Barchas, L.A., and Kaufer, D. (2013) Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *Elife* 2, e00362-e00362.
154. Kitakaze, M., Node, K., Asanuma, H., Takashima, S., Sakata, Y., Asakura, M., . . . Hori, M. (2000) Protein tyrosine kinase is not involved in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning in canine hearts. *Circulation research* 87, 303-308.
155. Klein, R.S. and Hunter, C.A. (2017) Protective and Pathological Immunity during Central Nervous System Infections. *Immunity* 46, 891-909.
156. Knapp, K., Zebisch, M., Pippel, J., El-Tayeb, A., Müller, Christa E., and Sträter, N. (2012) Crystal Structure of the Human Ecto-5'-Nucleotidase (CD73): Insights into the Regulation of Purinergic Signaling. *Structure* 20, 2161-2173.
157. Knofel, T. and Sträter, N. (2001) E. coli 5'-nucleotidase undergoes a hinge-bending domain rotation resembling a ball-and-socket motion. *Journal of molecular biology* 309, 255-266.
158. Kornyei, Z., Czirok, A., Vicsek, T., and Madarasz, E. (2000) Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. *Journal of neuroscience research* 61, 421-429.
159. Kovacs, Z., Dobolyi, A., Kekesi, K.A., and Juhasz, G. (2013) 5'-nucleotidases, nucleosides and their distribution in the brain: pathological and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry* 20, 4217-4240.
160. Kovacs, Z., Juhasz, G., Palkovits, M., Dobolyi, A., and Kekesi, K.A. (2011) Area, age and gender dependence of the nucleoside system in the brain: a review of current literature. *Current topics in medicinal chemistry* 11, 1012-1033.
161. Laketa, D., Savic, J., Bjelobaba, I., Lavrnja, I., Vasic, V., Stojiljkovic, M., and Nedeljkovic, N. (2015) Brain Injury Alters Ectonucleotidase Activities and Adenine Nucleotide Levels in Rat Serum. *Journal of medical biochemistry* 34, 215-222.
162. 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 5473-5480.
163. Lampugnani, M.G. (1999) Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 96, 177-182.
164. Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., and Zimmermann, H. (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell and tissue research* 334, 199-217.
165. Lavrnja, I., Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Pekovic, S., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., and Nedeljkovic, N. (2009) Time-course changes in ectonucleotidase activities during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochemistry international* 55, 193-198.

166. Lavrnja, I., Laketa, D., Savic, D., Bozic, I., Bjelobaba, I., Pekovic, S., and Nedeljkovic, N. (2015) Expression of a second ecto-5'-nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of molecular neuroscience : MN* 55, 898-911.
167. Lechtenberg, B.C., Mace, P.D., and Riedl, S.J. (2014) Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. *Current opinion in structural biology* 29, 17-25.
168. Lehnardt, S. (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253-263.
169. Lehto, M.T. and Sharom, F.J. (1998) Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *The Biochemical journal* 332 (Pt 1), 101-109.
170. Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W.J., . . . Neary, J.T. (2000) P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes. *British journal of pharmacology* 129, 927-936.
171. Lewis, D.K., Woodin, H.R., and Sohrabji, F. (2008) Astrocytes from acyclic female rats exhibit lowered capacity for neuronal differentiation. *Aging cell* 7, 836-849.
172. Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A.C., Fowler, S.W., . . . Zheng, H. (2015) NFkappaB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85, 101-115.
173. Liddelow, S.A. and Barres, B.A. (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957-967.
174. Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., . . . Barres, B.A. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487.
175. Linden, J. (2005) Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Molecular pharmacology* 67, 1385-1387.
176. Linden, J. (2011) Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv Pharmacol* 61, 95-114.
177. Liu, C.-Y., Yang, Y., Ju, W.-N., Wang, X., and Zhang, H.-L. (2018) Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12, 193.
178. Livne-Bar, I., Lam, S., Chan, D., Guo, X., Askar, I., Nahirnyj, A., . . . Sivak, J.M. (2016) Pharmacologic inhibition of reactive gliosis blocks TNF- α -mediated neuronal apoptosis. *Cell Death & Disease* 7, e2386.
179. Louveau, A., Plog, B.A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., and Kipnis, J. (2017) Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *The Journal of clinical investigation* 127, 3210-3219.
180. Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J.D.R., . . . Nedergaard, M. (2015) Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature Communications* 6, 6807.
181. Marques-Fernandez, F., Planells-Ferrer, L., Gozzelino, R., Galenkamp, K.M., Reix, S., Llecha-Cano, N., . . . Comella, J.X. (2013) TNF α induces survival through

