

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

Андреј Коренић

**МЕХАНИЗМИ ПРЕЖИВЉАВАЊА
АСТРОЦИТА ПАЦОВА У
МЕДИЈУМУ БЕЗ ГЛУКОЗЕ И У
УСЛОВИМА ХИПОКСИЈЕ *IN VITRO***

докторска дисертација

Београд, 2015.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Andrej Korenić

**THE MECHANISMS OF RAT
ASTROCYTES SURVIVAL IN THE
MEDIUM WITHOUT GLUCOSE AND
IN HYPOXIC CONDITIONS *IN
VITRO***

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2015

Ментор:

др **Лидија Раденовић**, редовни професор Биолошког факултета у Београду

Чланови комисије:

др **Павле Анђус**, редовни професор Биолошког факултета у Београду

др **Невена Зоговић**, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Експериментална истраживања ове докторске дисертације су урађена у Центру за ласерску микроскопију Биолошког факултета Универзитета у Београду и лабораторији Fraunhofer института за ћелијску терапију и имунологију, Лајпциг, Немачка.

Захваљујем се:

менторки, др Лидији Раденовић и др Павлу Анђусу на стрпљењу током мог вишегодишњег истраживачког рада, указаном поверењу и пруженим приликама за стручно усавршавање, као и на дискусијама резултата и помоћи при писању радова и изради ове докторске дисертације,

др Невени Зоговић на указаној помоћи и сугестијама током експерименталног рада и изради ове докторске дисертације,

др Ивану Спасојевићу на искри нових идеја и екстензивним дискусијама,

др Јоханесу Болцеу и др Миријам Питерс на указаном поверењу и помоћи у планирању експеримената,

као и свим колегама Центра за ласерску микроскопију и Фраунхофер института који су учинили тренутке неуспеха лаким, а успеха још срећнијим

Механизми преживљавања астроцита пацова у медијуму без глукозе и у условима хипоксије *in vitro*

Резиме

Увод. Познато је да астроцити преживљавају дуже излагања депривацији кисеоника и глукозе (OGD) и да преживљавају данима без нутријената у поређењу са изразито осетљивим неуронима. Разлози овако смањене осетљивости астроцита и даље нису довољно разјашњени. Шта више, промене мембранског потенцијала митохондрија (ψ_m) астроцита, као индикатора ћелијског енергетског метаболизма и вијабилности, нису испитане током симулиране реперфузије након дужег излагања OGD (односно 1 % O₂ без глукозе у присуству ограничене количине алтернативних нутријената). Смањена осетљивост астроцита може бити последица коришћења алтернативних ванћелијских извора енергије, као и унутарћелијских залиха енергије у циљу одржања мембранског потенцијала митохондрија. Стратегија преживљавања астроцита током таквих метаболичких изазова и даље није јасна.

Методe. У овој студији, култура астроцита изложена је депривацији глукозе (GD), OGD и њиховој сукцесивној комбинацији различитих трајања. Промене ψ_m , праћене путем промена у флуоресценцији JC-1, испитане су у току једног сата током симулиране реперфузије у циљу моделовања услова *in vivo*. Флуоресцентни обележивач митохондрија JC-1 улази у матрикс митохондрије у зависности од потенцијала мембране митохондрије, померајући при томе максимум флуоресценције из зеленог у црвени део спектра. Такође, ефекти фармаколошке инхибиције два битна метаболичка пута: аутофагије хлорокином (CQ) и липолизе орлистатом, испитани су током депривације нутријената. Праћен је утицај поменутих инхибиција на промене вијабилности астроцита бојењима са акридин наранџастим (АО) и пропидијум јодидом (PI), као и промене мембранског потенцијала митохондрија (JC-1).

Резултати. Показали смо да су астроцити отпорни на дуже периоде OGD (у трајању од 6 и 8 часова) која је имала слаб утицај на ψ_m током симулиране реперфузије, док је GD довела до хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрија астроцита.

Накнадна хемијска хипоксија изазвана третманом са натријум азидом довела је до деполаризације митохондрија, али је њихова реакција на такав третман након OGD била одложена у односу на нормоксичне услове. Када је GD у трајању од 12 часова претходила OGD, пораст ψ_m изазван је и са GD и са накнадном OGD, али значајна интеракција између њихових ефеката није забележена. Међутим, када је GD продужена на 48 часова, имала је синергистичан ефекат са накнадном OGD изазивајући додатно повећање мембранског потенцијала митохондрија астроцита.

Инхибиција аутофагије није показала значајан ефекат на преживљавање астроцита све до 8-9 часа депривације нутријената. Показали смо и да краткотрајна инхибиција аутофагије чини астроците осетљивим на депривацију нутријената. Инхибиција липолизе довела је до смрти ћелија, али је до ње дошло знатно касније у поређењу са инхибицијом аутофагије. Такође, оба инхибитора спречила су пораст мембранског потенцијала митохондрија изазван депривацијом нутријената.

Закључци. Један од најбитнијих закључака ове студије јесте да астроцити одржавају мембрански потенцијал митохондрија хиперполаризованим током депривације нутријената и OGD. Такође смо истакли значај два основна супстрата ланца транспорта електрона (глукозе и кисеоника) у хиперполаризацији мембране митохондрија и релевантност добијених резултата за отпорност астроцита на исхемичну повреду *in vitro*. Ови резултати такође показују да су аутофагија и липолиза есенцијалне за преживљавање астроцита током депривације нутријената, што може представљати адаптацију која је блиско повезана са улогом астроцита у подршци неуронима у обављању њихове функције.

Кључне речи: астроцити, исхемија, мембрански потенцијал митохондрија, аутофагија, липолиза

Научна област: неуронауке

Ужа научна област: неурофизиологија са биофизиком

UDK број: 57.085:616.831-005.1 (043.3)

The mechanisms of rat astrocytes survival in the medium without glucose and in hypoxic conditions *in vitro*

Abstract

Introduction. Astrocytes are known to tolerate long periods of oxygen-glucose deprivation (OGD) and they survive nutrient deprivation (ND) for days as compared to rather vulnerable neurons. The reasons for this reduced vulnerability of astrocytes are not well understood. In fact, changes in mitochondrial membrane potential (ψ_m), as the indicator of the cellular energy metabolism and viability, have not been investigated during simulated reperfusion after extended OGD exposure (i.e. 1 % of O₂ without glucose in the presence of limited alternative nutrients). This reduced vulnerability could be due to utilization of the alternative extracellular sources of energy, as well as utilization of the internal energy stores, in maintenance of mitochondrial membrane potential. The pro-survival strategy of astrocytes under such metabolic challenge is still not clear.

Methods. Here, we subjected astrocytes in culture to glucose deprivation (GD), OGD and combinations of both conditions varying in duration and sequence. Changes in ψ_m , visualized by the change in the fluorescence of JC-1, were investigated within one hour after reconstitution of oxygen and glucose supply, intended to model *in vivo* reperfusion. Fluorescent probe JC-1 enters the mitochondrial matrix in a potential-dependent manner, thus shifting its emission from green to red. Furthermore, the effects of inhibition of two potential steps in energy acquisition during ND: autophagy using chloroquine (CQ) and lipolysis using orlistat were investigated. Changes in astrocytes viability were followed with acridine orange (AO) and propidium iodide (PI) staining, and ψ_m was followed with JC-1.

Results. We showed that astrocytes were resilient to extended periods of OGD (6 and 8 h), which had little effect on ψ_m during reperfusion, whereas GD contributed to a more negative ψ_m . Subsequent chemical oxygen deprivation induced by sodium azide caused depolarization, which, however, was significantly delayed as compared to the normoxic group. When GD preceded OGD for 12 h, mitochondrial membrane hyperpolarization was induced by both GD and subsequent OGD, but significant interaction between these conditions was not

detected. However, when GD was extended to 48 h preceding OGD, hyperpolarization enhanced during reperfusion. This implicates synergistic effects of both conditions in that sequence.

The inhibition of autophagy did not show significant effects on cell viability until 8-9 h of ND. We observed that early inhibition of autophagy makes astrocytes vulnerable to later ND. The inhibition of lipolysis also provoked cell death, but it emerged much later compared to the effects of autophagy inhibition. Furthermore, the application of these inhibitors prevented ND-related hyperpolarization of mitochondrial membrane.

Conclusions. One of the most important original findings of this work is that astrocytes maintain ψ_m at hyperpolarization after extended GD, ND or OGD. We also point to the role of the two main substrates of the electron transport chain (glucose and oxygen) in the hyperpolarization of the mitochondrial membrane, and emphasize how this result may further be relevant in terms of astrocyte resilience to prolonged ischemic injury *in vitro*. These results also show that autophagy and lipolysis are essential for astrocytes survival under nutrient deprivation, which may add to their role as neuron-supporting cells.

Key words: astrocytes, ischemia, mitochondrial membrane potential, autophagy, lipolysis

Scientific field: Neuroscience

Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics

UDC number: 57.085:616.831-005.1 (043.3)

Садржај:

1. УВОД.....	1
1.1. ИСХЕМИЈА – ОСЕТЉИВОСТ МОЗГА НА НЕДОСТАТАК КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ	1
1.2. УЛОГА АСТРОЦИТА У ЦЕНТРАЛНОМ НЕРВНОМ СИСТЕМУ	2
1.3. ОТПОРНОСТ АСТРОЦИТА НА МЕТАБОЛИЧКИ СТРЕС.....	4
1.3.1. Депривација кисеоника.....	4
1.3.2. Депривација глукозе	5
1.3.3. Депривација кисеоника и глукозе	6
1.4. МЕТАБОЛИЗАМ ГЛУКОЗЕ У АСТРОЦИТИМА - УЛОГА У „ЕНЕРГЕТИЦИ“ МОЗГА.....	7
1.5. ОКСИДАТИВНА ФОСФОРИЛАЦИЈА.....	11
1.5.1. Хиперполаризација мембране митохондрија - физиолошка улога	13
1.5.2. Утицај депривације кисеоника и глукозе на промене мембранског потенцијала митохондрија	16
1.5.3. Физиолошка улога хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрија или артефакт.....	16
1.6. УЛОГА АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ У ПРЕЖИВЉАВАЊУ АСТРОЦИТА ТОКОМ ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА.....	18
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	21
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ.....	22
3.1. ПРИМАРНА БЕЛИЈСКА КУЛТУРА КОРТИКАЛНИХ АСТРОЦИТА	22
3.1.1. Раствори и реагенси за изолацију астроцита.....	22
3.1.2. Изолација примарних кортикалних астроцита из мозга пацова	23
3.1.3. Расејавање астроцита у култури	24
3.2. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА УДЕЛА АСТРОЦИТА У КУЛТУРИ ПРИМЕНОМ ИМУНОЦИТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ.....	25
3.3. ПРОТОКОЛИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ <i>IN VITRO</i> МОДЕЛА ДЕПРИВАЦИЈЕ КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ, ХЕМИЈСКЕ ХИПОКСИЈЕ И ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА	26
3.4. ПРОТОКОЛИ ЗА ИЗАЗИВАЊЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА И ИНХИБИЦИЈУ АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ.....	27
3.5. ЕСЕЈИ ВИЈАБИЛНОСТИ АСТРОЦИТА У КУЛТУРИ.....	28

3.6. ПРАЋЕЊЕ ПРОМЕНА МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА ПОМОЋУ ЈС-1 БОЈЕ	30
3.7. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	31
4. РЕЗУЛТАТИ	33
4.1. УТИЦАЈ ДЕПРИВАЦИЈЕ КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ НА ПРОМЕНЕ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА	33
4.1.1. Утицај OGD и накнадне хемијске хипоксије на мембрански потенцијал митохондрија астроцита	33
4.1.2. Утицај нивоа глукозе током депривације кисеоника на промене мембранског потенцијала митохондрија астроцита	36
4.2. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ НА ВИЈАБИЛНОСТ АСТРОЦИТА И ПРОМЕНЕ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА	40
4.2.1. Утицај депривације нутријената на вијабилност астроцита	42
4.2.2. Утицај дуготрајне инхибиције аутофагије на вијабилност астроцита	42
4.2.3. Утицај краткотрајне инхибиције аутофагије на осетљивост астроцита на услове депривације нутријената и промену мембранског потенцијала митохондрија астроцита ..	46
4.2.4. Утицај инхибиције липолизе на вијабилност и промену мембранског потенцијала митохондрија астроцита	51
5. ДИСКУСИЈА	56
5.1. ПРОМЕНЕ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА НАКОН ДЕПРИВАЦИЈА КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ, КАО И ФАРМАКОЛОШКИХ ТРЕТМАНА	56
5.2. УЛОГА АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ У ПРЕЖИВАЉАВАЊУ УСЛОВА ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА И ХИПЕРПОЛАРИЗАЦИЈИ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА	64
6. ЗАКЉУЧЦИ	68
7. ЛИТЕРАТУРА	70
8. БИОГРАФИЈА	83

Листа скраћеница

Скраћеница	Назив на српском
2-DG	2-деокси-D-глукоза
ADP	аденозин дифосфат
AMP	аденозин монофосфат
ANT	транслокатор аденинског нуклеотида
АО	акридин наранцасто
АТФ	аденозин трифосфат
Bcl2	Б-ћелијски лимфом 2
Bcl-xL	Б-ћелијски лимфом – екстра велики
BSA	албумин говеђег серума
CCCP	карбонил цијанид <i>m</i> -хлорофенилхидразон
CNP-аза	циклична 2',3'-нуклеотидна 3'-фосфодиестераза (маркер олигодендроглије)
CQ	хлорокин
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол
DIV	дани <i>in vitro</i>
DMEM	енгл. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNP	2,4-динитрофенол
EBSS	Ерлов балансирани раствор соли
EDTA	етиленаминамтетрасирћетна киселина
F1.6P	фруктозо-1,6-бис-фосфат
F6P	фруктозо-6-фосфат
FADH ₂	флавин аденин динуклеотид (редукован)
FBS	фетални телећи серум
FCCP	карбонил цијанид-4-(трифлуорометокси)фенилхидразон
FDA	флуоресцеин диацетат
G6P	глукозо-6-фосфат
GD	депривација (недостатак) глукозе
GFAP	глијални кисели фибриларни протеин (маркер астроцита)
Glc или glu	глукоза
hG	огледни медијум са високим нивоом глукозе
Iba1	јонизовани калцијум-везујући адаптерски молекул 1 (маркер микроглије)

JC-1	флуоресцентни обележивач за праћење промена мембранског потенцијала митохондрија
L-15	Лајбовиц медијум за изолацију ћелија
LDH	лактат дехидрогеназа
IG	огледни медијум са ниским нивоом глукозе
mPTP	пора за промену пермеабилности митохондрије
MTG	флуоресцентни зелени обележивач митохондрија
NAD ⁺	никотинамид аденин динуклеотид
NADH	никотинамид аденин динуклеотид (редукован)
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат (редукован)
NaN ₃	натријум азид
nG	огледни медијум без глукозе
NO	азот-моноксид
OD	депривација (недостатак) кисеоника
OGD	депривација (недостатак) кисеоника и глукозе
PBS	физиолошки раствор са фосфатним пуфером
PFA	параформалдехид
PI	пропидијум јодид
PPP	пут фосфата пентозних шећера
ROS	реактивне кисеоничне врсте
Triton-X 100	тритон, нејонизујући сурфактант
ψ_m	мембрански потенцијал митохондрије
ацетил-КоА	ацетил-коензим А
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
РНК	рибонуклеинска киселина

1. УВОД

1.1. ИСХЕМИЈА – ОСЕТЉИВОСТ МОЗГА НА НЕДОСТАТАК КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ

Исхемична (*ischaemia,ae* од грч. ἴσχειν = исхеин: зауствити и αἷμα = хаима: крв) болест мозга [1] (исхемични мождани удар, шлог, апоплексија, инфаркт мозга) је метаболички поремећај недостатка кисеоника и глукозе и последица је неадекватног или прекинутог снабдевања мозга крвљу чији је континуирани доток у тај орган неопходан за задовољење његових метаболичких потреба. Овакав поремећај доводи до низа поремећаја осетљиве хомеостазе мозга који даље доводе до ирреверзибилних структурних промена на ћелијском нивоу већ у оквиру неколико минута. Све дужим излагањем патолошким процесима на ћелијском нивоу, долази и до структурних и функционалних промена на нивоу различитих региона мозга, чиме се усложњава патолошки процес исхемичне болести мозга и са морфолошког и са етиолошког аспекта.

Одреднице почетка и тока патогенезе исхемичне болести и општећења мозга разликују се у односу на то за које клиничке симптоме се везују. Стога треба напоменути да се у најширем смислу мождани удар дефинише као „нагли или иктални почетак фокалних или глобалних неуролошких симптома изазваних исхемијом или крварењем у мозгу или око мозга, а које настају као резултат болести крвних судова мозга“ (цит. из [1]), што је сасвим извесно везано за саме последице болести. Уколико се пак посматра проток крви у мозгу, исхемија може бити: (1) „комплетна исхемија“ као последица потпуног прекида протока крви, односно (2) „некомплетна исхемија“ као последица смањења протока крви испод 40 % од контролних вредности. Међутим, физички узрок смањеног протока може бити: (1) престанак рада срца или тешка системска хипотензија што доводи до глобалне исхемије или (2) хипоперфузија региона услед оклузивних промена артерија као последице тромбозе или (микро)емболије што доводи до фокалне исхемије. Центар фокалне исхемије

карактерише се често комплетном исхемијом за разлику од зоне „пенумбре“ коју карактерише некомплетна исхемија. Са клиничког аспекта прекид циркулације изазива губитак свести за око 10 секунди, губитак спонтане електричне активности за око 20 секунди, док је 30 секунди довољно да дође до поремећаја метаболизма, а свега један минут да дође до поремећаја функције неурона. Генерално се, према хистолошким критеријумима и даље сматра да је најмање 5-6 минута исхемије услед застоја срца потребно за развијање иреверзибилних оштећења ћелија [1].

Код одрасле особе мозак чини само 2 % укупне телесне тежине (1500 g). Снабдева се крвљу путем две каротидне и две вертебралне артерије и од 70 ml крви колико се сваком контракцијом у стању мировања истисне у аорту, 10-15 ml намењено је мозгу што чини око 15 % крви минутног волумена срца. Поред тога, мозак дневно захтева континуирано снабдевање са око 150 g глукозе и 72 l кисеоника, што је потрошња од око 20 % кисеоника и око 25 % глукозе на нивоу читавог тела [1-3]. Ако се генерално узме у обзир да мозак има ограничене могућности да ускладишти кисеоник и глукозу, постаје јасно колико је функција овог органа осетљива на њихово смањење испод критичних вредности. Сагоревањем толике количине шећера добија се енергија неопходна за одржавање и базалног метаболизма и активационог метаболизма. У току рада мозак утроши трећину енергије за стварање и одржавање јонских градијената (Na^+ и K^+) који се користе за кодирање сигнала преко (пост)синаптичких и акционих потенцијала у неуронима, трећину за преузимање и рециклирање неуротрансмитера који те сигнале преносе са неурона на неурон и трећину за одржавање базалног метаболизма и вијабилности ћелија [1,2].

1.2. УЛОГА АСТРОЦИТА У ЦЕНТРАЛНОМ НЕРВНОМ СИСТЕМУ

Астроцити су најбројнији не-неуронални тип ћелија у мозгу заузимајући просечно 20-25 % укупног волумена мозга [4] и неурони не могу да преживе без блиске интеракције са њима [5]. Оваква тврдња заснива се управо на испитивањима већ поменутих догађаја током повреде и опоравка мозга што укључује студије тока церебралне исхемије, интрацеребралне и субарахноидне хеморагије (уз пратећу вазоконстрикцију), аноксије или хипоксије услед асфиксије и респираторне инсуфицијенције, хипо- и хипергликемије, као и трауматске повреде мозга. Све

наведене болести/повреде, поред различитих етиологија, у основи повезује дефицит кисеоника и глукозе у мозгу. У било ком региону где астроцити не преживе иста судбина задеси и неуроне, а такође се губи и могућности за синаптичко ремоделирање [5]. Све детаљнија и дубља истраживања спроведена на астроцитима откривају сасвим нове и разноврсне функције овог типа глијалних ћелија (*glia,ae* грч. $\gamma\lambda\iota\alpha$ = глија: лепак). Неурони су већ дуго познати као преносиоци електро-хемијских „порука“ у мозгу, док су астроцити некада били окарактерисани само као „лепак“ који спаја неуроне. Временом је та листа проширена, па су добили статус „кућепазитеља“. Данас је листа њихових функција довољно импресивна да заслужују статус „активних учесника“ и обухвата: преузимање глутамата и његово ослобађање, преузимање јона K^+ , H^+ и Ca^{2+} када се нађу у вишку у ванћелијској средини, транспорт воде, чишћење слободних радикала, учествовање у формирању хематоенцефаличне (цереброваскуларне, крвно-мождане) баријере и регулација мозданог крвотока, па затим учествовање у синаптичкој трансмисији и модулацији синаптичке пластичности [6,7], уклањање синапси које више нису у функцији (енгл. *synaptic pruning*) [8,9], учествовање у запаљенском процесу (неуринфламацији), формирању глијалног ожиљка, као и учествовање у израстању неурита и опоравку мозга у пост-трауматском периоду.

Преглед литературе и резултата на тему енергетског метаболизма који се одвија у астроцитима и њихових разноврсних улога даје Hertz [4] указујући на то да кортикални астроцити користе око 30 % кисеоника у стању мировања и да се половина глукозе из крви јавља у фосфорилисаном облику у астроцитима, коју они, уз утрошак већ расположиве енергије, складиште у облику гликогена. У стању појачане активности мозга појачавају се разградња гликогена (гликогенолиза) и оксидативни метаболизам у астроцитима *in situ*, док низак количник укупне потрошње кисеоника и укупне потрошње глукозе у мозгу сутерише да се у таквим условима глукоза користи и анаеробним (не-оксидативним) путем. Bélanger и сар. у релативно скоријем прегледу литературе [3] такође истичу астроците као „активне учеснике“ у енергетској хомеостази мозга, како у потрошњи, тако и у производњи енергије и подршци коју пружају неуронима у њиховој функцији. С тим у вези, астроцити су добили своје место у истраживањима тока исхемичне болести мозга и свој фокус је добила њихова осетљивост, односно отпорност на недостатак кисеоника и глукозе, као и могућност модификације њиховог одговора у (пато-)физиолошким условима у циљу превенције и терапије.

1.3. ОТПОРНОСТ АСТРОЦИТА НА МЕТАБОЛИЧКИ СТРЕС

У раду интересантног наслова: „Исхемија: астроцити показују своју сензитивну страну“, Fern сумира дотадашња сазнања о разликама у отпорности на недостатак кисеоника и глукозе које постоје између неурона и астроцита када се пореде *in vivo* и *in vitro* услови [10]. Са једне стране, у *in vitro* условима астроцити показују много већу отпорност на недостатак кисеоника и глукозе од неурона, што је постало широко прихваћено мишљење које је последица пажљиво контролисаних *in vitro* студија [11], док је, пак, у *in vivo* условима та разлика заправо занемарљива. Неке од наведених студија донекле су расветлиле тако велике разлике у резултатима [10] указујући на осетљивост астроцита на промене у киселости ванћелијске средине, концентрацији ванћелијског K^+ , као и разликама у експресији јонских канала за Ca^{2+} и Na^+ у астроцита у *in vitro* у поређењу са *in vivo* условима. С обзиром да ће у првом делу ове студије бити речи о утицају депривације кисеоника и глукозе на стање митохондрија у астроцитима у *in vitro* условима, потребно је направити преглед експерименталних модела и досадашњих резултата који су из њих проистекли.

1.3.1. Депривација кисеоника

Депривација кисеоника (енгл. *oxygen deprivation, OD*) укључује експерименте у којим се у инкубатору за узгајање ћелијских култура (или мањој комори) са могућношћу херметичког затварања, стандардна гасна смеша мења мешавином у којој је ниво кисеоника спуштен испод 1 %. Поред тога, користе се и херметички затворене коморице које се монтирају директно на постоље микроскопа код којих постоји могућност контролисања гасне смеше увођењем гасова директно у раствор у коморици. У већ поменутом раду Goldberg и Choi [11], гасна смеша у инкубатору/комори је садржала: 5 % CO_2 , 10 % H_2 и 85 % N_2 , а ћелијама је стандардни медијум био замењен медијумом без кисеоника. Важно је напоменути да је ниво кисеоника био праћен кисеоничном електродом ($<2 \text{ mm Hg}$) и да су аутори термине депривација кисеоника и хипоксија користили за исти експериментални приступ. Yu и сар. [12] су такве услове такође назвали хипоксијом и одредили су да до 24-ог часа излагања и поред аноксичне атмосфере у инкубатору, у медијуму остаје растворена мала количина кисеоника коју астроцити могу да користе. Као услове тешке хипоксије

дефинисали су тренутак када је парцијални притисак кисеоника (pO_2) у медијуму пао испод 25 mM Hg што се дешавало након 12 часова оваквог излагања.

Goldberg и Choi [11] су показали да када се ниво глукозе константно прати и на дневној бази одржава на физиолошком нивоу (5 mM), чак и 5 дана континуираног излагања недостатку кисеоника доводи до смрти изузетно малог броја астроцита – до смрти великог броја ћелија је по њиховом запажању дошло не због недостатка кисеоника, већ због закишељавања ванћелијске средине [13]. У односу на астроците, неурони преживљавају 4-8 часова у 2 mM глукози, 8-14 часова у 5 mM глукози и више од 24 часа у 20 mM глукози [11]. Поменити аутори у својој дискусији наводе и сагласност добијених резултата са радом Yu и сар. [12] који су забележили нешто краћа времена од 12-18 часова која су потребна да би дошло до повећаног ослобађања лактат дехидрогеназе (енгл. *lactate dehydrogenase*, LDH), које се користи за мерење смртност ћелија, као и до појаве морфолошких промена које прате ћелијску смрт (отицање ћелијског тела и одвајање од подлоге).

1.3.2. Депривација глукозе

На самом уводу о утицају депривације глукозе (енгл. *glucose deprivation*, GD) потребно је напоменути да уклањање глукозе из медијума или раствора соли у већини случајева подразумева уклањање и серума. Иако има аутора који праве дистинкцију између одузимања глукозе и уклањања нутријената, о којој ће бити речи касније, треба знати да се под појмом депривације глукозе (као основног нутријента) не ретко уствари подразумева депривација свих нутријената (глукозе, аминокиселина и фактора раста).