- the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *Cell death & disease* 4, e493.
182. Martinez-Martinez, A., Munoz-Delgado, E., Campoy, F.J., Flores-Flores, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fini, C., and Vidal, C.J. (2000) The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds. *Biochimica et biophysica acta* 1478, 300-308.
 183. Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 27, 229-265.
 184. Mathern, D.R. and Heeger, P.S. (2015) Molecules Great and Small: The Complement System. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10, 1636-1650.
 185. Matos, M., Shen, H.Y., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C.J., Wang, Y.T., . . . Chen, J.F. (2015) Deletion of adenosine A2A receptors from astrocytes disrupts glutamate homeostasis leading to psychomotor and cognitive impairment: relevance to schizophrenia. *Biological psychiatry* 78, 763-774.
 186. McCarthy, K.D. and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology* 85, 890-902.
 187. McCauley, M.E. and Baloh, R.H. (2018) Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta neuropathologica*.
 188. McCoy, M.K. and Tansey, M.G. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5, 45.
 189. McGeer, P.L., Lee, M., and McGeer, E.G. (2017) A review of human diseases caused or exacerbated by aberrant complement activation. *Neurobiology of Aging* 52, 12-22.
 190. Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y. (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168-1175.
 191. Meflah, K., Bernard, S., and Massoulie, J. (1984) Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase in different cell types. *Biochimie* 66, 59-69.
 192. Mehul, B., Aubery, M., Mannherz, H.G., and Codogno, P. (1993) Dual mechanism of laminin modulation of ecto-5'-nucleotidase activity. *Journal of cellular biochemistry* 52, 266-274.
 193. Melani, A., Amadio, S., Gianfriddo, M., Vannucchi, M.G., Volonte, C., Bernardi, G., . . . Sancesario, G. (2006) P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26, 974-982.
 194. Melani, A., Corti, F., Stephan, H., Muller, C.E., Donati, C., Bruni, P., . . . Pedata, F. (2012) Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Experimental neurology* 233, 193-204.

195. Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences* 36, 587-597.
196. Migheli, A., Piva, R., Atzori, C., Troost, D., and Schiffer, D. (1997) c-Jun, JNK/SAPK kinases and transcription factor NF-kappa B are selectively activated in astrocytes, but not motor neurons, in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 1314-1322.
197. Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S., and Ikehara, Y. (1990a) Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *The Journal of biological chemistry* 265, 2178-2183.
198. Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S., and Ikehara, Y. (1990b) Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *European journal of biochemistry* 191, 563-569.
199. Molofsky, A.V., Krencik, R., Ullian, E.M., Tsai, H.H., Deneen, B., Richardson, W.D., . . . Rowitch, D.H. (2012) Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26, 891-907.
200. Morales, I., Farías, G.A., Cortes, N., and Maccioni, R.B. (2016) Neuroinflammation and Neurodegeneration.
201. Morgan, B.P. (2015) The role of complement in neurological and neuropsychiatric diseases. *Expert review of clinical immunology* 11, 1109-1119.
202. Morote-Garcia, J.C., Sanchez Del Campo, L.F., Campoy, F.J., Vidal, C.J., and Munoz-Delgado, E. (2006) The increased ecto-5'-nucleotidase activity in muscle, heart and liver of laminin alpha2-deficient mice is not caused by an elevation in the mRNA content. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1092-1101.
203. Mouzon, B.C., Bachmeier, C., Ferro, A., Ojo, J.O., Crynen, G., Acker, C.M., . . . Crawford, F. (2014) Chronic neuropathological and neurobehavioral changes in a repetitive mild traumatic brain injury model. *Annals of neurology* 75, 241-254.
204. Mrak, R.E. and Griffin, W.S.T. (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging* 26, 349-354.
205. Naito, Y. and Lowenstein, J.M. (1985) 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Inhibition by adenine nucleotides and related compounds. *The Biochemical journal* 226, 645-651.
206. Navarro-González, J.A., García-Benayas, C., and Arenas, J. (1998) Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. *Clinical Chemistry* 44, 679-681.
207. Navarro, J.M., Olmo, N., Turnay, J., López-Conejo, M.T., and Lizarbe, M.A. (1998) Ecto-5'-nucleotidase from a human colon adenocarcinoma cell line. Correlation between enzyme activity and levels in intact cells. *Molecular and cellular biochemistry* 187, 121-131.
208. Neary, J.T. and Zimmermann, H. (2009) Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends in neurosciences* 32, 189-198.

209. Nedeljkovic, N. (2019) Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A2AR-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation. *Pharmacological Research* 144, 99-115.
210. Nedeljkovic, N., Bjelobaba, I., Subasic, S., Lavrnja, I., Pekovic, S., Stojkov, D., . . . Stojiljkovic, M. (2006) Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell biology international* 30, 541-546.
211. Nedergaard, M., Takano, T., and Hansen, A.J. (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3, 748-755.
212. Negi, N. and Das, B.K. (2018) CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International reviews of immunology* 37, 57-68.
213. Ng, S.K., Higashimori, H., Tolman, M., and Yang, Y. (2015) Suppression of adenosine 2a receptor (A2aR)-mediated adenosine signaling improves disease phenotypes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology* 267, 115-122.
214. Nguyen, M.D., Julien, J.P., and Rivest, S. (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227.
215. Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., . . . Peineau, S. (2013) The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT* 2, e22925-e22925.
216. Niemela, J., Ifergan, I., Yegutkin, G.G., Jalkanen, S., Prat, A., and Airas, L. (2008) IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. *European journal of immunology* 38, 2718-2726.
217. 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.
218. Nortley, R. and Attwell, D. (2017) Control of brain energy supply by astrocytes. *Current opinion in neurobiology* 47, 80-85.
219. Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45.
220. Ogata, S., Hayashi, Y., Misumi, Y., and Ikehara, Y. (1990) Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. *Biochemistry* 29, 7923-7927.
221. Ohana, G., Bar-Yehuda, S., Barer, F., and Fishman, P. (2001) Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *Journal of cellular physiology* 186, 19-23.
222. Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H., and Myers, R.R. (2004) TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine* 29, 1082-1088.
223. Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., . . . Okano, H. (2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature medicine* 12, 829-834.
224. Olmo, N., Turnay, J., Risse, G., Deutzmann, R., von der Mark, K., and Lizarbe, M.A. (1992) Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact

- cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin. *Biochemical Journal* 282, 181-188.
225. Olmos, G., Llad, #xf3, J., #xf2, and nia (2014) Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators of Inflammation* 2014, 12.
 226. Orr, A.G., Hsiao, E.C., Wang, M.M., Ho, K., Kim, D.H., Wang, X., . . . Mucke, L. (2015) Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nature neuroscience* 18, 423-434.
 227. Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.J., Gross, R.E., and Traynelis, S.F. (2009) Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nature neuroscience* 12, 872-878.
 228. Parsons, J.T., Martin, K.H., Slack, J.K., Taylor, J.M., and Weed, S.A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19, 5606-5613.
 229. Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 7817-7830.
 230. Perry, S.W., Dewhurst, S., Bellizzi, M.J., and Gelbard, H.A. (2002) Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *Journal of neurovirology* 8, 611-624.
 231. Petrovic-Djergovic, D., Hyman, M.C., Ray, J.J., Bouis, D., Visovatti, S.H., Hayasaki, T., and Pinsky, D.J. (2012) Tissue-resident ecto-5' nucleotidase (CD73) regulates leukocyte trafficking in the ischemic brain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188, 2387-2398.
 232. Pilz, R.B., Willis, R.C., and Seegmiller, J.E. (1982) Regulation of human lymphoblast plasma membrane 5'-nucleotidase by zinc. *The Journal of biological chemistry* 257, 13544-13549.
 233. Plog, B.A. and Nedergaard, M. (2018) The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual review of pathology* 13, 379-394.
 234. Puntambekar, S.S., Saber, M., Lamb, B.T., and Kokiko-Cochran, O.N. (2018) Cellular players that shape evolving pathology and neurodegeneration following traumatic brain injury. *Brain Behav Immun.*
 235. Quintana, F.J. (2017) Astrocytes to the rescue! Glia limitans astrocytic endfeet control CNS inflammation. *The Journal of clinical investigation* 127, 2897-2899.
 236. Quintas, C., Fraga, S., Goncalves, J., and Queiroz, G. (2011) P2Y receptors on astrocytes and microglia mediate opposite effects in astroglial proliferation. *Purinergic Signal* 7, 251-263.
 237. Quintas, C., Vale, N., Gonçalves, J., and Queiroz, G. (2018) Microglia P2Y13 Receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y1 Receptors. *Frontiers in Pharmacology* 9.
 238. Ransohoff, R.M. (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 353, 777-783.

239. Ransohoff, R.M. and Brown, M.A. (2012) Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 122, 1164-1171.
240. Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A., and Mulle, C. (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57, 121-134.
241. Rebola, N., Simoes, A.P., Canas, P.M., Tome, A.R., Andrade, G.M., Barry, C.E., . . . Cunha, R.A. (2011) Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *Journal of neurochemistry* 117, 100-111.
242. Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2013) New functions of Muller cells. *Glia* 61, 651-678.
243. Renner, N.A., Sansing, H.A., Inglis, F.M., Mehra, S., Kaushal, D., Lackner, A.A., and Maclean, A.G. (2013) Transient acidification and subsequent proinflammatory cytokine stimulation of astrocytes induce distinct activation phenotypes. *J Cell Physiol* 228, 1284-1294.
244. Resta, R., Hooker, S.W., Hansen, K.R., Laurent, A.B., Park, J.L., Blackburn, M.R., . . . Thompson, L.F. (1993) Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133, 171-177.
245. Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20, 570-577.
246. Rodrigues, R.J., Marques, J.M., and Cunha, R.A. (2018) Purinergic signalling and brain development. *Seminars in cell & developmental biology*.
247. Rodrigues, R.J., Tome, A.R., and Cunha, R.A. (2015) ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Frontiers in neuroscience* 9, 148.
248. Rossi, D. (2015) Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol* 130, 86-120.
249. Rothhammer, V. and Quintana, F.J. (2015) Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol* 37, 625-638.
250. Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., and Eliceiri, K.W. (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
251. Rusakov, D.A. (2015) Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nature reviews. Neuroscience* 16, 226-233.
252. Rusnakova, V., Honsa, P., Dzamba, D., Stahlberg, A., Kubista, M., and Anderova, M. (2013) Heterogeneity of astrocytes: from development to injury - single cell gene expression. *PLoS One* 8, e69734.
253. Russo, M.V. and McGavern, D.B. (2016) Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science* 353, 783.
254. Sadej, R., Inai, K., Rajfur, Z., Ostapkowicz, A., Kohler, J., Skladanowski, A.C., . . . Sychala, J. (2008) Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 35-40.
255. Sadej, R. and Skladanowski, A.C. (2012) Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta biochimica Polonica* 59, 647-652.

256. Sadej, R., Spychala, J., and Skladanowski, A.C. (2006a) Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 25, 1119-1123.
257. Sadej, R., Spychala, J., and Skladanowski, A.C. (2006b) Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma research* 16, 213-222.
258. Salter, M.W. and Beggs, S. (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158, 15-24.
259. Savic, V., Blanchard, A., Vlahovic, P., Stefanovic, V., Ardaillou, N., and Ardaillou, R. (1991) Cyclic adenosine monophosphate-stimulating agents induce ecto-5'-nucleotidase activity and inhibit DNA synthesis in rat cultured mesangial cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 290, 202-206.
260. Schafer, D.P. and Stevens, B. (2013) Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Current opinion in neurobiology* 23, 1034-1040.
261. Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., . . . Grassi, F. (2008) Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1 Hemichannels. *Science Signaling* 1, ra6.
262. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676.
263. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.
264. Schoen, S.W., Graeber, M.B., Toth, L., and Kreutzberg, G.W. (1988) 5'-Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Brain research* 467, 125-136.
265. Schoen, S.W., Graeber, M.B., Toth, L., and Kreutzberg, G.W. (1991) Synaptic 5'-nucleotidase is transient and indicative of climbing fiber plasticity during the postnatal development of rat cerebellum. *Brain research. Developmental brain research* 61, 125-138.
266. Schoen, S.W. and Kreutzberg, G.W. (1994) Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Experimental neurology* 127, 106-118.
267. Schoen, S.W., Leutenecker, B., Kreutzberg, G.W., and Singer, W. (1990) Ocular dominance plasticity and developmental changes of 5'-nucleotidase distributions in the kitten visual cortex. *The Journal of comparative neurology* 296, 379-392.
268. Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., and McKenna, M.C. (2014) Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Advances in neurobiology* 11, 13-30.
269. Sharom, F.J., McNeil, G.L., Glover, J.R., and Seier, S. (1996) Modulation of the cleavage of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by specific bacterial phospholipases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 74, 701-713.
270. Shigetomi, E., Bushong, E.A., Hausteiner, M.D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., . . . Khakh, B.S. (2013) Imaging calcium microdomains within entire

- astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol* 141, 633-647.
271. 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.
 272. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5522-5527.
 273. Silva, A.A., Silva, R.R., Gibaldi, D., Mariante, R.M., Dos Santos, J.B., Pereira, I.R., . . . Lannes-Vieira, J. (2017) Priming astrocytes with TNF enhances their susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. *Journal of neuroinflammation* 14, 182-182.
 274. Sofroniew, M.V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647.
 275. Sofroniew, M.V. (2014) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 20, 160-172.
 276. Sofroniew, M.V. (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 16, 249-263.
 277. Sofroniew, M.V. and Vinters, H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 7-35.
 278. Sousa, C., Golebiewska, A., Poovathingal, S.K., Kaoma, T., Pires-Afonso, Y., Martina, S., . . . Michelucci, A. (2018) Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO reports* 19.
 279. Sychala, J. and Kitajewski, J. (2004) Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Experimental cell research* 296, 99-108.
 280. Sychala, J., Mitchell, B.S., and Barankiewicz, J. (1997) Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158, 4947-4952.
 281. Sychala, J., Zimmermann, A.G., and Mitchell, B.S. (1999) Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *The Journal of biological chemistry* 274, 22705-22712.
 282. Stanojevic, I., Bjelobaba, I., Nedeljkovic, N., Drakulic, D., Petrovic, S., Stojiljkovic, M., and Horvat, A. (2011) Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29, 397-403.
 283. Stochaj, U., Richter, H., and Mannherz, H.G. (1990) Chicken gizzard 5'-nucleotidase is a receptor for the extracellular matrix component fibronectin. *European journal of cell biology* 51, 335-338.