Отпорност астроцита на депривацију нутријената се мери у данима, што се знатно разликује у односу на друге ћелије централног нервног система. На пример, 24 часа без нутријената доводи до смрти око 70 % олигодендроцита [14], док се општећење неурона повећава за 50 % у току 6-8 часова и достиже максимум између 10-12 часова [11]. Вијабилност ћелија неуробластома смањује се за 50 % већ у првих 3-8 сати и пада на свега 25 % већ након једног дана без глукозе [15,16].

У поређењу са овим подацима депривација нутријената доводи до смрти знатно мањег броја астроцита, али и овде подаци варирају од студије до студије. У зависности од одабраних експерименталних услова и избора методе квантификације (праћење морфолошких знакова општећења ћелија, бројни есеји вијабилности) та бројка износи:

20 % након 24 часа [14], 50 % оштећених ћелија након више од 36 часова [11], али и мање од 10 % након 48 часова [17,18]. Догађаји током првих 24 часа нису праћени значајним повећањем ослобађања LDH и повећаном смртношћу астроцита [19]. Показано је да астроцити надокнађују депривацију глукозе повећаном оксидацијом масних киселина, што није праћено повећаним оксидативним стресом, док само 5 % ћелија показује знаке апоптозе након 48 сати излагања [18].

1.3.3. Депривација кисеоника и глукозе

Како сâм термин каже овај *in vitro* модел исхемичног оштећења мозга састоји се из комбинованих депривација кисеоника и глукозе (енгл. *oxygen-glucose deprivation, OGD*). Генерално се може рећи да су астроцити отпорнији на депривацију кисеоника или депривацију глукозе у поређењу са комбинованим ефектима депривација кисеоника и глукозе. Међутим, и у овом случају резултати варирају од студије до студије, а измене у дизајну експеримента (које укључују промене у јонском саставу раствора и његове киселости, концентрацију кисеоника и глукозе коришћену како током третмана, тако и током симулиране реперфузије) отежавају међусобно поређења резултата.

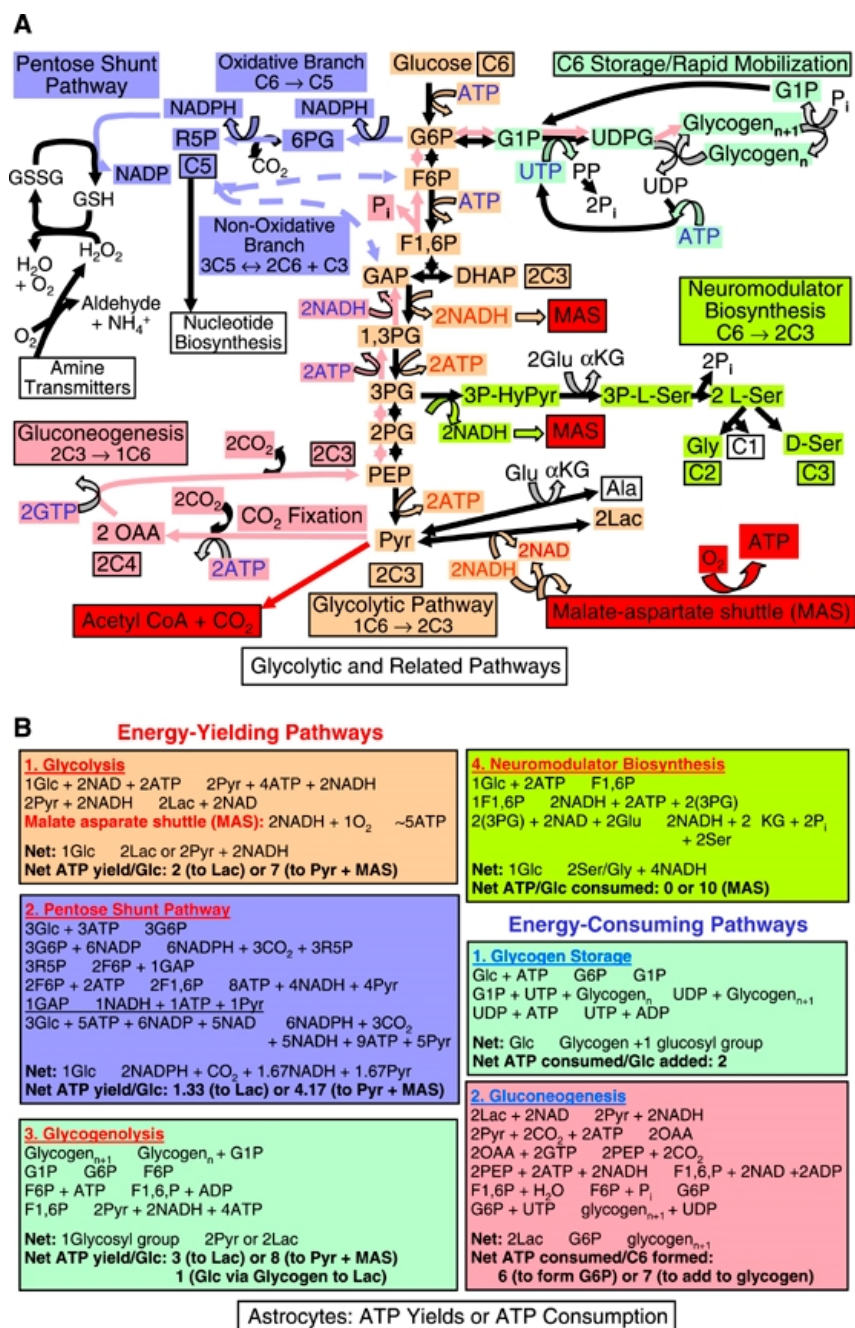
Ипак, може се рећи да мање од три часа комбиноване депривације кисеоника и глукозе није довољно да би довело до пререзибилних оштећења астроцита [11,19,20], а знакови апоптозе нису примећени ни раније од четири часа излагања оваквим екстремним условима [21]. Излагање астроцита комбинованој депривацији кисеоника и глукозе које траје дуже од 6-8 часова значајно повећава број астроцита који су ушли у апоптозу и некрозу [11,22], повећава се број формираних аутофагозома у ћелијама [23] и долази до појачаног ослобађања LDH из ћелија [19,24]. Мерењем смртности након 24 часа током симулиране реперфузије добија се да око 14 % астроцита умире од излагања OGD у трајању од 6 часова и тај број се повећава на 24 % након 9 часова OGD [22]. У поређењу са астроцитима, 50 % неурона буде оштећено већ у року од 45 минута OGD, док након 70 минута ослобађање LDH прелази 90 % [11]. Наравно, као што је већ поменуто у делу о хипоксији, уколико је глукоза присутна у медијуму профил умирања неурона се мења на дозно-зависни начин.

1.4. МЕТАБОЛИЗАМ ГЛУКОЗЕ У АСТРОЦИТИМА - УЛОГА У „ЕНЕРГЕТИЦИ“ МОЗГА

С обзиром да се ова студија бави енергетским метаболизмом астроцита и променама мембранског потенцијала митохондрија прво ће бити описана разноврсност супстрата које астроцити могу да користе у продукцији енергије да би се затим дошло до тога на који начин астроцити преживљавају у експерименталним условима са недостатком кисеоника и глукозе. Преглед сазнања о метаболизму глукозе у астроцитима даје Hertz (слика 1) [4].

Први корак гликолитичког метаболизма глукозе (скр. Glc или glu) јесте формирање глукозо-6-фосфата (G6P) дејством хексокиназе која се инхибира повратном спрегом преко свог продукта. Главни регулаторни ензим који контролише флуks гликолизе је фосфофруктокиназа која конвертује фруктозо-6-фосфат (F6P) до фруктозо-1,6-бис-фосфата (F1.6P) и активирана је ADP и AMP, а инхибирана АТФ и фосфокреатином. На тај начин већ у првим корацима овај биохемијски пут детектује ниво искористиве енергије у ћелији (количник АТФ и ADP). Продукција 2 молекула пирувојане киселине (одн. пирувата) из глукозе захтева 2 молекула АТФ уз стварање 4 молекула АТФ, што представља нето приход од 2 АТФ. Гликолитички процес којим долази до стварања пирувата укључује и оксидативни процес којим се ствара NADH. С обзиром да овај молекул не може да прође кроз мембрану митохондрија потребна је брза оксидативна реакција да би се NAD⁺ регенерисао. У нормоксичним условима та реакција се одиграва преко малатно-аспартатног шатла. Када брзина гликолизе премашу брзину оксидације пирувата или у току хипоксичних/аноксичних услова NADH се реоксидује превођењем пирувојане киселине у млечну киселину (лактат). Пируват се затим помоћу пируват дехидрогеназног комплекса преводи у ацетил-коензим А уз стварање CO₂ и NADH. Овај процес ствара 2,5 АТФ по 1 пирувату и троши кисеоник кроз ланац транспорта електрона када се NADH оксидује да би се NAD⁺ регенерисао. Сам ацетил-КоА са оксалацетатом формира лимунску киселину (цитрат) и улази у циклус трикарбоксилних киселина (циклус лимунске киселине, Кребсов циклус). Нето принос при сваком обрту циклуса трикарбоксилних киселина је продукција 2 CO₂, 2 NADH и 1 FADH₂. Све укупно процес оксидативног

метаболизма („сагоревања“) глюкозе – од глюкозе, преко пирувата до циклуса трикарбоксилних киселина – даје 32 молекула АТФ по молекулу глюкозе.



Слика 1. Дијаграм метаболизма глюкозе и са њим повезаних метаболичких путева представљен у оригиналу из Hertz (2006)

Горњи панел представља шематски приказ повезаности метаболичких путева, док су на доњем панелу дате стехиометријске рачунице приноса и потрошње АТФ. Важније скраћенице дате су у тексту.

Гликолитички пут у астроцитима има неколико важних гранања која повећавају количину глукозе која се метаболише неоксидативним путем, међутим коришћење угљеника за синтезу *L*-серина и глицина, као и синтеза гликогена и *D*-серина су процеси који троше АТФ. *G6P* такође улази у пут фосфата пентозних шећера (енгл. *pentose phosphate pathway, PPP*) који представља пут продукције супстрата за синтезу аминокиселина у свим ћелијама мозга, али и пут превођења редукционог потенцијала глукозе у високи редукциони потенцијал *NADPH* који је неопходан за синтезу липида, метаболизам шећера са 5 угљеникових атома и функционисање глутатион пероксидазе.

Од свих наведених процеса синтеза гликогена је специфична за астроците као начин складиштења глукозо-6-фосфата. Поред тога гликоген изгледа представља „тројанског коња“ за неуроне који избегавају његову синтезу јер их води у апоптозу. Зашто га неурони не синтетишу, а астроцити имају велике залихе и даље остаје непознаница [25]. Процес синтезе гликогена се одвија уз утрошак 2 АТФ по молекулу глукозе која је његов главни извор. Међутим, гликоген се може синтетисати и из пирувата/лактата путем глуконеогенезе и из циклуса лимунске киселине. Ови алтернативни путеви захтевају утрошак нешто веће количине енергије и присуство два ензима специфично присутна у астроцитима: фруктозо-1,6-бисфосфатазу и пируват карбоксилазу. Стога, астроцити могу да остваре нето синтезу интермедијера циклуса трикарбоксилних киселина и њихових деривата, што укључује глутамат, γ -аминобутерну киселину, аспартат и глутамин, док неурони не могу сами да произведу ове аминокиселинске прекурсоре и трансмитере. Процес производње и „обрт“ глутамата је у основи лоциран у астроцитима и комбинација биосинтезе и деградације глутамата производи АТФ скоро колико и оксидација глукозе.

Разградња гликогена има за 50 % већи енергетски допринос у поређењу са гликолизом, јер гликоген фосфорилаза ствара глукозо-1-фосфат и мутаза га преводи у глукозо-6-фосфат без утрошка енергије. Гликоген фосфорилаза је стимулисана протеин киназом А и повећањем концентрације унутарћелијског Ca^{2+} . Међутим, скоро истовремена (симултана) синтеза и разградња гликогена дају нето принос од само једног молекула АТФ, што је половина од нето приноса гликолизе. Претпоставља се да би резултујући пораст АДФ (који може да се одвија у периферним наставцима астроцита) стимулисао гликолизу и дупло више глукозе би било искоришћено за

производњу исте количине АТР. Оваква теоријска метаболичка слика, која укључује: појачану гликолизу [26], гликогенолизу, РРР и биосинтезу, поклапа се са запажањима о дешавањима *in vivo*, где се примећује да низак количник укупне потрошње кисеоника и укупне потрошње глукозе сугерише да се, и у физиолошким, нормоксичним условима, глукоза користи и анаеробним (не-оксидативним) путем. Сматра се да су за то „одговорни“ астроцити [4].

Сви типови ћелија у мозгу могу да продукују и користе лактат и због тога је лактат добио посебну пажњу као могуће ванћелијско „ендогено гориво“, али је евалуација такве његове улога у мозгу тешка са аспекта комплексности чиниоца који утичу на ниво лактата (ниво метаболита не даје информацију о флуксу, само нето резултат односа стварања и разградње). Често се током активности мозга примећује дуплирање концентрације лактата, али је то и даље јако мали нето проценат у односу на количину конзумиране глукозе и гликогена. Моделовање преузимања лактата током активности и промене количника NADH и NAD⁺ имало је за циљ да покаже да мозак може да користи лактат као извор енергије.

Ацидоза, односно закишељавање ванћелијске средине услед недостатка O₂ представља последицу преласка на анаеробни метаболизам односно производњу млечне киселине (лактата) из глукозе. Метаболисањем 1 mol-а глукозе добијају се 2 mol-а млечне киселине при чему се стварају 2 mol-а АТР. Његовом хидролизом до ADP и неорганског фосфата (P_i) ослободиће се 2 mol-а H⁺. На тај начин порастом анаеробне гликолизе долази до закишељавања унутарћелијске и ванћелијске средине. Интересантно је да се током хипогликемичке коме не развија инфаркт иако постоји енергетски дефицит, а разлог томе је одсуство ацидозе [1]. Разлог овакве осетљивости астроцита на закишељавање може бити експресија електрогеног ко-транспортера за Na⁺ и бикарбонат у мембрани астроцита, али не и у неурона који показују мању осетљивост у односу на њих [5]. Заједно са наглим порастом ванћелијске концентрације K⁺ услед престанка рада Na⁺/K⁺-АТР-азе, ацидоза представља још један фактор за *in vitro* модел систем општећења током фокалне исхемије. Најчешће се у литератури помиње као „исхемични раствор“, „симулирана исхемија“ или „јонски дисбаланс“ (енгл. *ionic shift*) и чини га комбиновани недостатак кисеоника и глукозе који се одвија у малим запреминама раствора замењујући киселу ванћелијску средину измењеног јонског састава.

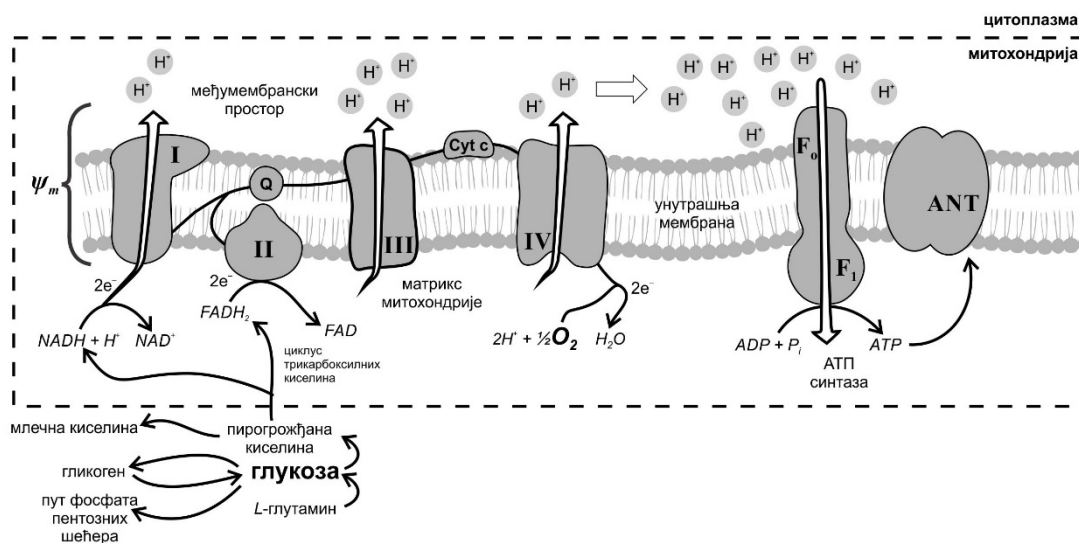
На основу ранијих истраживања сматрало се да астроцити имају мале захтеве за енергијом и да сходно томе производе АТФ веома ниском стопом. Екстремно низак ниво оксидативног метаболизма примећен је код астроцита у примарној култури што се највероватније може приписати високој концентрацији глукозе у медијуму за гајење (о чему ће бити речи у дискусији). Уколико се ниво глукозе константно одржава на 6-7 mM/l астроцити показују да су способни за већу ефикасност оксидативне фосфорилације.

1.5. ОКСИДАТИВНА ФОСФОРИЛАЦИЈА

За еукариотске ћелије, одржавање мембранског потенцијала митохондрије (обележава се са ψ_m , а његова промена са $\Delta\psi_m$) представља везу (односно „купловање“ од енгл. *coupling*) између гликолизе која се одвија у цитоплазми и оксидативне фосфорилације која се одвија у митохондријама (приказано на слици 2) и представља основу за подмиривање метаболичких захтева за синтезом АТФ и одржавање високог количника унутарћелијских концентрација АТФ и АДФ [27,28]. Енергија која је неопходна да се процес синтезе АТФ одигра складишти се у виду потенцијалне енергије, односно електро-хемијског градијента протона (H^+) између спољашње и унутрашње стране унутрашње мембране митохондрије (што представља ψ_m , односно транс-мембрански потенцијал). Стварање таквог градијента постиже се кроз активност респираторних пумпи за протоне, које представљају „станице“ у ланцу транспорта електрона (познато као комплекси I-IV). Енергија која се преноси електронима, а ослобађа се редукцијом супстрата (углавном глукозе), постепено се користи за пренос протона на спољашњу страну унутрашње мембране (односно у међумембрански простор), при чему сваким обављеним радом кроз H^+ „пумпе“ електрон губи део своје енергије, пре него што га коначно не преузме молекул кисеоника. Проток протона назад у матрикс митохондрије кроз АТФ синтазу („завивљујућа протеинска турбина“) која се налази у унутрашњој мембрани митохондрија омогућава синтезу АТФ и повезује процесе у цитоплазми са процесима у матриксу митохондрија [27].

Недостатак два основна супстрата - глукозе као донора електрона и кисеоника као акцептора електрона, доводи или до прекида у ланцу транспорта или до његовог неисправног функционисања, што сматра се има за последицу губитак

транс-мембранског потенцијала, односно деполаризацију мембране митохондрије, па тиме и прекид оксидативне фосфорилације.



Слика 2. Шематски приказ процеса који се одигравају на унутрашњој мембрани митохондрије

Приказан је ланац транспорта електрона (комплекси I-IV), активан транспорт протона (H^+) у међумембрански простор и искоришћење мембранског потенцијала митохондрије (ψ_m) за стварање АТФ помоћу АТФ синтазе. Створени АТФ транспортује се из митохондрије.

То даље води смањењу продукције АТФ, што доводи до проблема у одржању електро-хемијског градијента активношћу Na^+/K^+ -АТФ-азе. Такав колапс може довести до „отицања“ ћелије (бубређе услед осмотског стреса), отварање поре за промену пермеабилности митохондрије (енгл. *mitochondrial permeability transition pore, mPTP*), ослобађање цитохрома C из унутрашње мембране митохондрије, затим активације каспаза и коначно апоптозе или некрозе (све ћелије мозга и кичмене мождине подложне су истој каскади [29]).

Ипак, апликација различитих стресора, као што су: уклањање фактора раста, депривација глукозе, реоксигенација након краткотрајне OGD, инхибиција ћелијског дисања изазвана азот-моноксидом, третман липополисахаридом и интерфероном гама, доводе до хиперполаризације мембране митохондрија код различитих типова неуралних и не-неуралних ћелија [30-32]. У неким случајевима повећање ψ_m претходи активном отпуштању цитохрома C [33]. Такође, има студија које повезују депривацију глукозе и гликолитички створен АТФ са хиперполаризацијом унутрашње мембране

митохондрија. Таква хиперполаризација зауставља ланац транспорта електрона, што се такође наводи као механизам који штити ћелију од апоптоотске смрти [30,34].

1.5.1. Хиперполаризација мембране митохондрија - физиолошка улога

Испитујући како Bcl-2 протеини могу регулисати физиологију митохондрија и на тај начин контролисати апоптозу, Vander Heiden и Thompson [35] су се осврнули на проблем хиперполаризације митохондрија. Показано је да се код ћелија којима су ускраћени фактори раста (раст без спољашњих сигнала најмање 12-15 часова) јавља губитак респирације повезане са ADP као и хиперполаризација мембране митохондрија пре него што отпочне ћелијска смрт (са или без ослобађања цитохрома C) [32,36,37]. Тај релативни пораст ψ_m аутори су повезали са дефектом у размени ATP и ADP између цитосола и митохондрија. У испитиваним ћелијама цитосолни количник ATP и ADP је падао, док је у митохондријама растао. Претпостављено је да долази до заустављања ланца транспорта електрона када способност пумпи да избацују протоне постане ограничена хиперполаризацијом унутрашње мембране митохондрија [35]. С обзиром да се фосфорилација ADP одиграва у матриксу митохондрија, његов лимитирани транспорт преко спољашње и унутрашње мембране митохондрија има за последицу снижавање концентрације супстрата за ATP синтазу. Такав догађај смањује искоришћење ψ_m и доводи до смањене продукције ATP. То даље има за последицу још већи пад количника ATP и ADP у цитосолу, што доводи до стимулације гликолизе (преко раније поменуте фосфофруктокиназе 1 [38]) да би се одржао високи ниво цитосолног ATP. Резултат је повећана продукција лактата и закишељавање цитосола [35]. Са друге стране гликолитички створен ATP може да се користи од стране митохондрија, које постају његов главни потрошач, да би се активношћу ATP синтазе, која сада постаје ATP-аза, одржао мембрански потенцијал митохондрије (па тако постоји и посебан фактор инхибиције 1, IF_1 , који регулише поменути процес [39]).

У компаративној студији неурона и астроцита у култури Almeida и сар. [30] показали су да, иако у контролним условима неурони и астроцити имају сличне стопе искоришћења кисеоника и продукције ATP, дијаметрално се разликују у одговору на инхибицију ланца транспорта електрона изазвану азот-моноксидом (NO). Користећи концентрацију NO која блокира ланац транспорта електрона и снижава стопу

искоришћења кисеоника, али не блокира гликолизу, аутори су показали да: (1) долази до значајног поспешења гликолизе и продукције лактата у астроцитима као резултат спречавања прогресивног пада нивоа АТФ, (2) долази до временски зависног пораста ψ_m астроцита (око 20 % током 40-60 минута) и временски зависног пада ψ_m неурона (око 35-40 % током 40-60 минута), (3) да је пре-инкубација у трајању од 45 минута у Хенковом пуферском раствору (енгл. *Hanks' buffer solution*) без глукозе истрошила резерве гликогена у астроцитима и повећала њихову осетљивост на смањење АТФ изазвано NO, (4) да је третман олигомицином спречио хиперполаризацију [40-42] и изазвао деполаризацију ψ_m , (5) да је блокада транслокатора аденинског нуклеотида (енгл. *adenine nucleotide translocase, ANT*) бонгкрекичном киселином спречила пораст ψ_m , али није довела до деполаризације као олигомицин, и (6) да је NO делимично заштитио астроците и од колапса ψ_m изазваног стауроспорином и од, њему пратеће, апоптозе. Стога ово истраживање нуди увид у метаболичке путеве астроцита који повезују гликолитички створен АТФ [38,43], измену цитосолног АТФ за митохондријски ADP преко транслокатора аденинског нуклеотида, хидролизу АТФ од стране АТФ синтазе и порст мембранског потенцијала митохондрија. Аутори су окарактерисали коришћене концентрације NO као про-апоптотске и истакли су да је апоптоза неизбежна осим „уколико је способност ћелије да се пребаци на гликолизу довољна за производњу АТФ неопходног за одржавање ψ_m “ (цит. из [30]).

Током хипоксије са 2,5 % кисеоника у трајању од 24 часа астроцити могу да одржавају мембрански потенцијал митохондрија у хиперполарисаном стању, што такође указује на њихову већ поменућу способност анаеробне продукције енергије [44,45]. Са друге стране, акутно и брзо уклањање кисеоника (до 20 минута) убацивањем аноксичне смеше у коморицу за снимање доводи до деполаризације митохондрија и нестанка физиолошких флукуација ψ_m код астроцита у култури, а враћањем кисеоника тај ефекат се поништава [46]. Депривација кисеоника у току једног часа није довела ни до стварања слободних радикалских врста кисеоника, ни до промене у нивоу АТФ и NADPH, нити до апоптозе или некрозе ни код неурона ни код астроцита [47].

Иако су Almeida и сар. [30] показали да се митохондрије астроцита, којима је ускраћена глукоза и инхибиран ланац транспорта електрона, деполаризују у таквом стању, аутори нису испитали шта се дешава са ψ_m само у условима депривације глукозе. У таквим условима астроцити одржавају мембрански потенцијал митохондрија у

периоду посматрања од 6 часова и то без продукције реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species, ROS*)[18]. Међутим, у другачије дизајнираној студији где је испитиван ефекат појачане експресије Bcl-xL гена, Ouyang и сар. [48] су показали да, иако није било смрти астроцита у току пет часова депривације глукозе, већ након сат и по времена излагања недостатку глукозе у нормоксичним условима долази до хиперполаризације мембране митохондрија који износи 120 % у односу на контролу. Ипак, та хиперполаризација је затим праћена падом потенцијала на око 80 % четири часа након почетка депривације, при чему је могуће додатно деполарисати митохондрије хемикалијама које преносе протоне (тзв. протонофоре, транслокатори протона). Такође, иста студија је показала да долази до појачане продукције слободних радикала, али не и до повећања концентрације унутарћелијског Ca^{2+} . Тај последњи податак аутори су протумачили као одсуство екситотоксичности. Појачане експресије Bcl-xL гена смањила је продукцију слободних радикала и поништила хиперполаризацију.