284. Stockwell, J., Jakova, E., and Cayabyab, F.S. (2017) Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22.
285. Strater, N. (2006) Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic signalling* 2, 343-350.
286. Sullan, M.J., Asken, B.M., Jaffee, M.S., DeKosky, S.T., and Bauer, R.M. (2018) Glymphatic system disruption as a mediator of brain trauma and chronic traumatic encephalopathy. *Neurosci Biobehav Rev* 84, 316-324.
287. Sun, L., Li, Y., Jia, X., Wang, Q., Li, Y., Hu, M., . . . Ren, H. (2017) Neuroprotection by IFN- γ via astrocyte-secreted IL-6 in acute neuroinflammation. *Oncotarget* 8, 40065-40078.
288. Sun, M. and Zigman, S. (1978) An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical biochemistry* 90, 81-89.
289. Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., . . . Colgan, S.P. (2002) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation* 110, 993-1002.
290. Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience* 9, 260-267.
291. Tandon, P.N. (2016) *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies*. Springer.
292. Terp, M.G., Olesen, K.A., Arnspang, E.C., Lund, R.R., Lagerholm, B.C., Ditzel, H.J., and Leth-Larsen, R. (2013) Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191, 4165-4173.
293. Theodore, S., Cao, S., McLean, P.J., and Standaert, D.G. (2008) Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 1149-1158.
294. Thompson, L.F., Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Van De Wiele, C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C., and Colgan, S.P. (2004) Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *The Journal of experimental medicine* 200, 1395-1405.
295. Thompson, L.F. and Ruedi, J.M. (1988) Synthesis of immunoglobulin G by pokeweed mitogen- or Epstein-Barr virus-stimulated human B cells in vitro is restricted to the ecto-5'-nucleotidase positive subset. *The Journal of clinical investigation* 82, 902-905.
296. Thomson, L.F., Ruedi, J.M., Glass, A., Moldenhauer, G., Moller, P., Low, M.G., . . . Lucas, A.H. (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue antigens* 35, 9-19.

297. Turnay, J., Olmo, N., Risse, G., von der Mark, K., and Lizarbe, M.A. (1989) 5'-Nucleotidase Activity in Cultured Cell Lines. Effect of Different Assay Conditions and Correlation with Cell Proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 25, 1055-1061.
298. Tuttolomondo, A., Pecoraro, R., and Pinto, A. (2014) Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug design, development and therapy* 8, 2221-2238.
299. Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., and Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science (New York, N.Y.)* 291, 657-661.
300. van den Bosch, R., Geuze, H.J., du Maine, A.P., and Strous, G.J. (1986) Transport and metabolism of 5'-nucleotidase in a rat hepatoma cell line. *European journal of biochemistry* 160, 49-54.
301. van den Bosch, R.A., du Maine, A.P., Geuze, H.J., van der Ende, A., and Strous, G.J. (1988) Recycling of 5'-nucleotidase in a rat hepatoma cell line. *The EMBO journal* 7, 3345-3351.
302. Verkhratsky, A. and Burnstock, G. (2014) Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 697-705.
303. Verkhratsky, A. and Nedergaard, M. (2014) Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369, 20130595.
304. Vieira, C., Magalhães-Cardoso, M.T., Ferreira, F., Silva, I., Dias, A.S., Pelletier, J., . . . Correia-de-Sá, P. (2014) Feed-forward inhibition of CD73 and upregulation of adenosine deaminase contribute to the loss of adenosine neuromodulation in postinflammatory ileitis. *Mediators of inflammation* 2014, 254640-254640.
305. Villacara, A., Spatz, M., Dodson, R.F., Corn, C., and Bembry, J. (1989) Effect of arachidonic acid on cultured cerebromicrovascular endothelium: permeability, lipid peroxidation and membrane "fluidity". *Acta Neuropathologica* 78, 310-316.
306. Voet, S., Prinz, M., and van Loo, G. (2018) Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in molecular medicine*.
307. Vogel, M., Kowalewski, H.J., Zimmermann, H., Janetzko, A., Margolis, R.U., and Wollny, H.E. (1991) Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata* (electric ray) electric organ. *The Biochemical journal* 278 (Pt 1), 199-202.
308. Volkandt, W., Vogel, M., Pevsner, J., Misumi, Y., Ikehara, Y., and Zimmermann, H. (1991) 5'-nucleotidase from the electric ray electric lobe. Primary structure and relation to mammalian and procaryotic enzymes. *European journal of biochemistry* 202, 855-861.
309. Wada, I., Himeno, M., Furuno, K., and Kato, K. (1986) Biosynthesis and intracellular transport of rat liver 5'-nucleotidase. *The Journal of biological chemistry* 261, 2222-2227.
310. Wang, C.-C., Chio, C.-C., and Chang, C.-P. (2015) Early serum and microglial expression of tumor necrosis factor- α after experimental traumatic brain injury contributes to behavioral deficits. *The FASEB Journal* 29, 835.833.

311. Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., . . . Zhou, P. (2008) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 134, 365-372.
312. Wiese, S., Karus, M., and Faissner, A. (2012) Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in pharmacology* 3, 120.
313. Wilhelmsson, U., Faiz, M., de Pablo, Y., Sjoqvist, M., Andersson, D., Widestrand, A., . . . Pekny, M. (2012) Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30, 2320-2329.
314. Willis, C.L., Leach, L., Clarke, G.J., Nolan, C.C., and Ray, D.E. (2004) Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia* 48, 1-13.
315. Wilson, J.X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75, 1149-1163.
316. Wink, M.R., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Lenz, G., Zerbini, L.F., Libermann, T.A., . . . Robson, S.C. (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138, 421-432.
317. Woodcock, T. and Morganti-Kossmann, M.C. (2013) The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* 4, 18-18.
318. Xu, S., Shao, Q.Q., Sun, J.T., Yang, N., Xie, Q., Wang, D.H., . . . Qu, X. (2013) Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro-oncology* 15, 1160-1172.
319. Yang, J., Jiang, Z., Fitzgerald, D.C., Ma, C., Yu, S., Li, H., . . . Zhang, G.X. (2009) Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *J Clin Invest* 119, 3678-3691.
320. Yarrow, J.C., Perlman, Z.E., Westwood, N.J., and Mitchison, T.J. (2004) A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC biotechnology* 4, 21.
321. Yegutkin, G.G. (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta* 1783, 673-694.
322. Yegutkin, G.G. (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 49, 473-497.
323. Yuan, Y.M. and He, C. (2013) The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull* 29, 421-435.
324. Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., and Manley, G.T. (2009) Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*, 159-170.
325. Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 6391-6410.
326. Zhang, D., Xiong, W., Chu, S., Sun, C., Albeni, B.C., and Parkinson, F.E. (2012) Inhibition of hippocampal synaptic activity by ATP, hypoxia or oxygen-glucose deprivation does not require CD73. *PloS one* 7, e39772.

327. Zhi, X., Chen, S., Zhou, P., Shao, Z., Wang, L., Ou, Z., and Yin, L. (2007) RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clinical & experimental metastasis* 24, 439-448.
328. Zimmermann, H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The Biochemical journal* 285 (Pt 2), 345-365.
329. Zimmermann, H. (2011) Purinergic signaling in neural development. *Seminars in cell & developmental biology* 22, 194-204.
330. Zimmermann, H., Zebisch, M., and Sträter, N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signalling* 8, 437-502.
331. Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., . . . Schwartz, M. (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience* 9, 268-275.
332. 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. *Nature neuroscience* 6, 43-50.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija B. Adžić je rođena 23. aprila 1986. u Trebinju (Bosna i Hercegovina). Osnovnu školu i prirodno-matematički smjer gimnazije je završila u Nikšiću (Crna Gora). Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2005/2006. godine, smjer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2012. sa prosječnom ocjenom 9.34 odbranivši diplomski rad pod naslovom „Ekspresija subjedinića Nox2 zavisne NADPH oksidaze u mozgu pacova u animalnom modelu shizofrenije“. Doktorske studije je upisala školske 2012/2013. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u okviru studijskog programa Biologija, modul Eksperimentalna neurobiologija – od gena do ponašanja.