Да би даље испитали промене до којих долази у ψ_m током депривације глукозе, Ouyang и сар. [49] су измерили потрошњу кисеоника током различитих респираторних стања. Уколико је пумпање водоникових јона максимално искоришћено путем оксидативне фосфорилације онда ће митохондрије продуковати максималну количину АТФ и минимално топлоте по јединици калорије коју потроше [50] што представља респираторно стање III (или ADP-купловану респирацију на сатуришућем нивоу кисеоника) [51]. Респираторно стање IV настаје кад се потроши сав ADP и то је управо стање у коме АТФ синтаза може да користи АТФ за одржавање ψ_m и тиме чак рециклира ADP. Губитак („цурење“) протона у респираторном стању IV може бити тестирано блокадом АТФ-азе (тј. синтазе) помоћу олигомицина. Даље, респирација која се одвија мимо оксидативне фосфорилације („де-куплована“ респирација) може се испитати протонофорама (нпр. FCCP, CCCP, DNP) које својим дејством смањују електро-хемијски градијент протона.

Респираторно стање III показало је значајни пад након три часа депривације глукозе, док су респираторно стање IV и „де-куплована“ респирација остале непромењене [49], указујући на пад респирације и у улазак у респираторно стање IV због смањења количине супстрата. Према ауторима ова временска тачка одговара крају хиперполаризације митохондрија [48]. Након пет часова депривације глукозе

респираторно стање IV се значајно повећало, док је респираторно стање III наставило да пада указујући на „цурење“ унутрашње мембране митохондрија, што се поклапа са деполаризацијом митохондрија. „Де-куплована“ респирација се није променила до 5-ог сата што указује да до тада није дошло до општећења ланца транспорта електрона.

1.5.2. Утицај депривације кисеоника и глукозе на промене мембранског потенцијала митохондрија

Када су астроцити изложени OGD, деполаризација мембране митохондрија и губитак цитохрома C из мембране може се уочити већ након једног часа излагања оваквом метаболичком стресу. Ипак, као што је већ речено, такав догађај не доводи до смрти астроцита [11,20]. Пре структурних промена, у астроцитима долази до промене ψ_m почевши од 45 минута па до 2 сата излагања комбинованој депривацији кисеоника и глукозе. Ипак, тачно време почетка и даље је контраверзно, а промене у ψ_m током реперфузије након излагања OGD још нису довољно испитане и зависе од комбинације експерименталних фактора о којима ће бити речи у Дискусији. Ијима и сар. [31] показали су да 30 минута OGD деполаризује неуроне, а да се током 60 минута симулиране реперфузије они хиперполаризују. У неуронима је након сат времена примећен губитак активности комплекса I у митохондријама, пад ψ_m , смањење нивоа АТФ и NADPH, продукција супероксид анјон радикала, као и смањење концентрације оксидованог и редукованог глутатиона (GSSG и GSH) и некроза, што је ауторе ове студије навело да посумњају на улогу PPP [47]. Делимично спасавање ψ_m астроцита било је могуће фармаколошким агенсима који утичу на пору за промену пермеабилности митохондрије и синтезу NO. Ипак, ниво цитохрома C у цитосолу није се значајно мењао што значи да није дошло до индуковања апоптозе и да реоксигенација није довела до његовог даљег ослобађања. Такође, ови догађаји нису праћени активацијом каспаза 3 и 9. Након реоксигенације било је потребно више од сат времена да се ψ_m врати на контролне вредности [20].

1.5.3. Физиолошка улога хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрија или артефакт

Оуџанг и сар. [48] поставили су хипотезу да чак и када митохондрије бубре услед осмотског стреса, постоји могућност да боја коју су користили за флуоресцентно обележавање промена ψ_m показује пораст интензитета флуоресценције као у случају

хиперполаризације. Такође, Vander Heiden и сар. [35] наводе аргументе на основу којих се очекује да би дуготрајна хиперполаризација најзад довела до бубрења митохондрије. Ова проблематика може се посматрати са два аспекта.

Са једне стране, чак и у физиолошким условима одржавање ψ_m представља изазов за митохондрије због дистрибуције катјона [52], јер фаворизује дистрибуцију K^+ у супротном смеру од H^+ градијента. Такође, протони у међумембранском простору могу да неутралишу слабе киселине које, сада у протонованом стању, могу да уђу у матрикс митохондрије где ће се поново депротонovati (у киселој средини). Због тога, нето проток осмотски активних супстанци, K^+ и слабих киселина мора бити стално регулисан. Први проблем је регулисан електрично неутралним H^+/K^+ измењивачем, док је други регулисан метаболизмом. Ако је међумембрански простор хиперполарисан онда се теоријски очекује нагомилавање слабих киселина и K^+ , што би постепено довело до бубрења митохондрија, насупротив брзом бубрењу које се повезује са отварањем поре за промену пермеабилности митохондрије и падом ψ_m [35].

С обзиром да је површина унутрашње мембране митохондрије већа од површине спољашње мембране, бубрење матрикса би довело до пуцања спољашње мембране. Предложено је да, поред своје основне функције у транспорту АТФ и АДФ [32], ANT на унутрашњој мембрани и волтажно-зависни анјонски канал (енгл. *voltage-dependent anion channel*) на спољашњој мембрани, имају заправо улогу у формирању поре за промену пермеабилности митохондрије (mPTP) [35], за коју се зна да је осетљива на смањење ψ_m и рН матрикса [35,53]. Постоје и претпоставке да сама АТФ-аза (њене субјединице) учествује у формирању поре [54-56]. С обзиром да Vcl-xL може да утиче на регулацију размене АТФ и АДФ између митохондрија и цитосола, тај механизам је предложен као алтернатива пори mPTP као контролна тачка апоптозе [35,49,57].

Са друге стране, зачуђујуће је да ћелије канцера развијају гликолитички фенотип који укључује управо хиперполарисану мембрану митохондрија и супримиран оксидативни метаболизам чак и у условима када је кисеоник присутан у ванћелијској средини. Овај феномен назива се Варбургов ефекат и карактерише се измењивачем стварања енергије у цитосол које оставља митохондрије на неки начин „инактивираним“, а ћелију отпорном на апоптозу [34]. Међутим, истраживања су показала да, у релативно малом броју канцера, дефицит у митохондријама представља узрок таквом феномену и да је такво маладаптивно понашање под одређеним

условима реверзибилно, односно да ћелије канцера могу да користе митохондрије [34,58-60].

1.6. УЛОГА АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ У ПРЕЖИВЉАВАЊУ АСТРОЦИТА ТОКОМ ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА

Из наведених истраживања се види да су догађаји везани за промене ψ_m комплексни како са аспекта броја актера који учествују у различитим каскадама, тако и са аспекта регулације тих каскадних процеса. Сама хиперполаризација унутрашње мембране митохондрија јавља се као феномен са или без ћелијске смрти, па чак и као могући протективни механизам, указујући на постојање и других „преломних тачака“ у одређивању судбине ћелије. С обзиром да је на почетку Увода истакнуто да астроцити могу да издрже изузетно дуго без присуства нутријената у ванћелијској средини, фокус ове студије био је усмерен и на способност астроцита да користе унутарћелијске изворе супстрата у циљу одржања ψ_m и сопственог преживљавања.

„Гладовање“, из угла појединачне ћелије и једноћелијских организама, првенствено је дефинисано као недостатак основних ванћелијских нутријената који фаворизују анаболизам (амино-киселине, фосфати, глукоза и азот), али је код вишећелијских организама синхронизовање метаболичке активности на нивоу ткива, органа, па и читавог организма одређено како ванћелијским концентрацијама нутријената, тако и присуством фактора раста у околини ћелије.

Током гладовања преживљавање ћелија зависи од катаболизма, па је стога регулисање „само-изједања“, односно аутофагије (грч. *auto-* „само“ и *phagein-* „јести“) значајан процес у прилагођавању стресним условима. У том контексту, аутофагија представља компензаторни механизам на тај начин што продукује супстрат (аминокиселине и масне киселине) који може бити оксидован у процесу дисања у митохондријама да би ћелија преживела. У току аутофагије (прецизније макро-аутофагије) део цитоплазме, са цитосолним протеинима и органеллама, се затвара у ћелијску структуру, која се одликује дуплом мембраном, познату као аутофагозом. Касније се садржај такве везикуле вари ензимима пореклом из лизозома након што дође до њихове фузије у аутофаголизом. Међутим, ако се процес

аутофагије појачано активира може довести до аутофагне смрти, такозване програмиране ћелијске смрти типа II. Овај процес конзервативно је присутан код свих еукариота, али није до краја истражен [61-68].

Аутофагија је активирана у астроцитима у условима стреса, како у исхемичном региону након прекида дотока крви *in vivo* [23,69], тако и у култури – након депривације кисеоника и глукозе и након симулиране исхемије *in vitro* [70]. Резултати *in vitro* студије са симулираном исхемијом указују на повезаност процеса аутофагије и апоптозе у експерименталном моделу пенумбре и подржавају резултате о повећаној отпорности астроцита на исхемичне услове моделоване *in vitro* у односу на сличне *in vivo* услове [70].

Треба напоменути да би се такође очекивало да ћелије неће више гладовати, па самим тим и неће вршити аутофагију, када им се врати супстрат из кога могу добити енергију. Показано је да враћање глукозе (у концентрацији најмање 4 mM) враћа ниво гликогена у року од два часа, али се максимални ниво гликогена дуплира уколико је пристуран серум, инсулин или фактори раста слични инсулину I или II [71]. Такође се сматра да присуство глукозе у медијуму инхибира аутофагију [72]. Тачна улога аутофагије у механизмима који су одговорни за дуготрајно преживљавање астроцита и даље је непознаница.

Са једне стране, у условима депривације глукозе резерве гликогена астроцита се изгледа јако брзо троше са полу-временом од 7-15 минута (зависно од порекла културе) [30,71,73], међутим *in vivo* студије показују да ниво гликогена може трајати и два часа [74-76]. Са друге стране, зна се да већина ћелија у култури формира липидне (масне) капи кад год у медијуму постоје доступни липиди (чији су главни извор липопротеини садржани у серуму), па ни астроцити нису изузетак [77]. Формирање липидних капи дешава се и у условима стреса који могу бити на пример: достизање конfluентности, започињање апоптозе [78], излагање киселој средини или отпочињање инфламације [77].

У току гајења у медијуму са 7,5 % феталним говећим серумом (енгл. *fetal bovine serum, FBS*) више од 75 % астроцита имало је липидне капи у себи (критеријум: две или више), да би 24 часа након уклањања серума из медијума за гајење тај број пао на око 25 % ћелија уз заустављање пролиферације астроцита у култури, али без пада вијабилности (додатни материјал у публикацији [77]). Уклањање серума се из тог разлога може користити и за синхронизацију културе астроцита [79,80]. Скорашње

истраживање pokazalo je da u astroцитима који имају накупљених масних капи и који се потом изложе депривацији глукозе и серума, долази до коришћења масних капи у процесу β -оксидације масних киселина. То је утврђено на индиректан начин обележавањем са 1 $\mu\text{Ci/ml}$ трицирне (^3H) палмитинске киселине у одсуству серума и праћењем производње трициране воде ($^3\text{H}_2\text{O}$). Смрт астроцита је била повезана са потпуном потрошњом масних капи која је изазвана управо излагањем астроцита недостатку серума у трајању од 24 часа пре него што су изложени депривацији и глукозе и серума (тзв. комплетна депривација нутријената, енгл. *complete nutrient deprivation*) [81].

Студија на хепатоцитима показала је одређену везу између аутофагије и метаболизма липида коју су аутори назвали макролипофагија [67]. Наиме, слободне масне киселине у хепатоцитима могу или да се користе (у процесу β -оксидације масних киселина) или да се чувају (превођењем у триглицериде, заједно са холестеролом, депонују се као липидне капи) што су два дијаметрално супротна процеса. Поменута студија је показала да смањење аутофагије (фармаколошки или помоћу мале интерферирајуће РНК, скраћено енгл. *siRNA*) повећава садржај триглицерида и холестерола у хепатоцитима изложеним липидном стимулусу/стресу, али у исто време и појачава β -оксидацију масних киселина, док се током активације аутофагије смањује број масних капи и триглицерида. На основу овог резултата закључује се да веза између ова два процеса постоји, али размере и тачан механизам доприноса аутофагије разградњи унутарћелијских липида још увек су нејасани [68]. Cabodevilla и сар. нису показали да је аутофагија имала улогу у мобилизацији масних капи за β -оксидацију масних киселина указујући на то да је веза између аутофагије и липидног метаболизма сложенија и специфична за тип ћелија, међутим без података за астроците [81]. Показано је да инхибиција аутофагије може да побољша преживљавање астроцита изложених комбинованој депривацији кисеоника и глукозе [23], доводећи у везу аутофагију и апоптозу (преко Bcl-2).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ овог истраживања био је да се покаже да ниво глукозе и кисеоника у медијуму има пресудни значај на преживљавање астроцита, отпочињање аутофагије, као и одржавање и хиперполаризацију мембранског потенцијала митохондрија.

Из описаног циља произашли су следећи задаци истраживања:

1. Испитати поларизацију мембране митохондрија у астроцитима који преживе 6 и 8 часова OGD (са 1 % O₂ и алтернативним нитријентима). Очекује се да након OGD митохондрије у преживелим астроцитима нису деполарисане. Такође, испитати промене мембранског потенцијала митохондрија астроцита на накнадни третман натријум азидом у циљу поређења осетљивости респираторног ланца и АТФ-азе на фармаколошку инхибицију респирације астроцита претходно изложених OGD и контролних астроцита.
2. Показати да депривација глукозе доводи до хиперполаризације мембране митохондрија астроцита. Ради поређења са променама током OGD, од посебног интереса су поменуте две временске тачке 6-и и 8-и сат, када се по литературним подацима очекује да током OGD долази до повећања смртности астроцита.
3. С обзиром да ниво глукозе утиче на ниво оксидативног метаболизма у астроцитима, постављена је хипотеза да недостатак кисеоника испољава додатни хиперполаризујући ефекат на астроците са повећаним у односу на астроците са смањеним оксидативним метаболизмом. Испитати ефекат депривације кисеоника која следи након депривације глукозе. Такође, испитати да ли постоји синергистички ефекат између депривације кисеоника и депривације глукозе.
4. Испитати преживљавање астроцита у условим депривације нутријената уз фармаколошку инхибицију процеса аутофагије и липолизе. Ако се астроцити у условима недостатка хранљивих материја ослањају на ова два процеса као на извор енергије, њихова инхибиција треба да доведе до пада ψ_m и ћелијске смрти.
5. Коначно, показати да враћање нутријената спасава астроците од ћелијске смрти.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

3.1. ПРИМАРНА ЋЕЛИЈСКА КУЛТУРА КОРТИКАЛНИХ АСТРОЦИТА

Ћелијске културе за потребе ове студије гајене су под уобичајеним *in vitro* условима у инкубатору са влажном атмосфером уз удео угљен диоксида од 5 % и при температури од 37° С. У овом раду коришћени су пацови соја *Wistar* који су узгајани у Виваријуму Института за физиологију и биохемију Биолошког факултета, Универзитета у Београду. Животињама су храна и вода биле доступна *ad libitum* и одржаване су под дванаесточасовним дневно-ноћним ритмом на собној температури. Поступак жртвовања пацова и изоловања нервног ткива за културе одобрен је од стране Етичког комитета Биолошког факултета.

3.1.1. Раствори и реагенси за изолацију астроцита

Физиолошки раствор са фосфатним пуфером (PBS) коришћен је за дисекцију и испирање ткива приликом изолације кортикалних астроцита и касније током одржавања ћелијских култура, као и за испирања приликом имуноцитохемијских бојења. Овај раствор припреман је растварањем 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ и 0,2 g KH₂PO₄ у 1000 ml дејонизоване воде.

Медијум за гајење ћелија DMEM+ прављен је од основног медијума DMEM у који је (у зависност од основног састава) додавано 2 mM L-глутамин, 100 IJ/ml пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина, 1 mM натријум пирувата и 10 % феталног телећег серума (FBS). Медијум за изолацију ћелија L-15+ прављен је од основног медијума „Leibovitz L-15“ у који је додат 2 mM L-глутамин, 100 IJ/ml пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина и 0,1% BSA.

За одлепљивање астроцита са подлоге при пресејавању коришћен је раствор трипсина који је припреман додавањем 250 mg овог ензима и 20 mg EDTA у 100 ml PBS (0,25 % трипсин, 0,02 % EDTA) и овако припремљен раствор трипсина аликвотиран је и до употребе чуван на -20° С.

3.1.2. Изолација примарних кортикалних астроцита из мозга пацова

Културе примарних астроцита изоловане су из фронтотаријеталног церебралног кортекса новорођених пацова старих између нултог и два дана (P0-2) модификацијама протокола проистеклим из рада McCarthy и de Vellis [82,83].

Ћелијска култура добијена из кортекса новорођених пацова представља мешовиту примарну културу нервног ткива у којој је најзаступљенија астроглија за којом следе микроглија и олигодендроглија. Неурони слабије преживљавају што је животиња старија [82], међутим тада се очекује већи принос прекурсора олигодендроглије [84]. Применом различитих протокола могуће је добити чисте ћелијске културе сва три типа глијалних ћелија [84-89]. Разликовање осталих глијалних ћелија од астроцита могуће је како према морфологији, тако и према неједнакој оптичкој густини приликом микроскопирања уз употребу фазног контраста. Астроцити су слабо контрастни, па стога изгледају равни, док се олигодендроцити одликују сферичним телом са израженијим контрастом у односу на подлогу и са већим бројем гранатих наставака који се пружају ка суседним ћелијама. Микроглија се уочава на два начина: налази се на површини мешовите културе као тамна, округласта и са светлим прстеном око тела ћелија, најчешће врло слабо закачена тако да се може уклонити трешењем [85], али се такође налази и испод астроцита и, уколико су услови повољни, значајан принос микроглије може се добити селективним одлепљивањем слоја астроцита [86].

Алат за дисекцију је припреман непосредно пред почетак изолације тако што су инструменти након натапања и испирања 70 %-им етанолом излагани дејству ултра-љубичастих зрака унутар ламинарне коморе у трајању од најмање 30 минута. Као физиолошки раствор за дисекцију коришћен је хладан PBS, а ћелије су потом пребациване у L-15+ медијум. Глава и врат младунаца дезинфиковани су 70 %-им етанолом, а затим је глава одсечана маказама и мозак је изолован на Петри шољи са ледом. Мозак је затим пребациван у Петри шољу са хладним PBS у коме су под бинокуларном лупом прво очишћене мождане овојнице њиховим повлачењем заједно са олфакторним булбусима, затим је уклоњен хипокампус и потом су издвојене хемисфере мозга. Овако очишћени кортекси (2 хемисфере по фласку) пребацивани

су у 15 ml епрувету са L-15+ медијумом на леду и ткиво је преношено у ламинарну комору за стерилни рад.

Дисоцирање можданог ткива вршено је механички пипетом са пластичним наставком од 1 ml. Ћелијска суспензија је затим центрифугирана 5 минута на 500 g. Након центрифугирања супернатант је одливан и ћелије су ресуспендоване у 5 ml L-15+ медијума. Након мешања пипетом са наставком од 1 ml, ћелијска суспензија је опет центрифугирана 5 минута на 500 g. Након центрифугирања одливан је супернатант и ћелије су ресуспендоване у 2 ml L-15+ и пребачене у тубицу од 2 ml. Уследило је провлачење суспензије ћелија 3 пута кроз стерилну 21 g иглу. Садржај шприца након последњег провлачења пребациван је у 15 ml епруверу, додавано је 3 ml L-15+ медијума до финалних 5 ml и ћелијска суспензија је још једном (трећи пут) центрифугирана 5 минута на 500 g. Након последњег центрифугирања, супернатант је одливан и ћелије су ресуспендоване у 2 ml DMEM+ медијума. Оваква суспензија ћелија је додата у већ постојећих 3 ml DMEM+ медијума у пластичним флашковима површине 75 cm² (2 хемисфере по фласку) који су за време изолације били у инкубатору.

Прва промена медијума следила је након 48 h уз пажљиво руковање флашковима и минимално ремећење мешовите културе ћелија. Медијум је мењан на свака два дана да би се фаворизовао раст астроглије у односу на остале типове глије. Након 8 дана у *in vitro* (DIV8) условима, ћелије су испране загрејаним PBS и енергично протрешене да би се слабо залепљена микроглија и прекурсори олигодендроглије одлепили, а затим је медијум поново додат у флашкове.

3.1.3. Расејавање астроцита у култури

Након још два дана (DIV10), поступак испирања и трешења са PBS је поновљен. Ћелије су испране загрејаним PBS са додатком EDTA (5 mM [82]) и затим још 3 пута PBS без EDTA да би се уклонили трагови FBS, Ca²⁺ и EDTA, а затим су из фласкова астроцити одлепљивани раствором трипсина (1 ml) у трајању од 1-2 минута на 37° C. Након одлепљивања у фласк је додавано 4 ml загрејаног DMEM+ да би се инактивисао трипсин. Садржај флашка је пребациван у 15 ml епрувету. Ћелије су потом центрифугиране 5 минута на 500 g. Након центрифугирања одливан је супернатант и ћелије су ресуспендоване у 2 ml загрејаног DMEM+ и у нове флашкове пребачена је по 1/3 ћелија. Ћелије су гајене у DMEM+ наредних 10 дана уз промену медијума на свака

2 дана уз испирање PBS и трешење, а затим су истим поступком расејавања астроцити засејани у густини 80×10^3 ћелија/ml у 250 μ l медијума у средини Петри шоље пречника 35 mm. За утврђивање броја ћелија коришћен је раствор трипан плавог и коморица за бројање (Neubauer). Уобичајен број живих ћелија био је 2-5 милиона ћелија по фласку. Након 10 минута, када би се све ћелије залепиле за подлогу, додавано је 2 ml DMEM+ медијума. Астроцити су коришћени за експерименте четри дана касније након што би достигли конфлуентност у кругу у коме су били засејани.

3.2. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА УДЕЛА АСТРОЦИТА У КУЛТУРИ ПРИМЕНОМ ИМУНОЦИТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ

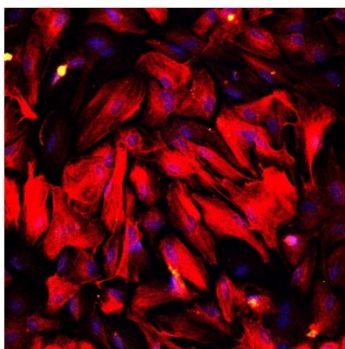
Да би се одредио удео астроцита у култури ћелија изолованих из кортекса пацова према горе описаној методи, ћелије су засејане на покровна стакла и након достизања око 70 % конфлуентности културе приступано је имуноцитохемијском протоколу. Ћелије су испирание у PBS да би се уклонили трагови медијума за гајење, а затим су фиксирание 20 минута у 4 % PFA. После три испирања по 5 минута у PBS, астроцити су пермеабелизовани 10 минута помоћу 0,05 % Triton-X 100, а неспецифично везивање секундарног антитела блокирано је 30 минута са 10 % серумом из животиње из које је добијено секундарно антитело и 1 % BSA.

Следећа примарна антитела су коришћена за инкубацију преко ноћи на $+4^\circ$ C: зечје антитело против GFAP (1:500), мишије антитело против CNP-азе (1:200) и козје антитело против Iba1 (1:500). Разблажења примарних антитела су припремана у раствору који садржи 1 % одговарајућег серума и 1 % BSA.

Ћелије су испирание три пута по 10 минута у циљу уклањања неvezаног примарног антитела пре инкубације са флуоресцентно обележеним секундарним антителом: магареће против зеца Alexa 555, магареће против миша Alexa 488 и магареће против козе Alexa 647 (за сва секундарна антитела 1:200) у трајању од 2,5 часа у мраку на собној температури. Ћелије су испирание пет пута по 5 минута PBS и затим инкубирание 10 минута са 4',6'-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 1:4000) који обележава једра ћелија. Након још пет испирања по 5 минута PBS, ћелије су постављене на микроскопска стакла преко капљице *Mowiol* гела. Имуноцитохемијски

препарати су одлагани на +4° C до снимања на конфокалном ласерском скенирајућем микроскопу.

Снимање имуноцитохемијских препарата је урађено на конфокалном ласерском скенирајућем микроскопу (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Немачка) објективом Plan-Neofluar 20x/0,75. Екситација флуорофора постигнута је ласерском линијом аргонског ласера (Ar) и хелијум-неонских ласера (HeNe), а емисиона светлост раздвајана је одговарајућим филтерима на следећи начин: GFAP: HeNe 543 nm и ускопојасни филтер BP 560-615, Iba1: HeNe 633 nm и широкопропусни LP 650 и CNP: Ar 488 nm и ускопојасни филтер BP 505-530. DAPI сигнал је сниман пропуштањем светлости живине лампе кроз екситациони филтер за ову боју. Сlike добијене са истог видног поља су потом преклопљене (слика 3).



100 μm

Слика 3. Карактеризација удела астроцита у култури применом имуноцитохемијске методе

Црвеном бојом обележен је маркер астроцита (GFAP), жутом бојом маркер микроглије (Iba1), док се плавом бојом виде обележена једра хелија (DAPI). Процена удела астроцита у хелијској култури износила је око 97-98 %.

3.3. ПРОТОКОЛИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ *IN VITRO* МОДЕЛА ДЕПРИВАЦИЈЕ КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ, ХЕМИЈСКЕ ХИПОКСИЈЕ И ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

У експериментима где је испитиван утицај депривације кисеоника и глукозе (OGD) на промене ψ_m процедура је у основи била подељена у три корака: прекондиционирање депривацијом глукозе, сама OGD и симулирана реперфузија/реоксигенација.

У току депривације глукозе, астроцити су били изложени медијуму без глукозе: (1) DMEM медијуму без глукозе са додатим 1 % серумом (означен као „low glucose“, IG) или (2) Neurobasal-A медијуму са додатим 2 % B-27 суплементом и 1 %

L-глутамином (означен као „no glucose“, nG). Медијум са свим потребним нутријентима био је на бази DMEM медијума са 25 mM глукозом и 10 % серумом (означен као „high glucose“, hG) (слика 4).

Астроцити су пре почетка експеримента испрани три пута одговарајућим растворима (или IG или nG), а затим су уколико се радило о хипоксији пребачени у инкубатор (Binder Labware, Tuttlingen, Немачка) са влажном атмосфером који је имао гасну смешу подешену на 1 % O₂, 5 % CO₂ и 94 % N₂, са температуром од 37° C у трајању од 6 или 8 часова. Уколико се радило о нормоксичним условима астроцити су изложени стандардној гасној смеси у којој су и гајени. Након OGD културе астроцита су извађене из хипоксичне средине и на тај начин дошло је до реоксигенације. Свеж медијум био је замењен и ћелије су враћене у стандардне нормоксичне услове гајења на 10 минута (5 % CO₂, 37° C) симулирајући реперфузију *in vivo*. Након тога астроцити су обојени са JC-1 флуоресцентном бојом и снимани на флуоресцентном микроскопу.

Натријум азид (NaN₃), инхибитор цитохром C оксидазе (комплекс IV) и хидролизујуће функције F₀F₁-АТФ-азе [90-93] коришћен је за изазивање „хемијске хипоксије“ и то у концентрацијама од 5, 10 и 25 mM у трајању од 10 минута и дуже. Такође је коришћена и висока концентрација водоник-пероксида (3 и 15 mM H₂O₂, 15 минута и дуже) у циљу потврде резултата добијених са NaN₃ с обзиром да те концентрације H₂O₂ доводе до оксидативног стреса, пада ψ_m и ћелијске смрти [94]. У овим експерименталним условима флуоресценција пореклом од JC-1 боје снимана је без испирања NaN₃ или H₂O₂, јер се у претходним пробним експериментима показало да је ефекат NaN₃ пролазан и реверзибилан већ 15 минута након његовог испирања.

3.4. ПРОТОКОЛИ ЗА ИЗАЗИВАЊЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА И ИНХИБИЦИЈУ АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ

Астроцити су испрани три пута и тиме је медијум за гајење у потпуности замењен са 2 ml Ерловог балансираног раствора соли (енгл. *Earle's Balanced Salt Solution, EBSS*) који је садржао (у mM-има): 116 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,8 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ чија је pH била подешена на 7,4, а осмоларитет је износио 260-280 mOsm. Такав раствор соли коришћен је за изазивање депривације нутријената, а уколико се

радило о раствору са нутријентима у њега је додата 25 mM глукоза са или без 10 % серума (FBS). Астроцити су инкубирани у стандардним нормоксичним условима у инкубатору са влажном атмосфером уз удео угљен диоксида од 5 % и при температури од 37° С. Да бисмо испитали ефекат инхибиције аутофагије/липолизе на вијабилност астроцита, они су третирани хлорокином (CQ) односно орлистатом. Хлорокин [95,96] доводи до повећања рН лизозома и ендозома, тиме ремети функционисање ензима у лизозомима који иначе функционишу у киселој средини, спречава фузију аутофагозома и лизозома, доводи до нагомилавања аутофагозома и на тај начин доводи до инхибиције аутофагије, док је орлистат инхибитор липаза, као и инхибитор синтезе масних киселина. Финалне концентрације хлорокина и орлистега износиле су 100 μM према суб-максималним концентрацијама у претходним студијама са хлорокином [97-99], одн. орлистатом [100-102].

Временске тачке у којима хлорокин и орлистат доводе до смрти астроцита одређене су систематским испитивањем различитих времена инкубације: 1-13 часова за хлорокин и 8, 12, 18, 20 и 22 часа за орлистат. У зависности од циља експеримента смртност је праћена током самог третмана (хлорокин и орлистат), односно у 24-ом часу када је извођена краћа инхибиција аутофагије хлорокином, сензитизација астроцита на депривацију нутријената и експерименти са спасавањем враћањем нутријената у раствор соли.

3.5. ЕСЕЈИ ВИЈАБИЛНОСТИ АСТРОЦИТА У КУЛТУРИ

У циљу детектовања вијабилности астроцита путем флуоресцентне микроскопије користили смо бојења акридин наранџастим и пропидијум јодидом. Акридин наранџасто („акридин-оранџ“, енгл. *acridine orange*, *AO*) је благо катјонска, липофилна, слаба база која лако пролази ћелијску мембрану у својој неутралној форми. Често се користи као боја за одређивање вијабилности ћелија зато што диференцијално може да обоји нуклеинске киселине (дволанчана ДНК *vs.* једноланчана ДНК или РНК), као и да разликује здраве од апоптотских ћелија с обзиром да релативна дистрибуција еухроматина и хетерохроматина одређује структурне варијације у интензитету флуоресценције [103,104]. Међутим, након што се протонује ова боја постаје заробљена унутар киселих везикула, јер у таквом стању

не може да прође кроз плазма мембрану, што доводи до нагомилавања АО (преглед дат у [105]). Још су 1963-е Robbins и Marcus [106] показали да приликом коришћења ниске концентрације боје (1:1.000.000, одн. 3,2 μM ; у поређењу са 1:20.000) долази до промене у обрасцу бојења чак и при дужим третманима – цитоплазма не показује „црвенило“ (енгл. *cytoplasmic reddening*, CR) и примећују се само формирање партикула акридин наранџастог (енгл. *acridine orange particle*, AOP) у околини једра, али се на сликама такође види да нема бојења једарног материјала или цитоплазме. Уколико се ћелије боје у медијуму (уместо у балансираном раствору соли) третман може трајати и 48 часова. Аутори су показали да са већом концентрацијом боје долази до јасног бојења једарног материјала, појаве „црвенила“ у цитоплазми и губитка партикула акридин наранџастог. Чак и у таквој ситуацији са испирањем је било могуће након два часа видети исту слику као и приликом употребе ниских концентрација, што је демонстрирало реверзибилност процеса. С обзиром да пропидијум јодид боји само пикнотичка једра ћелија које су изгубиле интегритет цитоплазме, преостала црвена флуоресценција може потицати и од његовог везивања за РНК или АО флуоресценције из киселих везикула. Такође, наведено је и у другим протоколима и студијама да се једра ћелија које су кренуле пут апоптозе боје са АО јарко зелено [104,107]. У експериментима приказаним у овој студији здраве ћелије су окарактерисане одсуством једарних бојења са АО и PI, као и морфологијом која одговара нетретираној конфлуентној култури. Ћелије под метаболичким стресом са могућношћу уласка у апоптозу имале су јарко зелено обојена једра, док су мртве ћелије имале таман једарни материјал видљив на фазном контрасту који је био црвено флуоресцентан услед уметања PI у нуклеинске киселине.

Астроцити су били обојени или са мешавином АО (0,5-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ одн. 1.66-3.32 μM) и PI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 1.50 μM) или само са PI. У другом случају, максималан број ћелија је одређен додавањем Triton-X 100 директно у Петри шољу (без њеног померања са постоља микроскопа) до финалне запремине 0,01 % (170 μM), док су слике снимљене након 10-15 минута инкубације. За микроскопију је коришћен Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Јена, Немачка) инвертовани микроскоп са EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 објективом. Коришћене боје су ексцитиране са полихроматорским системом VisiChrome и флуоресценција је снимљена „Evolve“ EMCCD 512 Photometrics дигиталном камером кроз Chroma сет филтера. Зелена флуоресценција (једноланчана ДНК, цитоплазматско бојење, ниска концентрација АО боје у слабо киселим

везикулама) снимљена је подешавањима за FITC (ексцитација/емисија = 488/535 nm), а црвена флуоресценција (концентрирана АО боја, кисела средина, пропидијум јодид) детектована је подешавањима за TRITC (ексцитација/емисија = 545/630 nm). Број АО⁺ и PI⁺ једара одређен је коришћењем програма IMARIS (Bitplane AG, Цирих, Швајцарска) и комбиновањем процедура „surface“ и „spots“ у аутоматску рутину за бројање једара. Приликом неколико прелиминарних бојења коришћен је и флуоресценин диацетат (FDA, 3 µg/ml) чија се флуоресценција у живим ћелијама дејством естераза активира кроз уклањање естарски везаних ацетатних група.

3.6. ПРАЋЕЊЕ ПРОМЕНА МЕМБРАНског ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА ПОМОЋУ JC-1 БОЈЕ

Промене мембранског потенцијала митохондрија ($\Delta\psi_m$) праћене су бојењем астроцита JC-1 бојом (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензимидазол карбоцијанин јодид). То је липофилна, катјонска боја чије се накупљање у електронегативном матриксу митохондрије објашњава Нернстовом једначином [108-110]. Код осталих флуоресцентних боја, које се користе у сврху праћења промена мембранског потенцијала митохондрија, приликом пораста концентрације боје у матриксу митохондрије (и тиме учесталије интеракције молекула боје) долази до гашења флуоресценције (енгл. *quenching*). Међутим, код JC-1 боје након агрегације долази до промене у спектру емисије, па тако мономерна форма има максимум флуоресценције на 530 nm (зелени мономер), док агрегирана форма има максимум флуоресценције на 590 nm (црвени „J-агрегат“) [40,46,110-115]. За ексцитирање мономера и снимање зелене JC-1 емисионе светлости могу се користити одговарајућа подешавања за флуоресценин, док се за ексцитирање агрегата и снимање црвене JC-1 емисионе светлости могу користити одговарајућа подешавања за родамин. Међутим, уколико се снимање обе флуоресценције обавља истовремено уз раздвајање емисионе светлости, онда се ексцитација врши плавом светлошћу [112].

Астроцити су бојени у инкубатору на 37° C са JC-1 бојом концентрације 2.5 µg/ml у трајању од 15 минута. Након тога ћелије су испране три пута раствором

соли (PBS или EBSS) и боја је остављена још 10 минута на собној температури да постигне равнотежу унутар ћелија пре него што би се приступило снимању.

За микроскопију су коришћена два микроскопска система. Први систем је био Nikon Eclipse Ti-E инвертовани микроскоп са Plan Fluor 10x објективом. JC-1 је ексцитирана помоћу Nikon C-HGFIE Intensilight (Precentered Fiber Illuminator) и флуоресценција је снимљена помоћу Nikon DS-Qi1Mc дигиталне камере. Црвена флуоресценција детектована је подешавањима за $Cy3$ (ексцитација/емисија = 550/570 nm), док је зелена флуоресценција детектована подешавањима за FITC (ексцитација/емисија = 485/535 nm). Добијене слике анализирани су помоћу NIS-Elements v3.0 програма (Nikon Instruments Inc., Melville NY, САД) одређивањем средње вредности флуоресценције за сваки канал.

Други систем је био LSM 510 конфокални ласерски скенирајући микроскоп (Carl Zeiss, Јена, Немачка) са Achromplan 40x/0,8 W објективом. Ексцитација JC-1 боје постигнута је аргонским ласером на 488 nm. Емисиона светлост развојена је употребом дихроичног огледала NFT 545 (нем. *NebenFarbeTeiler*). Црвена флуоресценција детектована је широкопропусним LP 585 филтером, док је зелена флуоресценција детектована ускопојасним BP 505-550 филтером. Слике су анализирани помоћу пратећег Carl Zeiss програма (верзија 3.2 SP2) одређивањем средње вредности флуоресценције за сваки канал.

Вредности интензитета флуоресценција, једне пореклом од агрегатног (црвено) и друге пореклом од мономерног (зелено) стања JC-1 боје, прво су нормализоване у односу на одговарајућу контролу, а затим је израчунат њихов количник као мера релативне промене мембранског потенцијала митохондрије.

3.7. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Мерења из појединачних Петри шоља извршена су најмање у трипликатима, а добијени резултати из појединачних експеримената у различитим експерименталним данима су усредњени и нормализовани. Сви добијени резултати тестирани су на нормалну дистрибуцију Shapiro-Wilk тестом. Статистичка значајност разлика између група анализирана је помоћу one-way ANOVA теста, док су међусобна поређења група

извршена помоћу Holm-Sidak's *post hoc* testa у програму GraphPad Prism (верзија 5.03). У случају two-way ANOVA коришћена је апроксимација теста коју поменути програм пружа. Све вредности изражене су као средње вредности \pm стандардна девијација, док је вредност $p < 0,01$ сматрана је статистички значајном (приказано са два одговарајућа симбола, у односу на вредност $p < 0,05$ приказану једним симболом).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. УТИЦАЈ ДЕПРИВАЦИЈЕ КИСЕОНИКА И ГЛУКОЗЕ НА ПРОМЕНЕ МЕМБРАНског ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА

4.1.1. Утицај OGD и накнадне хемијске хипоксије на мембрански потенцијал митохондрија астроцита

Да бисмо испитали промене ψ_m у условима OGD (са 1 % O₂ и алтернативним нутријентима), астроцити су изложени овом третману у трајању од 6 часова, након чега су враћени у нормоксичне услове у трајању од 10 минута уз промену медијума, обојени флуоресцентом бојом JC-1 којом се прате промене ψ_m и потом снимани флуоресцентним микроскопом (слика 4).

Ефекат хемијске хипоксије натријум азидом (NaN₃) испитан је у циљу поређења осетљивост респираторног ланца и АТР-азе на фармаколошку инхибицију респирације [90-93] између астроцита у условима симулиране реперфузије која је следила након шест сати депривације кисеоника у медијуму са сниженом глукозом (lG) и контроле. Контролни астроцити су инкубирани у нормоксичним условима у медијуму са високом концентрацијом глукозе (hG).

Као што се на слици 5А може видети није било значајних разлика у $\Delta\psi_m$ између астроцита у контролној и OGD групи. Ипак, након третмана са 5 и 10 mM NaN₃ дошло је до значајног дозно-зависног смањења ц/з количника JC-1 сигнала код третираних контролних астроцита у поређењу са нетретираном контролом ($0,831 \pm 0,189$ % и $0,581 \pm 0,153$ %, $p < 0,01$). Са друге стране, астроцити који су били изложени шест сати OGD и након тога третирани са 5 mM NaN₃ нису показали значајне промене у ц/з количнику JC-1 сигнала у односу на астроците изложене OGD без третмана са NaN₃. То уједно значи да је третман са 5 mM NaN₃ контролних астроцита и астроцита током симулиране реперфузије довео до значајних разлика између ове две групе ($0,831 \pm 0,189$ % *vs.* $0,974 \pm 0,149$ %, $p < 0,01$).

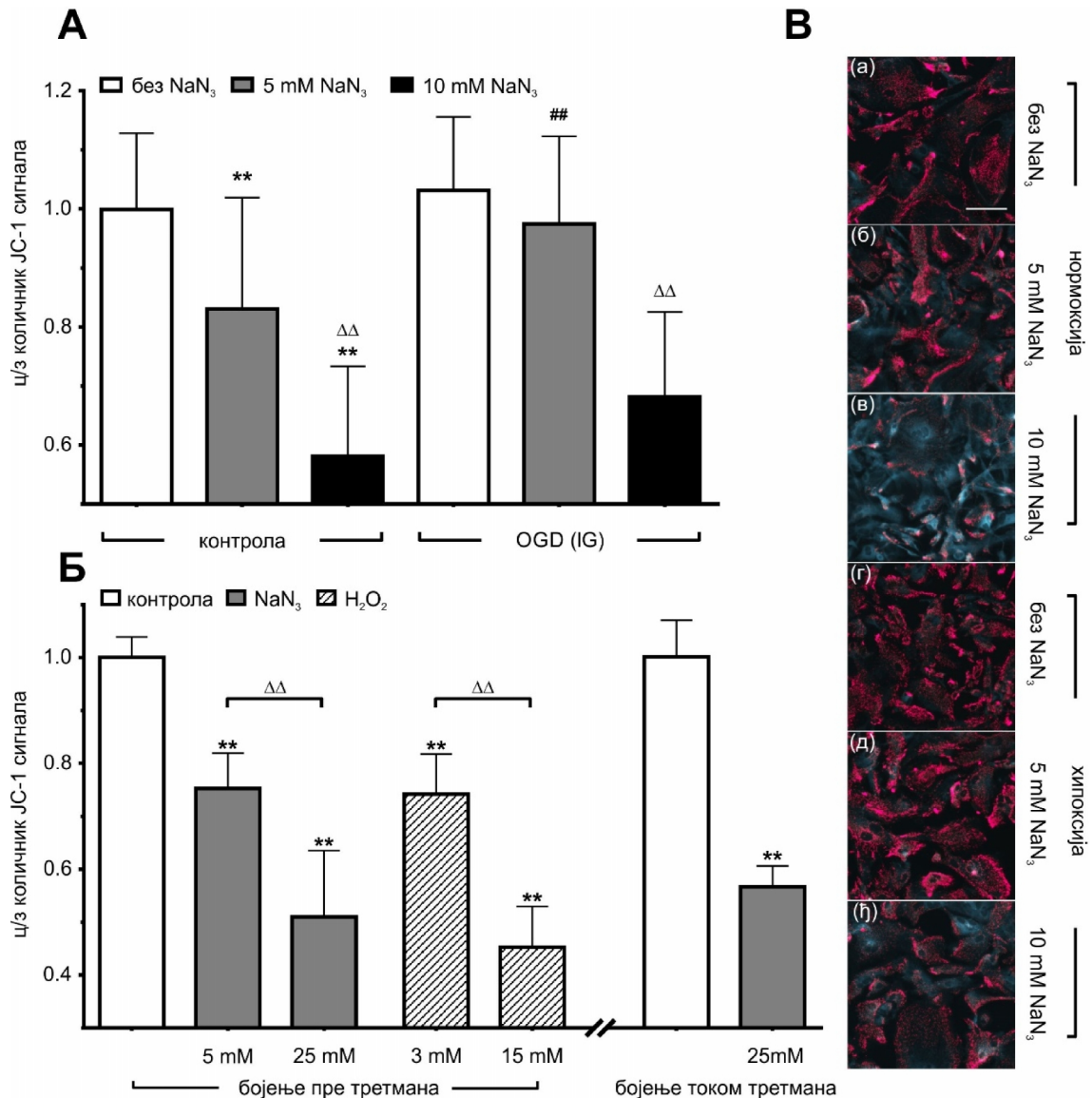


“high glucose” (hG) - DMEM са 25 mM глюкозом + 10 % FBS
 “low glucose” (IG) - DMEM без глукозе + 1 % FBS
 “no glucose” (nG) - Neurobasal-A без глукозе + 2 % B27 суплемент без серума + 1 % L-глутамин

Слика 4. Шематски приказ експерименталног дизајна у испитивању утицаја OGD на промене ψ_m астроцита

Дијаграм приказује повезаност експеримената и резултата који су из њих проистекли. Кораци приказани овалним обликом представљају експерименталну поставку, док су угластим обликом кратко представљени основни закључци.

Иако је овај тренд поновљен у групама третираним са 10 mM NaN_3 ($0,581 \pm 0,153\%$ vs. $0,682 \pm 0,144\%$), међу њима нису пронађене значајне разлике. Деполаризација је видљива код астроцита који су били у контролној групи (слика 5B под б и в) видљиво као дозно-зависно смањење магента боје и појачање плаве боје), али су те промене мање изражене код астроцита у OGD групи након третмана NaN_3 -ом (слика 5B под д и ђ). Из ових резултата закључујемо да комбинована депривација кисеоника и снижене глукозе (IG медијум) значајно успорава смањење количника флуоресценција JC-1 боје изазване третманом са 5 mM NaN_3 током симулиране реперфузије астроцита у односу на контролу.



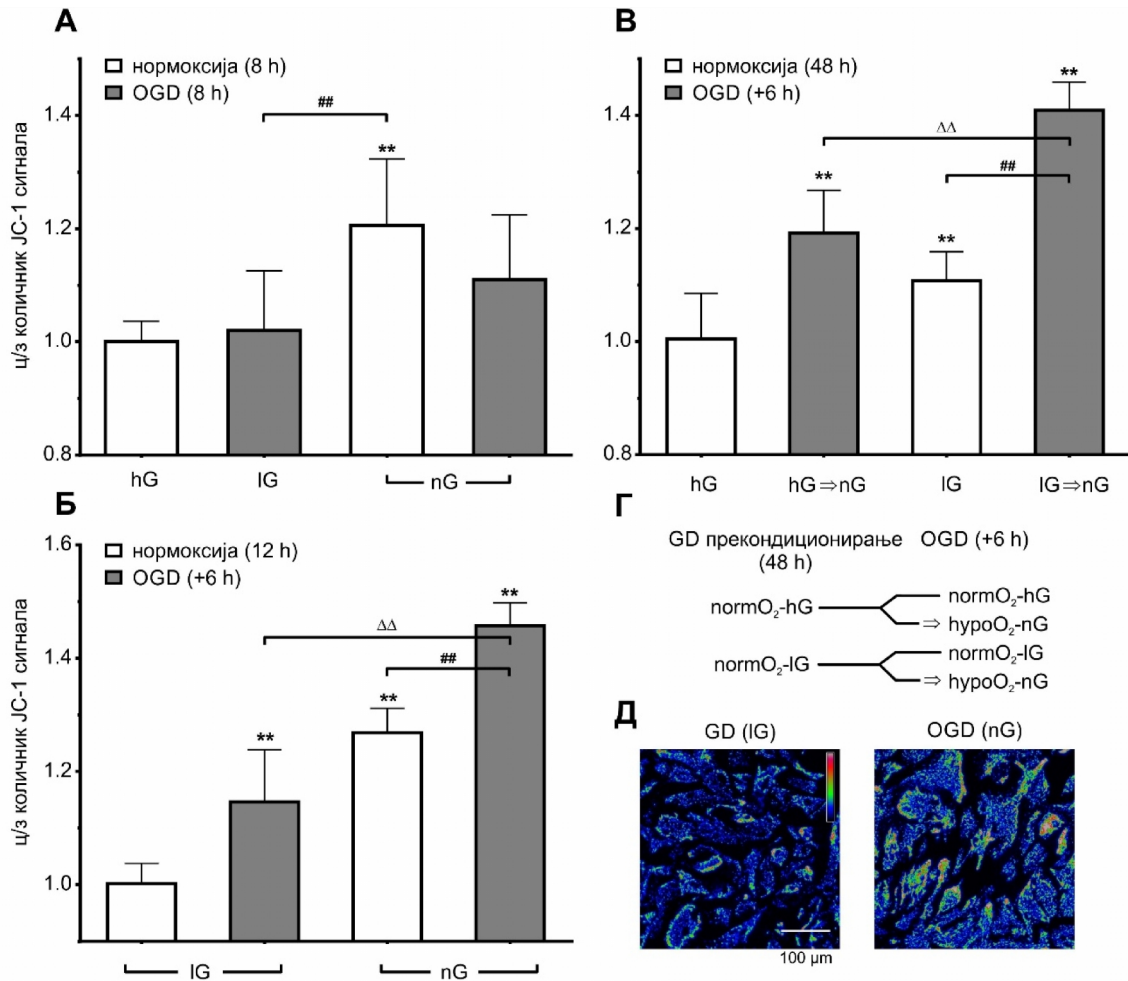
Слика 5. Утицај OGD-а и накнадне хемијске хипоксије на мембрански потенцијал митохондрија астроцита

(А) Астроцити су изложени условима OGD (са 1% O_2 и алтернативним нутријентима) у трајању од шест часова, након чега су враћени у нормоксичне услове у трајању од 10 минута уз промену медијума, обојени флуоресцентом бојом JC-1 и потом снимани флуоресцентним микроскопом. Накнадно су третирану натријум азидом (NaN_3) у циљу фармаколошке инхибиције респирације. (Б) Астроцити су изложени различитим концентрацијама NaN_3 и H_2O_2 у трајању од 15 минута. Обојени су са JC-1 пре или током третмана са NaN_3 (означено испод x-осе као бојење пре и током третмана). (А и Б) Значајност разлика обележена је са: * у односу на нетретирану контролу (први стубић са леве стране), # за разлике између третмана и одговарајуће контроле и Δ за разлике између различитих концентрација хемикалија. (В) Репрезентативне флуоресцентне микрографије астроцита обележених са JC-1 бојом. Оригиналне микрографије су преведене у палету тританопија типа (ImageJ 1.48a). Скала представља 100 μm

Наш следећи циљ је био да упоредимо ефекте NaN_3 и H_2O_2 на ψ_m астроцита (слика 5Б). Да бисмо то испитали астроцити су изложени различитим концентрацијама NaN_3 и H_2O_2 у трајању од 15 минута, те смо првом хемикалијом симулирали услове престанка рада ланца транспорта електрона, док смо другом симулирали појачано оксидативно оштећење. Дозно-зависно и значајно смањење ц/з количника JC-1 сигнала забележено је за NaN_3 ($0,752 \pm 0,067$ % за 5 mM и $0,51 \pm 0,125$ % за 25 mM, $p < 0,01$) и за H_2O_2 ($0,742 \pm 0,076$ % за 3 mM, и $0,453 \pm 0,077$ % за 15 mM, $p < 0,01$). Када су црвени и зелени сигнал засебно анализирани, нашли смо да NaN_3 доводи до повећања зеленог сигнала до $1,886 \pm 0,254$ % (црвени сигнал је остао на $0,989 \pm 0,211$), док је H_2O_2 довео до смањења зеленог сигнала на $0,900 \pm 0,333$ %, али и црвеног сигнала на $0,398 \pm 0,135$ %. Пуњење астроцита JC-1 бојом под инхибицијом рада ланца транспорта електрона није довело до значајних разлика у бојењу (и квалитативно и квантитативно) у односу на протокол по коме су астроцити обојени пре почетка третмана. Резултат показује да NaN_3 није утицао на пропустљива својства ћелијске мембране омогућавајући боји JC-1 да уђе у цитоплазму, а затим и у митохондрије астроцита.

4.1.2. Утицај нивоа глукозе током депривације кисеоника на промене мембранског потенцијала митохондрија астроцита

Да бисмо даље испитали ефекат OGD на $\Delta\psi_m$ продужили смо трајање саме OGD на 8 часова, односно астроцити су били изложени хипоксији или у медијуму са мало глукозе (lG) или у медијуму без глукозе (nG). Такође је праћен ефекат излагања овим медијумима у нормоксичним условима, односно условима без депривације кисеоника (слика 6А).



Слика 6. Утицај нивоа глукозе током депривације кисеоника на промене мембранског потенцијала митохондрија астроцита

(**А**) Астроцити су изложени депривацији кисеоника и глукозе (сиви стубићи) или само депривацији глукозе (бели стубић nG) у трајању од 8 часова и затим су праћене промене JC-1 сигнала током симулирне реперфузије. (**Б**) Астроцити су прекодиционарани у трајању од 12 часова у медијуму који је садржао мало или ни мало глукозе (IG или nG), а затим су изложени нормоксичним (бели стубићи) или хипоксичним условима (сиви стубићи) додатних шест часова. (**В**) Астроцити су били изложени два дана медијуму са високом концентрацијом глукозе (hG) или медијуму са ниском концентрацијом глукозе (IG). Након тога астроцити су били изложени хипоксичним условима без глукозе следећих шест сати (сиви стубићи) или нормоксичним условима у одговарајућем медијуму (бели стубићи). Значајност разлика обележене су са: * у односу на контролу (нормоксија у hG за график **А** и **В**, и нормоксија у IG за график **Б**), # између нормоксије и OGD (у IG или nG) и Δ између два OGD третмана. (**Г**) Схематски приказ дизајна експеримента под В. Трајање сваког од третмана приказано је у заградама. (**Д**) Репрезентативне микрографије астроцита црвеног сигнала пореклом од JC-1 боје. Оригиналне микрографије су преведене у палету боја „rainbow“ која кроз промену боје показује промену интензитета сигнала (ImageJ 1.48a).