Od januara 2013. do septembra 2015. godine je bila angažovana kao istraživač pripravnik, a od septembra 2015. do danas kao istraživač saradnik na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u okviru nacionalnog projekta “Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (MPNTR, III41014).

Učestvovala je kao organizator i instruktor u okviru ljetnje škole „Uloga astrocita i oligodendrocita u bolesti i zdravlju“ održanoj 2014. u Istraživačkom centru Petnica (Srbija) pri projektu „DAAD Akademischer Neuaufbau Sudosteuroopa“. U okviru istog projekta je boravila na Institutu za farmakologiju i toksikologiju “Rudolf-Boehm”, u Lajpcigu (Nemačka). Bila je polaznik prestižne škole o astrocitima, 2015. godine u Bertinoru (Italija) – “IAS: Gliotransmission in the normal and diseased brain”, a u okviru COST akcije CA16119 je učestvovala u CellFit školi “Add a new dimension to cell culture” - A practical full immersion course on 3D matrix, održanoj 2019. godine u Unimont Campus-u, Ponte di Legno, (Italija).

Dobitnik je nagrade za najbolji naučni rad mladog istraživača u školskoj 2017/2018. godini od strane Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Takođe, angažovana je na izvođenju praktične nastave na kursu Opšta fiziologija na osnovnim studijama Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu od školske 2013/2014.

godine, kao student doktorand. Bila je član komisije za odbranu dva master rada. Dodatno, od 2013. godine je aktivno učestvovala u različitim manifestacijama naučnog karaktera kao što su „Nedelja svesti o mozgu“, „Noć istraživača“ i „Festival nauke“.

Marija Adžić je član Srpskog biološkog društva, Društva za neuronauke Srbije i Evropske federacije društava za neuronauke (FENS). Autor je ili koautor 5 naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima iz M20 kategorije (jedan M21a, jedan M21, dva M22 i jedan M23). Autor je brojnih saopštenja na međunarodnim skupovima iz kategorije M34. Mikrografija koja je uključena u naučni rad, čiji je Marija Adžić autor, je izborom urednika časopisa *Journal of Neuroscience Research* objavljena na naslovnoj stranici časopisa (Volume 95, Number 5, april 2017).

PRILOZI

1. Prilog 1 – Izjava o autorstvu
2. Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
3. Prilog 3 – Izjava o korišćenju
4. Publikacija PMID 29545748: Adzic, M., Nedeljkovic, N., (2018). Unveiling the Role of Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 in Astrocyte Migration by Using Pharmacological Tools. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 153.
<http://doi.org/10.3389/fphar.2018.00153>
5. Publikacija PMID 27714837: Adzic M, Stevanovic I, Josipovic N, Laketa D, Lavrnja I, Bjelobaba I, Bozic I, Jovanovic M, Milosevic M, Nedeljkovic N. (2017) Extracellular ATP induces graded reactive response of astrocytes and strengthens their antioxidative defense in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 1053-1066. <https://doi.org/10.1002/jnr.23950>

Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани-а Марија Б. Аџић

број индекса Б3054/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита

- 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, 22.7.2019.

Handwritten signature of Marija B. Azic in blue ink, written over a horizontal line.

Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Марија Б. Ацић

Број индекса Б3054/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита

Ментор проф. др Надежда Недељковић

Потписани/а Марија Б. Ацић

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, 22.7.2019.



Марија Ацић

Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита

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, 22.7.2019.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.