Није пронађена значајна интеракција ефеката састава коришћених медијума и OGD третмана астроцита (two-way ANOVA, $p > 0,05$). Сама OGD није показала значајан ефекат на $\Delta\psi_m$, али је ниво значајности био приметно низак ($p = 0,059$), док је ефекат састава коришћених медијума показао значајан ефекат ($p < 0,01$, са доприносом од 34 % укупне варијансе). Резултати су показали значајно повећање ц/з количника JC-1 сигнала код астроцита изложених 8 сати нормоксичним условима у nG медијуму (one-way ANOVA $1,206 \pm 0,118 \%$, $p < 0,01$). Астроцити изложени nG медијуму и OGD у трајању од 8 сати такође су показали повећање количника флуоресцентних сигнала ($1,110 \pm 0,114 \%$), али ова промена није била статистички значајна у односу на одговарајућу контролу ($p > 0,05$). Астроцити изложени lG медијуму и OGD у трајању од 8 сати нису показали статистички значајну промену ($1,020 \pm 0,106 \%$, $p > 0,05$).

С обзиром да није било значајне разлике у $\Delta\psi_m$ током симулиране реперфузије између астроцита изложених OGD у трајању од 8 сати било у lG или nG медијуму (слика 6А), у следећим експериментима смо испитали ефекат прекондиционирања астроцита у условима са смањеном глукозом (lG) или без глукозе (nG) у трајању од 12 часова, после чега смо их изложили дејству OGD додатних 6 часова (слика 6Б).

Није било значајне интеракције између ефекта прекондиционирања и OGD на промене ц/з количника JC-1 сигнала астроцита (two-way ANOVA, $p > 0,05$), али је постојала статистички значајна разлика између свих тестираних група (one-way ANOVA, $p < 0,01$). Астроцити који су били изложени lG медијуму, а затим OGD показали су значајно повећање ц/з количника JC-1 сигнала у поређењу са астроцитима изложеним нормоксичним условима ($1,146 \pm 0,092 \%$, $p < 0,01$). Излагање nG медијуму такође је довело до значајног повећања количника флуоресценција у поређењу са излагањем lG медијуму ($1,268 \pm 0,043 \%$, $p < 0,01$). Астроцити изложени nG медијуму, а затим и OGD показали су још веће повећање количника флуоресценција ($1,458 \pm 0,040 \%$) које је било статистички значајно у односу на све три преостале групе ($p < 0,01$, слике 6Б и 6Д).

Претходни експеримент указао је на могућност интеракције ефеката депривације глукозе и накнадне депривације кисеоника, па смо у следећем експерименту продужили трајање прекондиционирања. Резултати су приказани на слици 6В, док је шема дизајна експеримента приказана на слици 6Г. Астроцити су прво били изложени

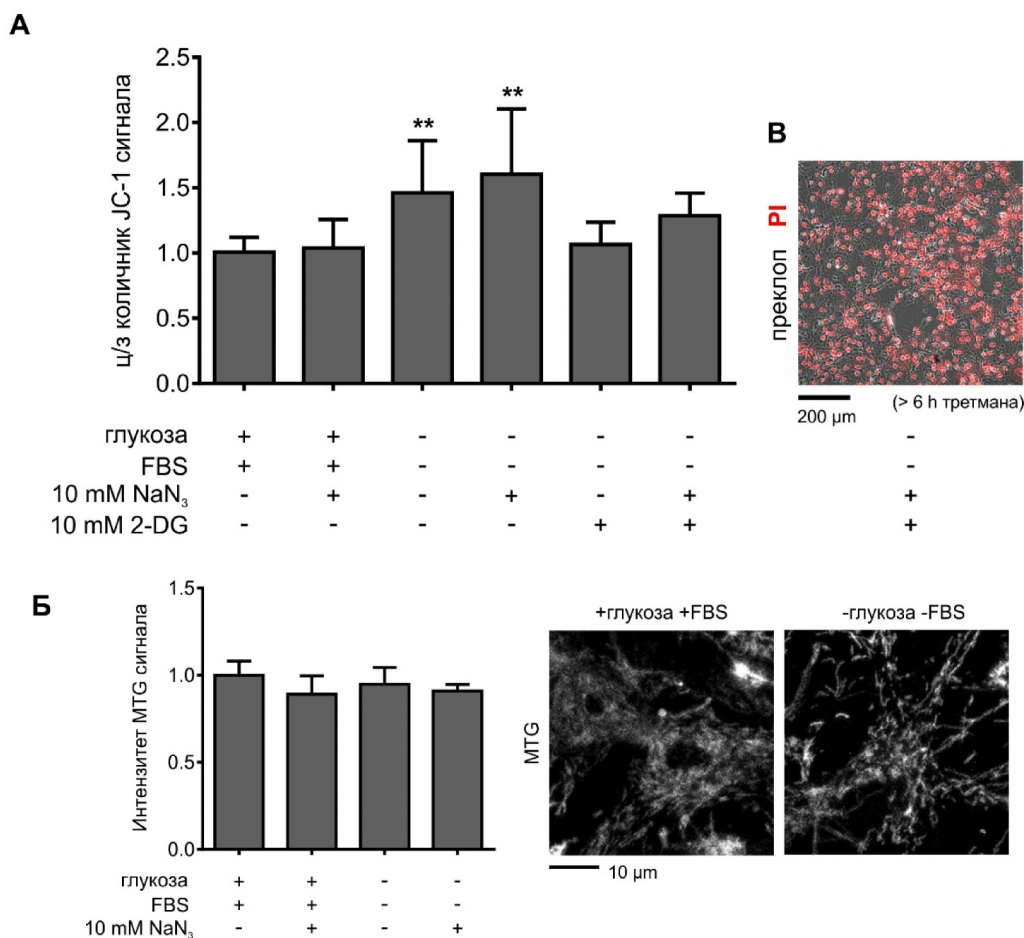
нормоксичним условима у трајању од 48 часова или у hG или у lG медијуму. Затим су те две групе подељене на још две (под)групе где је једна подгрупа остала у нормоксичним условима, док је друга подгрупа изложена хипоксији и потпуном уклањању глукозе пребацивањем у nG медијум (слика 6Г).

Астроцити у нормоксичним условима који су били изложени lG медијуму показали су статистички значајно повећање ц/з количника JC-1 сигнала у поређењу са астроцитима изложеним нормоксичним условима у hG медијуму ($1,108 \pm 0,051 \%$, $p < 0,01$; слика 6В) указујући на то да смањење глукозе у медијуму доводи до повећања ц/з количник JC-1 сигнала током симулиране реперфузије. Астроцити изложени hG медијуму и каснијој OGD такође су показали повећање количника флуоресценција у поређењу са нормоксичним условима ($1,192 \pm 0,076 \%$, $p < 0,01$). Највеће повећање количника флуоресценција показали су астроцити у OGD групи који су били прекондиционирани lG медијумом ($1,409 \pm 0,050 \%$, $p < 0,01$ у поређењу са свим осталим експерименталним условима). Постојала је, такође, и статистички значајна интеракција између ефеката прекондиционирања астроцита различитим медијумима и ефекта OGD (two-way ANOVA, $p < 0,05$, са доприносом од 3 % укупне варијансе), што је указало на различити ефекат који је имала OGD у трајању од шест часова након два дана прекондиционирања у lG медијуму у поређењу са hG медијумом.

4.2. УТИЦАЈ ИНХИБИЦИЈЕ АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ НА ВИЈАБИЛНОСТ АСТРОЦИТА И ПРОМЕНЕ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА

Вреди такође поменути прелиминарну студију на мањем узорку чији су нам резултати указали на даљи ток истраживања везе између снижавања нивоа глукозе, фармаколошке инхибиције метаболичких процеса и промена ψ_m астроцита. Астроцити су били подељени у три групе: (1) контролна у медијуму са високом глукозом, (2) третман изложен депривацији глукозе у трајању од шест часова и (3) третман изложен депривацији глукозе у присуству 10 mM 2-деокси-D-глукозе (2-DG), фармаколошког инхибитора гликолизе, такође у трајању од шест часова. Те три групе имале су две подгрупе од којих је једна била третирана 10 mM NaN₃ у последњих 10 минута третмана, а затим је NaN₃ испран пре бојења.

Као што се очекивало на основу претходних резултата, у прве две групе није дошло до промена ψ_m астроцита након третмана NaN₃ и астроцити изложени депривацији глукозе су показали карактеристично повећање ц/з количника JC-1 сигнала у односу на контролу ($1,462 \pm 0,400$ vs. $1,007 \pm 0,114$, $p < 0,01$; слика 7А). Новина је била група изложена 2-DG код које није дошло до промена у количнику флуоресценција у односу на контролу, нити је реаговала на кратак третман NaN₃. Пробно бојење са зеленим обележивачем митохондрија (MitoTracker Green®, MTG) показало је да нема промена у укупној маси митохондрија астроцита, али се на већем увеличању примећује да долази до промена у морфологији митохондрија (штанићасти облик) у групи изложеној депривацији глукозе у односу на контролну групу (слика 7Б). Прво документовање преживљавања астроцита под фармаколошком инхибицијом метаболизма (комбинација 10 mM 2-DG и 10 mM NaN₃) у условима депривације глукозе приказано је на слици 7В и представља резултат излагања астроцита таквом стресу у трајању од више од шест часова, што је утврђено непосредним опажањем под светлосним микроскопом. На слици се може запазити да се изузетно велики број једара боји позитивно на пропидијум јодид (енгл. *propidium iodide*, PI), маркер смртности ћелија.



Слика 7. Приказ прелиминарних резултата апликације метаболичких инхибитора 2-DG и NaN₃ у култури астроцита

(**А**) Астроцити су изложени депривацији нутријената (са или без 10 mM 2-DG) или контролним условима у трајању од шест часова. Последњих 10 минута третмана одређеним групама (означено знаком + испод x-осе) додат је 10 mM NaN₃ који је потом испран. Потом је праћена промена JC-1 сигнала у одговору на третмане. Значајност разлике обележена је са * у односу на контролу (први стубић с леве стране). (**Б**) Астроцити су били изложени депривацији нутријената и краткотрајном третману са NaN₃ и праћен је промена у укупној маси митохондрија астроцита преко интензитета флуоресценције зеленог обележивача митохондрија (MTG). Микрографије са десне стране приказују на већем увећању промене у морфологији митохондрија астроцита. (**В**) Пример микрографије који приказује културу астроцита на фазном контрасту преклопљену са флуоресцентним сигналом једара обележених PI након више од шест часова третмана са 10 mM 2-DG и 10 mM NaN₃ током депривације нутријената.

4.2.1. Утицај депривације нутријената на вијабилност астроцита

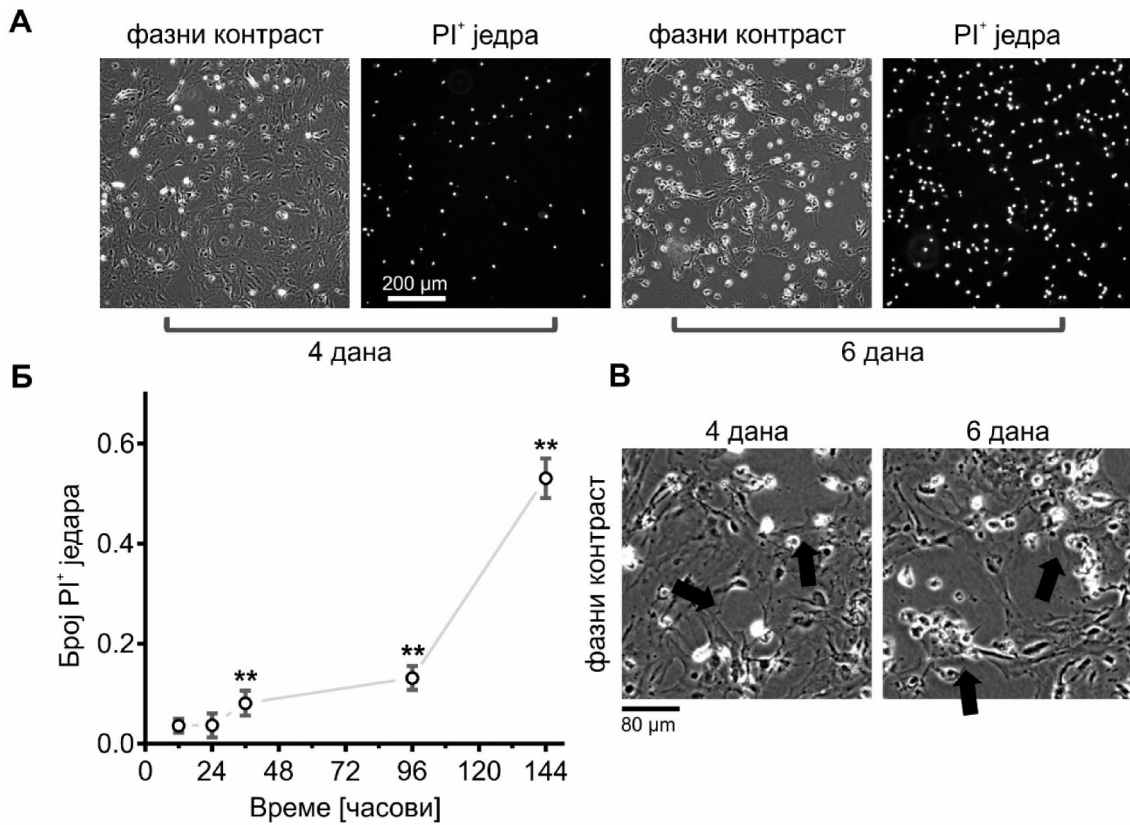
Значајан пад вијабилности астроцита постао је евидентан не раније од 4-ог дана од почетка депривације глукозе (слика 8). Након 36 часова излагања депривацији глукозе око 8 % астроцита је имало једра обојена PI (слика 8A), док је након четири дана тај број још увек био испод 15 %. Код астроцита који су умирали услед недостатка нутријената дошло је до скупљања ћелијског тела, кондензовања хроматина и одлепљивали су се у „крпицама“ са дна Петри шоље. Битно је истаћи да, у овој студији, излагање астроцита условима без нутријената није довело до значајног повећања броја мртвих ћелија у периоду од 24-26 часова. Астроцити изложени условима без нутријената у трајању од 24 часа и без фармаколошке инхибиције метаболичких процеса имали су мали проценат PI⁺ једара ($0,037 \pm 0,024$, слике 8B и 11B) и велики проценат AO⁺ једара ($0,927 \pm 0,083$, слика 11B и испрекидана линија на графику 10B). С обзиром да астроцити изложени раствору соли са 25 mM глукозом и 10 % серумом нису показали знаке умирања током 6 дана посматрања, полазећи од оваквих резултата приступило се експериментима са фармаколошком инхибицијом два есенцијална метаболичка процеса (аутофагије хлорокином и липолизе орлистатом), а за контролну групу узети су управо астроцити изложени депривацији нутријената.

4.2.2. Утицај дуготрајне инхибиције аутофагије на вијабилност астроцита

Инхибиција аутофагије је трајала више од 12 часова у растворима соли који су се разликовали по присуству глукозе и серума. Као што је приказано на слици 9, визуелним поређењем морфологије ћелија и бојења једара уочава се мањи број PI⁺ једара, већи број AO⁺ једара и смањење општећења конфлуентне ћелијске културе након додатка нутријената током фармаколошке инхибиције аутофагије хлорокином у периоду између 9 и 10 часова третмана.

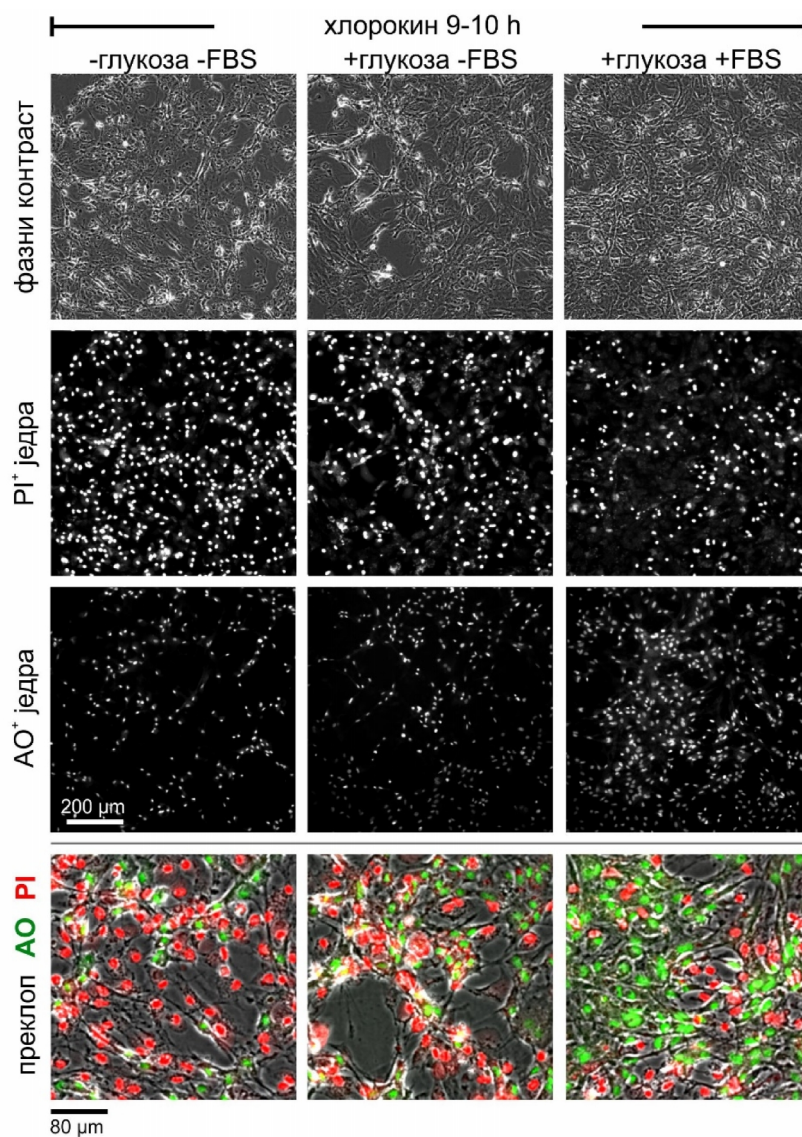
Инхибиција аутофагије хлорокином у условима без нутријената није значајно утицала на вијабилност астроцита све до 8-ог часа излагања када је забележен пораст броја PI⁺ једара ($0,136 \pm 0,029$, $p < 0,01$) и смањење броја AO⁺ једара ($0,732 \pm 0,114$, $p < 0,01$; слика 10). Од те временске тачке па и после 12-ог часа трајања третмана, број PI⁺ једара постепено је растао достигавши око 60 % од укупног броја ћелија по

посматраном кадру ($0,623 \pm 0,114$, $p < 0,01$), док је број ΔO^+ једара сходно томе падао ($0,227 \pm 0,188$, $p < 0,01$).



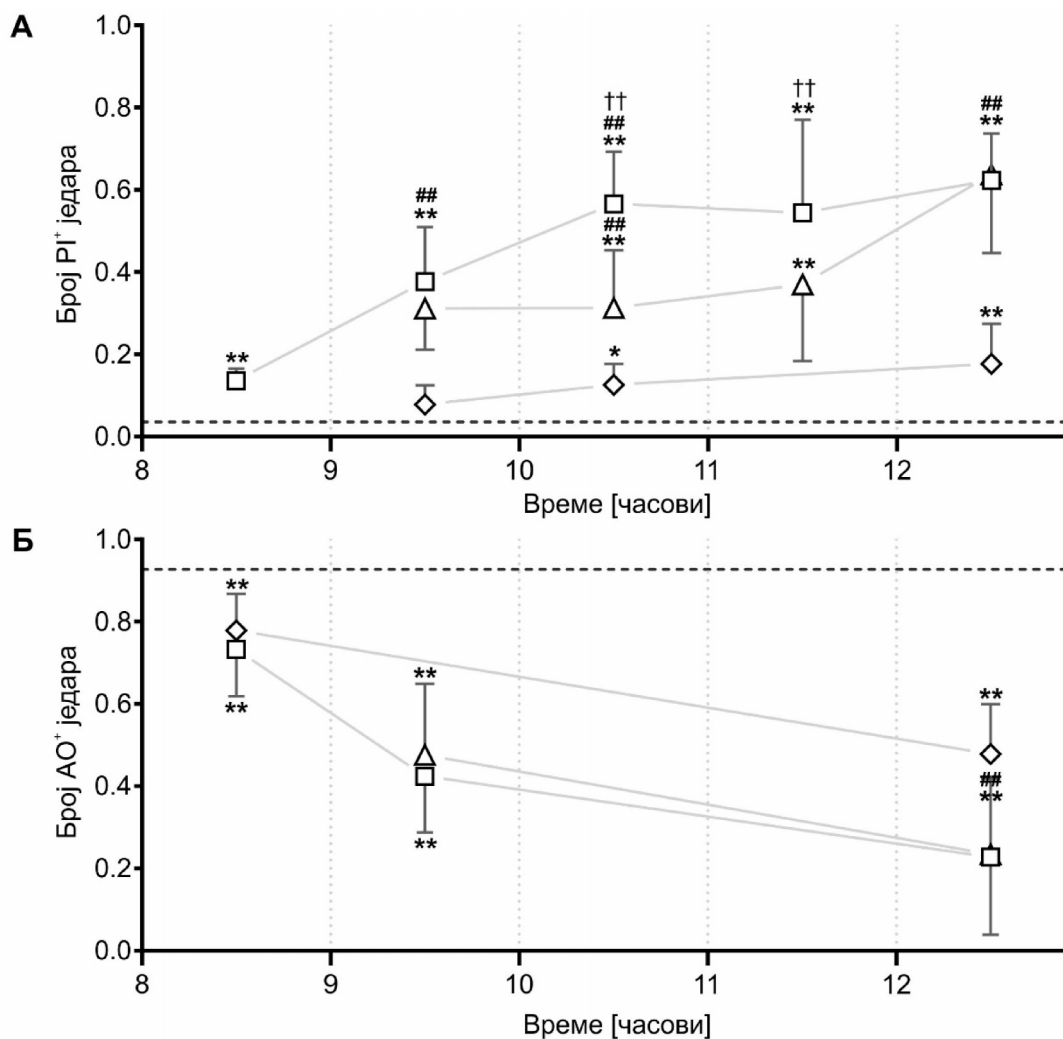
Слика 8. Утицај депривације нутријената на преживљавање астроцита у култури

(**А**) Репрезентативне микрографије астроцита изложених депривацији нутријената у трајању од шест дана које показују изглед хелијске културе (фазни контраст) и инкорпорацију PI у једра астроцита. (**Б**) Динамика повећања броја PI⁺ једара током депривације нутријената. Значајност разлике обележена је са: * у односу на број PI⁺ једара након првих 12 часова. (**В**) Увећане микрографија културе астроцита посматране фазним контрастом након 4 и 6 дана депривације нутријената. Стрелицама су обележене карактеристичне промене у морфологији које су пратиле умирање астроцита у овим условима (в. објашњење у тексту).



Слика 9. Утицај дуготрајне инхибиције аутофагије на преживљавање астроцита изложених депривацији нутријената (I)

Репрезентативне микрографије астроцита изложених третману CQ у трајању између 9-10 часова у раствору: (1) без нутријената, (2) са 25 mM глюкозом и (3) са 25 mM глюкозом и 10 % серумом које показују изглед ћелијске културе (фазни контраст) и инкорпорацију PI и АО у једра астроцита. Последњи ред приказује увећане микрографије преклопљених слика.



Слика 10. Утицај дуготрајне инхибиције аутофагије на преживљавање астроцита изложених депривацији нутријената (II)

Графици приказују динамику промене броја PI⁺ и AO⁺ једара током третмана CQ у раствору: (□) без нутријената, (Δ) са 25 mM глукозом и (◇) са 25 mM глукозом и 10 % серумом.

(А) Астроцити су изложени депривацији нутријената без CQ или третману CQ са и без нутријената у трајању између 8-13 часова током којих је праћен пораст броја PI⁺ једара. (Б) У истим експерименталним условима праћено је смањење броја AO⁺ једара. Средње вредности за сваки посматрани временски интервал представљене су средњом вредношћу на средини датог интервала. Значајности разлика обележене су са: * у односу на испрекидане линије на графицима (депривација нутријената без CQ), # у односу на третман CQ уз глукозу и серум и † у односу на третман CQ само уз додаток глукозе.

У односу на услове третмана без нутријената може се рећи да је CQ имао слаб утицај на вијабилност астроцита изложених раствору соли са нутријентима у истом периоду између 8-ог и 13-ог часа третмана. Додатак 25 mM глукозе и 10 % серума смањило је број забележених PI⁺ једара, који је остао релативно низак и након 12 часова

третмана у поређењу са остале две групе ($0,177 \pm 0,098$, $p < 0,01$) које су тада достигле своје највише вредности. Иста ситуација забележена је и кроз смањени пад броја АО⁺ једара ($0,478 \pm 0,122$, $p < 0,01$) након релативно високе почетне вредности у 8-ом часу ($0,778 \pm 0,089$, $p < 0,01$). Поред великог броја светло зелених АО⁺ једара, ова група астроцита показала је и униформно дистрибуирану црвену флуоресценцију у цитоплазми која указује на нагомилавање киселих везикула у ћелији (слика 9).

Са једне стране, у поређењу са групом која је била третирана CQ у условима са нутријентима, астроцити којима је била додата само глукоза без серума нису задржали своју вијабилност после 12-ог часа третмана ($0,638 \pm 0,191$). Са друге стране, иако између 9-10 часа ова група није показала разлике у односу на третман CQ у условима без нутријената, у периоду између 10-11. и 11-12. часа додатак глукозе довео је до значајног смањења број PI⁺ једара ($0,312 \pm 0,141$ и $0,566 \pm 0,127$, $p < 0,01$ и $0,370 \pm 0,185$ и $0,544 \pm 0,226$, $p < 0,01$). Када се као параметар посматра број АО⁺ једара види се да додатак глукозе на третман CQ у условима без нутријената није побољшао вијабилност астроцита и није било значајних разлика између те две групе у периоду посматрања након 9 часова третмана.

У овим резултатима уочено је да постоји постепено смањење ћелијске смрти и степена оштећења ћелија индукованих CQ током излагања у трајању од 8-12 часова уколико астроцити имају глукозу у раствору, односно имају и глукозу и серум (слике 9 и 10). Стога је закључено да додавање нутријената одлаже ћелијску смрт индуковану продуженом инхибицијом аутофагије хлорокином.

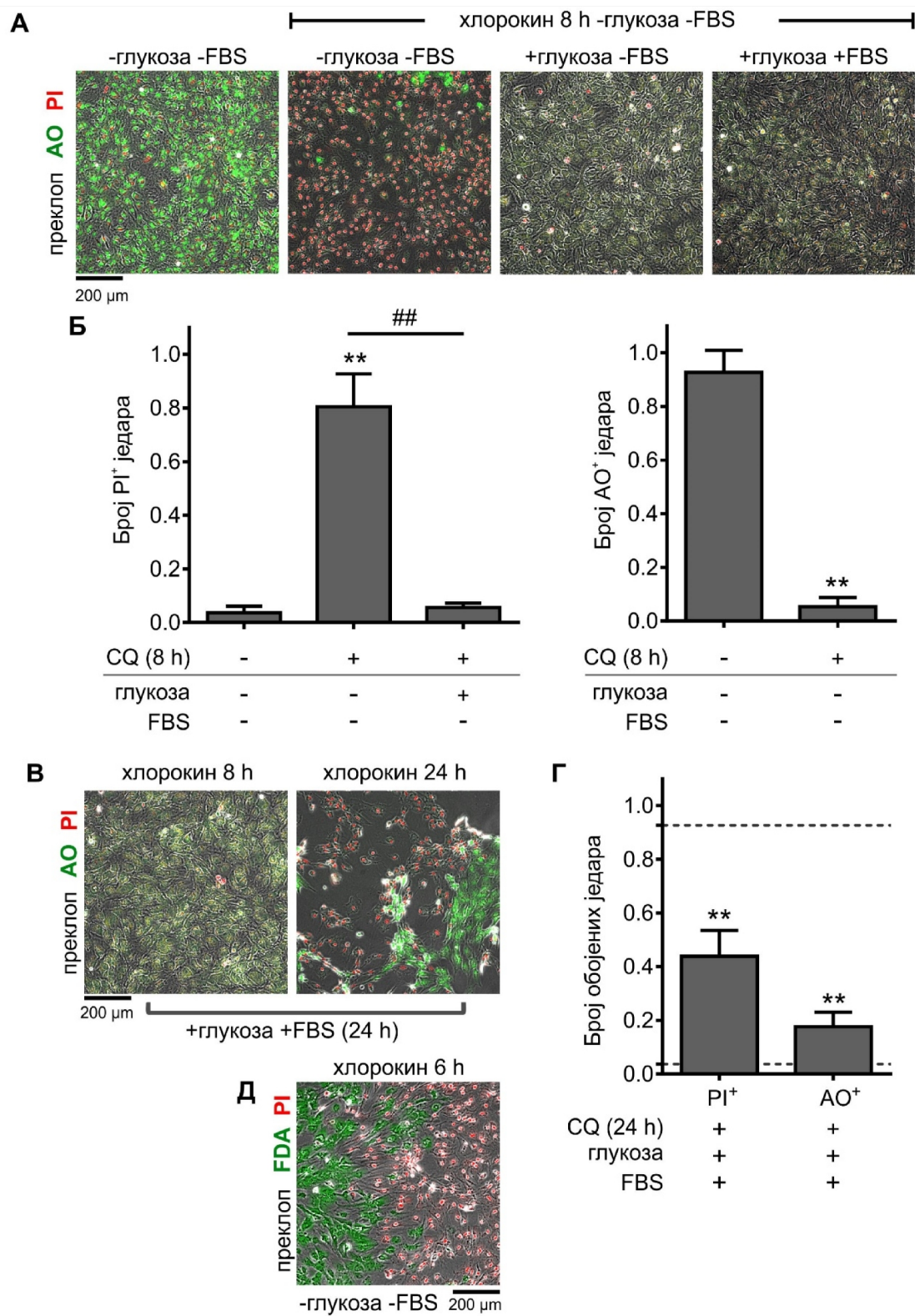
4.2.3. Утицај краткотрајне инхибиције аутофагије на осетљивост астроцита на услове депривације нутријената и промену мембранског потенцијала митохондрија астроцита

Хлорокин је могао да доведе до ћелијске смрт на следеће начине: а) поремећајем енергетског метаболизма преко инхибиције аутофагије, б) цитотоксичним ефектом током депривације глукозе, или в) комбинованим ефектом уз недостатак серума (тачније фактора раста у њему). Слика 10 показује да, са једне стране, излагање астроцита CQ дуже од 12 часова засигурно показује знаке цитотоксичног ефекта CQ, јер се смртност ћелија значајно повећава чак и када астроцити имају све нутријенте на располагању. Са друге стране, излагање астроцита CQ краће од 8 часова није довело

до значајног повећања броја мртвих ћелија у условима без нутријената. Из наведених разлога приступило се излагању астроцита CQ у условима без нутријената не дуже од 8 часова, након чега је CQ испран, а астроцити су или враћени у услове којима су већ били изложени или су им додати нутријенати са циљем њиховог спасавања и опоравка након стресних услова. Такав третман пуштен је у укупном трајању од 24 часа (нпр. 8 + 16 часова), након чега су астроцити обојени и снимљени флуоресцентним микроскопом (слика 11А).

Изолагање астроцита третману CQ у трајању од 8 часова без нутријената довело је до значајног пораста броја PI⁺ једара у току 24 часа у поређењу са контролом ($0,804 \pm 0,123$, $p < 0,01$; слика 11А и Б). У складу са тим, број AO⁺ једара показао је значајан пад у односу на контролу ($0,053 \pm 0,035$, $p < 0,01$). Треба напоменути да су и времена излагања краћа од 8 часова такође довела до смрти ћелија (изразито код 4 и 6 часова). Ипак, квантификација таквих резултата путем флуоресцентне микроскопије је била отежана зато што су ћелије умирале локално, па није био редак приказ да се види јасна граница до које су ћелије умрле, као што је то приказано на слици 11Д. Због тога, за ову студију било је одређено да третман CQ траје 8 часова јер је смртност униформно захватала астроците засејане у Петри шољи па је било могуће проценити просечан број умрлих ћелија по кадру.

Враћање глукозе у раствор коме су астроцити били изложени у наредних 16 часова након третмана CQ довело је до значајног смањења броја PI⁺ једара у односу на услове без глукозе ($0,056 \pm 0,016$, $p < 0,01$). У случају када је и серум враћен у раствор више није било PI⁺ једара која би се могла квантификовати, што је стање које се и иначе примећује када су астроцити изложени раствору са 25 mM глукозом и 10 % серумом. Поред тога, након враћања нутријената у раствор више није било уочљивих AO⁺ једара, што у поређењу са сликом 11В говори у прилог одсуству цититоксичног ефекта CQ у овим условима, и наравно, заједно са морфолошком сликом културе ћелија, говори о опоравку астроцита.



Слика 11. Утицај ране инхибиције аутофагије CQ на осетљивост астроцита на депривацију нутријената

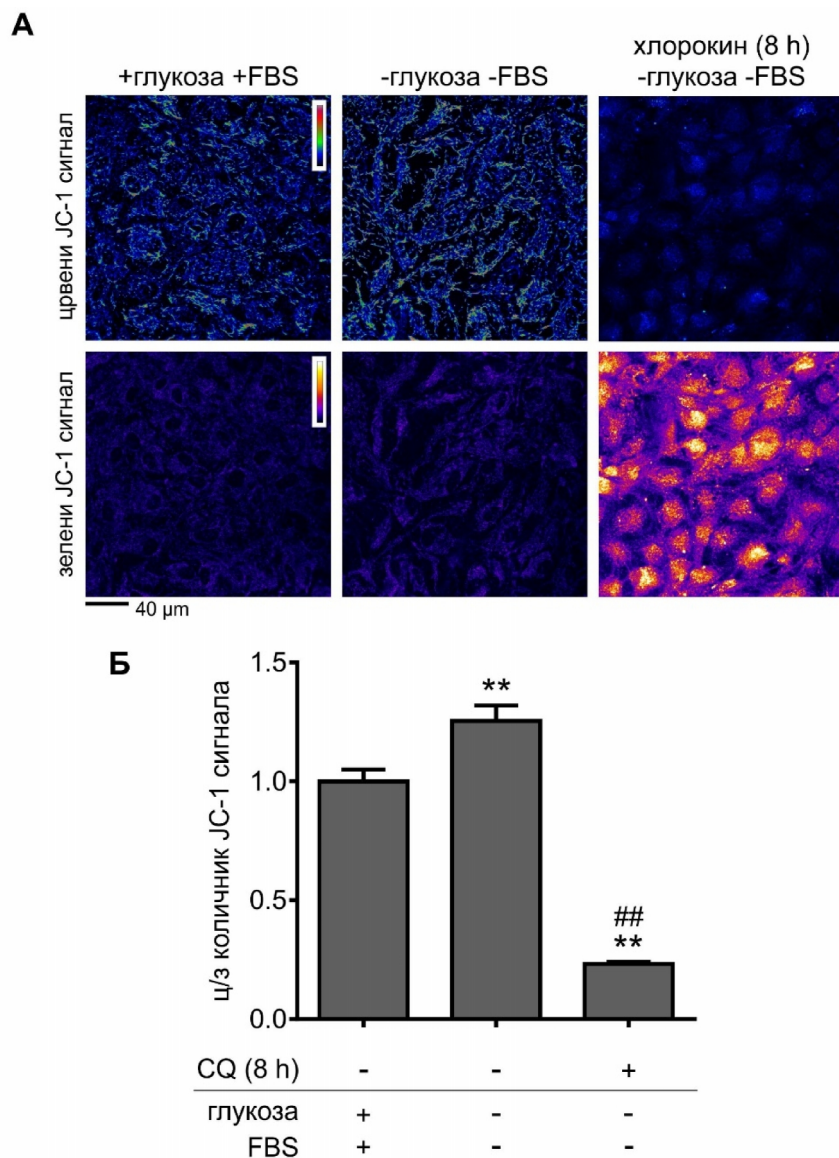
(...наставак легенде на следећој страни)

(...наставак легенде за слику 11)

(А) Репрезентативне микрографије астроцита изложених третману CQ без нутријената у трајању од 8 часова, а потом изложених 16 часова растворима без CQ и: (1) без нутријената, (2) са 25 mM глукозом и (3) са 25 mM глукозом и 10 % серумом. Микрографије приказују изглед ћелијске културе (фазни контраст) и инкорпорацију PI и AO у једра астроцита 24 часа након почетка третмана. (Б) Квантификација промене у броју PI⁺ и AO⁺ једара приказаних на сликама под А. У случају излагања ћелија раствору са глукозом и серумом квантификација није била могућа (в. објашњење у тексту). Значајности разлика обележене су са: * у односу на депривацију нутријената без CQ (први стубић са леве стране) и # у односу на додатак глукозе током 16 часова третмана. (В) Излагање астроцита третману CQ у трајању од 8 часова и 24 часа у присуству глукозе и серума. Микрографије приказују преклопљене кадрове изгледа ћелијске културе (фазни контраст), инкорпорације PI и AO у 24-ом часу излагања. (Г) Квантификација промена у броју PI⁺ и AO⁺ једара приказаних на сликама под В. Испрекидане линије на графику означавају вредности добијене у 24-ом часу у условима депривације нутријената без CQ. Значајност разлика обележена је са * у односу на испрекидане линије на графицима (депривација нутријената без CQ). (Д) Репрезентативна микрографија изгледа ћелијске културе (фазни контраст) астроцита обојених са PI и FDA након третмана CQ у трајању од шест часова и накнадне депривације нутријената у трајању од 18 часова (такође укупно 24 часа).

Да би се потврдио цититоксични ефекат CQ (у вези са резултатима приказаним на слици 10А), астроцити изложени раствору са 25 mM глукозом и 10 % серумом третирани су CQ у трајању од 8 часова и 24 часа (слика 11В). Смртност астроцита након 24 часа оваквог третман била је висока што се огледало у високом уделу PI⁺ једара ($0,438 \pm 0,097$, $p < 0,01$), ниском уделу AO⁺ једара ($0,176 \pm 0,054$, $p < 0,01$; слика 11Г) и великим површинама кадрова на којима више није било ћелија (слика 11В).

Још једна прелиминарна студија имала је за циљ да испита промене ψ_m астроцита у следећим експерименталним условима: (1) раствору са 5 mM глукозом и 10 % серумом, (2) раствору без нутријената и (3) раствору без нутријената са CQ у трајању од 8 часова, након чега је CQ испран и астроцити су изложени раствору без нутријената. Флуоресценција пореклом од JC-1 боје снимљена је након додатних сат времена што је укључивало и време потребно за бојење (слика 12).



Слика 12. Утицај инхибиције аутофагије током депривације нутријената на промене ψ_m астроцита

(**А**) Репрезентативне микрографије црвеног и зеленог сигнала пореклом од JC-1 боје астроцита након излагања депривацији нутријената са и без CQ. Оригиналне микрографије су преведене у палету боја „rainbow“ (за црвени сигнал) и „fire“ (за зелени сигнал) које кроз промену боје приказују промену интензитета флуоресцентног сигнала (ImageJ 1.48a). (**Б**) Квантификација промена интензитета сигнал пореклом од JC-1 боје приказаних на сликама под А. Значајности разлика обележене су са: * у односу на контролу (први стубић с леве стране) и # у односу на депривацију нутријената без CQ.

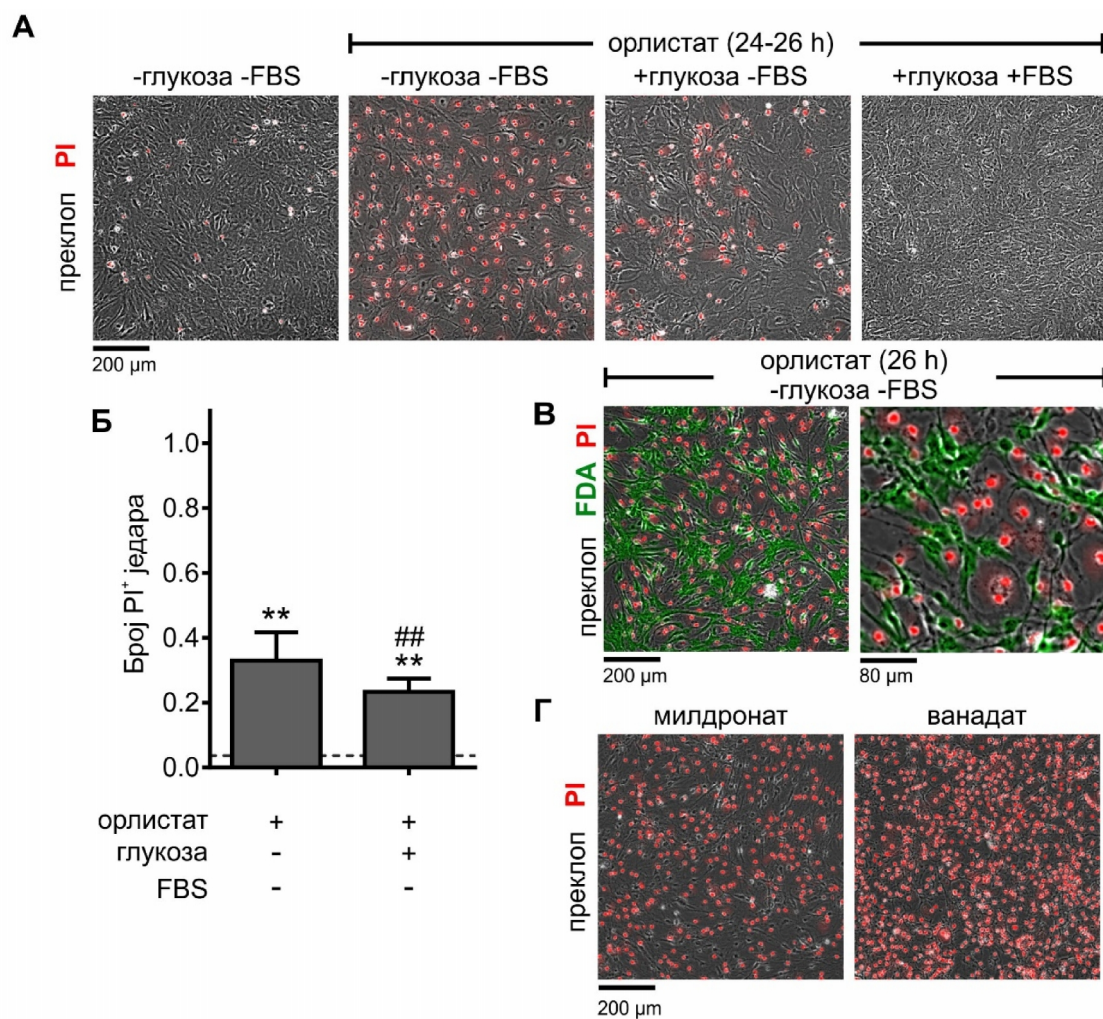
Као контролне вредности у овом експерименту узете су вредности добијене након излагања астроцита раствору са глюкозом и серумом. У односу на те вредности, као што се и очекивало на основу претходних резултата, уклањање нутријената из раствора довело је до значајног повећања ц/з количника JC-1 сигнала ($1,254 \pm 0,065$,

$p < 0,01$) астроцита. Третирање астроцита са CQ у условима депривације нутријената довело је до значајног пада ц/з количника JC-1 сигнала и у односу на контролу и у односу на депривацију нутријената без CQ ($0,232 \pm 0,009$, $p < 0,01$). Овај резултат поткрепљен је и експериментима који су му претходили, а где је мањи пад количника флуоресценција примећен већ два часа након отпочињања третмана CQ.

4.2.4. Утицај инхибиције липолизе на вијабилност и промену мембранског потенцијала митохондрија астроцита

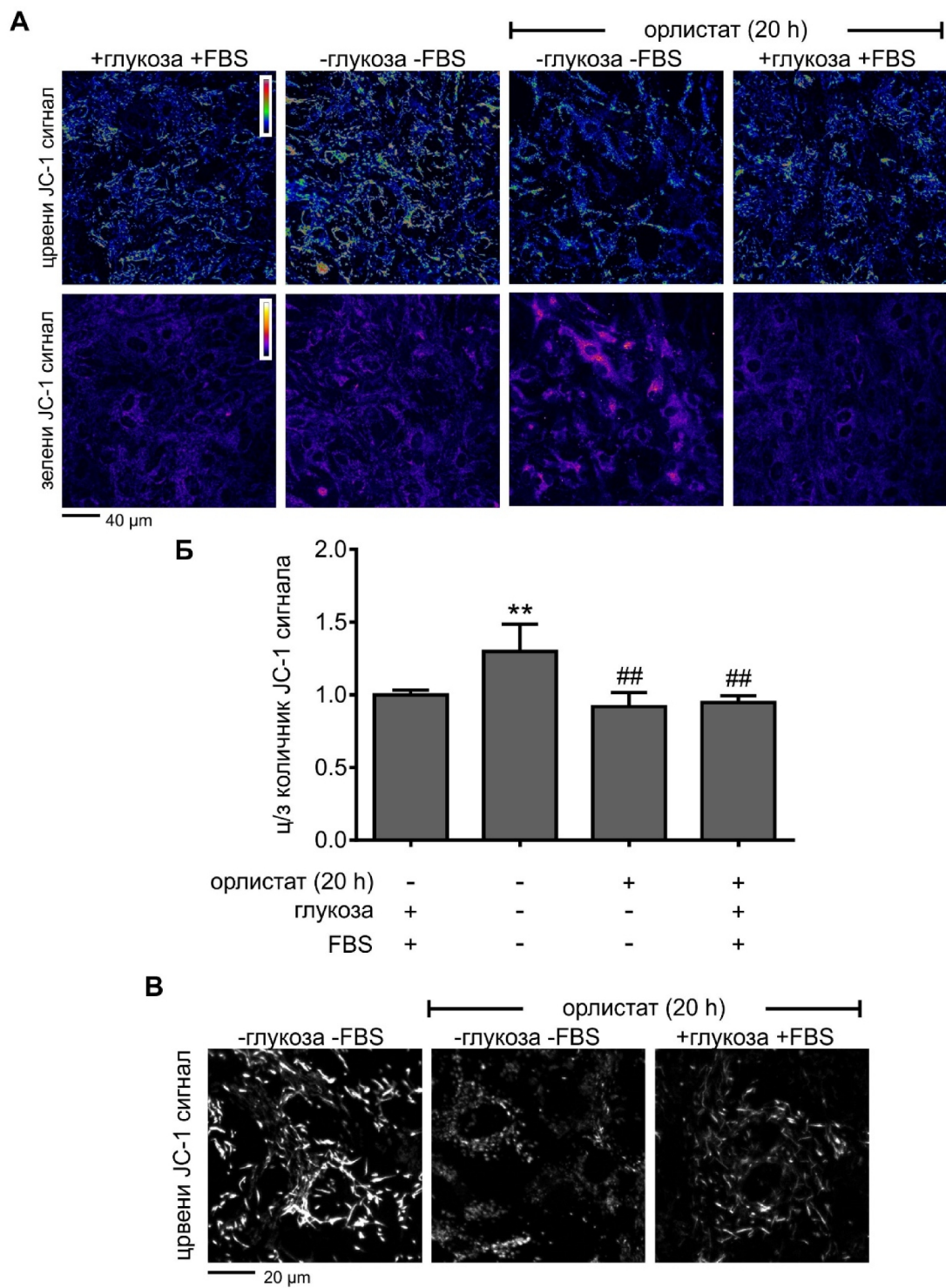
У даљем току истраживања астроцити су изложени инхибицији липолизе додатком $100 \mu\text{M}$ орлистата у раствор соли који је био: (1) без нутријената, (2) са додатом 25 mM глукозом и (3) са додатим 25 mM глукозом и 10% серумом и праћено је њихово преживљавање у таквим експерименталним условима (слика 13А). Орлистат није показао утицај на смртност ћелија пре 20 часа третмана у условима без нутријената, што је утврђено непосредним посматрањем морфологије ћелија под светлосним микроскопом. Почевши од 22 часа број PI^+ једара износио је око 25% , да би се тај број попео до око 40% у наредних четири часа третмана. Због тога су све временске тачке обједињене у једну групу, па је значајно повећање броја PI^+ једара уочено након 24 часа излагања астроцита орлистату у раствору без нутријената ($0,330 \pm 0,087$, $p < 0,01$; слика 13Б). Треба напоменути да су се ћелије које нису имале PI^+ једра бојиле са FDA што указује на одређени број живих ћелија у посматраном временском периоду (слика 13В).

Са једне стране, додаток глукозе у раствор са орлистатом довео је до значајног смањења броја PI^+ једара у поређењу са излагањем орлистату у условима без нутријената ($0,233 \pm 0,041$, $p < 0,01$), али је тај број ипак био значајно виши него у контроли ($p < 0,01$). Са друге стране, излагање астроцита орлистату у раствору са глукозом и серумом није довело до смрти астроцита ни након 36 часова третмана, што је закључено на основу одсуства PI^+ једара и интактне конфлуентне ћелијске културе (слика 13А).



Слика 13. Утицај инхибиције липолизе на преживљавање астроцита изложених депривацији нутријената.

(**A**) Репрезентативне микрографије астроцита изложених третману орлистатом у растворима: (1) без нутријената, (2) са 25 mM глюкозом и (3) са 25 mM глюкозом и 10 % серумом. Микрографије приказују изглед ћелијске културе (фазни контраст) и инкорпорацију PI у једра астроцита између 24-26 часа након почетка третмана. (**Б**) Квантификација промене у броју PI⁺ једара приказаних на сликама под **A**. У случају излагања ћелија раствору са глюкозом и серумом квантификација није била могућа (в. објашњење у тексту). Значајности разлика обележене су са: * у односу на депривацију нутријената без орлистата (испрекидна линија) и # у односу на депривацију нутријената са орлистатом. (**В**) Репрезентативне микрографије изгледа ћелијске културе (фазни контраст) астроцита обојених са PI и FDA након 24-26 часа третмана орлистатом у условима депривације нутријената. (**Г**) Микрографије илуструју утицај третмана милдронатом (200 μ M, 36 часова) и ванадатом (5 mM, 24 часа) на изглед ћелијске културе (фазни контраст) и инкорпорацију PI.



Слика 14. Утицај инхибиције липолизе током депривације нутријената на промене $\Delta\psi_m$ астроцита

(...наставак легенде на следећој страни)

(...наставак легенде за слику 14)

(А) Репрезентативне микрографије астроцита и промена црвеног и зеленог сигнала пореклом од JC-1 боје астроцита након излагања депривацији нутријената или контролним условима у оба случаја са и без орлистата. Оригиналне микрографије су преведене у палету боја „rainbow“ (за црвени сигнал) и „fire“ (за зелени сигнал) које кроз промену боје приказују промену интензитета флуоресцентног сигнала (ImageJ 1.48a). (Б) Квантификација промена интензитета сигнала пореклом од JC-1 боје приказаних на сликама под А. Значајности разлика обележене су са: * у односу на контролу (први стубић с леве стране) и # у односу на депривацију нутријената без орлистата. (В) Увећани приказ промена морфологије митохондрија уочљивих преко црвеног канала у наведеним експерименталним условима.

Треба напоменути да су још два инхибитора разградње липида показала слично дејство на вијабилност астроцита у условима без нутријената (слика 13Г): милдронат (инхибитор β -оксидације масних киселина; 200 μ M) након 36 часова и ванадат (инхибитор липолизе; 5 mM) [116] након 24 часа, али су због техничких ограничења ти експерименти прекинути.

Даље је испитан ефекат депривације нутријената и третмана орлистом на промене ψ_m астроцита након 20 часова, јер у том временском тренутку није примећено значајно смањење вијабилитета астроцита током излагања овим условима.

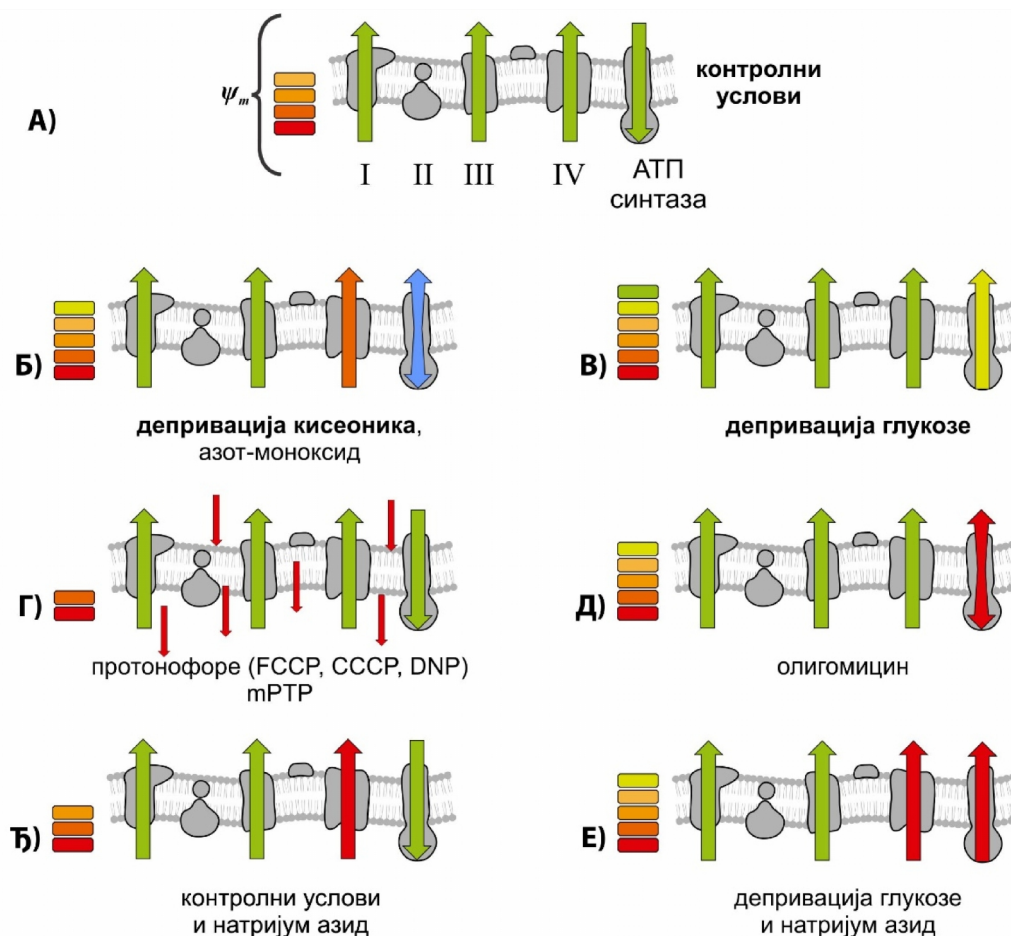
Као што је и очекивано на основу претходних резултата, астроцити изложени депривацији нутријената у трајању од 20 часова показали су значајно повећање ц/з количника JC-1 сигнала у односу на контролу ($1,298 \pm 0,186$, $p < 0,01$). У оваквим условима митохондрије су имале штапићасти облик (слика 14В).

Третман астроцита орлистом у условима депривације нутријената спречио је повећање ц/з количника JC-1 сигнала ($0,918 \pm 0,096$, $p < 0,01$; слика 14Б) и он је по својој вредности одговарао контролним вредностима. Ипак, на микрографијама је био уочљив тачкасти сигнал пореклом из митохондрија (слика 14В средина) који указује на могуће отицање митохондрија астроцита. Коначно, орлистат није показао ефекат нити на ψ_m (слика 14Б) нити на морфологију митохондрија (слика 14В) у условима када су астроцити били изложени раствору са глукозом и серумом.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. ПРОМЕНЕ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА НАКОН ДЕПРИВАЦИЈА КИСОНИКА И ГЛУКОЗЕ, КАО И ФАРМАКОЛОШКИХ ТРЕТМАНА

Отпорност астроцита на дужа излагања комбинованој депривацији кисеоника и глукозе и на накадну симулирану реперфузију, контраверзна је са аспекта промена у функционисању митохондрија, поготову промене мембранског потенцијала митохондрија ($\Delta\psi_m$). Резултати студија укључују како продужену деполаризацију и спори опоравак ψ_m астроцита [20], тако и одсуство промена (међутим резултати нису показани у раду) [47]. Промене ψ_m астроцита описане су у периоду између 45 минута и два сата иако се смртност ћелија постепено повећава тек касније између 4-ог и 12-ог часа излагања [11,22]. Једна од хипотеза овог истраживања била је да астроцити, у наведеним студијама које испитују ефекте депривације кисеоника и/или глукозе, преживљавају тако што неко време одржавају респирацију и продукцију енергије узимајући супстрат из унутарћелијске средине, односно ванћелијске средине током симулиране реперфузије, пре него што наступе иреверзибилна оштећења која воде ћелијској смрти. У свом ревијском раду Dungan и Kim-Han [117] осврћу се на раније добијене резултате [20] и кажу: „У одсуству OGD-а, астроцити су сигурно способни да користе АТФ за одржање ψ_m , да реверзијом рада F_0F_1 -АТП-азе одрже ψ_m , али зашто астроцити изложени OGD не успевају да одрже ψ_m путем овог механизма је нејасно“.



Слика 15. Шематски приказ промена ψ_m астроцита изазваних различитим експерименталним условима и фармаколошким агенсима

Са леве стране сваке слике, бојом и бројем правоугаоника (по аналогији са пиктограмом који приказује пуњење и пражњење батерије) илустрована је промена у мембранском потенцијалу митохондрија – више правоугаоника и зеленија боја значи виши ψ_m астроцита, мање правоугаоника и црвенија боја значи нижи ψ_m астроцита. Смер стрелица означава претпостављени ток протона, а боја претпостављени интензитет тока (са изузетком плаве боје под Б где подаци нису познати аутору).

У овој студији у односу на контролну групу, астроцити нису показали промене ψ_m током реперфузије ни након 6 часова, нити након 8 часова OGD – тачније у експерименталним условима са 1% кисеоника, изложени медијуму без глукозе са додатим или 1% серумом или B-27 суплементом са 1% L-глутамином. У поређењу са DMEM-ом, Neurobasal-A медијум (основа „nG“ медијума) инхибира раст астроглије без употребе антимиотичких агенаса истовремено обезбеђујући одрживу средину за раст неурона уз замену серума B-27 суплементом. Међутим, тај медијум се ипак користи и за узгајање ко-култура неурона и астроцита (који представљају „слој хранитеља“, енгл. *feeder layer*). У оваквој формулацији, L-глутамин обезбеђује астроцитима скромни

алтернативни извор енергије, јер могу да га конвертују у глукозу. Са друге стране, основа „IG“ медијума је био DMEM медијум без глукозе, али је садржао 1 % FBS, што се грубо преводи у око 700 пута мању концентрацију нивоа глукозе него у контроли, као што је слично описано код Jelluma и сар. [18]. Поред тога, инкубатор коришћен у сврху постизања OGD није имао могућност да спусти ниво кисеоника на нулу, већ је био подешен на 1 % (у ноћи пре започињања третмана). Да би се астроцити ставили у хипоксичну средину било је неопходно отворити херметички затворена врата, што је уједно значило да након отпочињања хипоксије инкубатору треба још барем пола сата да би поново успоставио ниво од 1 % O₂.

Да бисмо видели да ли је OGD имала неког ефекта на ψ_m и да бисмо потврдили поменута мерења, третирали смо астроците натријум азидом (NaN₃) у циљу инхибиције ланца транспорта електрона током симулиране реперфузије. Поређењем промена у флуоресценцији између третмана са H₂O₂ и са NaN₃, закључено је да NaN₃ није утицао на организацију плазма мембране астроцита омогућавајући улазак JC-1 боје у цитосол и митохондрије у исто време. С_ам H₂O₂ смањује активност α -кетоглутарат дехидрогеназе као и ниво NAD(P)H, повећава продукцију ROS и унутарћелијског Ca²⁺, и оштећује митохондријске протеине осетљиве на оксидацију [48,57,118]. Поред тога, у високим концентрацијама доводи до апотозе (0,5-1,0 mM), док у веома високим и до некрозе (5-10 mM) астроцита [94].

OGD у „IG“ медијуму донекле је „сачувала“ ψ_m астроцита, тачније одложила је деполаризацију изазвану NaN₃ током симулиране реперфузије. Овај веома интересантан феномен може бити последица инхибиције хидролизуће функције F₀F₁-АТП-азе изазване NaN₃ у спрези са разликом у оксидативном метаболизму између астроцита изложених нормоксији у „hG“ медијуму и астроцита изложених OGD у „IG“ медијуму. Ефекат NaN₃ на ψ_m астроцита се у принципу сматра пролазним и реверзибилним [46,113] (неурони су, наравно, знатно осетљивији од астроцита [92,119]), али поред везивања за неколико места на цитохром C оксидази (комплекс IV) у ланцу транспорта електрона [120-122], NaN₃ се везује и за F₀F₁-АТП-азу и њена сензитивност на NaN₃ се повећава након везивања АТП који треба да се хидролизује до ADP и неорганског фосфата [90]. Овај резултат покренуо је додатно питање да ли ослањање астроцита на хидролизу АТП, када је количник АТП и ADP у митохондрији

низак, доводи до тога да је смањење ψ_m астроцита изазвано NaN_3 спорије него када је тај количник висок (слике 15Б и Е)?

Речено је већ у Уводу да експериментални модели хипоксије (односно аноксије) укључују спуштање нивоа кисеоника у инкубатору или комори испод 1 %, као и да одређена концентрација кисеоника заостаје растворена у медијуму, што се у неким случајевима може уклонити и хемијским путем (нпр. натријум дитионитом). Испитиване ћелијске културе углавном се третирају растворима соли који немају глукозу, али ни друге нутријенте који су нормално присутни у хранљивом медијуму. Из тога је јасно да такви модели описују стање у коме су ћелије изложене потпуној депривацији нутријента и, релативно брзо, потпуној аноксији након што потроше сав кисеоник из медијума.

Међутим, у току испитивања $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ ко-транспорта и измену $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Kintner и сар. [123] забележили су сличан феномен као што је забележен и у овој студији. Астроцити су изложени условима са 1 % O_2 и без нутријента у трајању од два часа, док су у првих 30 минута ћелије биле стављене на орбиталну мешалицу у циљу изједначења хипоксичне гасне смеси. Аутори ове студије су вероватно наишли на одсуство разлика између контролне групе и OGD групе током симулиране реперфузије у трајању од једног часа, што је закључак који може да се изведе узимајући у обзир да је за испитивање $\Delta\psi_m$ астроцита такође коришћен рациометријски, флуоресцентни обележивач JC-1. У даљим корацима, користећи протонофору FCCP (са или без олигомицина, слике 15Г и Д) да фармаколошким путем изазову промене ψ_m , аутори су изазвали деполаризацију мембране митохондрија астроцита у обе групе. Вредности добијене у контролној групи узете су за нормализацију и контролне и OGD групе – вредност од 100 % одговарала је забележеном количнику флуоресценција без третмана FCCP, док је за максимално смањење ψ_m (0 %) астроцита узета вредност након третмана FCCP. Са графика се види да је, уколико је уз FCCP коришћен и олигомицин [40-42], поларизованост митохондрија астроцита у контроли износила око 40 %, као и да обе групе почињу од 100 % (одн. апсолутне вредности су им исте). Такође се уочава да се митохондрије астроцита изложених OGD мање деполарису након третмана FCCP са олигомицином у односу на контролу. Мањи пад „смањења пада ψ_m индукованог помоћу FCCP“ (без помињања олигомицина) у OGD групи протумачен је као релативна деполарисаност митохондрија астроцита у тој групи у односу на

контролу. Међутим, поменуто „одлагање пада ψ_m “ више подсећа на резултат добијен са NaN_3 у овој студији, за који је даљим испитивањем показано да боље одговара хиперполаризацији митохондрија астроцита у датим условима.

Астроцити умиру након третмана ротеноном (инхибитор комплекса I), а да при томе не долази до смањења ψ_m са или без присуства глукозе. Са једне стране, у току шест часова депривације глукозе долази до повећања оксидације масних киселина [18]. Са друге стране, краткотрајно или хронично повећање глукозе у медијуму супримира оксидативни митохондријски метаболизам астроцита, а повећава ниво гликогена и ослобођеног лактата [124]. Ови подаци узети заједно постављају питање да ли OGD има другачији ефекат на ћелије са смањеним у односу на повећани оксидативни метаболизам (слике 15Б и В)? Стога смо укупну дужину прекондиционирања депривацијом глукозе (наравно и даље у медијумима без комплетне депривације нутријената) уз накнадну OGD прилагодили времену из литературе које је потребно сјмој хипоксији (тј. аноксији) да доведе до општећења астроцита (18 часова). То време је такође и половина времена која је потребна сјмој депривацији глукозе да доведе до истог општећења [11,12,125]. Када смо упоредили два коришћена медијума („IG“ и „nG“) утврдили смо да су одређене разлике у саставу медијума довеле до мерљивих промена ψ_m астроцита након OGD.

Коначно, астроците смо изложили дужем прекондиционирању (48 часова) у „IG“ медијуму пре него што су изложени „nG“ медијуму са или без хипоксије у трајању од шест часова. Прекондиционирање је довело до пораста ψ_m астроцита и имало је синергистични ефекат са наступајућом OGD. Ови резултати указали су на то да снижавање количине нутријената пре хипоксије даје главни допринос променама ψ_m астроцита (одн. утиче на оксидативни метаболизам) и подстиче хиперполаризацију током симулиране реперфузије.

Као што је већ поменуто, експериментални модели коришћени у наведеним студијама испитују ситуацију у којој су ћелије изложене потпуној депривацији нутријената и, релативно брзо, и потпуној аноксији. Такође, још један потенцијални проблем у дизајну експеримента, па и тумачењу добијених резултата, представљају концентрације кисеоника и глукозе које се користе у *in vitro* условима.

Са једне стране, ћелијске културе се углавном гаје у условима са 95 % ваздуха и 5 % CO_2 , што је око 20 % O_2 (149 mm Hg) унутар инкубатора и одговара концентрацији

од $> 250 \mu\text{M}$ раствореног O_2 у медијуму. Унутар паренхима мозга притисак кисеоника је око 20-30 mm Hg, односно 30-50 μM O_2 раствореног у ванћелијској средини, иако је артеријални притисак O_2 око 90 mm Hg. Притисак O_2 може достићи 75 mm Hg само када системски артеријални притисак пређе 300 mm Hg, што може бити изазвано вентилацијом са 100 % O_2 . Постоје процене да око 50 % можданих региона функционише на притиску O_2 мањем од 10 mm Hg, па тако оно што представља нормоксичне услове за неуроне и глију било би хипоксично за ћелије других ткива [17,126]. Поменути *in vitro* услови дакле одговарају хипероксији и Danilov и Fiskum [17] су показали да смањење концентрације кисеоника (са 20 % на 7 % O_2) током реоксигенације (симулиране реперфузије) након четири часа „симулиране исхемије“ смањује смртност астроцита и штити их од оксидативних модификација протеина и ДНК. Такође су показали да постоји тренд ка бољем исходу преживљавања након реоксигенације уколико су астроцити гајени 48 часова у условима са 7 % O_2 пре наступања „симулиране исхемије“. Chadwick и сар. [126] испитали су утицај различитих нивоа кисеоника (када фактор индуцибилан хипоксијом, енгл. *hypoxia-inducible factor, HIF-1 α* , регулише општи ћелијски одговор на хипоксију) у трајању од 24 часа на транскрипциону активност астроцита у култури. Ниво од 4 % O_2 узет је као процењени нормални, физиолошки ниво, док је ниво од 9 % O_2 представљао хипероксију, 1 % хипоксију, а 20 % стандардне услове гајења ћелијских култура. У својим резултатима показали су значајне промене у обрасцима транскрипције, рибозомалној активности, регулаторним механизмима везаним за цитоскелет и енергетски метаболизам, као и сигналирању везаном за инфламаторне процесе астроцита. Преломна тачка био је управо ниво од 4 % O_2 .

Са друге стране, редукција редокс индикатора унутар ћелија, у присуству различитих супстрата и метаболичких инхибитора, указује на специфичности енергетског метаболизма у неуронима и астроцитима [127]. У односу на неуроне астроцити показују да су бољи у коришћењу глукозе, док су неурони бољи од астроцита у коришћењу пирогрођане и млечне киселине. У току три часа без ванћелијских нутријената астроцити су одржали ниво редукције редокс индикатора, што указује на коришћење унутарћелијских резерви. Међутим, дуготрајно (3 недеље) или краткотрајно (24 часа) излагање астроцита високој концентрацији глукозе (22 mM), у односу на ниску концентрацију глукозе (2 или 5 mM), доводи до значајног смањења у оксидацији радиоактивно обележених ($\text{U-}^{14}\text{C}$) ацетата, млечне и

пирогрођане киселине у астроцитима (праћено преко продукције $^{14}\text{CO}_2$), али не утиче на укупно искоришћење глукозе што се закључује према накупљању фосфорилисане радиоактивне 2-деокси-D-глукозе (2-DG). Астроцити изложени високој глукози имали су 250 % ниво гликогена у поређењу са излагањем ниској глукози [128]. Ови резултати указују на смањену активност циклуса трикарбоксилних киселина, смањен оксидативни метаболизам (висока концентрација АТФ инхибира пируват дехидрогеназни комплекс) и подржавају податке о појачаној гликолизи, продукцији лактата (49 % више) [128] и активацији пута фосфата пентозних шећера [129] код астроцита изложених високој концентрацији глукозе.

Сви ови аргументи указују на то да су астроцити у нормалним, контролним условима изложени хипероксичној и хипергликемичној средини која утиче на њихов оксидативни метаболизам и обрасце транскрипције. Нагло смањење нивоа кисеоника до нивоа аноксије уз потпуну депривацију нутријената не оставља много могућности за продукцију енергије. Након смањења нивоа цитосолног АТФ, астроцити се могу ослонити на продукцију АТФ преко продукције пирогрођане киселине гликолизом, а повећане потребе за NAD^+ се подмирују њеним превођењем у млечну киселину, јер митохондрије не могу да искористе накупљени NADH . Нагло закишељавање унутарћелијске средине доводи до каскаде која даље води отварању mPTP , колапсу ψ_m и општењу митохондрија који воде ћелијској смрти. Уколико до таквих општења и не дође у потпуности у току OGD, онда оксидативна модификација протеина и ДНК и токсичност ROS који се производе током реоксигенације такође доводе до ћелијске смрти. Студије са прекондиционирањем указују на то да краткотрајна излагања стресу покрећу одбрамбене системе у ћелији који вишеструко доприносе отпорности на накнадне продужене третмане [22,130], што говори у прилог „неспремности“ ћелија у ситуацији када су нагло изложене дуготрајном стресу, а та „неспремност“ не мора реално осликавати физиолошке (*in vivo*) услове.

Резултати ове студије показују да астроцити одржавају ψ_m током излагања хипоксији (1 % O_2) у медијуму без глукозе у присуству ограничене количине алтернативних нутријената без последица по вијабилност и промене мембранског потенцијала митохондрија. Фармаколошка инхибиција ланца транспорта електрона и АТФ-азе током симулирне реперфузије показала је да је равнотежа померена у смеру хиперполаризације мембране митохондрија након излагања астроцита OGD.

Депривација глукозе доводи до хиперполаризације ψ_m и, уколико претходи хипоксији, има са њом синергистичан утицај на повећање ψ_m . У Уводу је поменуто да би и у општењеним митохондријама флуоресцентне боје којима се испитују промене ψ_m могле показати повећање интензитета флуоресценције. С обзиром да је ЈС-1 рациометријска боја код које приликом агрегације долази до промене спектра емисије и да су астроцити бојени након третмана када се претпоставља да је до промена у ψ_m већ дошло, врло је вероватно да интензитет уласка боје у митохондрије осликава њихову тренутну поларизованост, а није производ неспецифичних интеракција молекула боје са мембраном митохондрија астроцита. Ови резултати могу допринети бољем разумевању утицаја исхемичне болести мозга на ћелије астроглије, као и утицаја поменутих нивоа кисеоника и глукозе (нутријената) који се користе у студијама исхемије *in vitro*. На крају, ови резултати указују на могући протективни капацитет хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрије против ћелијске смрти у условима комбиноване депривације кисеоника и глукозе, и стављају фокус на улогу унутарћелијских извора нутријената у отпорности астроцита на модел исхемичне болести *in vitro*.

5.2. УЛОГА АУТОФАГИЈЕ И ЛИПОЛИЗЕ У ПРЕЖИВЉАВАЊУ УСЛОВА ДЕПРИВАЦИЈЕ НУТРИЈЕНАТА И ХИПЕРПОЛАРИЗАЦИЈИ МЕМБРАНСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИТОХОНДРИЈА АСТРОЦИТА

Прелиминарни експерименти са депривацијом нутријената и 2-деокси-D-глукозом (2-DG) у трајању од шест часова показали су да она укида хиперполаризацију ψ_m астроцита до које депривација нутријената доводи. Сама депривација глукозе не доводи до заустављања гликолизе, јер се глукозо-6-фосфат може добити из гликогена и глуконеогенезом. Након уласка у ћелију, 2-DG се фосфорилише до 2-деокси-D-глукозо-6-фосфата, али се не метаболише даље, нагомилала се у ћелији и на тај начин прогресивно зауставља гликолизу и гликогенолизу [131,132]. Ћелијама у том случају остаје да се ослоне на β -оксидацију масних киселина, што астроцити успешно чине [18,81]. Међутим, уколико се транспортни ланац електрона инхибира NaN_3 долази до смрти ћелија.

Астроцити су изванредне ћелије када је у питању преживљавање депривације глукозе/ нутријената. У експерименталној поставци ове студије око 15 % астроцита било је мртво након четири дана без нутријената. Напоменуо бих да у даљим студијама треба прецизније одредити тај број помоћу АО и PI континуираним праћењем умирања и одлепљивања ћелија са дна Петри шоље, а такође треба пратити смртност и другим методама. Услови гладовања доводе до смањења реактивности астроцита, што изгледа зависи и од соја животиње из које су изоловани [87], а само преживљавање депривације нутријената изгледа да зависи и од зрелости астроцита [133].

Ипак, након инхибиције аутофагије исти број мртвих ћелија достигнут је већ након 9 часова, а прогресивно умирање наставило се у следећих два сата достигавши 60 %. Ово јасно показује да је аутофагија битна за преживљавање астроцита у условима депривације нутријената. Иако се механизам индуковања ћелијске смрти помоћу хлорокина може повезати са измењеном пермеабилношћу лизозома и свеобухватном дисфункцијом лизозома [96,134,135], важно је истаћи да је, излагањем астроцита хлорокину у присуству нутријената, из каснијих експеримената искључен директан цитотоксичан ефекат хлорокина на ћелије. Цитотоксични ефекат се јавио касније и био је слабији него ефекат инхибиције изазване хлорокином. Такође, астроцити

изложени депривацији нутријената и хлорокину у дужини од 8 часова могли су бити у потпуности спасени накнадним укидањем инхибиције и додатком нутријената.

Да би се добио унутарћелијски супстрат за производњу енергије, различита једињења као што су шећери, липиди (липидне капи, липопротеини, фосфолипиди из органела) и протеини варе се у процесу аутофагије [66]. Dong и Czaja [68] дају преглед литературе на тему везе липолизе и аутофагије као два пута катаболизма који се активирају под истом хормоналном контролом у условима депривације нутријената. Подаци о присуству киселих липаза у лизозомима, уочавање липидних капи унутар аутофагозомних везикула помоћу електронског микроскопа, као и колокализација простих (неутралних) липида и компоненти аутофаголизозомалног система на флуоресцентној микроскопији, говоре у прилог повезаности ова два процеса. Показано је рецимо, барем на хепатоцитима изолованим из пацова изложених гладовању, да третман хлорокином доводи до 33-41 % смањења оксидације ендогених масних киселина, али он није имао утицаја на оксидацију егзогено додатог радиоактивног олеата [136]. Механизам препознавања липидних капи од стране „аутофагне машинерије“ и даље је непознаница, а такође треба показати појаву макролипофагије и у другим типовима ћелија као што су астроцити, јер је важност липолизе за преживљавање у условима без нутријента код њих већ показана [18,81]. Да би се инхибирала аутофагија често се користи 3-метил аденин [23,81], инхибитор фосфатидилинозитол 3-киназа. Ипак, примена овог једињења у испитивању аутофагије није без недоумица, јер 3-метил аденин показује двоструки (анти- и про-аутофагни) механизам дејства [137].

У овој студији показали смо да и хлорокин, инхибитор аутофагије и орлистат, општи инхибитор липаза, остварују своје дејство у астроцитима, доводе до смањења вијабилности и мембранског потенцијала митохондрија у условима депривације нутријената. Додатак глукозе само делимично спасава ћелије од смрти, док додатак серума и глукозе остварује значајније побољшање преживљавања и спасава ψ_m астроцита. Аутофагија је процес који захтева одређену количину АТФ барем у два своја корака приликом: (1) секвестрације цитосолног материјала у аутофагозоми и (2) закишљавање мембране лизосома (вакуоларни тип АТФ-азе) [72,138]. Такође, у одређеним типовима ћелија сама депривација глукозе не доводи до повећања аутофагног флукса и додатак глукозе може да инхибира фармаколошки индуковану

аутофагију [99]. Још један куриозитет јесу индукција аутофагије додавањем глукозе током гладовања ћелија изазваног депривацијом серума [139], као и смрт ћелија неуробластома након реперфузије глукозе [15]. Уклањање серума који садржи факторе раста доводи до прогресивне атрофије ћелија која је праћена аутофагијом [140]. Фактори раста из серума такође регулишу преузимање ванћелијског супстрата од стране циљне ћелије [62]. Ћелије којима недостају фактори раста можда не захтевају много енергије, јер се и захтеви тада смањују, а преузимање нутријената из ванћелијске средине се не зауставља одмах, па је и прелаз ка аутофагији постепен [141,142]. Аутофагија може да одржава ћелије вијабилним и неколико недеља под условом да је ћелијама уклоњена природна могућност да уђу у апоптозу [63,143]. Шта више, све док ћелије не уђу у апоптозу [134] могу бити спасене и потпуно опорављене поновним додавањем фактора раста или специфичних нутријената [62].

У нашој студији, када је липолиза била инхибирана, астроцити су морали да се окрену другим унутарћелијским изворима енергије и показали смо да астроцити могу да преживе доста дуго без деградације липида (орлигат, ванадат, милдронат). Гликоген такође може бити супстрат за аутофагију [144], мада је показано да његове резерве знатно краће трају [71] у односу на дужину преживљавања астроцита. Под оваквим условима, деградација протеина путем аутофагије може играти значајну улогу [145]. Депривација аминокиселина такође доводи до активације аутофагије [146], метаболизам глутамината може имати регулаторну улогу [147], док саме аминокиселине могу да уђу у циклус трикарбоксилних киселина и да допринесу продукцији АТФ [66] и на тај начин буду укључене у одржавање хомеостазе током гладовања у развићу неонатуса [148]. У нашој студији, ове резерве су вероватно биле истрошене у тренутку када је орлигат показао свој утицај на вијабилност астроцита (више од 20 часова депривације нутријената) што може да објасни разлике у ψ_m и облику митохондрија код астроцита изложених депривацији нутријената са и без инхибиције липолизе. Као што је приказано у претходном делу истраживања, митохондрије астроцита су остале не само поларизоване, већ хиперполаризоване након излагања астроцита депривацији глукозе и њихов облик је био штапићаст. Међутим, у присуству орлигата, након искоришћења других извора енергије осим липида, митохондрије су биле лоптастог облика и нису имале хиперполарисану мембрану.

Поред одговора на питање „како“, битно је одговорити и на питање „зашто“ астроцити имају толику отпорност на депривацију нутријената? Као што је речено у Уводу, депривација глукозе/нутријената може да се догоди током исхемичне болести мозга након можданог удара, трауматске повреде мозга или застоја у раду срца [149,150], као и током тешке хипогликемије индуковане инсулином код пацијената са дијабетесом [151,152]. Такође је предложено да у таквим условима астроцити достављају енергију неуронима производњом и ослобађањем у ванћелијску средину: лактата [152,153], кетонских тела [154] или чак везикула које садрже липидне капи, митохондрије и АТФ [155]. Изгледа да астроцити складиште и црпе енергију путем аутофагије у циљу подршке неуронима [66,156].

Стога, способност астроцита да преживе дуже време без нутријената у присуству јако мале концентрације кисеоника [60,66], може представљати адаптацију која је блиско повезана са улогом астроцита у подршци неуронима у обављању њихове функције – све функције које су неурони изгубили због своје специјализованости, астроцити су као њихов негатив, друга половина, довели до савршенства.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата приказаних у овој студији могу се извести следећи закључци:

1. Астроцити преживљавају излагање хипоксији (1 % O₂) у медијуму без глукозе у присуству ограничене количине алтернативних нутријената у трајању од 6 и 8 часова без последица по одржавање мембранског потенцијала митохондрија.
2. Митохондрије астроцита изложених депривацији кисеоника и глукозе спорије реагују на накнадну фармаколошку инхибицију респирације изазвану натријум азидом. Такво „одлагања пада мембранског потенцијала митохондрија“ тумачи се као хиперполаризација мембране митохондрија астроцита.
3. Депривација глукозе доводи до хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрија астроцита и уколико претходи хипоксији (прекондиционирање) има са њом синергистичан ефекат потврђујући да недостатак кисеоника испољава додатни хиперполаришући ефекат на астроците са повећаним у односу на астроците са смањеним оксидативним метаболизмом.
4. Фармаколошка инхибиција аутофагије хлорокином у условима депривације нутријената доводи до значајног повећања смртности астроцита у поређењу како са контролом тако и са цитотоксичним ефектом хлорокина у присуству нутријената (који се јавља касније). Акутна инхибиција аутофагије у условима депривације нутријената убрзава умирање астроцита уз деполаризацију мембранског потенцијала митохондрија, док накнадно враћање нутријената спасава астроците од смрти и доводи до њиховог опоравка.
5. Фармаколошка инхибиција деградације липолизе орлистатом у условима депривације нутријената доводи до значајног смањења вијабилности астроцита и губитка хиперполаризације мембранског потенцијала митохондрија. Пад вијабилности јавља се касније у односу на ефекат фармаколошке инхибиције аутофагије, док присуство нутријената током инхибиције побољшава вијабилност астроцита.

Ниво кисеоника и нутријената, посебно глукозе, у медијуму има пресудни значај за преживљавање астроцита, опорчињање аутофагије, одржавање и хиперполаризацију мембранског потенцијала митохондрија и усмеравање астроцита ка ћелијској смрти. Способност астроцита да преживе дуже време без нутријената у присуству јако мале концентрације кисеоника може представљати адаптацију која је блиско повезана са улогом астроцита у подршци неуронима у обављању њихове функције.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Živković M, Šternić N, Kostić VS (2000): Ishemička bolest mozga. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
2. Attwell D, Laughlin SB (2001): An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(10): 1133-1145.
3. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011): Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*, 14(6): 724-738.
4. Hertz L, Peng L, Dienel GA (2006): Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(2): 219-249.
5. Chen Y, Swanson RA (2003): Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(2): 137-149.
6. Jiang P, Chen C, Wang R, Chechneva OV, Chung SH, et al. (2013): hESC-derived Olig2+ progenitors generate a subtype of astroglia with protective effects against ischaemic brain injury. *Nat Commun*, 4: 2196.
7. Lee HS, Ghetti A, Pinto-Duarte A, Wang X, Dziewczapolski G, et al. (2014): Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *PNAS*: E3343-E3352.
8. Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004): Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, 47(3): 209-216.
9. Chung W-S, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, et al. (2013): Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480): 394-400.
10. Fern R (2001): Ischemia: astrocytes show their sensitive side. *Prog Brain Res*, 132: 405-411.
11. Goldberg MP, Choi DW (1993): Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*, 13(8): 3510-3524.
12. Yu ACH, Gregory GA, Chan PH (1989): Hypoxia-induced dysfunctions and injury of astrocytes in primary cell cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(1): 20-28.

13. Swanson RA, Farrell K, Stein BA (1997): Astrocyte energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: a mechanism of glial death in the penumbra. *Glia*, 21(1): 142-153.
14. Steiner J, Bernstein HG, Bogerts B, Gos T, Richter-Landsberg C, et al. (2008): S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation. *Neuroscience*, 154(2): 496-503.
15. Jang BG, Choi BY, Kim JH, Kim MJ, Sohn M, et al. (2013): Impairment of autophagic flux promotes glucose reperfusion-induced neuro2A cell death after glucose deprivation. *PLoS ONE*, 8(10): e76466.
16. Taoufik E, Valable S, Muller GJ, Roberts ML, Divoux D, et al. (2007): FLIP(L) protects neurons against *in vivo* ischemia and *in vitro* glucose deprivation-induced cell death. *J Neurosci*, 27(25): 6633-6646.
17. Danilov CA, Fiskum G (2008): Hyperoxia promotes astrocyte cell death after oxygen and glucose deprivation. *Glia*, 56(7): 801-808.
18. Jelluma N, Yang X, Stokoe D, Evan GI, Dansen TB, et al. (2006): Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. *Mol Cancer Res*, 4(5): 319-330.
19. Sochocka E, Juurlink BHJ, Code WE, Hertz V, Peng L, et al. (1994): Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and 'recovery' from hypoxia, substrate deprivation and simulated ischemia. *Brain Res*, 638(1-2): 21-28.
20. Reichert SA, Kim-Han JS, Dugan LL (2001): The mitochondrial permeability transition pore and nitric oxide synthase mediate early mitochondrial depolarization in astrocytes during oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci*, 21(17): 6608-6616.
21. Yu AC, Wong HK, Yung HW, Lau LT (2001): Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia*, 35(2): 121-130.
22. Rajapakse N, Kis B, Horiguchi T, Snipes J, Busija D (2003): Diazoxide pretreatment induces delayed preconditioning in astrocytes against oxygen glucose deprivation and hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci Res*, 73(2): 206-214.
23. Qin AP, Liu CF, Qin YY, Hong LZ, Xu M, et al. (2010): Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy*, 6(6): 738-753.

24. Xu M, Yang L, Hong LZ, Zhao XY, Zhang HL (2012): Direct protection of neurons and astrocytes by matrine via inhibition of the NF- κ B signaling pathway contributes to neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1454: 48-64.
25. Magistretti PJ, Allaman I (2007): Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat Neurosci*, 10(11): 1341-1342.
26. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S (2010): Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci*, 35(3): 145-149.
27. Lane N (2010): Why are cells powered by proton gradients? *Nature Education*, 3(9): 18-20.
28. Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T (2001): ATP synthase - a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(9): 669-677.
29. Petty MA, Wettstein JG (1999): White matter ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev*, 31(1): 58-64.
30. Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S (2001): Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26): 15294-15299.
31. Iijima T, Mishima T, Tohyama M, Akagawa K, Iwao Y (2003): Mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content after transient experimental ischemia in the cultured hippocampal neuron. *Neurochem Int*, 43(3): 263-269.
32. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB (1999): Bcl-x_L prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell*, 3(2): 159-167.
33. Poppe M, Reimertz C, Dussmann H, Krohn AJ, Luetjens CM, et al. (2001): Dissipation of potassium and proton gradients inhibits mitochondrial hyperpolarization and cytochrome c release during neural apoptosis. *J Neurosci*, 21(13): 4551-4563.
34. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, et al. (2007): A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 11(1): 37-51.
35. Vander Heiden MG, Thompson CB (1999): Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, 1(8): E209-216.
36. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997): Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91(5): 627-637.

37. Gottlieb E, Armour SM, Thompson CB (2002): Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation. *PNAS*, 99(20): 12801-12806.
38. Almeida A, Moncada S, Bolanos JP (2004): Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol*, 6(1): 45-51.
39. Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, et al. (2008): Regulation of mitochondrial structure and function by the F₁F₀-ATPase inhibitor protein, IF₁. *Cell Metab*, 8(1): 13-25.
40. Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, et al. (1995): Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol*, 486(Pt 1): 1-13.
41. Ludovico P, Sansonetty F, Côte-Real M (2001): Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*, 147(12): 3335-3343.
42. Macouillard-Poullietier de G, Belaud-Rotureau MA, Voisin P, Leducq N, Belloc F, et al. (1998): Flow cytometric analysis of mitochondrial activity in situ: application to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis. *Cytometry*, 33(3): 333-339.
43. Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A (2008): Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7-8): 789-793.
44. Smith IF, Boyle JP, Plant LD, Pearson HA, Peers C (2003): Hypoxic remodeling of Ca²⁺ stores in type I cortical astrocytes. *J Biol Chem*, 278(7): 4875-4881.
45. Diaz G, Setzu MD, Zucca A, Isola R, Diana A, et al. (1999): Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. *J Cell Sci*, 112(7): 1077-1084.
46. Keil VC, Funke F, Zeug A, Schild D, Müller M (2011): Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria. *Pflugers Arch*, 462(5): 693-708.
47. Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolaños JP, Medina JM (2002): Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, 81(2): 207-217.

48. Ouyang YB, Carriedo SG, Giffard RG (2002): Effect of Bcl-x_L overexpression on reactive oxygen species, intracellular calcium, and mitochondrial membrane potential following injury in astrocytes. *Free Radic Biol Med*, 33(4): 544-551.
49. Ouyang YB, Giffard RG (2003): Bcl-x_L maintains mitochondrial function in murine astrocytes deprived of glucose. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(3): 275-279.
50. Michelakis ED (2008): Mitochondrial medicine: a new era in medicine opens new windows and brings new challenges. *Circulation*, 117(19): 2431-2434.
51. Chance B, Williams GR (1955): Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*, 217(1): 409-428.
52. Bernardi P (1999): Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79(4): 1127-1155.
53. Zamzami N, Kroemer G (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(1): 67-71.
54. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, et al. (2013): Role of the c subunit of the F₀ ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*, 12(4): 674-683.
55. Chinopoulos C, Szabadkai G (2013): What makes you can also break you: mitochondrial permeability transition pore formation by the c subunit of the F₁F₀ ATP-synthase? *Front Oncol*, 3: 25.
56. Szabadkai G, Chinopoulos C (2013): What makes you can also break you, Part II: mitochondrial permeability transition pore formation by dimers of the F₁F₀ ATP-synthase? *Frontiers in Oncology*, 3: 140.
57. Ouyang YB, Giffard RG (2004): Changes in astrocyte mitochondrial function with stress: effects of Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int*, 45(2): 371-379.
58. Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011): Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(2): 85-95.
59. Frezza C, Gottlieb E (2009): Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol*, 19(1): 4-11.
60. Frezza C, Zheng L, Tennant DA, Papkovsky DB, Hedley BA, et al. (2011): Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival. *PLoS ONE*, 6(9): e24411.
61. Chen Y, Klionsky DJ (2011): The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124(Pt 2): 161-170.

62. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, et al. (2005): Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2): 237-248.
63. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005): Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(6): 439-448.
64. Russell RC, Yuan HX, Guan KL (2014): Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res*, 24(1): 42-57.
65. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007): Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9): 741-752.
66. Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013): Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 15(7): 713-720.
67. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, et al. (2009): Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242): 1131-1135.
68. Dong H, Czaja MJ (2011): Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends Endocrinol Metab*, 22(6): 234-240.
69. Xu M, Zhang HL (2011): Death and survival of neuronal and astrocytic cells in ischemic brain injury: a role of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*, 32(9): 1089-1099.
70. Pamerter ME, Perkins GA, McGinness AK, Gu XQ, Ellisman MH, et al. (2012): Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an *in vitro* mimic of the ischemic penumbra. *PLoS ONE*, 7(12): e51469.
71. Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1997): Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, 21(1): 22-34.
72. Moruno-Manchon JF, Pérez-Jiménez E, Knecht E (2012): Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells*, 1(3): 372-395.
73. Dringen R, Hamprecht B (1992): Glucose, Insulin, and Insulin-Like Growth Factor I Regulate the Glycogen Content of Astroglia-Rich Primary Cultures. *J Neurochem*, 58(2): 511-517.
74. Brown AM, Ransom BR (2007): Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12): 1263-1271.
75. Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R (2003): Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism *in vivo*. *J Neurosci Res*, 72(1): 25-32.
76. Gruetter R (2003): Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res*, 74(2): 179-183.

77. Gubern A, Casas J, Barceló-Torns M, Barneda D, de la Rosa X, et al. (2008): Group IVA Phospholipase A2 Is Necessary for the Biogenesis of Lipid Droplets. *J Biol Chem*, 283(41): 27369-27382.
78. Boren J, Brindle KM (2012): Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ*, 19(9): 1561-1570.
79. Chou RC, Langan TJ (2003): *In vitro* synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Res Brain Res Protoc*, 11(3): 162-167.
80. Langan TJ, Chou RC (2011): Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol Biol*, 761: 75-83.
81. Cabodevilla AG, Sanchez-Caballero L, Nintou E, Boiadjieva VG, Picatoste F, et al. (2013): Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled beta-oxidation of fatty acids. *J Biol Chem*, 288(39): 27777-27788.
82. McCarthy KD, de Vellis J (1980): Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85(3): 890-902.
83. Cole R, de Vellis J (2001) Preparation of astrocyte, oligodendrocyte, and microglia cultures from primary rat cerebral cultures. In: Fedoroff S, Richardson A, editors. *Protocols for Neural Cell Culture*: Humana Press. pp. 117-127.
84. Mecha M, Iñigo PM, Mestre L, Hernangómez M, Borrell J, et al. (2011): An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protocol Exchange*.
85. Ni M, Aschner M (2010): Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 12: Unit 12.17.
86. Saura J, Tusell JM, Serratosa J (2003): High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, 44(3): 183-189.
87. Codeluppi S, Gregory EN, Kjell J, Wigerblad G, Olson L, et al. (2011): Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes. *J Neurosci Methods*, 197(1): 118-127.
88. Kaech S, Banker G (2007): Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5): 2406-2415.
89. Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, et al. (2007): Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc*, 2(5): 1044-1051.

90. Muneyuki E, Makino M, Kamata H, Kagawa Y, Yoshida M, et al. (1993): Inhibitory effect of NaN_3 on the F_0F_1 ATPase of submitochondrial particles as related to nucleotide binding. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1144(1): 62-68.
91. Rahn CA, Bombick DW, Doolittle DJ (1991): Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. *Fundam Appl Toxicol*, 16(3): 435-448.
92. Safiulina D, Veksler V, Zharkovsky A, Kaasik A (2005): Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J Cell Physiol*, 206(2): 347-353.
93. Vasilyeva EA, Minkov IB, Fitin AF, Vinogradov AD (1982): Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. *Biochem J*, 202(1): 15-23.
94. Davies KJ (1999): The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 48(1): 41-47.
95. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R (2003): Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis*, 3(11): 722-727.
96. Thomé R, Lopes SCP, Costa FTM, Verinaud L (2013): Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett*, 153(1-2): 50-57.
97. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, et al. (2005): Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25(3): 1025-1040.
98. Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA (2010): Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncol*, 12(5): 473-481.
99. Ramirez-Peinado S, Leon-Annicchiarico CL, Galindo-Moreno J, Iurlaro R, Carro-Maldonado A, et al. (2013): Glucose starved cells do not engage in pro-survival autophagy. *J Biol Chem*, 288(42): 30387-30398.
100. Carriere F, Renou C, Ransac S, Lopez V, De Caro J, et al. (2001): Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(1): G16-28.
101. Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, Cacicedo JM, Saha AK, et al. (2008): AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem*, 283(24): 16514-16524.

102. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW (2004): Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*, 64(6): 2070-2075.
103. Roger R, Issaad C, Pallardy M, Leglise M, Turhan A, et al. (1996): BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. *Blood*, 87(3): 1113-1122.
104. Renvoizé C, Biola A, Pallardy M, Bréard J (1998): Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol*, 14(2): 111-120.
105. Han J, Burgess K (2010): Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev*, 110(5): 2709-2728.
106. Robbins E, Marcus PI (1963): Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *J Cell Biol*, 18(2): 237-250.
107. Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, et al. (2006): Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *CSH Protoc*, 2006(3).
108. Nicholls DG, Ward MW (2000): Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci*, 23(4): 166-174.
109. Farkas DL, Wei MD, Febbroriello P, Carson JH, Loew LM (1989): Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials. *Biophys J*, 56(6): 1053.
110. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, Barrientos AA, Erusalimsky JD (2000): Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 46(1): 126-138.
111. Reers M, Smith TW, Chen LB (1991): J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry (Mosc)*, 30(18): 4480-4486.
112. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, et al. (1991): Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *PNAS*, 88(9): 3671-3675.
113. Feeney CJ, Pennefather PS, Gyulkhandanyan AV (2003): A cuvette-based fluorometric analysis of mitochondrial membrane potential measured in cultured astrocyte monolayers. *J Neurosci Methods*, 125(1-2): 13-25.

114. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011): Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 50(2): 98-115.
115. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A (1997): JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, 411(1): 77-82.
116. Castan I, Wijkander J, Manganiello V, Degerman E (1999): Mechanisms of inhibition of lipolysis by insulin, vanadate and peroxovanadate in rat adipocytes. *Biochem J*, 339(Pt 2): 281.
117. Dugan LL, Kim-Han JS (2004): Astrocyte mitochondria in *in vitro* models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr*, 36(4): 317-321.
118. Chinopoulos C, Tretter L, Adam-Vizi V (2002): Depolarization of *in situ* mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals. *J Neurochem*, 73(1): 220-228.
119. Selvatici R, Previati M, Marino S, Marani L, Falzarano S, et al. (2009): Sodium azide induced neuronal damage *in vitro*: evidence for non-apoptotic cell death. *Neurochem Res*, 34(5): 909-916.
120. Yoshikawa S, Caughey WS (1992): Infrared evidence of azide binding to iron, copper, and non-metal sites in heart cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem*, 267(14): 9757-9766.
121. Li W, Palmer G (1993): Spectroscopic characterization of the interaction of azide and thiocyanate with the binuclear center of cytochrome oxidase: evidence for multiple ligand sites. *Biochemistry (Mosc)*, 32(7): 1833-1843.
122. Leary SC, Hill BC, Lyons CN, Carlson CG, Michaud D, et al. (2002): Chronic treatment with azide *in situ* leads to an irreversible loss of cytochrome *c* oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J Biol Chem*, 277(13): 11321-11328.
123. Kintner DB, Luo J, Gerds J, Ballard AJ, Shull GE, et al. (2007): Role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport and Na⁺/Ca²⁺ exchange in mitochondrial dysfunction in astrocytes following *in vitro* ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(3): C1113-C1122.
124. Takahashi S, Abe T, Izawa Y, Suzuki N (2012): Effects of fluctuating glucose concentrations on oxidative metabolism of glucose in cultured neurons and astroglia. *JDM*, 2(1): 19-26.

125. Gregory GA, Yu AC, Chan PH (1989): Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(1): 29-34.
126. Chadwick W, Boyle JP, Zhou Y, Wang L, Park SS, et al. (2011): Multiple oxygen tension environments reveal diverse patterns of transcriptional regulation in primary astrocytes. *PLoS ONE*, 6(6): e21638.
127. Abe T, Takahashi S, Fukuuchi Y (2002): Reduction of Alamar Blue, a novel redox indicator, is dependent on both the glycolytic and oxidative metabolism of glucose in rat cultured neurons. *Neurosci Lett*, 326(3): 179-182.
128. Abe T, Takahashi S, Suzuki N (2006): Oxidative metabolism in cultured rat astroglia: effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(2): 153-160.
129. Takahashi S, Izawa Y, Suzuki N (2012): Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments. *ASN Neuro*, 4(2).
130. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, et al. (2010): Mitochondria: the missing link between preconditioning and neuroprotection. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S475-485.
131. Rose CR, Waxman SG, Ransom BR (1998): Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na⁺ homeostasis in rat spinal cord astrocytes. *J Neurosci*, 18(10): 3554-3562.
132. Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, et al. (2006): Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines *in vitro*. *Anticancer Res*, 26(5A): 3561-3566.
133. Hertz L, Yager JY, Juurlink BH (1995): Astrocyte survival in the absence of exogenous substrate: comparison of immature and mature cells. *Int J Dev Neurosci*, 13(6): 523-527.
134. Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini J-L, et al. (2003): Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med*, 197(10): 1323-1334.
135. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ (2007): Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6(4): 304-312.
136. Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ, Mannaerts GP (1979): Lysosomal triacylglycerol lipase and lipolysis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 254(18): 8841-8846.

137. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, et al. (2010): Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 285(14): 10850-10861.
138. Plomp PJ, Wolvetang EJ, Groen AK, Meijer AJ, Gordon PB, et al. (1987): Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 164(1): 197-203.
139. Moruno-Manchon JF, Perez-Jimenez E, Knecht E (2013): Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway. *Biochem J*, 449(2): 497-506.
140. Li TY, Lin SY, Lin SC (2013): Mechanism and physiological significance of growth factor-related autophagy. *Physiology (Bethesda)*, 28(6): 423-431.
141. Altman BJ, Rathmell JC (2009): Autophagy: not good OR bad, but good AND bad. *Autophagy*, 5(4): 569-570.
142. Xu H-D, Wu D, Gu J-H, Ge J-B, Wu J-C, et al. (2013): The pro-survival role of autophagy depends on Bcl-2 under nutrition stress conditions. *PLoS ONE*, 8(5): e63232.
143. Wei MC, Zong W-X, Cheng EHY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, et al. (2001): Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517): 727-730.
144. Zirin J, Nieuwenhuis J, Perrimon N (2013): Role of autophagy in glycogen breakdown and its relevance to chloroquine myopathy. *PLoS Biol*, 11(11): e1001708.
145. Schneider JL, Cuervo AM (2014): Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(3): 187-200.
146. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, et al. (2007): Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 100(6): 914-922.
147. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT (2010): Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci Signal*, 3(119): ra31.
148. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, et al. (2004): The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432(7020): 1032-1036.
149. Hertz L (2008): Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*, 55(3): 289-309.

150. Stys PK (1998): Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(1): 2-25.
151. Maheandiran M, Mylvaganam S, Wu C, El-Hayek Y, Sugumar S, et al. (2013): Severe hypoglycemia in a juvenile diabetic rat model: presence and severity of seizures are associated with mortality. *PLoS ONE*, 8(12): e83168.
152. Won SJ, Jang BG, Yoo BH, Sohn M, Lee MW, et al. (2012): Prevention of acute/severe hypoglycemia-induced neuron death by lactate administration. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(6): 1086-1096.
153. Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JFR, Gourine AV, et al. (2014): Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat Commun*, 5.
154. Guzmán M, Blázquez C (2004): Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(3): 287-292.
155. Falchi AM, Sogos V, Saba F, Piras M, Congiu T, et al. (2013): Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochem Cell Biol*, 139(2): 221-231.
156. Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A (2012): Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *PNAS*, 109(35): E2334-2342.

8. БИОГРАФИЈА

Андреј Коренић је рођен 2. марта 1984. године у Београду, где је 1999. године завршио основну школу „Дринка Павловић“. Од 1999-2003. године похађао је Трећу београдску гимназију, природно-математички смер. Учествовао је у истраживачким активностима школе за таленте у Петници. Године 2003. уписао се на Основне академске студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, смер Биологија, усмерење Физиологија животиња. Током основних студија био је стипендиста Министарства науке (2004-2007), као и стипендиста града Београда за талентоване студенте (2005-2007). Године 2008. је дипломирао са просечном оценом 9,4. Године 2009. уписује Докторске академске студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, модул Неурофизиологија са биофизиком. Експериментални део докторске дисертације ради у Центру за ласерску микроскопију, Института за физиологију и биохемију, Биолошког факултета, Универзитета у Београду. Као студент докторских студија постаје стипендиста Министарства науке и просвете на пројекту „Биофизичко неуропрофилирање на експерименталним моделима оштећења и опоравка централног нервног система“, а касније и на пројекту „Биомаркери у неуродегенеративним и малигним процесима“ (2008-2012). Од школске 2010/11 године ангажован је као сарадник у настави на предмету Биофизичке основе опште физиологије, на смеру Молекуларна биологија и физиологија Биолошког факултета, Универзитета у Београду. Од фебруара 2012. године је запослен на истом пројекту чији је носилац Центар за ласерску микроскопију Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Резултати представљени у докторској дисертацији публиковани су у радовима:

Korenić A, Boltze J, Deten A, Peters M, Andjus P, Radenović L (2014): Astrocytic mitochondrial membrane hyperpolarization following extended oxygen and glucose deprivation. *PlosOne*, 9(2):e90697.

Korenic A, Andjus P, Radenovic L, Spasojevic I (2015): The role of autophagy and lipolysis in survival of astrocytes under nutrient deprivation. *Neurosci Lett*, 595:128-133.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Андреј Коренић _____

број индекса _____ Б1201/2008 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Механизми преживљавања астроцита пацова у медијуму без глукозе

и у условима хипоксије *in vitro*

- 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, _____ 10.05.2015. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

**Механизми преживљавања астроцита пацова у медијуму без
глукозе и у условима хипоксије *in vitro***

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, 10.05.2015.

